

## 二苯甲酰甲烷类卤酚的合成、活性评价及与 CAV-1 的相互作用

刘恒江<sup>1#</sup>, 程宁宁<sup>1#</sup>, 张梦如<sup>1</sup>, 原红霞<sup>2</sup>, 张圆琳<sup>2</sup>, 冯秀娥<sup>1\*</sup>, 李青山<sup>1,2\*</sup>

(1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 山西中医药大学, 基于炎性反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室, 山西 晋中 030619)

**摘要:** 小窝蛋白-1 (CAV-1) 与炎症、氧化损伤、免疫密切相关。为了获得靶向 CAV-1 且具有强抗炎抗氧化作用的二苯甲酰甲烷类卤酚, 本文以不同基团取代的酰氯与邻羟基苯乙酮为起始原料, 经 Baker-ventaraman 重排、脱甲基反应合成了 29 个目标卤酚, 并采用生物膜干涉 (BLI) 技术, 定量研究其与 CAV-1 的相互作用, 同时评价其体外抗炎和抗氧化作用。结果表明, 化合物 **A6**、**A17**、**A18**、**A29** 既与 CAV-1 有特异性结合, 又具有很强的抗炎和抗氧化作用, 这些化合物可能是通过直接作用于 CAV-1, 进而影响炎症和氧化应激相关的信号通路。尤其是, 该类化合物对 IL-1 $\beta$  和 COX-2 的抑制作用最为显著, 而 IL-1 $\beta$  是关节炎发生环节的关键调控角色。因此, 该类化合物可能在防治关节炎方面有重要的应用前景。

**关键词:** 二苯甲酰甲烷; 合成; 小窝蛋白-1; 抗炎; 抗氧化

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3493-10

## Synthesis, bioactivity evaluation of dibenzoyl methane halophenols and their interactions with CAV-1

LIU Heng-jiang<sup>1#</sup>, CHENG Ning-ning<sup>1#</sup>, ZHANG Meng-ru<sup>1</sup>, YUAN Hong-xia<sup>2</sup>, ZHANG Yuan-lin<sup>2</sup>, FENG Xiu-e<sup>1\*</sup>, LI Qing-shan<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shanxi Key Laboratory of Innovative Drug for the Treatment of Serious Diseases Basing on the Chronic Inflammation, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**Abstract:** Caveolin-1 (CAV-1) is related to inflammation, oxidative damage, and immunity. In order to obtain a series of dibenzoylmethane halophenols with strong anti-inflammatory and antioxidant effects targeting CAV-1, twenty-nine target compounds were therefore synthesized by Baker-Ventaraman rearrangement and demethylation reaction, starting from the substituted benzoyl chloride and *o*-hydroxyacetophenone, and their interactions with CAV-1 were investigated by BLI technique. Their *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant properties were also evaluated. The results showed that compounds **A6**, **A17**, **A18**, and **A29** not only specifically bind to CAV-1, but also present strong anti-inflammatory and antioxidant effects. These results suggest that this class of compounds can affect the signaling pathways related to inflammation and oxidative stress by directly acting on CAV-1. In particular, these compounds exhibit the most significantly inhibitory effects on IL-1 $\beta$  and COX-2 release. IL-1 $\beta$  plays a key regulatory role in the development of arthritis. Therefore, it is worth expecting for the application of such compounds

收稿日期: 2021-07-16; 修回日期: 2021-08-24.

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项 (2018ZX09711001-001-017); 山西省重点研发计划 (重点) 项目 (201703D111033); 山西省自然科学基金资助项目 (201901D111209).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 13191058319, E-mail: xiuefeng@163.com;

Tel: 86-351-3985190, E-mail: sxlqs2012@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1051

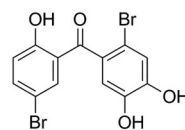
in the prevention and treatment of arthritis.

**Key words:** dibenzoyl methane; synthesis; caveolin-1; anti-inflammation; anti-oxidation

炎症是机体组织在各种损伤因素刺激下的一种防御反应,与动脉粥样硬化、糖尿病和关节炎等多种慢性疾病密切相关<sup>[1-4]</sup>。免疫细胞过量释放NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6和COX-2等炎症介质,可导致细胞信号通路调控的改变,进而改变机体的病理反应<sup>[5-7]</sup>。因此,抑制炎症因子释放,研发新型高效低毒的抗炎药物始终是医药领域的重要命题。小窝是一种直径为50~80 nm的细胞质膜结构,主要由胆固醇、糖酯及小窝蛋白(caveolin)组成<sup>[8]</sup>。CAV-1(caveolin-1)是位于小窝表面的标志性蛋白,广泛分布于哺乳动物的内皮细胞、脂肪细胞和血管平滑肌细胞中,近年发现,CAV-1还广泛表达于免疫细胞,参与巨噬细胞分化与凋亡的调节、B淋巴细胞活化和抗原呈递过程、T淋巴细胞共刺激信号以及免疫突触活动、中性粒细胞介导的炎症反应<sup>[9]</sup>。

课题组前期合成了二苯甲酮、二苯甲烷、苯基咪喃甲酮等不同骨架类型的系列卤酚化合物,通过体内外系统的活性筛选获得了苗头化合物2,4',5'-三羟基-5,2'-二溴二苯甲酮(LM49,图1),其具有很强的抗大鼠急性肾盂肾炎、动脉粥样硬化、糖尿病肾病等多种药理活性,而抗炎、抗氧化应激和调节免疫是其发挥药理活性的主要机制,CAV-1是其抑制炎症保护细胞的关键蛋白<sup>[10-16]</sup>。二苯甲酰甲烷(DBM)是从胀果甘草中提取的一种黄酮类天然产物,其结构是与两个苯环共轭的1,3- $\beta$ -二酮,与LM49的骨架结构高度相似,较LM49更为柔性,能与多种受体结合,呈现出抗炎、抗氧化和抗肿瘤等广泛的生物活性<sup>[17-20]</sup>。本文以LM49为先导化合物,以DBM骨架替代二苯甲酮,在母核上引入羟基、卤素、甲基、乙基、叔丁基、三氟甲基等多种基团,设计合成系列DBM类卤酚,采用生物膜干

涉(BLI)技术<sup>[21]</sup>,定量研究化合物与炎症相关蛋白CAV-1的相互作用,并评价其体外抗炎、抗氧化活性,以期获得靶向CAV-1且具有强抗炎抗氧化活性的候选药物。



