

全新结构吲哚类生物碱的合成及降甘油三酯活性研究

赵丽萍, 程阳阳, 范田运, 曾庆轩, 孔维佳, 宋丹青, 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: 本研究首次合成 3 个三环[6,5,7] 和 6 个四环[6,5,5,5] 两类全新结构的吲哚类生物碱, 评价了它们抑制甘油三酯活性, 其中, 化合物 **4c** 活性最优, IC_{50} 值为 $6.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且在细胞水平具有较好的安全性。初步作用机制显示 **4c** 可能是通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 增加细胞内脂质代谢。研究结果为寻找抗非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 化合物提供了一类全新的先导化合物。

关键词: 吲哚类生物碱; 合成; 降甘油三酯活性; AMPK

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0433-08

Synthesis and evaluation on triglyceride inhibitory activities of novel indole alkaloids

ZHAO Li-ping, CHENG Yang-yang, FAN Tian-yun, ZENG Qing-xuan, KONG Wei-jia,
SONG Dan-qing, WANG Yan-xiang*

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

Abstract: Three tricyclic [6,5,7] and six tetracyclic [6,5,5,5] novel indole alkaloids were synthesized and evaluated on triglyceride inhibitory activities for the first time. Among them, compound **4c** showed the most potent activity with IC_{50} value of $6.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Meanwhile, compound **4c** also exhibited a good safety profile at the cellular level. Preliminary mechanism study indicated that **4c** might increase intracellular lipid metabolism by activating AMPK. These results provide a novel family of lead compounds for the discovery of anti-NAFLD candidates.

Key words: indole alkaloid; synthesis; anti-triglyceride activity; AMPK

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种常见的慢性肝脏疾病, 其病理特征表现为无过量饮酒史或其他损肝因素而出现的肝细胞内脂质过度沉积, 部分患者最后会发展成肝硬化和肝癌^[1]。NAFLD 已成为严重威胁人类健康的疾病, 全球患病人数超过 15 亿, 呈现逐年增加的趋势, 该疾病与内脏脂肪增加和随之而来的代谢异常有关, 包括胰岛素抵抗、

糖尿病、高血压、血脂异常、动脉粥样硬化等, 并且尚无任何药物被美国食品药品监督管理局 (FDA) 或欧洲药品管理局 (EMA) 批准用于临床, 因此寻找有效的预防和治疗候选物成为全球研究热点^[2,3]。其中, 肝细胞内甘油三酯 (triglyceride, TG) 的蓄积是 NAFLD 的发病重要诱因之一, 使得肝细胞更容易受到损伤, 进而发展为非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 因此抑制肝细胞内 TG 的累积被认为是预防 NAFLD 的一种重要手段之一^[4,5]。

吲哚生物碱天然产物结构多样, 具有降脂、抗糖尿病、抗癌、抗菌等多种生物活性, 是开发新型药物的重

收稿日期: 2021-10-05; 修回日期: 2021-11-09.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-1-12M-030).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1439

要来源^[6-9]。本课题组长期致力于从生物碱天然产物中寻找化学结构新颖、作用机制独特的创新药物候选物。本研究在探索吲哚生物碱 (iheyamine A, 图1) 的合成过程中^[10], 偶然发现当起始原料 **1** 中氮原子上含取代基时, 可以获得独特结构的三环[6,5,7]吲哚类化合物; **1** 的氮原子上为氢原子时, 却得到四环[6,5,5,5]吲哚类全新骨架化合物。本研究在此工作基础上, 继续开展了两类化合物的合成研究, 共合成9个全新结构吲哚类衍生物, 包括3个三环[6,5,7]吲哚类和6个四环[6,5,5,5]吲哚类衍生物, 并通过X单晶衍射确定了其立体构型, 以及阐明两类吲哚骨架的化学形成机制。同时对9个全新化合物的生物活性进行了探索, 首次发现其均具有降TG活性, 并进一步对代表性化合物开展了初步成药性评价和作用机制研究。

结果与讨论

1 化合物的合成

如路线1所示: 首先, 将起始原料色胺 (tryptamine) 与溴乙酸乙酯经 *N*-取代反应得到中间体 **2**, **2** 再经 *N*-取代反应得到关键中间体 **3a~3c**, 收率为70%~83%。经过氢氧化钠水解成羧酸, 并与伊顿试剂 (Eaton reagent)

环合得到目标物 **4a~4c**, 收率为38%~55%。

如路线2所示: 以不同取代基的色胺为起始原料, 先经取代、水解反应得到 **6a~6f**, 然后其与伊顿试剂进行分子内环合, 得到目标物 **7a~7f**, 收率为25%~47%。所有目标化合物结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 以及 HR-MS 分析确证。目标化合物的收率、理化参数和波谱数据见表1。

