

野黄芩素类似物的设计合成与活性评价

袁雅婷^{1,2}, 吴秀兰¹, 汤凡², 王富江^{2*}, 葛海涛^{1,2*} (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏苏中药业研究院有限公司, 南京 210031)

摘要:目的 合成野黄芩素类似物并对其进行溶解性与生物活性研究。方法 基于先导化合物野黄芩素,通过官能团修饰、电子等排原理、母核开环进行结构设计并合成了12个化合物,通过氢核磁共振(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)、碳核磁共振(¹³C nuclear magnetic resonance, ¹³C-NMR)和质谱(mass spectrometry, MS)对化合物结构进行表征;测定化合物溶解度并通过钙流检测评价所有化合物对瞬时受体电位离子通道香草素亚家族3(transient receptor potential vanilloid 3, TRPV3)的抑制活性;通过建立咪喹莫特(IMQ)诱导银屑病动物模型,选择3种最具潜力的化合物进行的抗银屑病实验。结果 所有化合物溶解度均高于野黄芩素。在钙流实验中,化合物I-01, I-04, I-06显示出较强的TRPV3抑制作用,均优于YHQ,其中, I-06活性最强。银屑病动物实验显示I-06可显著改善银屑病小鼠的病理外观,降低炎症因子IL-6与TNF- α 水平, I-06抗银屑病活性最佳,优于I-01, I-04。结论 该类野黄芩素类似物对银屑病具有潜在的治疗价值,同时,为靶向TRPV3治疗各种皮肤疾病提供了一个新的思路。

关键词:野黄芩素类似物;瞬时受体电位离子通道香草素亚家族3;合成;生物活性

doi:10.11669/cpj.2024.17.007 中图分类号:R914;R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)17-1597-08

Design Synthesis and Bioactivity Evaluation of Scutellarein Derivatives

YUAN Yating^{1,2}, WU Xiulan¹, TANG Fan², WANG Fujian^{2*}, GE Haitao^{1,2*} (1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Suzhong Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize scutellarein derivatives and study their solubility and bioactivity. **METHODS** Based on the lead compound scutellarein, 12 compounds were designed and synthesized using functional group substitution, parent nucleus ring opening, and electron rearrangement principles. The structures of the compounds were characterized through ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS, their solubility was tested, and their transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) inhibitory activities were evaluated through calcium flow detection. An animal model of psoriasis induced by imiquimod (IMQ) was established and the three most active compounds were selected for anti-psoriasis evaluation. **RESULTS** All compounds had higher solubility than scutellarein. In the calcium flow experiment, compounds I-01, I-04, and I-06 showed stronger TRPV3 inhibition than scutellarein, with I-06 having the strongest activity. Animal experiments on psoriasis showed that I-01, I-04, and I-06 could significantly improve the pathological appearance and inflammatory response of psoriasis mice, and I-06 performed the best. **CONCLUSION** This type of modified scutellarein has potential therapeutic value for psoriasis and provides a new approach for targeting TRPV3 to treat various skin diseases.

KEY WORDS: scutellarein derivatives; transient receptor potential vanilloid 3; synthesis; biological activity

瞬时受体电位离子通道香草素亚家族3(transient receptor potential vanilloid 3, TRPV3)是Ca²⁺渗透通道的瞬时受体电位(TRP)家族的成员,广泛表达于皮肤、大脑、背根神经节等器官^[1],响应各种细胞外和细胞内刺激,并参与多种生理和病

理过程^[2-4]。TRPV3是一个治疗银屑病等皮肤疾病的潜在新靶点。已有研究表明,TRPV3在银屑病和Olmsted综合征患者皮肤表皮细胞中表达上调,与皮肤屏障功能,炎症性皮肤病、伤口愈合、疼痛信号的传递和瘙痒密切相关^[5]。在小鼠角化细胞

基金项目:泰州市“凤城英才计划”青年科技人才托举工程项目资助(TZ-018);南京中医药大学自然科学基金项目资助(XZR2020099)

作者简介:袁雅婷,女,硕士研究生 研究方向:药物化学 *通讯作者:王富江,男,博士,高级工程师 研究方向:新药创新药研发研究 Tel:(025)84818165;葛海涛,男,博士,高级工程师 研究方向:中药新药开发研究 Tel:(025)84818165

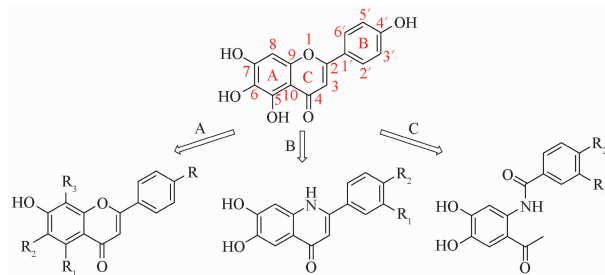
中,TRPV3 通道突变(Gly573^{Ser})可导致血清中 IgE 和 IL-4 水平升高,CD4⁺T 细胞浸润增加,干扰皮肤屏障稳态,抑制真皮毛发生,激活触发 PGE2、ATP、NO 和 NGF 等多种因子的释放,加重皮肤瘙痒、角质增厚及炎症反应,这些症状与银屑病高度相似^[6-7]。近期研究发现 TRPV3 活化介导胞外钙离子内流增加,进而导致皮肤瘙痒感和角质化,诱导银屑病发生^[7-8]。然而,银屑病发病机制复杂有待阐明。