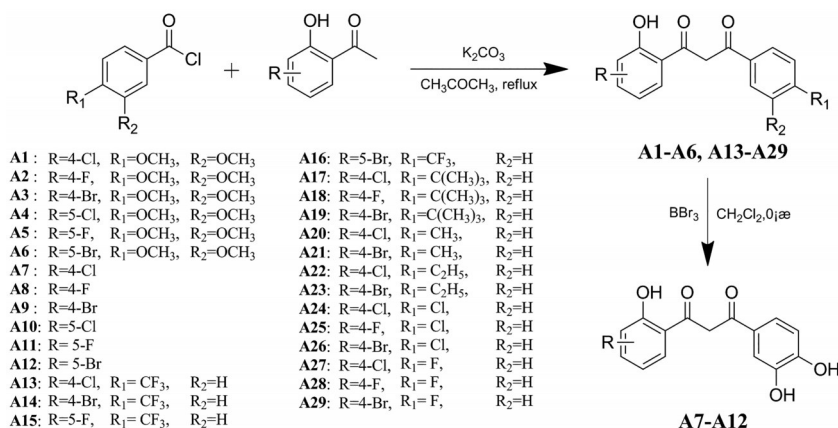
**Figure 1** Chemical structure of the lead compound LM49

## 结果与讨论

### 1 化合物的合成

目标化合物A1~A29的合成见合成路线1,3,4-二甲氧基苯甲酰氯在无水碳酸钾的催化下和不同卤素取代的邻羟基苯乙酮发生Baker-ventaraman重排生成关键中间体A1~A6,通过三溴化硼脱甲基获得A7~A12。以不同基团取代的邻羟基苯乙酮和苯甲酰氯为原料,直接反应得到A13~A29。合成的化合物理化性质和波谱数据分别见表1、2。

Baker-ventaraman重排是关键中间体邻酰氧基苯乙酮重排得到邻羟基苯基 $\beta$ -二酮,常用碳酸钾、氢氧化钾、氯化钠、吡啶、三苯甲基钠等作为催化剂。本文选择碳酸钾为催化剂,在制备DBM类卤酚的过程中,发现取代的邻羟基苯乙酮与碳酸钾的最佳摩尔比为1:6时,产率较高。薄层色谱(TLC)监控反应进程,发现目标化合物会经历酯化、重排的反应过程,表现在薄层色谱上即酚羟基显色从无到有,并在365 nm波长下,有强烈的黄色荧光。酰氯上的取代基不同,反应快慢差别较大,当酰氯上有三氟甲基、卤素等吸电子基团



**Scheme 1** Synthesis route of target compounds A1-A29

**Table 1** Physical properties and purities of target compounds.\*New compound; <sup>a</sup>Detected by HPLC

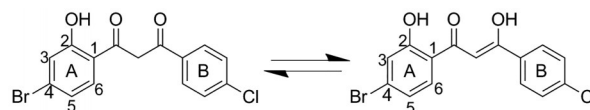
Compd.	Appearance	mp/°C	Overall yield/%	Purity /% <sup>a</sup>
A1	Yellow solid	246–249	41.7	99.67
A2*	Yellow solid	112–114	30.1	99.63
A3*	Yellow solid	153–155	32.9	99.07
A4	Yellow solid	245–248	28.3	99.00
A5*	Yellow solid	142–144	23.3	100.00
A6*	Yellow solid	127–130	37.9	99.67
A7*	Yellow solid	149–152	12.7	99.18
A8*	Yellow solid	130–133	15.1	99.50
A9*	Yellow solid	160–163	14.4	99.15
A10*	Yellow solid	163–165	12.8	100.00
A11*	Yellow solid	150–153	10.1	99.49
A12*	Yellow solid	170–172	15.6	99.04
A13*	Yellow solid	302–305	33.3	99.20
A14*	Yellow solid	278–280	55.5	99.28
A15*	Yellow solid	168–170	47.6	99.36
A16*	Yellow solid	147–151	55.8	100.00
A17*	Yellow solid	125–130	13.4	100.00
A18*	Yellow solid	187–191	11.7	99.42
A19*	Yellow solid	232–236	10.9	99.40
A20*	Yellow solid	160–162	41.4	99.11
A21*	Yellow solid	175–177	45.4	100.00
A22*	Yellow solid	237–240	11.3	100.00
A23*	Yellow solid	222–225	9.3	100.00
A24*	Yellow solid	187–191	45.8	100.00
A25*	Yellow solid	250–253	40.7	100.00
A26*	Yellow solid	185–188	55.2	100.00
A27*	Yellow solid	202–205	38.7	100.00
A28*	Yellow solid	247–250	39.1	100.00
A29*	Yellow solid	192–195	55.6	100.00

**Table 2** Spectra data of target compounds

Compd.	<sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, MS, and HR-MS
A1	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.74 (s, 1H), 12.28 (s, 1H), 7.68 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.89 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 3.98 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.7, 178.2, 162.9, 153.1, 149.2, 141.1, 129.2, 125.9, 121.0, 119.6, 118.8, 117.6, 110.8, 109.5, 91.7, 56.1, 56.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 335.39 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 335.068 6, found 335.069 0.
A2	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.67 (s, 1H), 12.47 (s, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.46 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.69–6.63 (m, 3H), 3.98 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 184.7, 171.8, 163.4, 153.4, 149.2, 132.0, 128.6, 127.7, 122.2, 121.7, 111.7, 110.5, 104.7, 104.5, 92.3, 56.2, 56.0. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 318.44 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> FO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 319.098 2, found 319.098 2.
A3	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.76 (s, 1H), 12.25 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.46 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 3.98 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.8, 178.3, 162.7, 149.1, 129.7, 129.2, 125.9, 122.5, 121.9, 121.8, 121.0, 110.7, 109.4, 91.1, 77.3, 63.6, 56.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 401.05 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> BrO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 379.018 1, found 379.017 7.
A4	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.84 (s, 1H), 12.04 (s, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 7.61 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.40 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1H), 6.97 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.95 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.00 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.3, 171.2, 170.5, 161.3, 155.9, 153.9, 142.1, 135.8, 131.6, 123.8, 121.3, 110.5, 109.6, 106.7, 91.1, 56.2, 56.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 336.93 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 335.068 6, found 335.068 9.
A5	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.86 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.56 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 3.98 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 184.7, 171.8, 163.4, 153.4, 149.2, 132.0, 128.6, 127.7, 122.2, 121.7, 111.7, 110.5, 104.7, 104.5, 92.3, 56.2, 56.0. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 317.42 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> FO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 319.098 2, found 319.099 4.
A6	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.84 (s, 1H), 12.06 (s, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 13.1 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.98 (s, 6H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 184.6, 175.3, 168.0, 152.7, 149.1, 138.1, 130.5, 128.4, 124.3, 121.0, 120.7, 110.5, 110.1, 109.7, 91.7, 63.7, 56.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 419.55 ([M+K] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI+): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> BrO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 379.018 1, found 379.019 8.