2 四环[6,5,5,5]吲哚类化合物的骨架及绝对构型确证

选择四环[6,5,5,5]吲哚类化合物 **7d** 进一步测定单晶X衍射, 对其立体结构进一步确证 (表2), 结果表明化合物 **7d** 的2-、5-以及10-位的绝对构型分别是2*S*、5*S*、10*R*-构型。

3 三环[6,5,7]和四环[6,5,5,5]吲哚类化合物的机制推导

两类不同骨架化合物 **4a** 和 **7a** 的可能反应机制如图2: 化合物 **1** 在伊顿试剂中经质子化生成中间体 **I**, 当氮原子上含取代基时, **I** 经过质子化反应得到中间体 **II**, **II** 通过吲哚的 C2 位对羧基进行亲核攻击得到中间体 **III**, **III** 通过质子转移消除一分子 H₂O 得到化合物 **4a**; 当氮原子取代基为氢原子时, **I** 质子化转移得到 **IV**, **IV** 通过氮原子氢原子进行分子内亲核攻击吲哚的

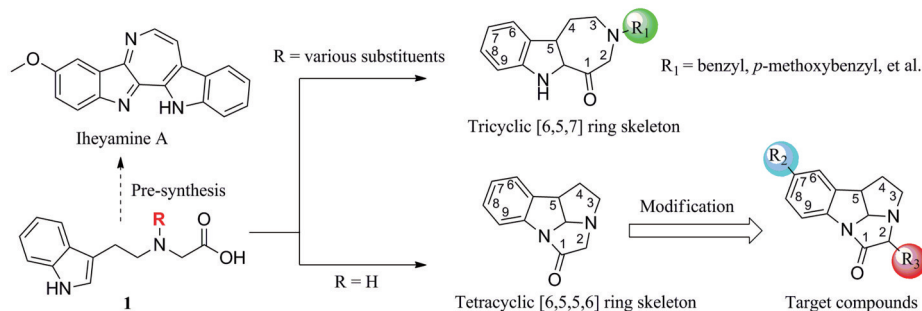
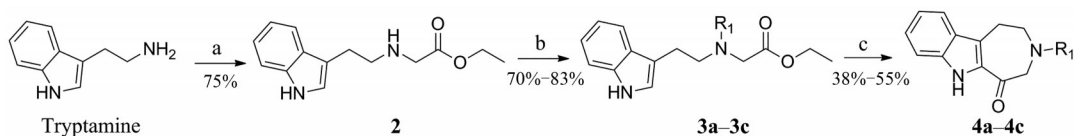
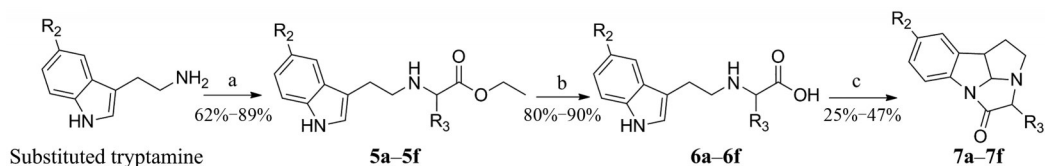


Figure 1 The chemical structures of iheyamine A and two types of novel skeleton



4a: R₁ = benzyl; **4b:** R₁ = *p*-methoxybenzyl; **4c:** R₁ = *p*-toluenesulfonyl

Scheme 1 Synthetic route of target compounds **4a-4c**. Reagent and conditions: (a) K₂CO₃, CH₂Cl₂, 1–3 h; (b) K₂CO₃, CH₂Cl₂, 2–6 h; (c) 1) MeOH, NaOH, 70 °C, 2 h; 2) Eaton reagent, 45 °C, 0.5–3 h



7a: R₂ = H, R₃ = H; **7b:** R₂ = H, R₃ = CH₃; **7c:** R₂ = H, R₃ = (CH₃)₂; **7d:** R₂ = H, R₃ = C₆H₅; **7e:** R₂ = OCH₃, R₃ = H; **7f:** R₂ = Cl, R₃ = H

Scheme 2 Synthetic route of target compounds **7a-7f**. Reagent and conditions: (a) Substituted ethyl bromoacetates, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 2–5 h; (b) MeOH, NaOH, 70 °C, 2 h; (c) Eaton reagent, 45 °C, 0.5–3 h

