

基于阻断 IL-6/STAT 信号通路的全新小檗碱衍生物的设计、合成及其抗炎作用评价

曾庆轩, 张 娜, 邓洪斌, 宋丹青, 蒋建东, 汪燕翔*

(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)

摘要: 白介素-6 (IL-6)/转录激活因子 (STAT) 信号通路的活化与动脉粥样硬化 (AS) 的发生发展密切相关。本研究以我国天然产物单体盐酸小檗碱 (BBR) 为先导物, 通过在其 3-位或/和 9-位引入不同类型的侧链基团, 设计合成了一系列全新结构 BBR 衍生物, 并对其抑制 IL-6 诱导的 STAT1/3 的磷酸化进行了评价。构效关系表明, 3-位或 9-位引入刚性结构有利于活性提高, 其中, 化合物 **2b** 和 **9** 显示出最优的抑制活性。进一步研究提示, 化合物 **2b** 和 **9** 通过激活 HUVEC 细胞中 AMPK 活性, 抑制 IL-6 诱导的 STAT1 和 STAT3 磷酸化。研究结果显示, BBR 衍生物通过 AMPK 途径抑制 IL-6/STAT 信号通路介导的炎症反应, 为此类化合物发展成为抗 AS 候选物提供了有益的科学数据。

关键词: 小檗碱; 动脉粥样硬化; 构效关系; IL-6; STAT-1/3

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1895-08

Design, synthesis and evaluation of anti-inflammatory effect of novel berberine derivatives on IL-6/STAT signaling pathway

ZENG Qing-xuan, ZHANG Na, DENG Hong-bin, SONG Dan-qing,
JIANG Jian-dong, WANG Yan-xiang*

(Institute of Medicinal Biotechnology, China Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Beijing 100050, China)

Abstract: Interleukin-6 (IL-6)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway is closely related to the development and progression of atherosclerosis (AS). Taking Chinese natural product berberine (BBR) as the leading compound, a series of novel BBR analogues defined on different types of substituents on position 3 or/and 9 were designed, synthesized and evaluated for their inhibitory activities on phosphorylation of STAT-1 and STAT-3 induced by IL-6. The structure-activity relationship indicated that introduction of rigid fragment on position 3 or 9 was beneficial for enhancing their activities. Among them, compounds **2b** and **9** exhibited the most satisfactory potency. The study revealed that the compounds **2b** and **9** exhibit anti-inflammatory potencies *via* activating AMPK, and down-regulation of phosphorylation of STAT1 and STAT3 induced by IL-6 in HUVEC cells. These results suggest that BBR derivatives may inhibit the inflammatory response mediated by the IL-6/STAT signaling pathway through regulation of AMPK, which provides useful insight into the development of BBR derivatives for treatment of atherosclerosis.

Key words: berberine; atherosclerosis; structure-activity relationship; IL-6; STAT-1/3

收稿日期: 2017-08-28; 修回日期: 2017-09-27.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助 (2016-12M-1-011).

*通讯作者 Tel: 86-10-63033012, E-mail: wangyanxiang@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0835

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 作为一种慢性炎症性疾病, 是多种心脑血管疾病的共同病理基础, 严重威胁人类的生命健康^[1-3]。白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 作为一种前炎症因子, 在斑块形成和发展中起着重要的作用, 被认为是 AS 发生和发展的主要致病因子之一^[1, 4, 5]。IL-6 与受体结合后活化细胞膜表面的糖蛋白 130 (gp130), 可以诱导下游信号转导和转录激活因子 (STAT) 活化, 进而引发炎症反应^[6]。研究表明 STAT 在 AS 病变中可被激活, 活化的 STAT 在人类 AS 的炎症区域增多, 提示 IL-6/STAT 信号转导通路在 AS 的发生、发展中的重要作用^[7, 8], 通过抑制 IL-6/STAT 信号通路介导的炎症反应, 可能为寻找新型抗 AS 候选物提供一种新的思路 and 策略。

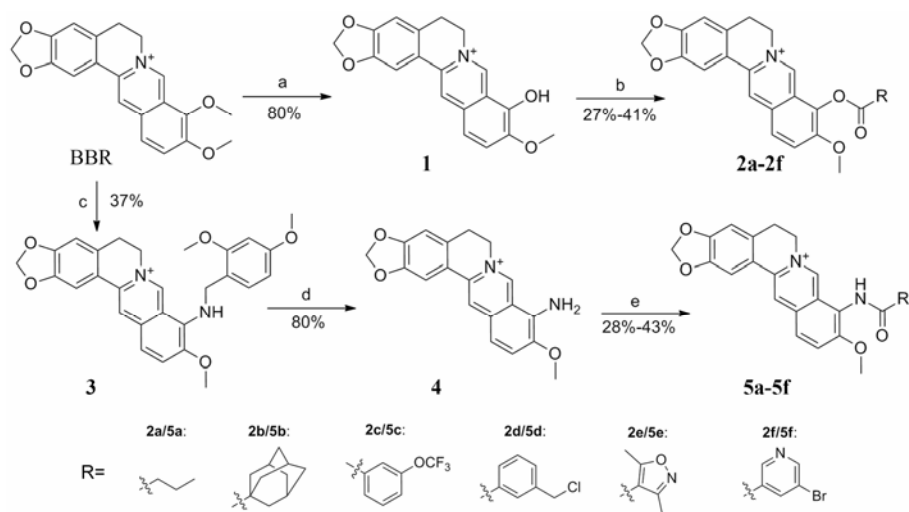
盐酸小檗碱 (berberine, BBR, 图 1) 作为我国传统中药单体, 安全性良好, 具有抗菌、抗炎、降血脂等广泛的药理活性^[9-13]。研究表明, 在 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, BBR 可以减少 *ApoE* 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块, 显示出中度的抗 AS 活性^[14]。鉴于本课题组长期致力于从我国生物碱天然产物中寻找创