时, 反应时间约需 24 h; 酰氯上有甲基、乙基、叔丁基、邻二甲氧基等给电子基团时, 反应最慢, 需 24~72 h 反应才会结束。BBr<sub>3</sub> 遇水会产生大量气体, 所以脱甲基反应所用溶剂要做除水处理, 且反应会大量放热, 需缓慢滴加 BBr<sub>3</sub>。

DBM 类卤酚属于 β-二酮类化合物, 可能存在酮式-烯醇式的互变异构。以 CDCl<sub>3</sub> 作溶剂, 对目标化合物进行 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 表征时, 发现其并不是 β-二酮结构, 而是烯醇式构型。但是, 并不能准确说明是结构上的哪个羰基形成烯醇式。因此, 进一步采取 HMBC 谱进行确证, 以化合物 A26 为例 (图 2), 以 CDCl<sub>3</sub> 为溶剂, 一维氢谱显示在 δ = 15.40 和 δ = 12.15 处有两个羟基的吸收峰, δ = 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) 是 A 环上 6 号位的氢; 碳谱上只在 δ = 195.0 位移处出现一个羰基碳; HMBC 谱图结果表明: 羰基碳 (δ = 195.0) 与 δ = 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) 处的氢远程相关, 与 B 环上氢未见相关。由此可说明, 羰基碳紧邻 A 环, 化合物 A26 在 CDCl<sub>3</sub> 中主要以烯醇式结构存在。其他所有目标化合物在 CDCl<sub>3</sub> 溶剂中表征时都出现了同样的情况。

**Figure 2** Keto-enol tautomerism of compound A26

Continued

Compd.	<sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, MS, and HR-MS
A7	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.33 (s, 1H), 7.91 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 0.6 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.69 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.0, 177.9, 163.0, 150.4, 145.7, 141.2, 139.8, 129.4, 120.2, 119.7, 118.8, 112.9, 110.8, 110.4, 91.3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 305.21 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 307.037 3, found 307.038 1.
A8	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.52 (s, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.52 (s, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.97 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.8, 177.5, 165.8, 148.3, 130.6, 121.0, 120.1, 115.4, 113.9, 112.9, 110.4, 107.2, 105.4, 105.2, 91.0. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 289.38 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> FO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 291.066 9, found 291.066 9.
A9	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.32 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.06 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.71 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ: 195.0, 185.2, 179.7, 158.3, 153.1, 151.5, 146.3, 137.1, 131.6, 127.4, 121.5, 119.5, 111.0, 105.3, 95.6. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 349.19 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> BrO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 350.986 8, found 350.985 7.
A10	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.09 (s, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.68 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 195.8, 178.5, 160.8, 145.8, 135.3, 129.8, 127.6, 126.4, 121.3, 120.3, 115.5, 113.0, 110.4, 110.1, 91.3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 305.22 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 307.037 3, found 307.036 9.
A11	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 11.89 (s, 1H), 7.80 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.66 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.1, 184.9, 155.6, 151.5, 146.0, 125.9, 123.4, 121.4, 121.0, 119.4, 119.3, 116.1, 115.1, 114.8, 95.3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 290.52 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> FO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 291.066 9, found 291.066 8.
A12	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.68 (s, 1H), 12.07 (s, 1H), 7.83 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.51 (s, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.90 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.1, 183.9, 169.7, 163.9, 152.3, 138.9, 138.0, 133.8, 130.6, 127.3, 122.9, 120.7, 116.1, 115.5, 91.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 348.46 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> BrO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 350.986 8, found 350.987 5.
A13	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.28 (s, 1H), 12.16 (s, 1H), 8.04 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 7.75 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ: 195.1, 183.7, 182.8, 170.8, 168.9, 164.2, 162.8, 146.7, 144.7, 136.4, 130.0, 128.2, 125.4, 120.9, 117.5, 92.6. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 341.14 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 343.034 9, found 343.035 8.
A14	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.15 (s, 1H), 8.07 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.78 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.25 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 7.10 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 195.4, 175.6, 163.1, 136.8, 134.1, 130.7, 129.5, 129.5, 127.2, 127.2, 125.9, 125.8, 122.8, 122.1, 117.7, 93.2. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 385.28 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> BrF <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 386.984 4, found 386.984 2.
A15	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.35 (s, 1H), 11.72 (s, 1H), 8.04 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 7.43 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.76 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 195.1, 176.0, 158.8, 156.0, 154.4, 136.7, 134.1, 127.2, 125.8, 124.5, 123.6, 120.2, 118.5, 113.6, 113.4, 93.2. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 325.27 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> F <sub>4</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 327.064 4, found 327.065 7.
A16	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.32 (s, 1H), 11.94 (s, 1H), 8.07 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.87 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.77 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.56 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.93 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ: 194.0, 182.3, 166.8, 161.1, 146.9, 135.8, 130.5, 128.3, 125.8, 125.5, 123.7, 123.5, 120.4, 115.1, 109.6, 93.5. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 385.27 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> BrF <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 386.984 4, found 386.984 6.
A17	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.47 (s, 1H), 12.32 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.90 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 1.36 (s, 9H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.4, 178.2, 163.1, 156.6, 129.4, 128.9, 126.8×2, 125.8, 119.7, 118.8, 117.7, 91.8, 40.9, 35.1, 31.1×3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 353.15 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 331.110 1, found 331.111 5.
A18	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.40 (s, 1H), 12.50 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.78 (dd, <i>J</i> = 8.9, 6.4 Hz, 1H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.69 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 6.65 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 1H), 1.36 (s, 9H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.4, 178.3, 163.7, 156.5, 130.7, 129.4, 128.4, 126.7×2, 125.8×2, 107.4, 107.2, 105.4, 91.7, 35.1, 31.1×3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 337.88 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> FO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 315.139 6, found 315.140 5.
A19	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.48 (s, 1H), 12.29 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.62 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.06 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 1.36 (s, 9H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.1, 173.8, 162.9, 156.7, 129.9, 129.4, 126.8, 125.9, 122.6, 122.1, 121.9, 121.3, 91.7, 35.2, 31.1×3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 375.32 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> BrO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 375.059 6, found 375.059 8.
A20	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.49 (s, 1H), 12.31 (s, 1H), 7.84 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.70 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.02 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.89 (dd, <i>J</i> = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 2.44 (s, 3H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.4, 178.2, 163.1, 143.6, 141.3, 129.7, 129.4, 128.4, 127.2, 126.9, 119.7, 118.8, 91.6, 21.7. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 310.82 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 289.063 1, found 289.063 6.