Table 1 Physical properties and spectra data of all synthesized compounds

Compd.	Yield/%	mp/°C	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS
			(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	<i>m/z</i>
4a	40	148–150	11.34 (s, 1H), 7.64 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.36–7.23 (m, 6H), 7.06 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.24 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 3.16 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H).	194.7, 138.7, 137.1, 132.2, 128.3 (2), 128.1 (2), 126.9, 126.9, 125.9, 122.4, 121.2, 119.4, 112.4, 65.3, 57.0, 51.4, 25.3.	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O [M+H] ⁺ : 291.149 2 Found: 291.149 3.
4b	55	135–137	11.33 (s, 1H), 7.65 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.41 (dt, <i>J</i> = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.32–3.27 (m, 1H), 7.27–7.22 (m, 2H), 7.06 (ddd, <i>J</i> = 8.4, 6.6, 1.2 Hz, 1H), 6.92–6.86 (m, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.73 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 5H), 3.22 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 3.18–3.12 (m, 2H).	194.75, 158.20, 137.04, 132.17, 130.44, 129.53 (2), 126.91, 125.90, 122.41, 121.15, 119.34, 113.51 (2), 112.35, 65.16, 56.49, 54.84, 51.27, 25.31.	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺ : 321.159 8 Found: 321.160 6.
4c	38	154–156	11.46 (s, 1H), 7.72–7.64 (m, 3H), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.36–7.29 (m, 3H), 7.09–7.05 (m, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.03 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 3.73 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.98 (s, 1H).	189.9, 143.4, 137.3, 136.0, 131.4, 129.8 (2), 126.7, 126.6 (2), 126.4, 121.6, 121.2, 119.8, 112.5, 57.0, 47.2, 26.6, 20.9.	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S [M+H] ⁺ : 355.111 1 Found: 355.111 3.
7a	38	83–85	7.34–7.20 (m, 3H), 7.11 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 5.71 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 3.92–3.69 (m, 2H), 3.24 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 3.05 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 2.24–2.13 (m, 1H), 2.07 (s, 1H), 1.74 (dd, <i>J</i> = 12.6, 5.4 Hz, 1H).	177.5, 140.9, 135.9, 127.6, 125.0, 124.5, 113.5, 88.3, 58.6, 51.5, 43.4, 32.8.	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O [M+H] ⁺ : 201.102 2 Found: 201.101 9.
7b	28	105–107	7.31 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.27–7.20 (m, 2H), 7.13–7.07 (m, 1H), 5.86 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 3.78 (q, <i>J</i> = 14.4, 7.8 Hz, 1H), 3.41 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 3.04 (dd, <i>J</i> = 9.0, 6.6 Hz, 1H), 2.18–2.05 (m, 2H), 1.76–1.71 (m, 1H), 1.38 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).	180.8, 141.3, 136.5, 128.1, 125.4, 125.0, 114.0, 86.3, 66.4, 51.9, 43.4, 33.0, 15.2.	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O [M+H] ⁺ : 215.117 9 Found: 215.118 2.
7c	25	119–121	7.31 (dq, <i>J</i> = 7.3, 0.9 Hz, 1H), 7.28–7.19 (m, 2H), 7.10 (td, <i>J</i> = 7.3, 1.4 Hz, 1H), 5.82 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H), 3.78 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 2.87 (dd, <i>J</i> = 9.3, 6.2 Hz, 1H), 2.19–2.09 (m, 1H), 2.08–1.97 (m, 1H), 1.75 (dd, <i>J</i> = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).	181.8, 141.4, 135.9, 127.7, 125.1, 124.6, 113.8, 84.0, 67.8, 47.2, 42.9, 32.8, 23.1, 20.1.	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O [M+H] ⁺ : 229.133 5 Found: 229.132 7.
7d	47	110–112	7.58 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 7.36–7.32 (m, 2H), 7.30 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.27–7.23 (m, 1H), 7.16–7.10 (m, 1H), 5.78 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.83 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 3.27 (dd, <i>J</i> = 9.6, 6.6 Hz, 1H), 2.40–2.32 (m, 1H), 2.30–2.21 (m, 1H), 1.83 (dd, <i>J</i> = 12.6, 5.4 Hz, 1H).	177.9, 140.9, 136.2, 135.1, 128.5 (2), 127.9, 127.5, 126.1 (2), 125.2, 125.0, 114.0, 86.6, 72.7, 52.0, 43.5, 32.6.	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O [M+H] ⁺ : 277.133 5 Found: 277.133 1.
7e	32	123–125	7.17 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 6.78 (dd, <i>J</i> = 8.4, 3.0 Hz, 1H), 5.68 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 3.81 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz, 1H), 3.75–3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.18 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 3.02 (dd, <i>J</i> = 9.6, 6.6 Hz, 1H), 2.20–2.10 (m, 1H), 2.07–1.96 (m, 1H), 1.76 (dd, <i>J</i> = 12.6, 5.4 Hz, 1H).	177.3, 156.6, 137.4, 134.3, 113.9, 112.3, 110.9, 88.7, 58.4, 55.0, 51.5, 43.5, 32.5.	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺ : 231.112 8 Found: 231.113 1.
7f	25	174–176	7.47–7.37 (m, 1H), 7.34–7.18 (m, 2H), 5.71 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 3.85 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz, 1H), 3.80 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 3.24 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz, 1H), 3.04 (dd, <i>J</i> = 9.6, 6.6 Hz, 1H), 2.20–2.11 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.78 (dd, <i>J</i> = 12.6, 5.2 Hz, 1H).	178.5, 140.7, 139.2, 129.0, 128.3, 126.0, 115.4, 89.4, 59.2, 52.2, 44.2, 33.5.	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ OCl [M+H] ⁺ : 235.063 3 Found: 235.063 1.