新药物^[15-18], 本研究以 BBR 为先导物, 主要在其 3-位或/和 9-位 (图 1) 引入不同类型的侧链基团, 包括短链烷基、刚性大基团、杂环和芳香性基团等, 由此设计合成了 17 个全新的 BBR 酯类、酰胺以及胺类衍生物。通过并测定其对 IL-6 诱导的 STAT1 和 STAT3 磷酸化的抑制活性, 总结结构效关系。并进一步证实此类化合物是通过抑制 AMPK 磷酸化水平抑制炎症反应。

首先, 以市售 BBR 为原料, 在高温真空条件下, 选择性脱除 9-位甲基, 而后在碱性条件下与相应的酰氯反应得到 9-位酯类化合物 **2a~2f** (合成路线 1)。以 BBR 为原料, 在高温条件下加入 2,4-二甲氧基苄胺, 获得重要中间体 **3**。强酸条件下裸露出 9-氨基后, 以吡啶为缚酸剂, 制得 9-位酰胺类衍生物 **5a~5f**。另外, 以市售药根碱 (**6**) 为起始原料, 在高温条件下获得 9-位取代氨基衍生物 **7**, 酸性条件下裸露出氨基制备出化合物 **8**。在化合物 **7** 的 3-位进行酯化反应, 得金刚烷甲酯衍生物 **9**, 盐酸脱苄后得氨基化合物 **10**。最后, 以乙腈为溶剂, 在三乙胺催化下转化为对应的 3-位酯类目标物 **11** (合成路线 2)。

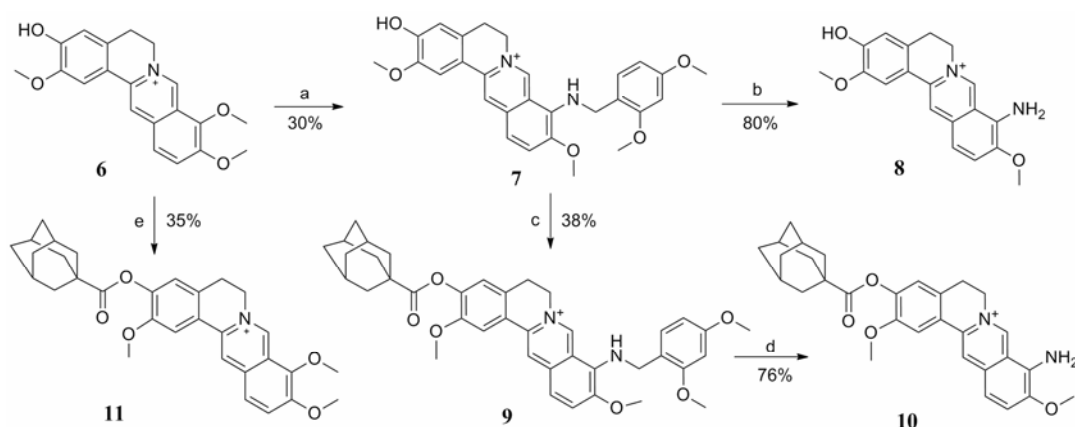


Figure 1 Chemical structure of berberine (BBR), and its structure modification strategy



Reagents and conditions: (a) $195 \text{ }^\circ\text{C}$, 30–40 mmHg, 60 min; (b) RCOCl , triethylamine, CH_3CN , reflux; (c) 2,4-Dimethoxybenzylamine, $120 \text{ }^\circ\text{C}$; (d) HCl , CH_3OH ; (e) R_1COCl , pyridine, CH_2Cl_2 , reflux.

Scheme 1 Synthesis of 9-substituted BBR derivatives



Reagents and conditions: (a) 2,4-Dimethoxybenzylamine, 120 °C; (b) HCl, CH₃OH; (c) RCOCl, triethylamine, CH₃CN, reflux; (d) HCl, CH₃OH; (e) RCOCl, triethylamine, CH₃CN, reflux.