Continued

Compd.	<sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, MS, and HR-MS
A21	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 12.31 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.64 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 2H), 7.22 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.07 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 2.46 (s, 3H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.8, 176.9, 164.6, 162.9, 130.2, 129.6, 129.3, 129.2, 122.6, 122.1, 117.8, 116.2, 91.9, 19.3. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 354.99 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> BrO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 333.012 6, found 333.012 5.
A22	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.49 (s, 1H), 12.32 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.70 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.90 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 2.73 (s, 2H), 1.25 (s, 3H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 195.3, 176.4, 155.1, 140.7, 138.1, 136.4, 128.4, 127.0, 118.8, 109.2, 105.9, 101.9, 91.7, 29.7, 15.2. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 325.13 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 303.078 8, found 303.079 1.
A23	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.50 (s, 1H), 12.27 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.62 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 2.73 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 1.26 (s, 3H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ: 192.0, 184.9, 182.4, 164.7, 147.1, 146.0, 140.7, 135.9, 128.6, 127.6, 121.1, 117.5, 89.9, 28.6, 15.8. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 369.11 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> BrO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 347.028 3, found 347.029 9.
A24	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.40 (s, 1H), 12.20 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.03 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 6.91 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 193.6, 176.1, 163.7, 152.4, 147.3, 137.9, 129.5, 128.2, 124.5, 119.8, 114.2, 110.6, 92.2. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 307.22 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 309.008 5, found 309.008 4.
A25	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.34 (s, 1H), 12.38 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.65 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.7, 176.0, 165.1, 138.8, 131.9, 130.7, 129.1, 128.1, 115.8, 107.5, 107.4, 105.5, 105.3, 92.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 315.10 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClFO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 293.038 1, found 293.038 8.
A26	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.40 (s, 1H), 12.15 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.59 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.20 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 7.05 (dd, <i>J</i> = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 195.0, 176.5, 162.9, 138.9, 131.8, 130.3, 129.4, 129.1, 128.1, 122.6, 122.0, 117.8, 92.1. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 353.37 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> BrClO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 352.958 0, found 352.957 9.
A27	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.48 (s, 1H), 12.21 (s, 1H), 7.95 (dd, <i>J</i> = 8.8, 5.4 Hz, 2H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.18 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.02 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 6.90 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.6, 176.8, 163.1, 141.6, 132.0, 129.6, 129.4, 129.3, 129.2, 119.7, 118.9, 117.5, 116.1, 116.0, 91.9. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 315.12 ([M+Na] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClFO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 293.038 1, found 293.038 3.
A28	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.42 (s, 1H), 12.40 (s, 1H), 7.95 (dd, <i>J</i> = 8.9, 5.3 Hz, 2H), 7.78 (dd, <i>J</i> = 9.1, 6.4 Hz, 1H), 7.18 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 6.69 (d, <i>J</i> = 4.7 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ: 191.8, 182.2, 164.2, 135.8, 131.1×2, 130.0, 118.5, 115.8, 115.7, 105.9, 105.8, 104.4, 104.3, 92.4. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 275.21 ([M-H] <sup>-</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 277.067 6, found 277.067 7.
A29	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 15.49 (s, 1H), 12.18 (s, 1H), 7.95 (dd, <i>J</i> = 9.2, 5.3 Hz, 2H), 7.61 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.20 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.18 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.06 (dd, <i>J</i> = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H). <sup>13</sup> C NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 194.7, 176.9, 170.5, 162.9, 132.9, 130.2, 129.3, 125.5, 122.6, 122.0, 117.8, 116.1, 115.8, 115.6, 91.9. EI-MS ( <i>m/z</i> ): 337.22 ([M+H] <sup>+</sup> ). HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): <i>m/z</i> calculated for C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> BrFO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 336.987 6, found 336.987 7.

## 2 与 CAV-1 的亲合力及结合特异性评价

CAV-1 参与动脉粥样硬化、糖尿病肾病、急性肾损伤等疾病的发生、发展过程,并在免疫细胞活化引起的炎症过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。通过采用 BLI 技术,定量研究化合物与 CAV-1 的相互作用,发现 DBM 类卤酚能够与 CAV-1 特异性结合,具有较强的亲合力(表 3)。亲合力强弱通过结合解离平衡常数  $K_D$  表达,  $K_D$  越小,表示化合物与 CAV-1 的亲合力越大,结果显示,在  $10^{-4} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内,有 12 个目标化合物与 CAV-1 的结合有明确的浓度依赖性,其亲合力顺序为 **A16 > A18 > A27 > A26 > A22 > A13 > A20 > A29 > A17 > A6 > A1 > A3**。图 3 所示为与 CAV-1 有较强亲和力的化合物的结合动力学过程,横坐标前 60 s 表示化合物与蛋白缓慢结合,后 60 s 表示化合物与蛋白缓慢解离,结合响应信号值随化合物浓度的升高而浓度依赖性的增强,表明化合物与 CAV-1 为特异性结合,提示该类化合

物可直接作用于炎症相关蛋白 CAV-1。

## 3 体外抗炎活性

CAV-1 在小鼠巨噬细胞中广泛表达,并在 LPS 诱导的免疫调节中具有重要作用<sup>[9]</sup>。DBM 可下调小鼠 RAW264.7 细胞中 iNOS 的表达,显著抑制 LPS 诱导的 NO 产生,有效抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的释放,还可剂量依赖性的降低 COX-2 的产生<sup>[17]</sup>。考虑到目标化合物与 CAV-1 存在特异性结合,而 CAV-1 与炎症有重要关联,因此,进一步评价了该类化合物的体外抗炎活性。

### 3.1 细胞毒性检测

目标化合物对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 活力的影响结果表明(表 4):在  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,与空白对照组相比,16 个目标化合物 **A2、A6、A7、A8、A9、A10、A12、A14、A17、A18、A19、A20、A22、A23、A24、A29** 的细胞存活率在 80% 以上,在该浓度下基本没有细胞毒性,