C2位, 转变为四氢吡咯并[2,3-*b*]吡啶体系**V**, 进而吡啶的NH与羧基反应消除一分子H₂O, 形成化合物**7a**。

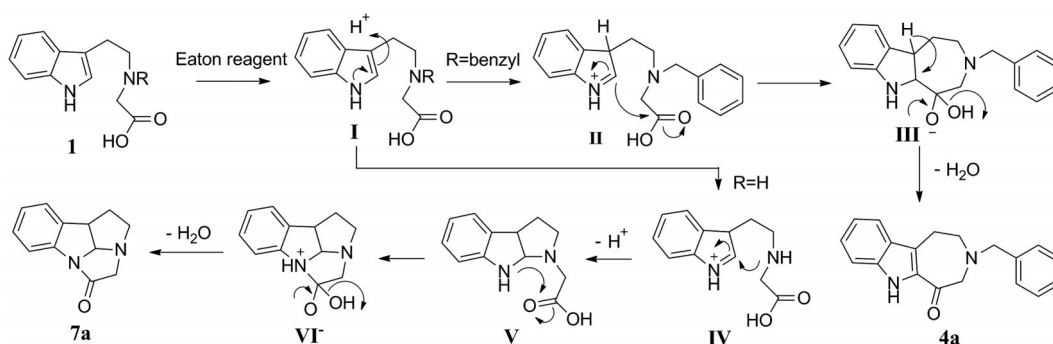
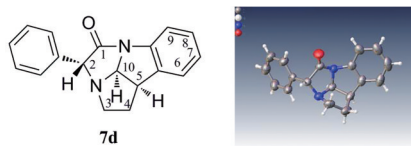
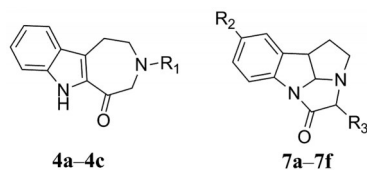
4 TG抑制活性测定

非诺贝特作为一种降脂药物, 对NAFLD患者有一定的治疗作用, 研究表明, 非诺贝特主要通过改善脂质代谢来治疗NAFLD^[11]。本研究选取非诺贝特为阳性对照药, 在人肝癌细胞HepG2中测定了9个衍生物在20 μmol·L⁻¹下的TG抑制活性, 目标化合物结构与活性结果见表3。三环[6,5,7]吡啶骨架衍生物中, 化合物**4a**~

4c的氮原子取代基分别为苄基、对甲氧基苄基和对甲苯磺酰基, 它们对TG的下调活性分别为32.6%、3.2%和64.1%, 化合物**4c**的活性优于阳性对照非诺贝特。在6个四环[6,5,5,5]吡啶类衍生物中, 化合物**7a**~**7d**的2-位取代基分别为氢原子、甲基、二甲基和苯基, 它们的活性均低于非诺贝特。然后当2-位为氢原子, 在其7-位分别引入甲氧基和氯原子得到**7e**和**7f**, 其中化合物**7e**的抑制率为53.7%, 与非诺贝特相当, 说明7-位引入给电子取代基可能有利于活性的提高。综上, 选

Table 2 Crystal data and structure refinement statistics of compound **7d**

Parameter	Value	Parameter	Value
Temperature/K	293 (2)	μ/mm	0.653
Crystal system	Monoclinic	F (000)	584.0
Space group	P2 ₁ /n	Radiation	CuK α ($\lambda = 1.54184$)
$a/\text{\AA}$	10.4109 (4)	2θ range for data collection/ $^\circ$	9.96 to 133.48
$b/\text{\AA}$	8.5881 (3)	Index ranges	$-12 \leq h \leq 11, -10 \leq k \leq 9, -18 \leq l \leq 18$
$c/\text{\AA}$	15.6420 (6)	Reflections collected	7 709
$\alpha/^\circ$	90.00	Independent reflections	2 467 [$R_{\text{int}} = 0.0286, R_{\text{sigma}} = 0.0233$]
$\beta/^\circ$	93.023 (3)	Data/restraints/parameters	2 467/0/191
$\gamma/^\circ$	90.00	Goodness-of-fit on F^2	1.088
$\rho_{\text{calc}}/\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1.314		