Hydra Biosciences、Glenmark 和 Abbvie 等制药公司对 TRPV3 通道的小分子抑制剂表现出浓厚的兴趣。Hydra Biosciences 先后报道了四氢喹啉酰胺化合物和喹啉酮类化合物作为 TRPV3 抑制剂,半数抑制浓度(inhibitory concentration 50, IC₅₀)均在 0.2 ~ 1 μmol · L⁻¹ 内,有良好的镇痛效果^[9-10]。Glenmark 更是针对 TRPV3 合成一系列噻吩类、铬酰胺类和铬酮类的 TRPV3 拮抗剂^[11]。野黄芩素是一种具有多种生物和药理活性的化合物^[9-14],作为一种新发现的靶向 TRPV3 的抑制剂,通过与 S6 跨膜和孔螺旋形成的口袋结合,直接抑制 TRPV3,从而减少香芹酚诱导的小鼠皮肤炎症、瘙痒和表皮增生^[15]。尽管 TRPV3 抑制剂的开发已经取得一定的进展,但是仍然迫切需要开发具有治疗潜力的新的 TRPV3 抑制剂。

本研究以野黄芩素为先导化合物,利用官能团修饰、电子等排、母核开环等策略进行结构与改造,见图 1。以芳基酮类化合物与苯甲酰氯类化合物为起始原料,运用取代、重排、脱水环化等化学方法,合成 12 个化合物^[16-17],通过氢核磁共振(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)、碳核磁共振(¹³C nuclear magnetic resonance, ¹³C-NMR)和质谱(mass spectrometry, MS)进行结构确证,测定化合物溶解度并通过钙流检测评价所有化合物对 TRPV3 的抑制活性,筛选出 3 种最具活性的化合物进行整体动物抗银屑病活性评价,可为开发治疗 TRPV3 异常所致疾病的药物提供参考。

1 实验部分

核磁共振分析仪氘代二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide-*d*₆, DMSO-*d*₆)或氘代氯仿(chloroform)为溶剂,TMS 为内标,瑞士 Bruker 公司);HPLC(美国 Agilent 公司);电喷雾电离-质谱仪(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)(美国 Thermo



A - 官能团修饰;B - 电子等排;C - 母核开环。

A - functional group modification; B - isosteric replacement; C - parent nucleus ring opening.

图 1 基于野黄芩素结构的靶化合物设计策略

Fig. 1 Design strategy of target compounds based on the structure of scutellarein

Fisher 公司);WRS-2 型微机熔点仪(上海申光仪器有限公司);细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);Lipofectamine TM²⁰⁰⁰(美国 Gibco 公司);咪喹莫特软膏(IMQ,四川明欣药业有限公司);糠酸莫米特软膏(Mom,上海药业闵行有限公司);野黄芩素(苏中药业研究院有限公司);2-氨基乙氧基二苯硼酸酯(2-APB,美国 Sigma 公司);HEK-293 细胞与 h-TRPV3 质粒由中国药科大学曹征宇教授实验室赠;C57BL/6 小鼠由扬州大学比较医学中心提供;均为分析纯。

1.1 化学合成

1.1.1 6,7,4'-三羟基黄酮(I-01)的合成 中间体 I-01c 的合成:将 2-羟基-4,5-二甲氧基苯乙酮(870 mg,4.4 mmol),四氢呋喃(25.0 mL),氢氧化钠(530 mg,13.3 mmol),4-甲氧基苯甲酰氯(750 mg,4.4 mmol)依次加入反应瓶中,60 °C 搅拌 3 h,再于室温搅拌 4 h,至薄层色谱(thinlayer chromatography, TLC)监测原料反应完全,反应结束后,滴加稀乙酸调节 pH 至中性,二氯甲烷萃取,饱和食盐水洗涤 2 至 3 次,分离有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,洗脱剂为二氯甲烷:石油醚(1:1),柱层析得黄色固体 1.0 mg,产率:68.0%,ESI-MS(*m/z*);331.11[M + H]⁺。

中间体 I-01d 的合成:将 1-(2-羟基-4,5-二甲氧基苯基)-3-(4-甲氧基苯)丙烷-1,3-二酮(1.0 g,3.0 mmol),乙酸(4.0 mL)浓硫酸(100 mg)依次加入反应瓶中,室温下搅拌过夜进行合环反应,液相色谱-质谱仪(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)监测原料峰比小于或等于 0.1%,然后加 15.0 mL 纯化水,氢氧化钠水溶液调节 pH 至中性,加入 20 mL 二氯甲烷溶液萃取,静置分层。取有机

相用饱和食盐水洗涤 2 至 3 次,分离有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,洗脱剂为二氯甲烷-石油醚(体积比为 1:1),柱层析得黄色固体 500 mg,产率:53.0%,ESI-MS(m/z):313.19[M+H]⁺。