Scheme 2 Synthesis of 3- and 9-substituted jatrorrhizine derivatives (7–11)

结果与讨论

1 化合物的合成

所有目标化合物结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 以及 HR-MS 分析确证。化合物的理化性质及图谱数据见表 1。

2 体外活性筛选

磷酸化的 STAT (p-STAT) 是 STAT 的活化形式, 其中 STAT1 酪氨酸 701 (Tyr701) 位点和 STAT3 酪氨酸 705 (Tyr705) 位点的磷酸化分别是两者活化的

标志。使用 Western blotting 的方法, 在人血管内皮细胞 (HUVEC) 中对新合成的化合物 (2a~2f、5a~5f 以及 7~11) 抑制 IL-6 诱导的 p-STAT1 (Tyr701) 和 p-STAT3 (Tyr705) 的磷酸化进行了筛选, 结果如图 2 所示。首先, 在 6 个 9-位取代 BBR 酯型衍生物 2a~2f 中, 金刚烷甲酯衍生物 2b 可以明显抑制 IL-6/STAT1 和 IL-6/STAT3 磷酸化; 而脂肪链 (化合物 2a)、芳香环 (化合物 2c 和 2d) 以及杂环取代 (化合物 2e 和 2f) 衍生物的活性则明显下降或完全丧失。随后,

Table 1 Physical properties and spectra data of all newly synthesized compounds

No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS (<i>m/z</i>)
2a	35	190–192	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.02 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.21 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.18 (s, 2H), 4.98 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.23 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 2.88 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.77 (h, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.06 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.2, 151.0, 150.6, 148.3, 145.1, 138.7, 134.2, 133.5, 131.5, 127.3, 126.5, 121.8, 121.2, 121.0, 109.1, 106.2, 102.8, 57.8, 55.8, 35.7, 26.8, 18.5, 14.0.	C ₂₃ H ₂₂ ClNO ₅ [M-Cl] ⁺ : 392.148 0, found: 392.149 2
2b	37	204–206	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.52 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.21 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.98 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.22 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.18 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 6H), 2.14–2.10 (m, 3H), 1.79 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 6H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 174.8, 150.8, 150.6, 148.4, 144.5, 138.7, 134.6, 133.6, 131.5, 127.2, 126.5, 121.6, 121.4, 121.0, 109.1, 106.2, 102.8, 57.9, 56.2, 41.6, 38.8 (3), 36.5 (3), 27.9 (3), 26.8.	C ₃₀ H ₃₀ ClNO ₅ [M-Cl] ⁺ : 484.211 9, found: 484.212 3
2c	41	176–178	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.06 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.37 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 8.34–8.31 (m, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.15 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 1H), 7.95–7.86 (m, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 4.90 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 162.8, 151.0, 150.7, 149.2, 148.4, 145.2, 138.9, 133.7, 133.6, 132.2, 131.6, 130.8, 130.2, 128.0, 127.9, 126.5, 123.2, 121.7, 121.3, 121.0, 120.7, 109.1, 106.2, 102.8, 58.0, 55.9, 26.8.	C ₂₇ H ₁₉ ClF ₃ NO ₆ [M-Cl] ⁺ : 510.115 9, found: 510.114 0
2d	33	180–182	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.04 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.36 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 8.34 (t, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.25 (dt, <i>J</i> = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.93 (dt, <i>J</i> = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.73 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.91 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 163.7, 151.0, 150.6, 148.4, 145.2, 139.5, 138.8, 135.6, 134.1, 133.6, 131.5, 131.2, 131.0, 130.3, 129.0, 127.7, 126.5, 121.8, 121.3, 121.0, 109.1, 106.2, 102.8, 57.9, 55.9, 45.9, 26.8.	C ₂₇ H ₂₁ Cl ₂ NO ₅ [M-Cl] ⁺ : 474.110 3, found: 474.108 6
2e	27	193–195	¹ H NMR (500 MHz, methanol- <i>d</i> ₄) δ 9.82 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.32 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.28 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 5.01–4.93 (m, 2H), 4.12 (s, 3H), 3.28 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 177.9, 160.5, 159.6, 151.2, 150.7, 148.4, 145.1, 138.9, 133.6, 133.2, 131.6, 127.8, 126.5, 121.9, 121.3, 121.0, 109.1, 108.1, 106.2, 102.8, 58.0, 55.9, 26.8, 14.2, 12.3.	C ₂₅ H ₂₁ ClN ₂ O ₆ [M-Cl] ⁺ : 445.139 4, found: 445.137 7