**Figure 2** Possible synthetic mechanism of compounds **4a** and **7a** mediated by Eaton reagent**Table 3** Structures and anti-triglyceride activities of all the target compounds. ^aConcentration of all compounds is $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 3$).^b IC_{50} : 50% inhibitory concentration (means \pm SD of three experiments). ^cUsed as a positive control

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	TG inhibition rate ^a (%)	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
4a	Benzyl	-	H	32.6 \pm 14.1	-
4b	<i>p</i> -Methoxybenzyl	-	H	3.2 \pm 2.95	-
4c^b	<i>p</i> -Tosyl	-	H	64.1 \pm 4.6	6.35 \pm 4.00
7a	-	H	H	20.8 \pm 6.1	-
7b	-	H	CH ₃	16.0 \pm 5.5	-
7c	-	H	(CH ₃) ₂	8.5 \pm 1.6	-
7d	-	H	C ₆ H ₅	31.7 \pm 2.6	-
7e^b	-	OCH ₃	H	53.7 \pm 7.9	17.67 \pm 2.51
7f	-	Cl	H	17.3 \pm 8.3	-
Fenofibrate ^c				50.3 \pm 6.2	7.94 \pm 3.79

取两个骨架系列中活性较优的活性化合物 **4c** 和 **7e** 进行 IC_{50} 值的测定, 其抑制 TG 的 IC_{50} 值分别为 $6.35 \pm 4.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.67 \pm 2.51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并进行下一步成药性初步评价。

5 成药性初步评价

5.1 化合物 4c 和 7e 成药性预测 首先使用 ADMET Predictor 9.5 软件对活性化合物 **4c** 和 **7e** 的吸收、代谢和毒理性质进行初步成药性预测并打分 (表 4)。其中,

参数吸收风险系数 (Absn Risk)、代谢性质风险系数 (CYP Risk) 和致突变性风险系数 (Mut Risk) 评估化合物的吸收、代谢性质及致突变性, 而参数 ADMET Risk 对化合物进行全方面的成药性预测。结果显示, **4c** 和 **7e** 的预测分值均在软件设定的合理范围内, 提示两者可能具有良好的成药性。

Table 4 ADMET prediction results of **4c** and **7e**. ^aAbsn risk (evaluation of absorption properties of compounds), suggested values: ≤ 3.5 . ^bCYP risk (evaluation of metabolic properties of compounds), suggested values: ≤ 2.5 . ^cMut risk (evaluation of mutagenicity of compounds), suggested values: ≤ 1 . ^dADMET risk (evaluation of medicinal properties of compounds), suggested values: ≤ 7.5

Compd.	Absn risk ^a	CYP risk ^b	Mut risk ^c	ADMET risk ^d
4c	1	0.006	0.6	2.006
7e	0	0.261	0.9	0.261

5.2 化合物 4c 和 7e 细胞毒活性测定 接下来对两个活性化合物进行了细胞毒活性评价。分别选取人肝癌 HepG2 细胞、人正常肾上皮细胞 293T 及非洲绿猴肾细胞 Vero, 测定了 **4c** 和 **7e** 的细胞毒性。结果如表 5 所示: 化合物 **4c** 的 CC_{50} 值均大于 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **7e** 的 CC_{50} 值均大于 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示两者均具有较好的细胞安全性, **4c** 的选择性指数 (selection index, $SI = CC_{50}/IC_{50}$) 大于 63, **7e** 的 SI 值为 21, 其中 **4c** 显示更好的安全性, 选为代表性化合物进行作用机制的探索。

Table 5 Cytotoxicities of the target compounds

Compd.	$CC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	HepG2	293T cell	Vero cell
4c	> 400	> 400	> 400
7e	373.3 ± 2.55	334.8 ± 46.33	> 400

6 降 TG 机制初步探究

AMPK 通过磷酸化作用抑制脂肪酸、胆固醇和 TG 的合成途径, 从而降低肝细胞内 TG 的累积^[12-16], 因此, 本研究评价了 **4c** 对 AMPK 的激活活性。结果如图 3A、3B 所示, 化合物 **4c** 可上调 AMPK 磷酸化水平, 并呈现较好的剂量和时间依赖性, 而总的 AMPK 水平无明显变化。

进而通过油红染色实验对其作用机制进行验证, 结果如图 3C 所示, 油酸 (oleic acid, OA) 作用 24 h 可诱导 HepG2 细胞脂肪变性, 表现为大面积红染; 化合物 **4c** 可以降低细胞的红染程度及脂肪变性, dorsomorphin 是一种有效的、可逆选择性的 AMPK 抑制剂^[17], 加入 dorsomorphin 后, **4c** 抑制细胞脂肪变性的效果被逆转。该结果提示, 化合物 **4c** 可能是通过激活 AMPK 增加细胞脂质代谢, 从而降低 TG 的积累。