I-01 的合成:将 6,7,4'-三甲氧基黄酮(500 mg, 1.6 mmol), 2.0 mol·L⁻¹三溴化硼的二氯甲烷溶液(10.0 mL, 含有 BBr₃ 20.0 mmol)依次加入反应瓶中,氮气保护,室温下搅拌进行去甲基化反应 4 h, LC-MS 监测原料峰比小于或等于 0.1%,旋去溶剂,缓慢滴加甲醇 4.0 mL 淬灭,甲醇旋干,再加入 5.0 mL 甲醇和 5.0 mL 二氯甲烷溶清残余物,然后缓慢滴加 7.0 mL 石油醚,搅拌 2 h,有大量黄色固体析出,过滤,滤饼 50 °C 真空干燥得到黄色固体 320 mg,产率:74.4%。

m. p. 320.1 ~ 323.4 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.39 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 176.3, 162.1, 160.6, 152.2, 150.8, 144.5, 128.0, 122.2, 116.0, 107.8, 104.0, 103.2; ESI-MS(m/z): 271.42[M+H]⁺。

1.1.2 5,7,4'-三羟基黄酮(**I-02**)的合成:橙黄色固体,产率:51.1%。m. p. 345.2 ~ 347.1 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.96 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.19 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 181.2, 163.6, 163.2, 160.9, 160.6, 156.7, 127.9, 120.6, 115.4, 103.2, 102.3, 98.3, 93.4; ESI-MS(m/z): 271.42[M+H]⁺。

1.1.3 5,6,7-三羟基黄酮(**I-03**)的合成:鲜黄色固体,产率:57.8%。m. p. 269.3 ~ 271.2 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.64 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.06 (m, 2H), 7.58 (m, 3H), 6.92 (s, 1H), 6.63 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 172.3, 169.2, 160.3, 150.8, 133.9, 132.2, 129.9, 129.5, 127.7, 102.2, 100.4, 95.8; ESI-MS(m/z): 271.42[M+H]⁺。

1.1.4 7,8,4'-三羟基黄酮(**I-04**)的合成:橙黄色固体,产率:63.5%。m. p. 200.9 ~ 202.3 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.25 (s, 1H), 7.99 (m, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 177.2, 162.7, 160.7, 150.4, 146.6, 133.1,

128.4, 122.1, 117.0, 115.9, 115.1, 113.9, 104.01; ESI-MS(m/z): 271.42[M+H]⁺。

1.1.5 5,8-异丙基-5,7,4'-三羟基黄酮(**I-05**)的合成:橙黄色固体,产率:81.8%。m. p. 186.0 ~ 186.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.04 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.66 (m, 1H), 1.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 182.3, 163.9, 162.0, 161.2, 159.1, 154.7, 128.4, 121.7, 116.2, 111.8, 103.9, 102.8, 98.9, 23.6, 20.8; ESI-MS (m/z): 313.10[M+H]⁺。

目标化合物的 **I-02** ~ **I-05** 合成方法同 **I-01**。

1.1.6 6,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)喹啉-4(1H)-酮(**I-06**)的合成 中间体 **I-06g** 的合成:将 2-氨基-4,5-二甲氧基苯乙酮(500 mg, 2.5 mmol), 四氢呋喃(20.0 mL), 4-甲氧基苯甲酰氯(655 mg, 3.8 mmol), 三乙胺(1.0 mL, 0.728 g, 7.19 mmol), 依次加入反应瓶中,升温至 65 °C,进行酰化反应 4 h,直至 TLC 监测原料反应完全。反应结束后,反应液待冷却至室温,缓慢滴加 20.0 mL 纯化水淬灭反应,二氯甲烷萃取,饱和食盐水洗涤 2 至 3 次,分离有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,洗脱剂为二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚(体积比为 1:1:3),柱层析得淡黄色固体 778 mg,产率:92.2%, ESI-MS (m/z): 329.35[M+H]⁺。

中间体 **I-06h** 的合成 将 N-(2-乙酰基-4,5-二甲氧基苯基)-4-甲氧基苯甲酰胺(330 mg, 1.0 mmol), 1,4-二氧六环(15.0 mL), 氢氧化钠(250 mg, 6.2 mmol), 依次加入反应瓶中,并置换氮气 3 次,升温至 110 °C,进行分子内环合反应 4 h,直至 TLC 监测原料反应完全。反应结束后,反应液冷却至室温,滴加稀醋酸调节 PH 至中性,二氯甲烷萃取,饱和食盐水洗涤 2 ~ 3 次,分离有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,洗脱剂为二氯甲烷-甲醇(体积比为 100:7 至 100:10),柱层析得白色固体 252 mg,产率:81.0%, ESI-MS(m/z): 312.19[M+H]⁺。

I-06 的合成 将 6,7-二甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)喹啉-4(1H)-酮(200 mg, 0.6 mmol), 2.0 mol·L⁻¹三溴化硼的二氯甲烷溶液(2.0 mL, 含有 BBr₃ 4.00 mmol)依次加入反应瓶中,氮气保护,室温下搅拌进行去甲基化反应 4 h, LC-MS 监测原料峰比小于或等于 0.1%,旋去溶剂,缓慢滴加甲醇 4.0 mL 淬灭,甲醇旋干,再依次加入 2.0 mL 甲醇和 2.0 mL