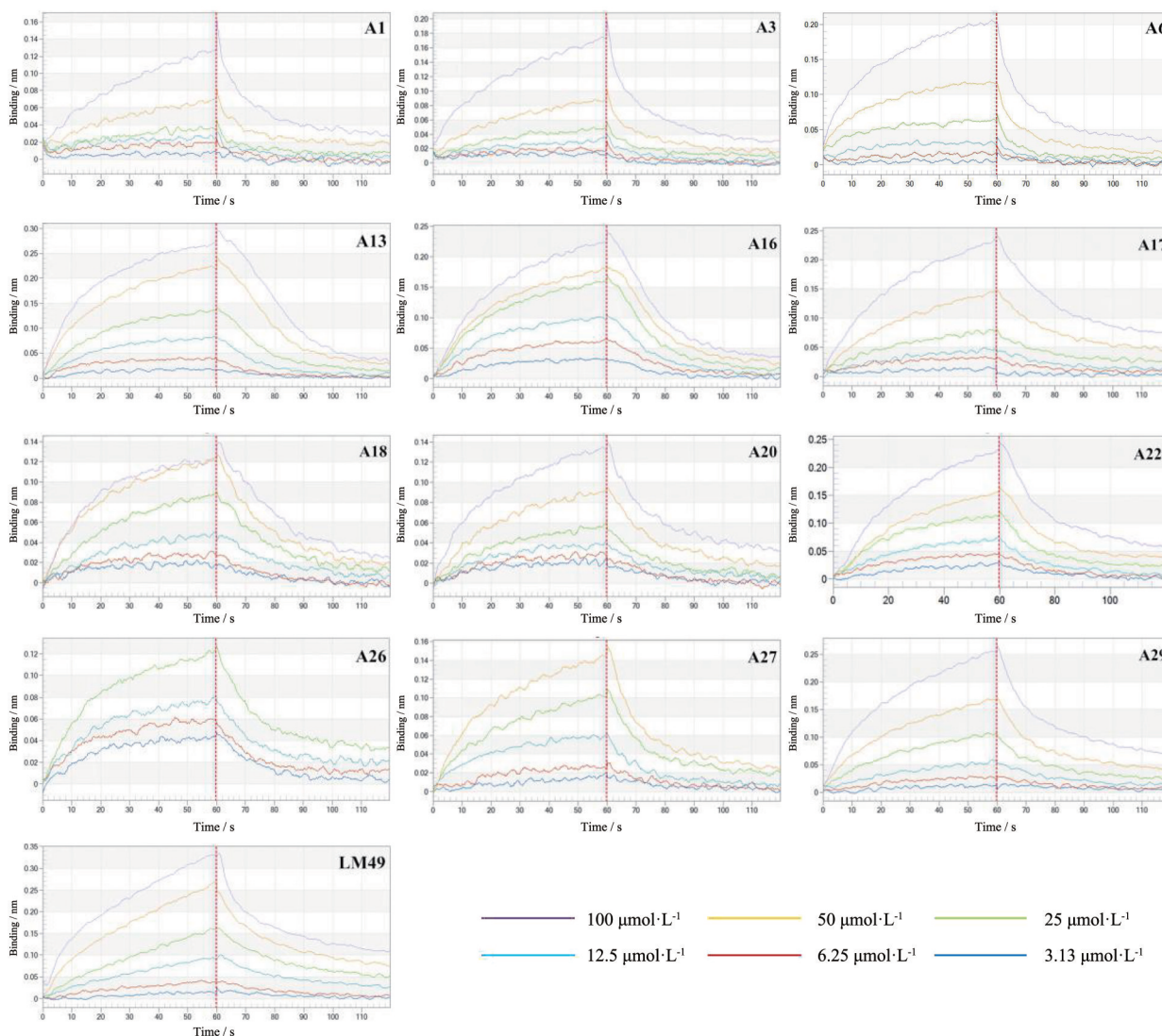


Figure 3 BLI analysis of compounds binding to CAV-1

Table 3 The dissociation equilibrium constant of target compounds and CAV-1

Compd.	$K_D/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Compd.	$K_D/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
A1	$2.36\times 10^{-4}$	A20	$5.42\times 10^{-5}$
A3	$3.08\times 10^{-4}$	A22	$4.89\times 10^{-5}$
A6	$1.78\times 10^{-4}$	A26	$4.58\times 10^{-5}$
A13	$5.21\times 10^{-5}$	A27	$3.56\times 10^{-5}$
A16	$2.03\times 10^{-5}$	A29	$7.36\times 10^{-5}$
A17	$9.25\times 10^{-5}$	LM49	$3.79\times 10^{-5}$
A18	$2.58\times 10^{-5}$		

安全性较高。

### 3.2 体外抗炎活性评价

3.2.1 化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 采用 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为炎症模型, 以塞来昔布为阳性对照, 采用 Griess 法测定 16 个在  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时无细胞毒性的化合物对 NO 释放量的影响<sup>[15]</sup>。表 5 结果显示, 5 个化合物 A7、A8、

Table 4 The survival rate of target compounds at  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n = 3$ ). <sup>a</sup>Average value by three independent experimental measurements

Compd.	Survival rate/% <sup>a</sup>	Compd.	Survival rate/% <sup>a</sup>
A1	76.7	A16	71.4
A2	95.4	A17	84.7
A3	74.8	A18	97.0
A4	74.7	A19	91.3
A5	74.4	A20	98.0
A6	82.2	A21	75.2
A7	90.4	A22	94.1
A8	99.7	A23	92.4
A9	87.8	A24	90.3
A10	99.0	A25	74.4
A11	78.3	A26	70.2
A12	97.6	A27	70.9
A13	71.5	A28	78.8
A14	91.1	A29	94.6
A15	72.8	LM49	99.8

**Table 5** The inhibitory effects of target compounds on NO release. Celecoxib was used as a positive reference compound. <sup>a</sup>Average value by three independent experimental measurements at 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . <sup>b</sup>Means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). N.D.: Not detected

Compd.	Inhibition rate/% <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>b</sup>	Compd.	Inhibition rate/% <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>b</sup>
A2	22	N.D.	A17	10	N.D.
A6	45	N.D.	A18	10	N.D.
A7	89	6.51 $\pm$ 0.36	A19	31	N.D.
A8	73	—	A20	8	N.D.
A9	66	N.D.	A22	28	N.D.
A10	91	3.93 $\pm$ 0.24	A23	39	N.D.
A12	90	5.36 $\pm$ 0.26	A24	26	N.D.
A14	40	N.D.	A29	73	—
Celecoxib	58	17.89 $\pm$ 3.19	LM49	75	—

