

类查尔酮 Nrf2 激活剂的合成及 ARE 诱导活性

胡文渊^{1,2}, 陈 婕³, 姜正羽^{1,2}, 王亚楼^{1,2*}, 尤启冬^{1,2**}(中国药科大学¹江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室,²药物化学教研室,南京 210009;³合肥市第八中学,合肥 230071)

摘要 对先导化合物 **CPUY191001** 结构进行改造,以期得到活性更好的 ARE-Nrf2 激活剂。通过羟醛缩合反应合成 17 个目标化合物,采用 MTT 法测试目标化合物的抗增殖活性,并利用荧光素酶报告基因实验考察目标化合物对 ARE 的诱导活性。MTT 数据显示,该系列化合物几乎无细胞毒性($IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$),活性测试结果表明,大部分类查尔酮衍生物对 ARE 具有一定的诱导活性,其中化合物 **2,3,10** 活性较优,且具有浓度依赖性。化合物 **2,3,10** 在抗炎与肿瘤预防治疗药物的研究领域具有一定的应用前景,值得进一步研究。

关键词 查尔酮; Nrf2; Keap1; ARE; 诱导活性

中图分类号 R914.2 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)06-0666-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160606

引用本文 胡文渊,陈婕,姜正羽,等. 类查尔酮 Nrf2 激活剂的合成及 ARE 诱导活性[J]. 中国药科大学学报,2016,47(6):666-672.

Cite this article as: HU Wenyuan, CHEN Jie, JIANG Zhengyu, et al. Synthesis and biological activity of chalcone derivatives as potent activators of Nrf2[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 666-672.

Synthesis and biological activity of chalcone derivatives as potent activators of Nrf2

HU Wenyuan^{1,2}, CHEN Jie³, JIANG Zhengyu^{1,2}, WANG Yalou^{1,2*}, YOU Qidong^{1,2**}

¹Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization; ²Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Hefei No. Eight Senior High School, Hefei 230071, China

Abstract To obtain ARE-Nrf2 potent activators through modifying the structure of the lead compound **CPUY191001**. 17 compounds were synthesized by aldol condensation, their cytotoxicity were tested using MTT assay, and ARE inductivity of these target compounds were analyzed by luciferase reporter gene assay. The biological evaluation results showed that most synthesized chalcone derivatives nearly had no cytotoxicity, and compounds **2,3,10** conducted better activity and in concentration-dependent manner. Compounds **2,3,10** are potential agents in the development of anti-inflammatory and chemoprevention, suggesting that compounds **2,3,10** are worth for further investigation.

Key words chalcone; Nrf2; Keap1; ARE; inductive activity

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81230078, No. 81573346)

转录因子 Nrf2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2)的相对分子质量为 66 kD,含碱性亮氨酸拉链 bZIP,是 CNC(Cap-N-Collar)转录因子家族成员^[1-2]。在生理状态下, Nrf2 与 Keap1 蛋白

(Kelch-like ECH2 associated protein 1, Keap1)结合,使得 Nrf2 泛素化后被降解,使细胞内的 Nrf2 蛋白保持在一个较低水平。在细胞受到活性氧或者亲电刺激时,Keap1 蛋白的构象改变, Nrf2 因而与之

解偶联,在胞浆内累积,并被转移至细胞核内,Nrf2 与核内的 Maf (musculoaponeurptic fibrosarcoma) 蛋白形成二聚体,结合至抗氧化应答元件 (antioxidant response element, ARE) 序列,激活下游保护性基因,从而表达抗氧化酶与 II 相解毒酶等保护性蛋白,发挥细胞保护作用^[3-4]。常见的保护性蛋白有血红素氧合酶、谷胱甘肽-S-转移酶、NAD(P)H 醌氧化还原酶等^[5]。当细胞遭受持续的氧化应激会损伤胞内大分子活性物质,如蛋白质、核酸等,引起慢性炎症,导致众多与炎症相关疾病的发生,如类风湿性关节炎、多发性硬化症、糖尿病、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、帕金森病、阿尔茨海默病以及癌症等^[6-7]。如果 Nrf2 不能足够地从 Nrf2-Keap1 偶联中解离,则会造成 Nrf2 的缺失,从而加剧氧化应激损伤与炎症损伤。因而,Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是细胞抗氧化,维持稳态的关键通路^[8]。