					Continue
No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS (<i>m/z</i>)
2f	34	180–182	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.07 (s, 1H), 9.38 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 9.19 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.82 (t, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.37 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.29 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 4.89 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.22 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 172.7, 161.8, 156.2, 151.0, 150.7, 150.0, 148.4, 145.2, 140.7, 139.0, 133.6, 133.3, 131.6, 128.0, 126.6, 121.5, 121.3, 121.2, 121.0, 109.1, 106.2, 102.8, 58.0, 56.0, 26.8.	C ₂₅ H ₁₈ BrClN ₂ O ₅ [M-Cl] ⁺ : 505.039 4 found: 505.037 5
5a	30	225–227	¹ H NMR (500 MHz, methanol- <i>d</i> ₄) δ 9.47 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.26 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.17 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.13 (s, 2H), 5.02–4.93 (m, 2H), 4.12 (s, 3H), 3.32–3.23 (m, 3H), 2.65 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.86 (h, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.13 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 173.2, 154.9, 150.5, 148.3, 146.8, 138.0, 133.8, 131.3, 127.9, 125.8, 124.6, 122.5, 121.4, 121.1, 109.1, 106.1, 102.8, 57.6, 55.9, 38.1, 26.9, 19.1, 14.4.	C ₂₃ H ₂₃ ClN ₂ O ₄ [M-Cl] ⁺ : 391.164 0 found: 391.165 2
5b	43	242–244	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.40 (s, 1H), 9.29 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz, 1H), 8.21 (s, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.18 (s, 2H), 5.00 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 4.07–3.96 (m, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.07 (s, 9H), 1.76 (s, 6H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 177.9, 155.2, 150.3, 148.1, 146.0, 137.8, 133.6, 131.2, 127.9, 125.7, 124.9, 122.9, 121.3, 120.9, 108.9, 106.0, 102.5, 57.5, 56.0, 41.3, 38.9, 36.6 (3), 28.2 (3), 26.8 (3).	C ₃₀ H ₃₁ ClN ₂ O ₄ Cl [M-Cl] ⁺ : 483.227 8 found: 483.228 0
5c	37	245–247	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.69 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 8.20 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.82–7.68 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.96 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.20 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 165.1, 155.3, 150.3, 148.8, 148.1, 146.4, 138.1, 136.2, 133.7, 131.2, 131.1, 128.5, 127.8, 125.7, 120.6, 125.0, 124.8, 121.7, 121.3, 121.2, 120.9, 108.8, 106.0, 102.5, 57.5, 55.6, 26.7.	C ₂₇ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₅ [M-Cl] ⁺ : 509.131 9 found: 509.129 9
5d	39	256–258	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.79 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.20–8.17 (m, 1H), 8.14 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.76–7.72 (m, 1H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.96 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.20 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166.2, 155.3, 150.2, 148.2, 146.4, 138.5, 138.1, 134.4, 133.7, 132.9, 131.2, 129.3, 129.2, 128.6, 128.3, 125.7, 124.9, 122.2, 121.3, 121.0, 108.9, 106.0, 102.6, 57.4, 55.6, 46.2, 26.7.	C ₂₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₂ O ₄ [M-Cl] ⁺ : 473.126 4 found: 473.124 8
5e	28	243–245	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.09 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.27 (s, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.98 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.45 (s, 3H).	¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.4, 161.9, 159.3, 155.0, 150.3, 148.1, 146.4, 138.0, 133.6, 131.2, 128.3, 125.6, 124.5, 121.6, 121.2, 120.9, 113.1, 108.9, 106.0, 102.5, 57.5, 55.7, 26.7, 13.1, 11.3.	C ₂₅ H ₂₂ ClN ₃ O ₅ [M-Cl] ⁺ : 444.155 4 found: 444.153 8
5f	36	205–207	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.84 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 9.01 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.95 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.21 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 172.5, 164.1, 155.3, 153.6, 150.4, 148.3, 148.2, 146.3, 138.7, 138.3, 133.7, 131.2, 128.7, 125.7, 124.7, 121.3, 121.1, 120.9, 120.5, 108.9, 106.0, 102.6, 57.5, 56.5, 26.7.	C ₂₅ H ₁₉ BrClN ₃ O ₄ [M-Cl] ⁺ : 504.055 4 found: 504.053 5
7	30	102–104	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.10 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.14 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.51 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 6.51–6.46 (m, 1H), 6.39 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 4.80 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 4.65 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.15 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 160.4, 158.5, 150.4, 148.4, 147.7, 146.8, 137.3, 137.0, 133.9, 130.2, 129.0, 125.0, 120.4, 119.6, 118.4, 118.0, 117.4, 115.6, 109.9, 104.7, 98.9, 57.5, 56.8, 56.0, 55.8 (2), 46.9, 26.7.	C ₂₈ H ₂₉ ClN ₂ O ₅ [M-Cl] ⁺ : 473.207 1 found: 473.205 4
8	80	207–209	¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.20 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 9.92 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.81 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.31 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.81 (s, 2H), 4.67 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.11 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 150.1, 148.4, 147.0, 143.7, 138.1, 136.3, 132.6, 128.8, 123.3, 119.2, 118.6, 115.6, 113.9, 113.2, 109.8, 57.1, 56.8, 55.5, 26.8.	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂ O ₃ [M-Cl] ⁺ : 323.139 0 found: 323.138 0
9	38	153–155	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.10 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.59 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.58 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H), 6.52 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 6.41 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 4.85 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 4.68 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.23 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.09–2.04 (m, 3H), 2.03–1.99 (m, 6H), 1.78–1.71 (m, 6H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 175.2, 160.5, 158.5, 151.4, 148.3, 147.5, 142.2, 137.7, 135.6, 133.2, 130.2, 128.2, 126.1, 124.7, 123.4, 121.6, 120.3, 118.2, 117.7, 110.4, 104.8, 98.9, 57.5, 57.3, 55.8, 55.8, 55.7, 46.9, 41.1, 39.0 (3), 36.5 (3), 27.9 (3), 26.4.	C ₃₉ H ₄₃ ClN ₂ O ₆ [M-Cl] ⁺ : 635.308 7 found: 635.311 7
10	76	215–217	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.48 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 4.76 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.22 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 2.10–2.04 (m, 3H), 2.04–1.96 (m, 6H), 1.81–1.67 (m, 6H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 175.4, 151.4 (2), 147.6, 144.4, 142.1, 138.5, 132.0, 128.1, 126.2, 123.4, 123.1, 121.1, 114.0, 113.7, 110.3, 57.3, 57.1, 55.5, 41.1, 39.0 (3), 36.5 (3), 27.9 (3), 26.44.	C ₃₀ H ₃₃ ClN ₂ O ₄ [M-Cl] ⁺ : 485.243 5 found: 485.241 8
11	35	186–188	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.98 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.27 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.99 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 4.12 (s, 3H), 4.10 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.24 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.08–2.04 (m, 3H), 2.04–2.00 (m, 6H), 1.78–1.71 (m, 6H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 175.2, 151.5, 151.4, 146.6, 144.4, 142.5, 137.5, 133.3, 128.6, 127.4, 125.9, 124.4, 123.5, 122.4, 121.9, 110.7, 62.6, 57.7, 57.3, 56.0, 41.2, 39.0 (3), 36.5 (3), 27.9 (3), 26.1.	C ₃₁ H ₃₄ ClNO ₅ [M-Cl] ⁺ : 500.243 2 found: 500.243 4