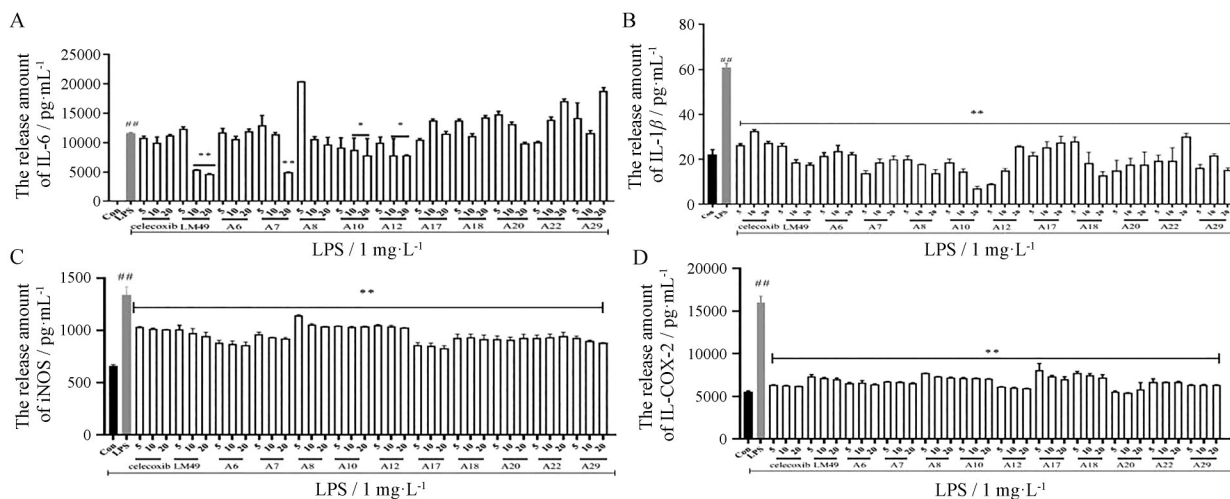
A10、A12、A29在20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均可显著抑制NO的释放,对NO抑制率大于70%,显著高于阳性对照塞来昔布(抑制率为58%)。在1.25~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度梯度下测定其IC<sub>50</sub>值,化合物A7、A10、A12均可剂量依赖性的抑制NO释放,活性顺序为A10 > A12 > A7, A7、A10、A12对NO的IC<sub>50</sub>值分别为6.51  $\pm$  0.36  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3.93  $\pm$  0.24  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5.36  $\pm$  0.26  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,高于阳性药物塞来昔布(IC<sub>50</sub>为17.89  $\pm$  3.19  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。而化合物A8和A29在1.25~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度内量效关系不明显。

**3.2.2 化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS和COX-2的抑制作用** 考虑到其他化合物虽对NO没有显著的抑制活性,但可能通过其他途径抑制炎症。因此,选择20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时无细胞毒性,且与CAV-1特异性结合的5个化合物A6、A17、A18、A20、A22及在20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对NO抑制率大于70%的5个优选化合物A7、A8、A10、A12、A29共10个化合物,采用ELISA法测定其对LPS诱导的RAW264.7细胞培养上清中IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS和COX-2释放量的影响(图4)。与空白对照组相比,LPS可诱导IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS

和COX-2的释放。图4A表明:在5~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,A7、A10、A12可剂量依赖性的显著抑制IL-6释放;图4B~D表明:10个化合物均能显著抑制IL-1 $\beta$ 、iNOS和COX-2的释放,在5~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,A8、A10、A18可剂量依赖性地抑制IL-1 $\beta$ ;A6、A7、A8、A17、A29可浓度依赖性地抑制iNOS释放;A8、A12、A17、A18可剂量依赖性地抑制COX-2释放。化合物A8对IL-1 $\beta$ 、iNOS和COX-2均有显著的抑制作用。化合物A10对NO、IL-6及IL-1 $\beta$ 均有显著的抑制作用。化合物A12可同时抑制NO和COX-2。化合物A17可同时抑制iNOS和COX-2。化合物A18可同时抑制IL-1 $\beta$ 及COX-2。

#### 4 体外抗氧化活性评价

二苯甲酰甲烷类卤酚能够与CAV-1特异性结合,提示该类化合物可能在抑制炎症、抗氧化应激中起着重要的作用。因此,通过测定化合物对DPPH和ABTS自由基的清除能力,进一步评价其抗氧化活性。表6结果表明:不同浓度的化合物对DPPH自由基都具有清除作用,随着浓度提高,清除率也随之不断增加,23个化合物呈现出较好的DPPH自由基清除活性,并具有浓度依赖性。其活性顺序为A18 > A14 > A3 > A26 >



**Figure 4** The inhibitory effects of target compounds on the release of IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS, and COX-2.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs LPS; ## $P < 0.01$  vs Con

Table 6 Scavenging ability of target compounds on DPPH and ABTS free radical

Compd.	IC <sub>50</sub> /mg·mL <sup>-1</sup>		Compd.	IC <sub>50</sub> /mg·mL <sup>-1</sup>	
	Scavenging ability on DPPH	Scavenging ability on ABTS		Scavenging ability on DPPH	Scavenging ability on ABTS
A1	4.01 ± 0.07	1.26 ± 0.13	A16	1.89 ± 0.14	1.81 ± 0.10
A2	4.02 ± 0.07	1.58 ± 0.14	A17	3.51 ± 0.08	2.07 ± 0.10
A3	1.30 ± 0.17	1.58 ± 0.13	A18	0.76 ± 0.21	1.60 ± 0.11
A4	3.64 ± 0.05	—	A19	2.54 ± 0.12	3.35 ± 0.10
A5	2.81 ± 0.03	—	A20	1.57 ± 0.15	1.12 ± 0.13
A6	3.01 ± 0.05	1.85 ± 0.11	A21	3.95 ± 0.07	—
A7	—	—	A22	3.21 ± 0.09	1.07 ± 0.07
A8	—	0.36 ± 0.03	A23	1.85 ± 0.13	1.16 ± 0.11
A9	—	—	A24	3.21 ± 0.05	1.23 ± 0.05
A10	—	0.63 ± 0.09	A25	2.29 ± 0.01	—
A11	—	—	A26	1.36 ± 0.16	1.80 ± 0.08
A12	—	—	A27	4.57 ± 0.01	—
A13	3.98 ± 0.08	0.81 ± 0.19	A28	2.73 ± 0.10	1.23 ± 0.07
A14	1.19 ± 0.22	1.77 ± 0.13	A29	2.08 ± 0.13	1.55 ± 0.13
A15	2.13 ± 0.07	1.97 ± 0.04			
LM49	2.63 ± 0.07	0.32 ± 0.07	Trolox	0.18 ± 0.05	1.40 ± 0.14

A20 > A23 > A16 > A29 > A15 > A25 > A19 > A28 > A5 > A6 > A24 > A22 > A17 > A4 > A21 > A13 > A1 > A2 > A27, 其中 A18 的 DPPH 自由基清除能力最强, 与阳性对照 trolox (0.18 ± 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>) 相当, 优于先导物 LM49。20 个化合物有 ABTS 自由基清除活性, 其活性顺序为 A8 > A10 > A13 > A22 > A20 > A23 > A24 > A28 > A1 > A29 > A2 ≈ A3 > A18 > A14 > A26 > A16 > A6 > A15 > A17 > A19, 9 个化合物的清除能力优于阳性对照 trolox, 其中 A8、A10、A13 的清除能力最强, 与先导化合物 LM49 相当。