目前,对于激活 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路,主要分为以下两种途径:一是亲电类物质共价修饰 Keap1 蛋白上的半胱氨酸残基,使其构象发生变化,Nrf2 被解离出来,进而累积入核发挥保护性调控作用;二是直接干扰 Keap1 与 Nrf2 的蛋白-蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI)^[9]。最为经典的亲电类 Nrf2 激活剂为富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF) 与 CDDO-Me。富马酸二甲酯由 Biogen Idec 公司研发,2013 年被 FDA 批准用于治疗多发性硬化症。氧化应激与炎症是多发性硬化症的病理生理基础,免疫细胞被激活后,浸润至中枢神经系统,产生大量含氮碎片与活性氧,造成细胞受损。富马酸二甲酯及其代谢产物富马酸单甲酯可激活 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路,防御与修复细胞受损。五环三萜类化合物 CDDO-Me 最初被用于治疗慢性肾病与 2 型糖尿病的临床试验,因其具肾脏毒副作用,终止于临床 III 期实验。因共价结合的 Nrf2 激活剂缺乏选择性和专一性,造成此类激活剂容易出现脱靶效应,引起不良反应。与之相比,竞争性的、直接干扰 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用的 Nrf2 激活剂就具有一定的优势。然而 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用确切的结合位点与结合方式尚不明确,但这类激活剂的研究与开发正日益引起人们的热切关注^[10-11]。

本课题组前期采用 ARE 荧光素酶报告基因方法,对化合物库进行 Nrf2-ARE 诱导活性筛选得到

类查尔酮先导化合物 **CPUY191001**^[12]。该化合物具有 Nrf2-ARE 诱导活性,为进一步探讨其构效关系,本研究以 **CPUY191001** 为先导化合物,进行结构修饰,共合成到 17 个化合物,并评价其细胞抗增殖活性和 Nrf2-ARE 荧光素酶报告基因诱导活性,期望能寻找到毒性低、活性更好的化合物。

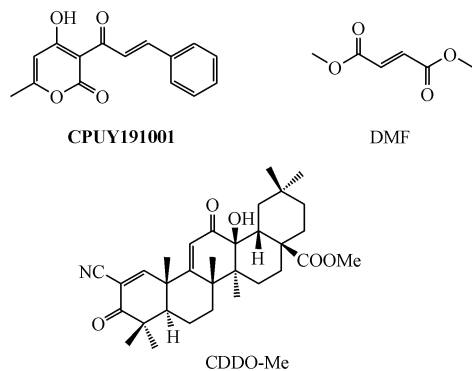
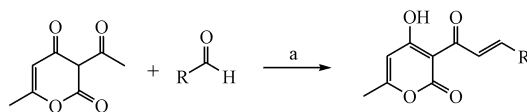


Figure 1 Structures of **CPUY191001**, DMF and CDDO-Me

1 合成方法

在哌啶/ CHCl_3 条件下,以 3-乙酰基-6-甲基-2H-吡喃-2,4-(3H)-二酮与各种芳香醛为反应原料, N_2 保护,60 °C 回流 12 h,经过羟醛缩合反应,得到类查尔酮衍生物 **1** ~ **17**。具体合成路线见路线 1。



Scheme 1 Synthesis of compounds **1-17**

Reagents and conditions: (a) Piperidine, CH_3Cl , 60 °C, 12 h

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

核磁共振谱图 (NMR) 使用 Bruker Avance 300MHz 核磁共振仪测定,TMS 作为内标, CDCl_3 或者 $\text{DMSO}-d_6$ 作为溶剂;质谱数据 (MS) 来源于岛津 GC-MS 2010 型质谱仪 (EI-MS)、Agilent 1946A-MSD 型质谱仪 (ESI-MS) 以及 Q-ToF micro 四极杆飞行时间串联质谱仪 (HRMS)。

人结肠癌 HCT116 细胞株从中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库中购买;HepG2-ARE-C8 细胞由中国药科大学胡容教授赠予;细胞