溶清残余物,然后缓慢滴加 4.0 mL 石油醚,搅拌 2 h,有大量橙红色固体析出,过滤,滤饼 50 °C 真空干燥得到橙黄色固体 152 mg,产率:88.3%。

m. p. 276.5 ~ 278.7 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.73 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 10.43 (d, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.05 (m, 3H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 166.3, 160.9, 154.4, 151.2, 147.8, 136.5, 131.1, 122.5, 116.3, 113.4, 104.6, 103.1, 101.2; ESI-MS (*m/z*): 270.07 [M + H]⁺。

1.1.7 2-(3-氟-4-羟基苯基)-6,7-二羟基喹啉-4(1H)-酮(**I-07**)的合成:棕褐色固体,产率:73.3%。 m. p. 232.0 ~ 233.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.75 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.22 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 161.3, 149.4, 146.7, 144.9, 143.4, 142.8, 131.4, 120.3, 117.8, 113.4, 111.2, 108.5, 99.4, 97.8, 96.4; ESI-MS (*m/z*): 288.06 [M + H]⁺。

1.1.8 6,7-二羟基-2-(4-异丙基苯基)喹啉-4(1H)-酮(**I-08**)的合成:淡黄色固体,产率:17.3%。 m. p. 125.0 ~ 126.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.00 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 10.62 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 3.04 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 166.5, 154.7, 152.6, 151.2, 148.2, 136.7, 129.8, 128.5, 127.4, 113.7, 104.6, 103.1, 102.0, 33.5, 23.7; ESI-MS (*m/z*): 296.12 [M + H]⁺。

1.1.9 2-(3,4-二氯苯基)-6,7-二羟基喹啉-4(1H)-酮(**I-09**)的合成:米黄色固体,产率:75.4%。 m. p. 206.2 ~ 207.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.01 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.21 (d, 1H), 7.88 (m, 3H), 7.46 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.87 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 168.9, 153.9, 147.7, 147.3, 136.6, 133.9, 133.5, 132.0, 131.4, 129.9, 128.3, 115.4, 105.3, 103.5, 103.1; ESI-MS (*m/z*): 322.90 [M + H]⁺。

1.1.10 6,7-二羟基-2-苯基喹啉-4(1H)-酮(**I-10**)的合成:淡黄色固体,产率:77.5%。 m. p. 107.5 ~ 111.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.01 (s,

1H), 11.26 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.67 (dd, *J* = 2.0 Hz, 3H), 7.60 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.15 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 166.2, 154.7, 151.1, 148.2, 136.7, 132.3, 131.7, 129.4, 128.4, 113.7, 104.5, 103.1, 102.4; ESI-MS (*m/z*): 254.26 [M + H]⁺。

目标化合物的 **I-07** ~ **I-10** 合成方法同 **I-06**。

1.1.11 N-(2-乙酰基-4,5-二羟基苯基)-3-氟-4-羟基苯甲酰胺(**I-11**)的合成:中间体 **I-11g** 的合成:将 2-氨基-4,5-二甲氧基苯乙酮(2.400 g, 12.3 mmol), 四氢呋喃(30.0 mL), 3-氟-4-甲氧基苯甲酰氯(2.000 g, 10.6 mmol), 三乙胺(2.0 mL), 依次加入反应瓶中,升温至 65 °C,进行酰化反应 4 h,直至 TLC 监测原料反应完全。反应结束后,反应液待冷却至室温,缓慢滴加 20.0 mL 纯化水淬灭反应,二氯甲烷萃取,饱和食盐水洗涤 2 至 3 次,分离有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,洗脱剂为二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚(体积比为 1:1:3),柱层析得淡黄色固体 3.100 g,产率:72.2%, ESI-MS (*m/z*): 347.21 [M + H]⁺。

I-11 的合成:将 N-(2-乙酰基-4,5-二甲氧基苯基)-3-氟-4-甲氧基苯甲酰胺(246 mg, 0.7 mmol), 2.0 mol · L⁻¹ 三溴化硼的二氯甲烷溶液(5.0 mL, 含有 BBr₃ 10.0 mmol) 依次加入反应瓶中,氮气保护,室温下搅拌进行去甲基化反应 4 h, LC-MS 监测原料峰比小于或等于 0.1%,旋去溶剂,缓慢滴加甲醇 4.0 mL 淬灭,甲醇旋干,再依次加入 2.0 mL 甲醇和 5.0 mL 二氯甲烷溶清残余物,搅拌打浆 2 h,溶液呈浑浊状,过滤,滤饼 50 °C 真空干燥得到橙黄色固体 126 mg,产率:57.4%。

m. p. 292.0 ~ 293.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.62 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.12 (t, 1H), 2.56 (s, 3H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 201.6, 163.3, 152.2, 150.8, 148.7, 140.5, 135.4, 126.0, 123.9, 118.8, 117.9, 115.3, 114.3, 106.8, 28.4; ESI-MS (*m/z*): 306.07 [M + H]⁺。

1.1.12 N-(2-乙酰基-4,5-二羟基苯基)-3,4-二氯苯甲酰胺(**I-12**)的合成:淡黄色固体,产率:84.3%。

m. p. 262.0 ~ 263.5 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.72 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 2.56 (s, 1H)。 ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 201.6, 162.1, 152.1, 140.9, 135.2, 134.8, 134.7, 131.9, 131.3, 129.1, 126.9, 118.8, 114.7,