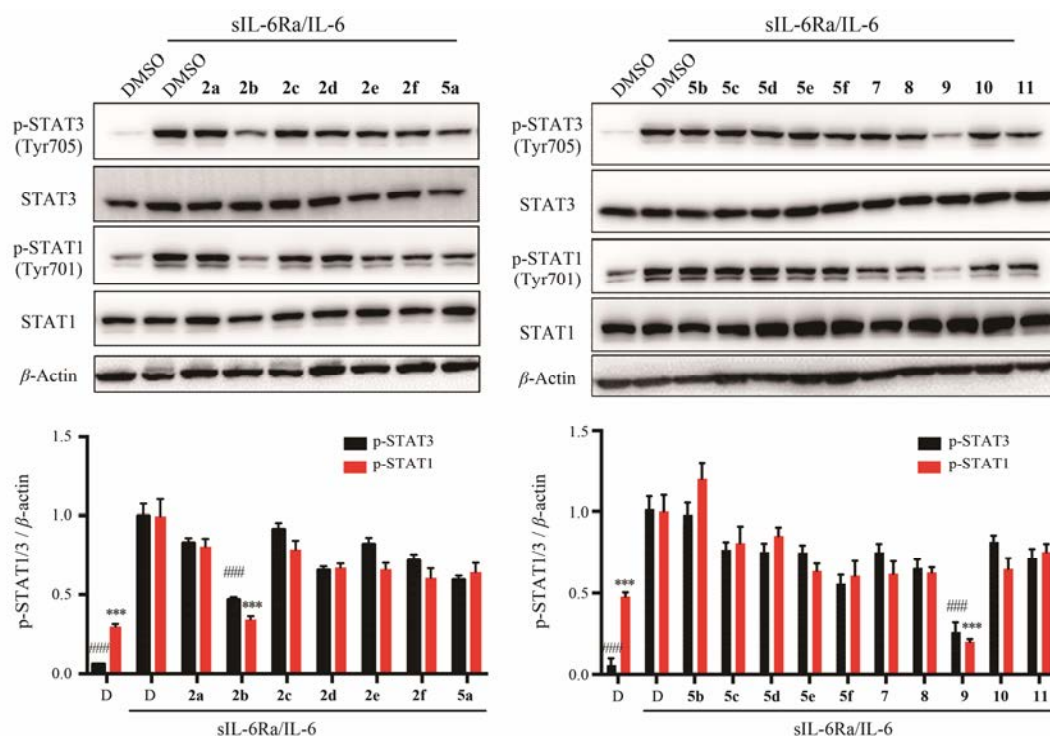


Figure 2 BBR analogues inhibited IL-6-induced STAT1 and STAT3 phosphorylation. Following pretreatment with BBR analogs **2a–2f**, **5a–5f** and **7–11** ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, HUVEC cells were treated with DMSO, sIL-6Ra ($25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)/IL-6 ($5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 30 min. The phosphorylation of STAT1 and STAT3 were measured by Western blotting using corresponding antibodies. D: DMSO. β -Actin served as the loading control. *** $P < 0.001$ compared with DMSO treated, IL-6-induced p-STAT1 group. ### $P < 0.001$ compared with DMSO treated, IL-6-induced p-STAT3 group

将 BBR 的 9-位氧原子替换为氮原子, 得到了 6 个与酯类衍生物对应的酰胺类衍生物 **5a~5f**。结果显示, 所有酰胺衍生物的抗炎活性均在不同程度上有所下降, 说明 9-位酯键连接刚性片段时有利于活性提高。