小结

本研究首次设计合成了三环[6,5,7]与四环[6,5,5,5]两类全新结构的吡啶类生物碱, 并经 X 单晶衍射确定了立体绝对构型。发现两类化合物均具有降 TG 的活性, 其中化合物 **4c** 表现出最优的活性, IC_{50} 值为 $6.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 优于阳性对照非诺贝特。**4c** 在细胞水平具有较好的安全性, 对于 HepG2、293T 和 Vero 细胞的 CC_{50} 值均大于 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。初步作用机制显示, 化合物 **4c** 可以通过激活 AMPK 的活性增加细胞脂质代谢, 进而发挥出较好的降 TG 活性, 并缓解 OA 诱导 HepG2 细胞脂肪变性。研究结果为两类化合物的进一步结构修饰与优化提供了有益的科学数据。

实验部分

熔点用美国 CXM-300 型精密熔点仪 (Mettler-Toledo) 测定, 温度未校正; 核磁共振氢谱和碳谱分别采用美国 Varian Mercury Plus 400 (600 MHz) 和 Bruker Avance III 500 (151 MHz) 核磁共振仪测定, 溶剂均为 $\text{DMSO}-d_6$, TMS 为内标; HR-MS 采用英国 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪 (Micromass UK Ltd.) 测定; Flash 柱分离纯化用美国 Combiflash Rf200 快速制备液相 (Teledyne); 荧光检测用中国上海宝山顾村电光仪器厂 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 目标化合物 4a~4c 的合成 将色胺 (10 mmol) 溶于二氯甲烷中, 加入碳酸钾 (2.07 g, 15 mmol), 室温搅拌 30 min, 缓慢滴加溴乙酸乙酯 (11 mmol), TLC 检测反应完全。反应完全后减压浓缩, 加入适量水用乙酸乙酯萃取 3 次 ($20 \text{ mL} \times 3$), 合并有机层, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩并加少量硅胶匀化样品, 以石油醚/乙酸乙酯为流动相进行 Flash 分离纯化, 得到淡黄色油状物 **2**, 收率为 75%。

将化合物 **2** (2.46 g, 10 mmol) 溶于 40 mL 二氯甲烷中, 加入碳酸钾 (2.07 g, 15 mmol), 室温搅拌 30 min, 分别与溴苄、对甲氧基苄氯、对甲苯磺酰氯 (11 mmol) 进行反应, TLC 检测反应完全。反应完全后减压浓缩, 加入适量水用乙酸乙酯萃取 3 次 ($20 \text{ mL} \times 3$), 合并有机层, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩并加少量硅胶匀化样品, 以石油醚/乙酸乙酯为流动相进行 Flash 分离纯化, 得到淡黄色固体 **3a~3c**, 收率为 70%~83%。

将 **3a~3c** (10 mmol) 加入甲醇中, 室温搅拌下加入 10 mL 的 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 升温至 $70 \text{ }^\circ\text{C}$, 反