107.0, 28.2; ESI-MS(m/z): 340.01 [M + H]⁺。

目标化合物的 **I-12** 合成方法同 **I-11**。

1.2 溶解度

用 DMSO 配制待测物和对照标准品孕酮的 10 mmol · L⁻¹ 储备液。取 30.0 μL 10.0 mmol · L⁻¹ 待测物储备液, 依次加入 96 孔板, 再加入 970.0 μL 的 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液。于 25 °C, 1 100 r · min⁻¹ 条件下搅拌 2 h。过滤, 转移 5.0 μL 滤液到新的样品板, 加入 5.0 μL DMSO-*d*₆ 和 490.0 μL 50% 乙腈。标准品溶液用 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液终浓度为 3.0 μmol · L⁻¹。通过液质对已知浓度的标准品峰的定性和定量, 代入公式 1 计算待测化合物表观溶解度(C_i)。

$$C_i = (A_i \times V_s \times F \times c_s) / (A_s \times V_i) \quad \text{公式(1)}$$

C_i : 各化合物表观溶解度, A_i : 各化合物峰面积, F : 样品稀释倍数, c_s : 标准品浓度, A_s : 标准品峰面积, V_i : 各化合物进样体积, V_s : 标准品进样体积。

1.3 钙流实验

HEK-293 细胞培养于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中。待细胞密度达 80%, 细胞消化。取 h-TRPV3 质粒及 Lipofectamine TM²⁰⁰⁰ 转染试剂根据使用说明书配制转染体系进行细胞转染, 接种, 每孔 2 × 10⁴ 个细胞。将 2-APB 与各化合物用 DMSO 溶解后, Locke's 缓冲液 (140.0 mmol · L⁻¹ NaCl, 5.0 mmol · L⁻¹ KCl, 2.0 mmol · L⁻¹ CaCl₂, 1.0 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 10.0 mmol · L⁻¹ 葡萄糖和 10.0 mmol · L⁻¹ 细胞实验缓冲液 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, pH 7.40) 分别稀释至终浓度 30.0 μmol · L⁻¹ 与 10.0 μmol · L⁻¹ 备用, 每孔溶液总体积为 150.0 μL。利用 FLIPR Penta 高通量实时荧光检测分析系统检测细胞内钙变化, 在 535 nm 波长下记录不同时间点的荧光值 (FI 值)。实验独立重复 3 次, 并按公式 2 计算钙流抑制率 (RI)。

$$RI = 1 - (FI_{\text{各化合物组}} / FI_{\text{对照组}}) \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

1.4 银屑病动物实验

1.4.1 分组给药与临床外观 35 只无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6 小鼠, 雄, 11 周龄, 剃除背毛, 面积约 2 × 3 cm, 24 h 后, 随机分为 7 组: 对照组 (Control)、模型组 (Model)、糠酸莫米松组 (Mom)、野黄芩素组、**I-01** 组、**I-04** 组、**I-06** 组, 每组 5 只。除空白对照组外, 每天上午涂抹 62.5 mg 咪喹莫特于小鼠背部皮肤造模; 给药 8 h 后, 除 Control 组, 其余各组给予相同剂量 (100 mg, 2% 含药量) 的相应软膏, 连续 5 d。从红斑, 鳞屑,

皮肤增厚 3 个方面对小鼠皮损处严重程度进程进行评分。银屑病面积和严重程度指数 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分标准: 0 ~ 4 分, 严重程度依次为无、轻度、中度、重度。总分为 3 个指标之和 (0 ~ 12 分)。

1.4.2 HE 染色 取下小鼠皮损处皮肤, 生理盐水清洗后, 放入体积分数为 10% 福尔马林溶液组织中固定, 石蜡包埋, 3.0 μm 切片, 进行苏木精-伊红染色。显微镜放大 200 倍, 观察皮损处组织病理学变化并拍照, Image-Pro 计算表皮厚度。

1.4.3 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 取适量组织制成匀浆, 2 000 ~ 3 000 r · min⁻¹, 离心 20 min 取上层清液, 按说明书操作, 检测各组 IL-6、TNF-α 炎症因子水平。

1.5 统计与分析

使用 Graphpad prism 9.5 软件进行统计分析。数据以平均值 ± 标准差表示。2 组样品间数据分析采用 *t* 检验。多组样品间数据分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计意义。