据此, 将 BBR 的 A 环亚甲二氧基打开, 在 3-位引入金刚烷活性片段; 同时在其 9-位分别引入氨基或者 2,4-二甲氧基苄胺等基团, 共设计合成了 5 个全新衍生物。结果显示, 当 3-位缺少金刚烷片段 (化合物 **7** 和 **8**), 或 9-位没有芳香体系存在 (化合物 **10** 和 **11**) 时, 所得衍生物的抗炎活性均有不同程度的降低。而当 3-位引入金刚烷片段, 同时 9-位为 2,4-二甲氧基苄胺取代时, 化合物 **9** 对 STAT1 和 STAT3 的活化显示出良好的抑制活性, 提示 3-位存在刚性片段的同时, 在 9-位引入芳香体系有利于抗炎活性的提高。

鉴于 AMPK 激活后可抑制 STAT 信号途径从而发挥其抑制炎症反应^[19, 20], 进一步探讨了此类衍生物抑制 STAT 通路的初步机制。通过 Western blotting 方法, 在 HUVEC 细胞中检测了目标化合物对 AMPK 磷酸化水平的影响, 结果如图 3 所示。结果显示, 代表性化合物 **2b** 和 **9** 能显著增加 AMPK 和下游因子 ACC 磷酸化水平, 表明化合物 **2b** 和 **9** 可以激活 AMPK。

此结果与 STAT1/3 磷酸化的抑制活性相对应, 提示化合物 **2b** 和 **9** 可以通过激活 AMPK 从而抑制 IL-6 诱导的 STAT1/3 的磷酸化。

结论

本研究以酯键、酰胺键等作为连接臂, 在 BBR 的 9-位或/和 3-位引入短链烷基、刚性基团、杂环以及取代芳环等不同类型取代基, 共设计合成了 17 个全新的 BBR 酯类、酰胺和胺类衍生物, 并对其抑制由 IL-6 诱导的 STAT1 和 STAT3 磷酸化进行了评价。构效关系显示, 3-位或 9-位刚性结构的引入有利于活性的提高。其中, 化合物 **2b** 和 **9** 表现出最优的抑制活性, 进一步研究提示, 两者可以通过激活 AMPK 抑制 IL-6 诱导的 STAT1 和 STAT3 磷酸化, 进而抑制 IL-6/STAT 信号通路介导的炎症反应。研究结果为 BBR 衍生物发展成为一类新型抗 AS 候选物提供了良好的构效关系与科学数据。

实验部分

熔点用 CXM-300 型精密熔点仪测定, 温度未校正; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 Bruker Avance III 500 和

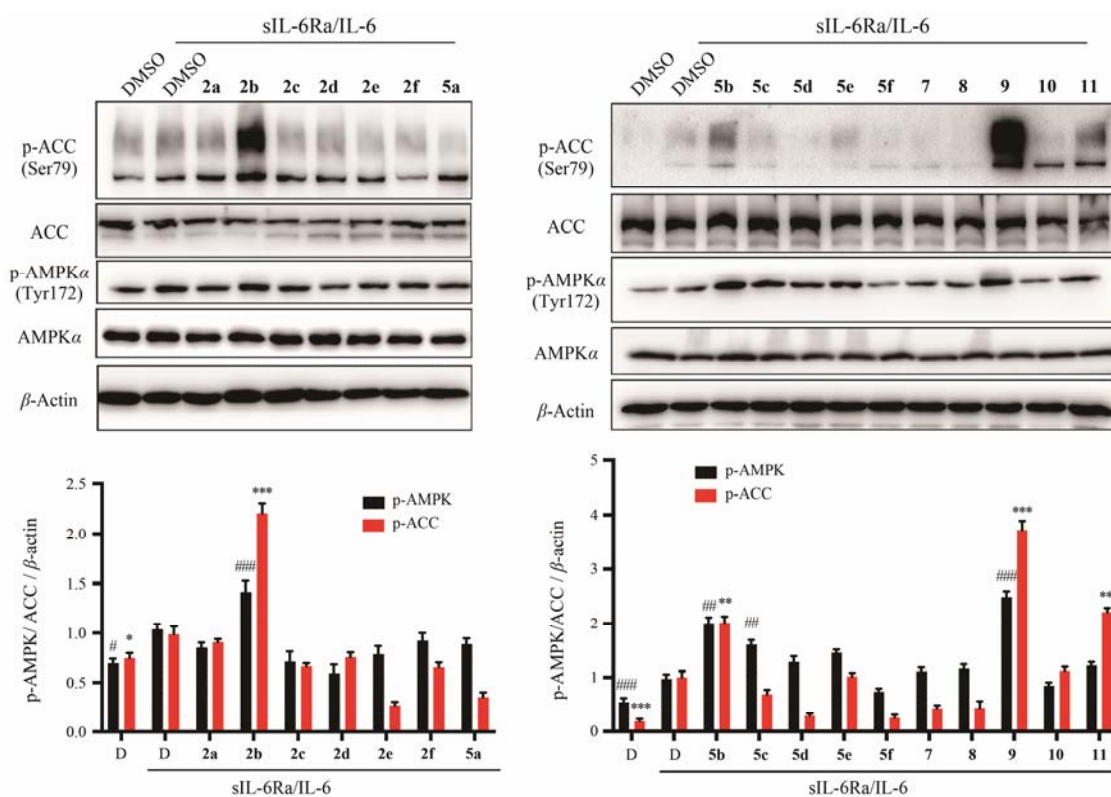


Figure 3 BBR analogues induced ACC and AMPK phosphorylation. Following pretreatment with BBR analogs **2a–2f**, **5a–5f** and **7–11** ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, HUVEC cells were treated with DMSO, sIL-6Ra ($25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)/IL-6 ($5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 30 min. The phosphorylation of ACC and AMPK were measured by Western blotting using corresponding antibodies. D: DMSO. β -Actin served as the loading control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with DMSO treated, IL-6-induced p-ACC group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared with DMSO treated, IL-6-induced p-AMPK group