## 小结

本文合成的 29 个二苯甲酰甲烷类卤酚中, 27 个未见文献报道。12 个化合物与 CAV-1 存在特异性结合, 其中, 化合物 A6、A17、A18、A29 既与 CAV-1 有特异性结合, 又具有很强的抗炎和抗氧化作用, 化合物 A18 可显著抑制 IL-1β, 化合物 A6、A17、A29 可显著抑制 iNOS, 化合物 A17、A18 可显著抑制 COX-2, 这些化合物可能是通过特异性结合 CAV-1, 进而影响炎症和氧化应激相关的信号通路。此外, 化合物 A7、A8、A10、A12 虽与 CAV-1 没有直接相互作用, 但是, 也显示了很强的抗炎作用, 可同时抑制 IL-6 和 COX-2 的释放, 化合物 A8、A10 可显著抑制 IL-1β, A7、A8、A12 可有效抑制 iNOS, 而且, 结构中含有邻位酚羟基的化合物 A8、A10 同时具有最强的 ABTS 自由基清除活性。值得注意的是, 该类化合物对 IL-1β 和 COX-2 的抑制作用最为明显, 而 IL-1β 是关节炎发生的驱动因素, 在关节炎发作期间产生的大量促炎细胞因子中, IL-1β 充当着关键的调控角色<sup>[22]</sup>。因此, 该类化合物在防治关节炎方面可

能有重要的研究价值。

## 实验部分

化合物熔点采用 X-4 显微熔点仪测定 (温度未经校正); 化合物纯度采用 Waters Acquity Arc 型高效液相色谱仪检测; 核磁共振氢谱、碳谱采用 Bruker-Avance 600NMR 核磁共振仪测定 (TMS 为内标); 质谱采用 Waters ZQ-2000 质谱仪测定; BLI 实验采用 Forte Bio Octet Red 96e 型生物膜干涉仪; 吸光度的测定选用 Epoch 型酶标检测仪。

薄层色谱用硅胶 GF254 购于青岛海洋化工厂; CAV-1 蛋白购自武汉云克隆科技股份有限公司; 标准胎牛血清、DMEM 高糖、RAW264.7 细胞均由武汉博士德生物工程有限公司提供; NO 测试盒由北京普利莱生物公司提供; IL-6、IL-1β、iNOS 和 COX-2 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供; 主要试剂 5-氯-2-羟基苯乙酮、5-氟-2-羟基苯乙酮、5-溴-2-羟基苯乙酮、4-氯-2-羟基苯乙酮、4-三氟甲基苯甲酰氯、4-叔丁基苯甲酰氯购自北京百灵威有限公司, 4-氟-2-羟基苯乙酮、4-溴-2-羟基苯乙酮、4-甲基苯甲酰氯、4-氯苯甲酰氯、4-氟苯甲酰氯、3,4-二甲氧基苯甲酰氯购自上海迈瑞尔有限公司, 4-乙基苯甲酰氯购自上海阿拉丁有限公司, 其他常规化学试剂均为国产分析纯或化学纯。

## 1 化学合成

### 1.1 1-(3,4-二甲氧基苯基)-3-(4-氯-2-羟基苯基)-1,3-丙二酮 (A1)

将 0.77 mL (5.8 mmol) 4-氯-2-羟基苯乙酮溶于 12 mL 无水丙酮, 加入无水碳酸钾 4.8 g (34 mmol), 将 2.7 mL (17 mmol) 3,4-二甲氧基苯甲酰氯缓慢加入反

应体系中。加热回流, TLC 监控反应进程, 搅拌 24 h, 反应结束后抽滤, 收集固体, 用少量丙酮洗涤后, 加至 100 mL 10% 乙酸中, 充分搅拌, 有气体逸出, 停止冒泡后抽滤, 收集固体, 真空烘箱干燥, 乙醇重结晶, 得到亮黄色粉末 0.82 g, 产率为 41.7%。类似方法制备得到目标化合物 A2~A6、A13~A29, 产率为 9.3%~55.8%。

### 1.2 1-(3,4-二羟基苯基)-3-(4-氯-2-羟基苯基)-1,3-丙二酮 (A7)

取 50 mg 化合物 A1 溶于少量无水二氯甲烷, 在 -30 °C 下, 滴加 1.0 mol·L<sup>-1</sup> 的 BBr<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 1.0 mL, 反应 30 min 后, 升至室温反应 2 h, TLC 监测, FeCl<sub>3</sub> 溶液显色, 反应结束后, 将反应液倒入冰水淬灭, 抽滤, 真空烘箱干燥, 乙醇重结晶, 得到 22 mg 黄色固体, 产率为 12.7%。类似方法制备得到 A8~A12, 产率为 10.1%~15.6%。

## 2 目标化合物的纯度测定

采用 Waters Acquity Arc 型高效液相色谱仪测定化合物纯度, 色谱条件: Diamonsil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇/水为流动相进行线性梯度洗脱: 5:95 洗脱 40 min, 95:5 洗脱 10 min, 5:95 洗脱 10 min; 化合物 A1~A29 的检测波长分别为 251.0、251.0、268.0、384.9、384.0、254.0、385.0、379.0、346.0、348.0、385.0、390.0、261.6、262.8、247.2、363.0、234.0、234.0、234.0、363.5、363.0、363.0、363.0、363.0、360.0、363.0、361.0、358.0、363.0 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。

## 3 BLI 实验

采用 Forte Bio Octet Red 96e 型生物膜干涉仪, 含有 5% DMSO 的 PBS 作为工作液。将带有 His 标签的 CAV-1 蛋白包被至 Ni-NTA 生物传感器上, 将获得的传感器分别浸没至含有不同浓度目标化合物的溶液中 (化合物浓度为 3.13、6.25、12.5、25、50 和 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 60 s 作为结合步骤, 然后将传感器浸没至空白对照溶液中 60 s 作为解离步骤。实验中, 未包被 CAV-1 的传感器作为空白对照以消除背景信号; 包被 CAV-1 浸没在空白对照溶液中, 而未与小分子溶液接触的传感器用以消除信号基线漂移。使用 Forte Bio Data Analysis 软件 (v.11.1.0.4) 分析所得数据, 计算结合解离常数。

## 4 细胞毒性检测

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养 24 h, 然后分别加入样品 (终浓度为 20 μmol·L<sup>-1</sup>) 和脂多糖 (LPS) (终质量浓度为 1 mg·L<sup>-1</sup>) 处理 24 h 吸净细胞上清液后, 在各孔中加入 5 g·L<sup>-1</sup> 甲基噻唑基四唑 (MTT) 10 μL 及无血清培养基 100 μL, 继续避光培养 4 h 后, 轻轻吸弃孔内液体, 每孔加入

100 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡使细胞内结晶充分溶解, 于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值。通过以下公式计算出各组的存活率: 存活率 (%) =  $A_{\text{样品组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