2 结果与讨论

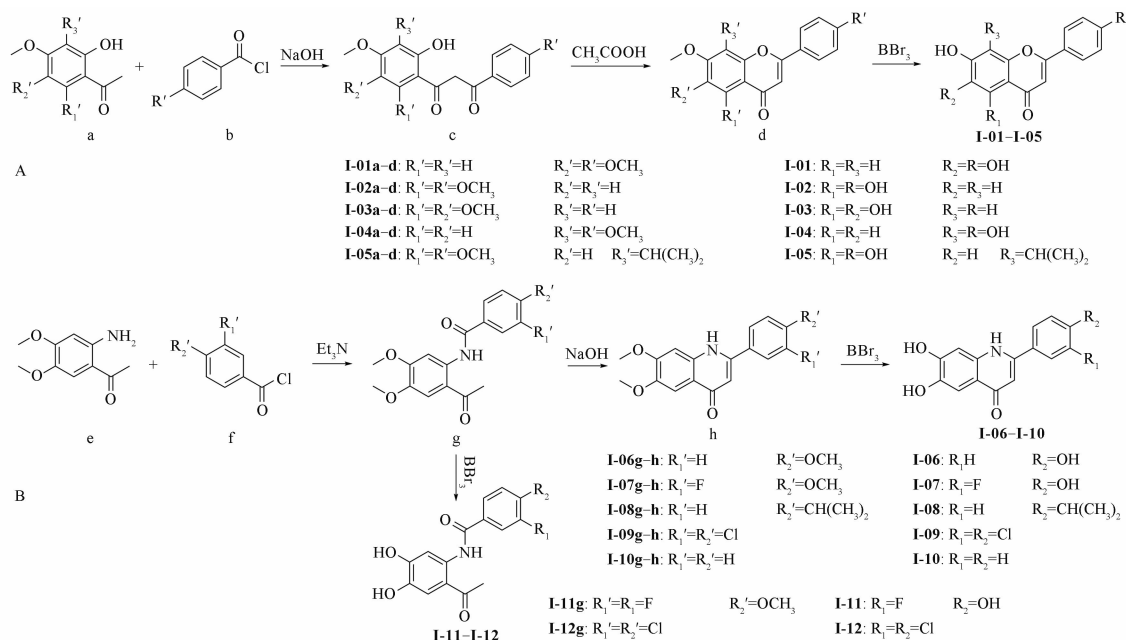
2.1 化学合成

I-01 ~ I-05 合成路线见图 2A, 苯甲酰氯或对甲氧基苯甲酰氯为起始原料与不同取代基的芳基酮类化合物在碱性条件下酯化、重排生成相应的芳香二酮中间体, 接着在酸性条件下发生合环生成相应甲氧基取代的黄酮类化合物, 进一步在脱甲氧基试剂作用下, 获得化合物 **I-01 ~ I-05**。化合物 **I-06 ~ I-12** 合成路线见图 2B, 2-氨基-4,5 二甲氧基苯乙酮与不同取代基的苯甲酰氯化合物生成芳基苯甲酰胺中间体, 再经过脱水合环、脱甲基化反应, 获得化合物 **I-06 ~ I-10**。2-氨基-4,5 二甲氧基苯乙酮为原料与不同取代基的苯甲酰氯化合物发生取代反应、去甲基化得化合物 **I-11 ~ I-12**。

2.2 溶解度与钙流抑制活性

表观溶解度实验结果见表 1, **I-01, I-02, I-03, I-04** 的水溶性高于野黄芩素, 可能是由于 A 环或 B 环上羟基缺失, 破坏了邻近羟基之间, 羟基与其他官能团形成分子内氢键或分子间氢键, 水溶性升高。非平面结构 **I-12, I-11** 的表观溶解度明显高于 **I-07** 和 **I-09**, 这一点证明了化合物 C2 号位与 C3 号位之间双键断裂开环, 破坏了分子平面性, 有利于水溶性的改善。

本研究为评估化合物对 TRPV3 活性的影响,



A - 化合物 **I-01** ~ **I-05** 的 5 条合成路线; B - 化合物 **I-06** ~ **I-12** 的 7 条合成路线; a, b, e, f - 原料; e, d, g, h - 中间产物。

A - synthetic routes of compounds **I-01-I-05**; B - synthetic routes of compounds **I-06-I-12**; a, b, e, f - raw materials; e, d, g, h - intermediates.

图 2 目标化合物 **I-01-I-12** 的 12 条合成路线图

Fig. 2 Synthetic routes of target compounds **I-01** to **I-12**

在 hTRPV3-HEK 293 瞬转细胞系上对 2-APB 诱导的钙流进行了检测^[18]。钙流实验表 1 所示,所有化合物对 2-APB 激活 TRPV3 诱导的钙离子流显示出不同程度的抑制作用。其中, **I-06** 对 TRPV3 活化介导的钙流抑制作用最强, **I-01** 次之, **I-04** 最后。4 种黄酮类化合物 **I-01**, **I-02**, **I-03**, **I-04** 对 TRPV3 活化所介导钙流的抑制作用强于野黄芩素,证明 A 环上 C5, C6 以及 B 环 C4' 号位上

相连的羟基对钙流抑制作用非必需的。 **I-06** 比 **I-01** 显示出更好的抑制活性与溶解度。B 环 C3' 位引入 F 基, **I-07** 表现的活性明显低于 **I-06**, 另外, C3' 与 C4' 号位分别直接连接 Cl 基的化合物 **I-09** TRPV3 抑制活性低于 60%, 由此推测若 B 环存在吸电子基团可削弱化合物抑制活性。化合物 **I-11** 和 **I-12** 表现出比非平面化合物 **I-09**, **I-07** 更低的抑制作用, 可推测化合物平面性会影响小分子化合物与 TRPV3 之间相互作用。