600 核磁共振仪测定 (500/600 MHz), 溶剂为 DMSO- d_6 或 methanol- d_4 ; HR-MS 用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪测定; Flash 柱分离纯化用 Combiflash Rf 200 快速制备液相; 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; 试剂均为分析纯。

Medium 200 培养基、低血清生长添加剂 (LSGS) 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、Tris 碱、过硫酸铵及 Tween-20 均购自美国 Amresco 公司。蛋白酶抑制剂 (Cocktail) 购自美国 Sigma 公司。磷酸化 STAT3 (p-STAT3 Tyr705) 抗体、磷酸化 STAT1 (p-STAT1 Tyr701) 抗体、磷酸化 ACC (p-ACC Ser79) 抗体、磷酸化 AMPK (p-AMPK Tyr172) 抗体、STAT3 抗体、STAT1 抗体、ACC 抗体和 AMPK 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。 β -Actin 抗体和羊抗兔或小鼠二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。白介素 6 刺激因子 sIL-6Ra 和 IL-6 均购自美国 Invivogen 公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。ECL Plus 超敏免疫印迹检测试剂盒购自美国 Bio-RAD 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1 化学合成

1.1 化合物 2a~2f 的合成 BBR (3.71 g, 10 mmol) 在 $195\sim 210\text{ }^\circ\text{C}$ 减压 ($30\sim 40 \text{ mmHg}$) 加热 30 min 得紫黑色油状物。产物经 5% 盐酸/甲醇酸化, 减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得橙红色固体 **1** (2.85 g, 80%)。

化合物 **1** (100 mg, 0.28 mmol) 溶于 5 mL 无水乙醇中, 加入三乙胺 (175 μL , 1.26 mmol) 和相应酰氯 (1.1~1.2 eq), $70\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5~6 h。冷却至固体完全析出, 抽滤, 沉淀以大量二氯甲烷洗, 得目标化合物 **2a~2f**。

1.2 化合物 5a~5f 的合成 BBR (7.4 g, 20 mmol) 加于 2,4-二甲氧基苯胺 15 mL (78 mmol) 中, $120\text{ }^\circ\text{C}$ 加热反应 6~8 h。冷却至室温, 加入丙酮 50 mL, 搅拌, 抽滤, 丙酮 $2\times 50 \text{ mL}$ 洗涤。固体经硅胶柱, 以二氯甲烷/甲醇为流动相分离纯化得红色化合物 **3** (3.5 g, 37%)。

化合物 **3** (3 g, 6.4 mmol) 溶于甲醇中, 加入浓盐酸 3 mL, 室温搅拌 5~6 h, 抽滤, 沉淀以 80% 乙醇洗涤, 得红色化合物 **4** (1.8 g, 80%)。

化合物 **4** (100 mg, 0.28 mmol) 于 5 mL 无水二氯甲烷中, 加入吡啶 (100 μL , 1.24 mmol) 和相应酰氯 (2~3 eq), 回流反应 10~12 h。减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得。目标化合物 **5a~5f**。

1.3 化合物 7~10 的合成 药根碱 (**6**, 2 g, 5.8 mmol) 于 2,4-二甲氧基苯胺 5 mL (23 mmol) 中, 120 $^{\circ}\text{C}$ 加热反应 6~8 h。冷却至室温, 加入乙醚 20 mL, 抽滤, 以乙醚 2 \times 20 mL 洗涤, 除去未反应的胺。沉淀以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得红色化合物 **7** (0.8 g, 30%)。

化合物 **7** (100 mg, 0.21 mmol), 加入 2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醚 2 mL, 室温搅拌 5~6 h, 抽滤, 沉淀以 80% 乙醇洗涤, 得红色化合物 **8** (54 mg, 80%)。

化合物 **7** (0.5 g, 1.05 mmol) 溶于 5 mL 无水乙腈中, 加入三乙胺 (175 μL , 1.26 mmol)、金刚烷甲酰氯 (235 mg, 1.2 mmol), 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5~6 h。减压除去溶剂, 加入二氯甲烷 50 mL, 以 0.5% 盐酸 20 mL、饱和食盐水 2 \times 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩。产物以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得红色化合物 **9** (0.38 g, 38%)。

化合物 **9** (100 mg, 0.16 mmol), 加入盐酸乙醚 2 mL, 室温搅拌 5~6 h, 抽滤, 沉淀以 80% 乙醇洗涤, 得红色化合物 **10** (58 mg, 76%)。