毒性评价实验的吸收度采用 Elx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Vermont, USA), 荧光素酶诱导实验数据由 luminoskan ascent (美国 Thermo Scientific 公司) 测定; 原料 3-乙酰基-6-甲基-2*H*-吡

喃-2,4(3*H*)-二酮(规格 100g, 纯度 98%) 购自于阿拉丁试剂公司, 实验中所用的芳香醛均购自于安耐吉化学试剂公司。

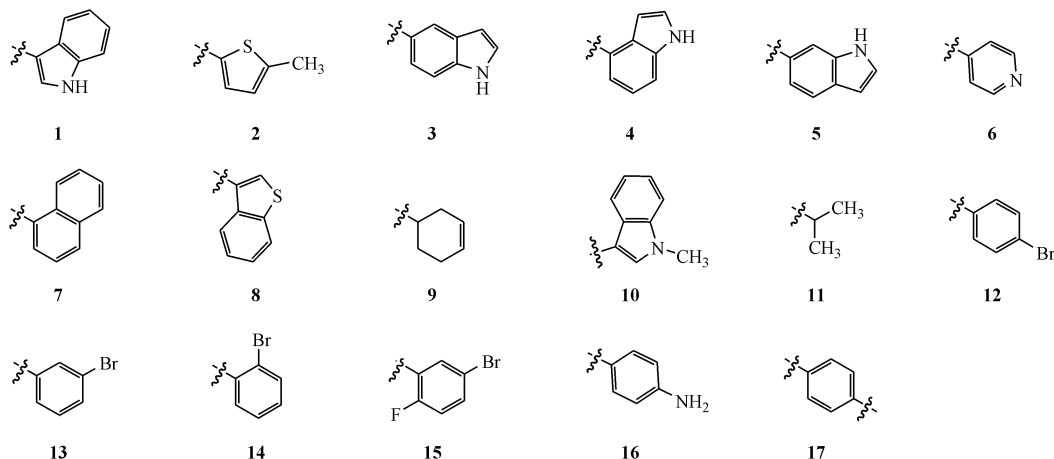


Figure 2 Structure of R groups in compounds 1-17

2.2 化学合成

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(3-吡啶)-2-烯-1-酮(1) 将脱氢乙酸(500 mg, 2.97 mmol)和 3-吡啶甲醛(431.64 mg, 2.97 mmol)溶于 CHCl_3 (4 mL) 中, 滴加哌啶 2 滴, 氮气保护, 60 °C 下反应 12 h。减压蒸馏除去溶剂 CHCl_3 , 乙醇重结晶, 得黄色固体, (476 mg, 54.21%); mp > 250 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.24 (s, 1H, OH), 8.34 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, CH), 8.29 ~ 8.17 (m, 2H, Ar-H), 7.97 (dd, $J = 6.3, 2.9$ Hz, 1H, CH), 7.61 ~ 7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.38 ~ 7.25 (m, 2H, Ar-H), 6.27 ~ 6.20 (m, 1H, Ar-H), 2.28 (s, 3H, CH_3); HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ [M + H] $^+$ 296.0917, Found 296.0917。

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(5-甲基-2-噻吩)-2-烯-1-酮(2) 按化合物(1)的制备方法而得, 得黄色固体(461 mg, 56.11%); mp: 144.5 ~ 146.1 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.04 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, CH), 7.81 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, CH), 7.49 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.00 ~ 6.90 (m, 1H, Ar-H), 6.25 (s, 1H, Ar-H), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.26 (s, 3H, CH_3)。HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}$ [M + H] $^+$ 277.0529, Found 277.0525。

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(5-吡啶)-2-烯-1-酮(3) 按化合物(1)的制备方法而得,

得黄色固体 (508 mg, 57.85%), mp: > 250 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.50 (s, 1H, OH), 8.25 ~ 8.04 (m, 2H, Ar-H), 7.98 (s, 1H), 7.59 ~ 7.40 (m, 3H, Ar-H), 6.56 (d, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H, CH), 6.29 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, CH), 2.27 (s, 3H, CH_3)。HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ [M + H] $^+$ 296.0917, Found 296.0918。