表 1 化合物 **I-01** ~ **I-12** 的溶解度及对钙流抑制率。 $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Solubility and calcium influx inhibition rates of compounds **I-01** to **I-12**. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Compounds	$c/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RI/%
YHQ	14.54	70.24 ± 0.91
I-01	266.44	86.28 ± 1.40
I-02	138.23	76.40 ± 1.11
I-03	116.52	73.64 ± 0.52
I-04	270.18	83.00 ± 0.23
I-05	29.90	70.78 ± 0.40
I-06	311.09	90.65 ± 0.06
I-07	207.04	70.49 ± 0.53
I-08	27.73	71.82 ± 0.73
I-09	51.54	52.63 ± 1.28
I-10	250.75	74.05 ± 0.30
I-11	249.76	48.35 ± 0.24
I-12	219.14	41.87 ± 1.96

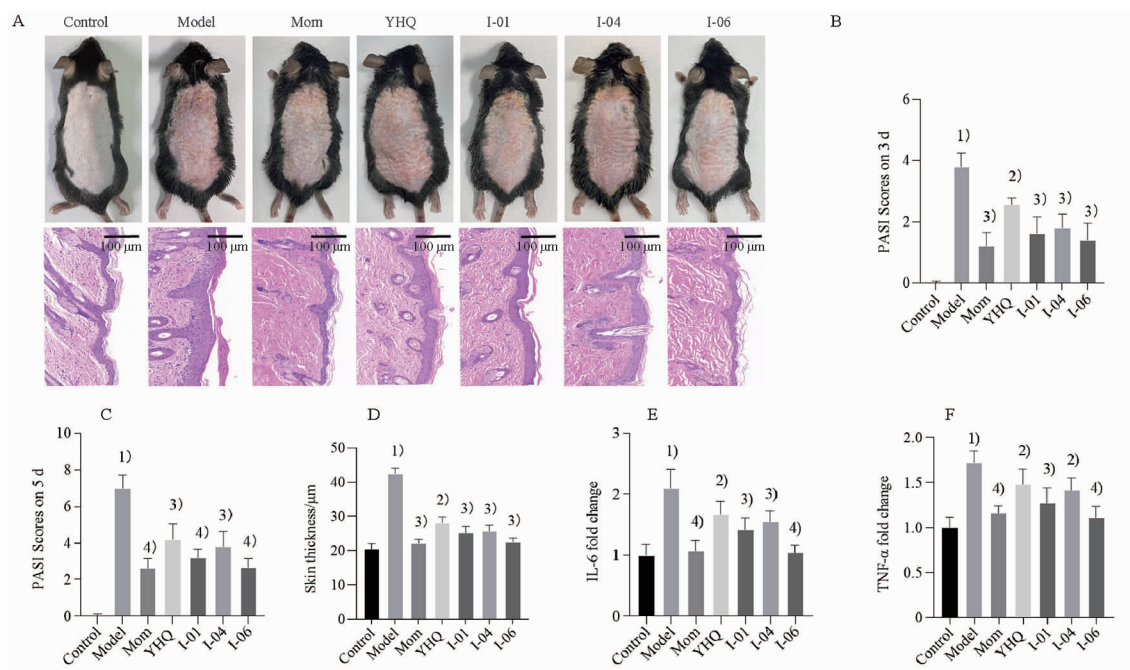
总之, 部分羟基(A 环上 C5, C6 以及 B 环 C4' 位) 缺失对 TRPV3 活性的影响较低, 但有助于化合物溶解度提高; 在改善 TRPV3 抑制活性与溶解度方面 C 环 1 号位的 NH 基比 C 环 1 号位的 O 基更重要; C 环 C2 与 C3 之间的双键断裂, 改变了分子平面性, 破坏了化合物晶体堆积, 有利于化合物的溶解度的改善, 但抑制了化合物的活性。

2.3 抗银屑病活性

通过 IMQ 诱导小鼠银屑病模型进一步研究优势化合物的抗银屑病活性。给药第五天后, Control 组背部皮肤光滑平整, 无红斑、鳞屑、增厚等症状; 与 Control 组相比, Model 组小鼠银屑病样症状严重, 其 PASI 评分显示, 从第 3 天开始, 差异具有显著性 ($P < 0.001$) (图 3A ~ D)。与 Model 组相比, **I-04**, **I-01**, **I-06** 组银屑病小鼠银屑病症状各组依

次减轻,且效果优于野黄芩素组小鼠。HE 染色显示,Control 组小鼠皮肤组织结构未见明显异常,表皮层厚度处于正常范围,毛囊、表皮、真皮层界线清晰可见,炎性细胞浸润较少。Model 组小鼠可明显观察到表皮层增厚、角质不全或角化过度、血管增生和病理性炎症浸润。与 Model 组相比,I-01, I-04, I-06 组可改善炎症浸润组织等病理症状,抑制咪喹莫特诱导表皮异常增厚。ELISA 检测各组 TNF- α 、IL-6 的表达。与 Control 组相比,Model 组

显著上调 IL-6 和 TNF- α 水平显著上调 ($P < 0.001$) (图 3E、F)。与 Model 组相比,I-01, I-04, I-06 组 IL-6 和 TNF- α 显著降低,说明 I-01, I-04, I-06 可抑制 IMQ 诱导的银屑病样皮肤病变中炎性细胞因子的上调,抑制作用 I-06 > I-01 > I-04 > 野黄芩素,其中 I-06 与阳性药 Mom 相当。这些结果表明野黄芩素及其改构体 I-01, I-04, I-06 可以改善 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮肤病变与炎症,且 I-06 活性最佳。