## 5 体外抗炎活性研究

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养 24 h, 设空白对照组、LPS 模型组 (1 mg·L<sup>-1</sup>)、化合物 (20 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 LPS 共同作用组、阳性药物和 LPS 共同作用组, 在细胞培养箱内继续培养 24 h 后取细胞培养上清液, 采用 Griess 法测定 NO 释放量。按“抑制率 (%) =  $(A_{\text{模型组}} - A_{\text{样品组}})/(A_{\text{模型组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ ”计算样品对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 NO 的抑制作用。

采用 ELISA 法测定 RAW264.7 细胞培养上清中 IL-6、IL-1β、iNOS 和 COX-2 的释放量。实验分组如下: 空白对照组、LPS 模型组 (1 mg·L<sup>-1</sup>)、化合物 (5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 LPS 共同作用组、阳性对照和 LPS 共同作用组, 在细胞培养箱内继续培养 24 h 后取细胞培养上清液, 采用 ELISA 法测定 IL-6、IL-1β、iNOS 和 COX-2 释放量。按“抑制率 (%) =  $(A_{\text{模型组}} - A_{\text{样品组}})/(A_{\text{模型组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ ”计算样品对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子生成的抑制作用。

## 6 体外抗氧化活性研究

将 96 孔板每孔加入 120 μL DPPH 乙醇溶液, 加 60 μL 不同浓度样品溶液, 混匀, 暗处静置 30 min 后, 在 519 nm 处测定样品的吸光值。清除率 (%) =  $(A_0 - A_{\text{样品}})/A_0 \times 100\%$ 。

将 96 孔板每孔加入 200 μL ABTS 乙醇溶液, 加 10 μL 不同浓度样品溶液, 混匀, 室温避光静置 5 min 后, 在 734 nm 处测定样品的吸光值。抑制率 (%) =  $(A_0 - A_{\text{样品}})/A_0 \times 100\%$ 。

## 7 统计软件

数据以至少 3 个独立实验的平均值 ± 标准差表示, 用 GraphPad Prism 8.0 检验评定各组间的统计显著性。

**作者贡献:** 刘恒江负责化合物的设计合成、抗氧化活性筛选, 程宁宁负责化合物与 CAV-1 的分子互作和纯度测定, 张梦如负责抗炎活性的筛选, 原红霞负责指导分子互作, 张圆琳负责指导化合物的纯度测定, 冯秀娥负责论文的设计、修改、构效关系分析, 李青山负责论文的整体构思。

**利益冲突:** 本文作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Zuo X, Luo JQ, Jiang XH, et al. The anti-atherosclerotic effect and mechanism study of berberine in hyperlipidemic *ApoE*<sup>-/-</sup> mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 104-110.

- [2] Hou BY, Li L, Zhang L, et al. The role of SIRT1 in the treatment of diabetic nephropathy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1625-1630.
- [3] Zhou YJ, Wang H, Li L, et al. Inhibitory effect of kaempferol on inflammatory response of lipopolysaccharide-stimulated human mast cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 702-707.
- [4] Zeng H, Bi HC, Huang M. A review on regulation of drug transporters during inflammation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 773-779.
- [5] Yang L, Shi H, Li YL, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel isobutyl benzophenone derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 256-262.
- [6] Zhao B, Li DT, Luo JR, et al. Synthesis and *in vitro* anti-inflammatory activity of *N*-alkyl-4-alkoxyformylbenzoxazolone derivatives [J]. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2020, 30: 583-588.
- [7] Xu J, Zhao Y, Aisa HA. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. Pharm Biol, 2017, 55: 2095-2101.
- [8] Lu R, Tao LJ, Peng ZZ. Research progress of caveolin 1 in acute and chronic kidney diseases [J]. Chin J Crit Care Med (Electron Ed) (中国急救医学·电子版), 2020, 13: 63-69.
- [9] Zhu Y, Qu C, Zou W. Role of caveolin-1 in regulation of immunity [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2016, 32: 267-273.
- [10] Feng XE, Wang QJ, Gao J, et al. Synthesis of novel nitrogen-containing heterocycle bromophenols and their interaction with keap1 protein by molecular docking [J]. Molecules, 2017, 22: 2142.
- [11] Zhang YL, Feng XE, Chang RR, et al. Therapeutic effects of 5,2'-dibromo-2,4',5'-trihydroxydiphenylmethanone (LM49) in an experimental rat model of acute pyelonephritis by immunomodulation and anti-inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 155-164.
- [12] Li QS, Feng XE, Chang RR, et al. Application of two halophenol compounds in the drug preparation against type II diabetic nephropathy: CN, ZL201610278158.4 [P]. 2018-10-02.
- [13] Li QS, Feng XE, Ban SR. Application of polyhydroxy brominated benzophenone compounds and their derivatives in the treatment and prevention of atherosclerosis: CN, ZL201210565382.3 [P]. 2014-09-17.
- [14] Feng XE, Liang TG, Gao J, et al. Heme oxygenase-1, a key enzyme for the cytoprotective actions of halophenols by upregulating Nrf2 expression *via* activating Erk1/2 and PI3K/Akt in EA.hy926 cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 7028478.
- [15] Yang F, Cai HH, Feng XE, et al. 5,2'-Dibromo-2,4,5-trihydroxydiphenylmethanone, a novel immunomodulator of T lymphocytes by regulating the CD4<sup>+</sup> T cell subset balance *via* activating the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 487-495.
- [16] Zhang YL. Polyphenol LM49 Protects Vascular Endothelial Cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Injury through Suppressing the Phosphorylation of Caveolin-1 (多酚化合物 LM49 通过抑制 caveolin-1 磷酸化发挥对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的血管内皮细胞的保护作用) [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.
- [17] Kim JH, Kim CY, Kang B. Dibenzoylmethane suppresses lipid accumulation and reactive oxygen species production through regulation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 and insulin signaling in adipocytes [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41: 680.
- [18] Kang B, Kim JH, Kim CY. Dibenzoylmethane, a component of licorice, suppresses monocyte-to-macrophage differentiation and inflammatory responses in human monocytes and mouse macrophages [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41: 1228-1236.
- [19] Cao MN, Wang HX. Dibenzoylmethane protects against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury by activating Nrf2 *via* JNK, AMPK, and calcium signaling [J]. AAPS J, 2017, 19: 1703-1714.
- [20] Lee ES, Kwon MH, Kim HM. Dibenzoylmethane ameliorates lipid-induced inflammation and oxidative injury in diabetic nephropathy [J]. J Endocrinol, 2019, 240: 169-179.
- [21] Desai M, Di R, Fan HZ. Application of bilayer interferometry (BLI) for studying protein-protein interactions in transcription [J]. J Vis Exp, 2019, 149: e59687.
- [22] Cao JM, Wang XX, Guo JY, et al. The proinflammatory role and clinical significance of IL-1 beta in gouty arthritis [J]. Chin J Clin (Electron Ed) (中华临床医师杂志·电子版), 2016, 10: 728-731.