1.4 化合物 11 的合成 药根碱 (100 mg, 0.29 mmol) 溶于 5 mL 无水乙腈中, 加入三乙胺 (175 μL , 1.26 mmol) 和金刚烷甲酰氯 (62 mg, 0.32 mmol), 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5~6 h。冷却至固体完全析出, 抽滤, 沉淀以大量二氯甲烷洗, 得黄色化合物 **11** (51 mg, 35%)。

2 生物学实验

2.1 细胞培养及化合物处理 人血管内皮细胞 HUVEC 购自美国 ATCC。使用含有 10% 胎牛血清、2% LSGS、100 u $\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硫酸链霉素的 M200 完全培养基, 在饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下进行细胞培养。当细胞生长至约 80%~90% 汇合时, 将细胞按 1:3 进行传代培养。实验中合成的化合物均溶于 DMSO 中, IL-6 和 IL-6Ra 溶于 PBS 缓冲液中。使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物作用细胞 2 h 后, 再加入 siIL-6Ra (25 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 IL-6 (5 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 30 min, 而后收集细胞进行蛋白免疫印迹分析。

2.2 Western blotting 将处理后的细胞用细胞刮刀刮下, 1 200 $\times g$ 离心收集细胞。加入适量裂解液 (50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton-100, 150 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$

NaCl, 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 1 \times Cocktail), 冰上放置 30 min, 然后 14 000 $\times g$ 离心 15 min, 收集上清液即为蛋白提取液。用标准 Bradford 方法测定样品的蛋白浓度。于 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 半干法将蛋白转至 PVDF 膜。转膜结束后, 将其放入含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T (20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、150 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、0.1% Tween-20, pH 7.6) 中振荡封闭 1 h。封闭后的膜装入杂交袋与一抗溶液 (1:1 000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBS-T 洗膜 3 次, 以洗去未结合的一抗。与辣根过氧化物酶标记的二抗溶液 (抗兔二抗 1:2 000 稀释、抗鼠二抗 1:5 000 稀释) 在室温孵育 1~2 h 后, TBS-T 洗膜 3 次, 按照 ECL Plus 免疫试剂盒说明书进行显色, 通过 Tanon-5100 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司) 捕获并分析图像。

References

- [1] van Diepen JA, Berbee JF, Havekes LM, et al. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228: 306-315.
- [2] Taleb S. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016, 109: 708-715.
- [3] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - a matter of unresolved inflammation [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27: 184-193.
- [4] Marciniak A, Nawrocka Rutkowska J, Brodowska A, et al. Cardiovascular system diseases in patients with polycystic ovary syndrome - the role of inflammation process in this pathology and possibility of early diagnosis and prevention [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2016, 23: 537-541.
- [5] Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy [J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22: 147-151.
- [6] Rutherford C, Speirs C, Williams JJ, et al. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling [J]. *Sci Signal*, 2016, 9: ra109.
- [7] Voloshyna I, Littlefield MJ, Reiss AB. Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24: 45-51.
- [8] Szelag M, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, et al. Targeted inhibition of STATs and IRFs as a potential treatment strategy in cardiovascular disease [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 48788-48812.
- [9] Yao J, Kong W, Jiang JD. Learning from berberine: treating chronic diseases through multiple targets [J]. *Sci China Life*

- Sci, 2015, 58: 854–859.
- [10] Heidarian E, Rafieian-Kopaei M, Khoshdel A, et al. Metabolic effects of berberine on liver phosphatidate phosphohydrolase in rats fed on high lipogenic diet: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4: S429–S435.
- [11] Bi CW, Zhang CX, Li YB, et al. Synthesis and structure-activity relationship of cycloberberine as anti-cancer agent [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1800–1806.
- [12] Li YH, Liu YX, Wang YX, et al. Synthesis and biological evaluation of new 13-n-nonylprotoberberine derivatives as antitubercular agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2013, 3: 38–45.
- [13] Wang YX, Fu HG, Li YH, et al. Synthesis and biological evaluation of 8-substituted berberine derivatives as novel anti-mycobacterial agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2012, 2: 581–587.
- [14] Feng M, Zou Z, Zhou X, et al. Comparative effect of berberine and its derivative 8-cetylberberine on attenuating atherosclerosis in *ApoE^{-/-}* mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43: 195–202.
- [15] 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.
- [16] Ma Y, Ou TM, Tan JH, et al. Quinolino-benzo-[5,6]-dihydroisoquinolium compounds derived from berberine: a new class of highly selective ligands for G-quadruplex DNA in c-myc oncogene [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 1906–1913.
- [17] Li YH, Wang L, Hong B, et al. Synthesis and structure-activity relationship of 13-hexylberberine analogues as CD36 antagonists [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1128–1133.
- [18] Ren G, Zhang MR, Song DQ, et al. Study on hypoglycemic activity of 9-substituted berberine derivatives *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1282–1286.
- [19] Mancini SJ, White AD, Bijland S, et al. Activation of AMP-activated protein kinase rapidly suppresses multiple pro-inflammatory pathways in adipocytes including IL-1 receptor-associated kinase-4 phosphorylation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 440: 44–56.
- [20] Kelly M, Keller C, Avilucea PR, et al. AMPK activity is diminished in tissues of *IL-6* knockout mice: the effect of exercise [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320: 449–454.