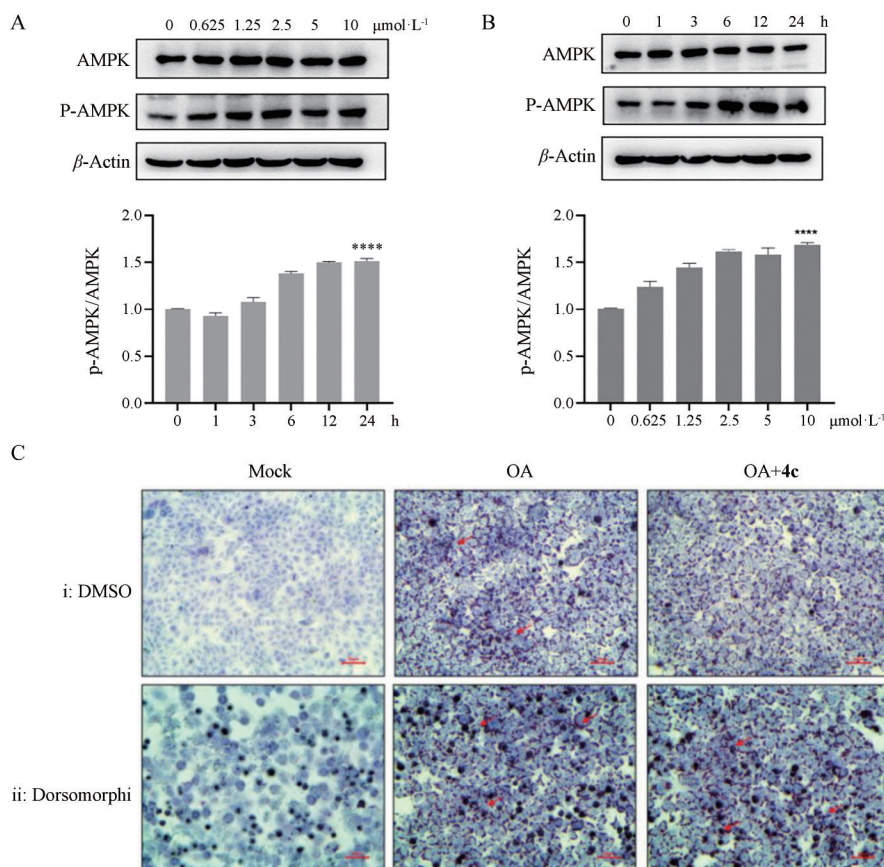


Figure 3 AMPK activation activity of **4c**. A: Compound **4c** concentrations of 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. The histograms are representatives of independent Western blots experiments, and the quantitative results are expressed as their mean \pm SD ($n = 3$). Statistical significant differences compared with vehicle control are indicated by **** $P < 0.001$. B: Compound **4c** concentration of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and time of 1, 3, 6, 12 and 24 h respectively. The histograms are representatives of independent Western blots experiments, and the quantitative results are expressed as their mean \pm SD ($n = 3$). Statistical significant differences compared with vehicle control are indicated by **** $P < 0.001$. C: i: HepG2 cells were left untreated or treated with OA or OA+**4c**. ii: HepG2 cells were pretreated with dorsomorphin; then the cells were again left untreated or treated with OA or OA+**4c** as indicated. (**4c** 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; dorsomorphin 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

应 2 h, TLC 检测反应完全, 反应结束后冷却至室温, 减压浓缩除去甲醇后, 用浓盐酸调 pH 至 3~4, 析出大量白色固体, 水洗并干燥后直接用于下一步反应。

将白色固体 (0.8 mmol) 分别加入 2.5 mL 伊顿试剂中, 氮气保护下进行搅拌, 升温至 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0.5~3 h, TLC 检测反应完全后, 置于冷阱中冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$, 用饱和 NaHCO_3 溶液调节 pH 至 7~8, 加入适量水用二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机层, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 以石油醚/乙酸乙酯和二氯甲烷/甲醇为流动相进行 Flash 分离纯化, 得到目标化合物 **4a**~**4c**, 收率为 38%~55%。

1.2 目标化合物 9a~9f 的合成 室温下, 将不同取代的色胺 (10 mmol) 溶于二氯甲烷中, 加入碳酸钾 (2.07 g, 15 mmol), 室温搅拌 30 min, 缓慢滴加含有不同取代基的溴乙酸乙酯 (11 mmol), TLC 检测反应完全。反应完全后减压浓缩, 加入适量水用乙酸乙酯萃取 3 次

(20 mL \times 3), 合并有机层, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩并加少量硅胶匀化样品, 以石油醚/乙酸乙酯为流动相进行 Flash 分离纯化, 得到淡黄色固体 **5a**~**5f**, 收率为 62%~89%。

将 **5a**~**5f** (10 mmol) 加入甲醇中, 室温搅拌下加入 20 mL 的 1.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 升温至 70 $^{\circ}\text{C}$, 反应 2 h, TLC 检测反应完全, 反应结束后冷却至室温, 减压浓缩除去甲醇后, 用浓盐酸调 pH 至 3~4, 析出大量固体, 水洗, 干燥后得中间体 **6a**~**6f**, 白色固体, 收率为 80%~90%。

向 2.5 mL 伊顿试剂中加入 **6a**~**6f** (0.8 mmol), 氮气保护下进行搅拌, 升温至 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0.5~3 h, TLC 检测反应完全后, 置于冷阱中冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$, 用饱和 NaHCO_3 溶液调节 pH 至 7~8, 加入适量水用二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机层, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 以石油醚/乙酸乙酯和二氯甲烷/甲醇为流动相进行 Flash

分离纯化, 得到目标化合物 **7a**~**7f**, 收率为25%~47%。

2 结构测定

在室温 (293 K) 下采集单晶 X 射线衍射数据, 将化合物 **7d** 在石油醚与乙酸乙酯体积比为 10:1 的混合溶剂中重结晶。

3 细胞内 TG 活性测定

HepG2 细胞系经胰酶消化成单个细胞, 接种 12 孔板, 每孔接种 3×10^5 个细胞, 10% FBS+MEM 培养基培养 24 h, 后换用 0.5% FBS+MEM 饥饿培养 24 h, 继续用 0.5% FBS+MEM 加 OA 终浓度为 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时加药培养 24 h。细胞处理后用高脂样本甘油三酯 (TG) 酶法测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司) 测定细胞内 TG 含量, 结果用蛋白浓度校准。向 12 孔板中加入 0.5 mL PBS 清洗细胞, 弃去 PBS 后, 用胰酶消化细胞, 收集细胞后, 加入 100 μL 裂解液, 混匀后室温静置 10 min。取 20 μL 上清液用于 BCA 法蛋白定量。另取 70 μL 上清液转移到 1.5 mL 离心管中, 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。室温 $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 上层清液用于酶学测定。用 96 孔板测定, 设置空白组、标准品组、样品组, 向孔中加入 10 μL 蒸馏水、系列浓度标准品以及待测样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。于全波长酶标仪中测定 550 nm 处吸光度, 绘制标准曲线并计算待测样品中 TG 浓度, 结果用蛋白浓度校准^[18]。