A - 小鼠皮肤外观变化及代表性苏木精-伊红染色法(HE)染色皮肤图像,标尺 = 100 μm ; B - 小鼠第 3 天的银屑病面积和严重程度指数(PASI)评分; C - 小鼠第 5 天的 PASI 评分; D - 各组小鼠表皮厚度; E - 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达水平; F - 白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平; 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.001$ 。

A - changes in the appearance of mouse skin and representative HE stained skin images of mice in each group, scale = 100 μm ; B - PASI scores of mice on the day 3; C - PASI scores of mice on day 5; D - epidermal thickness of mice in each group; E - the expression level of TNF- α ; F - the expression level of IL-6; ¹⁾ $P < 0.001$, vs control group; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.001$, vs model group.

图 3 I-01, I-04, I-06 改善银屑病小鼠皮肤组织的病理状况。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Compounds I-01, I-04, I-06 improved the pathological condition of skin tissue in psoriasis mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

3 结论

本文基于先导化合物野黄芩素,采用官能团替换、电子等排和母核开环的方法,设计合成了 12 个野黄芩素类似物,溶解度均高于野黄芩素,在钙流实验中,所有的化合物显示出一定程度的 TRPV3 抑制活性,其中,化合物 I-06 TRPV3 抑制活性最强,优于 I-01, I-04。动物试验表明,在改善屑病小鼠外观及组织病理,降低皮肤炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平方面,化合物 I-01, I-04, I-06 均优于野黄芩素。其中, I-06 活性最强与阳性药 Mom 相当。本研究可为

TRPV3 抑制剂的开发以及银屑病等相关皮肤疾病等方面提供理论基础。

REFERENCES

[1] WANG G, WANG K. The Ca^{2+} -Permeable cation transient receptor potential TRPV3 channel; an emerging pivotal target for itch and skin diseases[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92(3):193-200.

[2] XU H, RAMSEY I S, KOTECHA S A, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel[J]. *Nature*, 2002, 418(6894):181-186.

[3] LIU Y, QI H, E M, et al. Transient receptor potential va-

- nilloid-3 (TRPV3) activation plays a central role in cardiac fibrosis induced by pressure overload in rats via TGF- β 1 pathway[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2018, 391(2):131-143.
- [4] AIJIMA R, WANG B, TAKAO T, *et al.* The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia[J]. *FASEB J*, 2015, 29(1):182-192.
- [5] ASAKAWA M, YOSHIOKA T, MATSUTANI T, *et al.* Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents[J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(12):2664-2672.
- [6] ASUMALAHTI K, AMEEN M, SUOMALA S, *et al.* Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(4):627-632.
- [7] YOSHIOKA T, IMURA K, ASAKAWA M, *et al.* Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice[J]. *Invest Dermatol*, 2009, 129(3):714-722.
- [8] LIU D, LI Z P, JI S Y. Preparation of artesunate cream and its effect on imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2018, 53(18):1584-1588.
- [9] GOMTSYAN A M, SCHMIDT R G, BAYBURT E K. Synthesis and pharmacology of (Pyridin-2-yl)methanol derivatives as novel and selective transient receptor-potential vanilloid 3 antagonists[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(10):4926-4947.
- [10] CHONG J A, FANGER C, LARSEN G R. Compounds for modulating TRPV3 function; World Intellectual Property Organization, 122156[P], 2006-11-16.
- [11] PRASADARAO L V S, ABRAHAM T, ANANDRAO M D, *et al.* Fused pyrimidine derivatives as TRPV3 modulators; United States, 0292254 [P]. 2010-11-18.
- [12] SHI Y J, HE J, WANG L J, *et al.* Flavonoid constituents in humulus lupulus L[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2023, 58(20):1832-1838.
- [13] LIM J Y, KIM O K, LEE J, *et al.* Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice[J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(4):398. DOI:10.4162/nrp. 2014. 8. 4. 398.
- [14] YANG J Q, ZHENG J, AN J L, *et al.* Synthesis and antibacterial activities of novel osthole sulfonate derivatives[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2022, 57(2):102-108.
- [15] MIAO K, PAN T, MOU Y, *et al.* Scutellarein inhibits BLM-mediated pulmonary fibrosis by affecting fibroblast differentiation, proliferation, and apoptosis[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2020, 11: 204062232094018. DOI:10.1177/2040622320940185.
- [16] TELEB M, ZHANG F X, HUANG J, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel N₃-substituted dihydropyrimidine derivatives as T-type calcium channel blockers and their efficacy as analgesics in mouse models of inflammatory pain[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(6):1926-1938.
- [17] FARGHALY A M, RIZK O H, DARWISH I, *et al.* Design, synthesis, pharmacodynamic and in silico pharmacokinetic evaluation of some novel biginelli-derived pyrimidines and fused pyrimidines as calcium channel blockers[J]. *Molecules*, 2022, 27(7):2240. DOI:10.3390/molecules27072240.
- [18] CHUNG M K, LEE H, MLIZUN A, *et al.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(22):5177-5182.

(收稿日期:2023-12-11)