4 细胞毒活性测定

取对数生长期细胞, 消化后计数, 将细胞接种于 96 孔培养板。培养过夜待贴壁后, 用无血清培养基稀释药物, 用浓度梯度的药物处理细胞。72 h 后, 去除培养液, 加入 10 倍稀释的 CCK8 试剂 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 2~3 h 后, 震荡 3 min 混匀, 用酶标仪测定 450 nm 吸收度值 (A)。细胞存活率% = (加药细胞 A - 本底 A) / (对照细胞 A - 本底 A) $\times 100\%$ 。实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 数值为 3 次实验结果的平均值, 使用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析计算 CC_{50} 值。

5 Western blot 法检测 AMPK 蛋白表达水平

将处理后的 HepG2 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 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton-100, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 凝胶成像系统捕获并分析图像。

6 油红染色实验

弃去处理后的 HepG2 细胞培养液, 用 PBS 洗涤 2 次。从培养板壁缓慢加入 4% 多聚甲醛进行固定 0.5~1 h。弃去固定液, 水洗两次, 再用 60% 异丙醇孵育 5 min。弃去异丙醇, 加入油红工作液 (油红储备液: 去离子水 = 3:2, 需过滤), 摇晃孵育 10~20 min。弃去油红工作液, 用水洗 2 次, 直至水无色。加入苏木素染色 1 min, 弃去苏木素, 用水洗 2~5 次, 于显微镜下观察并拍照, 观察脂滴的分布情况。

致谢: 目标化合物的核磁共振氢谱、碳谱、高分辨质谱及单晶 X 衍射数据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。

作者贡献: 赵丽萍负责所有目标物的合成、文献的调研整理及初稿的撰写; 程阳阳负责甘油三酯抑制活性的测定; 曾庆轩负责 AMPK 蛋白表达水平测定和油红染色实验; 范田运、孔维佳、宋丹青对实验过程中出现的问题及论文撰写提供了有益的指导; 汪燕翔负责实验把关、稿件修改等工作。以上作者均已通读手稿并同意论文的刊发。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Tariq T, Desai AP. Nonalcoholic fatty liver disease: making the diagnosis [J]. Clin Liver Dis (Hoboken), 2020, 16: 53-57.
- [2] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016, 64: 73-84.
- [3] Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, et al. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25: 163-177.
- [4] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights [J]. Science, 2011, 332: 1519-1523.
- [5] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Metabolism, 2016, 65: 1038-1048.
- [6] Yan Y, Li X, Zhang C, et al. Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: a review [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10: 108.
- [7] Zhu Y, Zhao J, Luo L, et al. Research progress of indole compounds with potential antidiabetic activity [J]. Eur J Med Chem, 2021, 223: 113665.

- [8] Song F, Bian Y, Liu J, et al. Indole alkaloids, synthetic dimers and hybrids with potential *in vivo* anticancer activity [J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21: 377-403.
- [9] Tian KM, Li JJ, Xu SW. Rutaecarpine: a promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu) [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 541-550.
- [10] Sasaki T, Ohtani II, Tanaka J, et al. Iheyamines, new cytotoxic bisindole pigments from a colonial ascidian, *Polycitorella* sp. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 303-306.
- [11] Fabbrini E, Mohammed BS, Korenblat KM, et al. Effect of fenofibrate and niacin on intrahepatic triglyceride content, very low-density lipoprotein kinetics, and insulin action in obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 2727-2735.
- [12] Davies SP, Carling D, Munday MR, et al. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 203: 615-623.
- [13] Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273: E1107-E1112.
- [14] Zong H, Ren JM, Young LH, et al. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 15983-15987.
- [15] Li Y, Xu S, Mihaylova MM, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 13: 376-388.
- [16] Li J, Zhong L, Wang F, et al. Dissecting the role of AMP-activated protein kinase in human diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 249-259.
- [17] Kim YM, Kim MY, Kim HJ, et al. Compound C independent of AMPK inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219: 57-64.
- [18] Wang C, Jiang JD, Wu W, et al. The compound of mangiferin-berberine salt has potent activities in modulating lipid and glucose metabolisms in HepG2 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8753436.