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(4-吡啶)-2-烯-1-酮(4) 按化合物(1)的制备方法而得, 得黄色固体 (514 mg, 57.85%), mp: > 250 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.60 (s, 1H, OH), 8.46 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, CH), 8.22 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH), 7.68 ~ 7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.44 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.20 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar-H), 6.91 (s, 1H, Ar-H), 6.31 (s, 1H, Ar-H), 2.28 (s, 3H, CH_3)。HRMS (ESI): Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ [M + H] $^+$ 296.0917, Found 296.0923。

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(6-吡啶)-2-烯-1-酮(5) 按化合物(1)的制备方法而得, 得黄色固体 (512 mg, 58.31%), mp: > 250 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.49 (s, 1H, OH), 8.21 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH), 8.09 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, CH), 7.81 (s, 1H, Ar-H), 7.68 ~ 7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.45 ~ 7.34 (m, 1H, Ar-H), 6.51 (s, 1H, Ar-H), 6.26 (s, 1H, Ar-H), 2.26 (s, 3H,

CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₇H₁₄NO₄[M + H]⁺ 296.091 7, Found 296.092 0.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(4-吡啶)-2-烯-1-酮(6) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(296 mg, 38.70%), mp: 165.0 ~ 167.0 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.12(t, *J* = 4.3 Hz, 2H, 2CH), 7.80(dd, *J* = 24.8, 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.46(d, *J* = 30.7, 7.7 Hz, 2H, ArH), 6.36(s, 1H, ArH), 2.29(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₄H₁₂NO₄[M + H]⁺ 258.076 1, Found 258.076 1.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(1-萜基)-2-烯-1-酮(7) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(365 mg, 40.07%), mp: 196.5 ~ 198.2 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.34 ~ 8.19(m, 3H, CH, CH, ArH), 8.15 ~ 7.93(m, 3H, ArH), 7.64(p, *J* = 7.4, 6.9 Hz, 3H, ArH), 6.35(s, 1H), 2.28(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₉H₁₅O₄[M + H]⁺ 307.096 5, Found 307.096 4.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(3-苯并噻吩)-2-烯-1-酮(8) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(507 mg, 54.59%), mp: > 250 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.54(s, 1H, CH), 8.33(d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH), 8.25 ~ 8.07(m, 3H, ArH), 7.60 ~ 7.46(m, 2H, ArH), 6.34(s, 1H, ArH), 2.28(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₇H₁₃O₄S[M + H]⁺ 313.052 9, Found 313.052 5.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(3-环己烯基)-2-烯-1-酮(9) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(429 mg, 55.43%), mp: 187.5 ~ 189.3 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.27(s, 1H, ArH), 5.66(s, 2H, CH, CH), 4.59(s, 1H, CH), 2.73(s, 1H, CH), 2.21(s, 3H, CH₃), 2.02(s, 1H, CH), 1.93(s, 5H, CH, CH₂, CH₂), 1.22(s, 1H, CH). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₇O₄[M + H]⁺ 261.112 1, Found 261.112 1.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(3-(1-甲基-1*H*-咪唑))-2-烯-1-酮(10) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(736 mg, 产率 80.02%), mp: > 250 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.33 ~ 8.12(m, 3H, CH, CH, ArH), 8.01 ~ 7.90(m, 1H, ArH), 7.67 ~ 7.56(m, 1H,

ArH), 7.41 ~ 7.30(m, 2H, ArH), 6.22(s, 1H, ArH), 3.88(s, 3H, CH₃), 2.25(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₈H₁₆NO₄[M + H]⁺ 310.107 4, Found 310.107 9.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-异丙基-2-烯-1-酮(11) 按化合物(1)的制备方法而得,得白色固体(244 mg, 36.92%), mp: 164.8 ~ 166.7 °C; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 5.93(s, 1H, ArH), 4.35(s, 1H, CH), 2.27(s, 3H, CH₃), 2.14 ~ 2.00(m, 1H, CH), 1.10 ~ 0.97(m, 7H, CH, CH₃, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₂H₁₅O₄[M + H]⁺ 223.096 5, Found 223.095 5.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(4-溴苯基)-2-烯-1-酮(12) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(589 mg, 59.10%), mp: > 250 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.36 ~ 8.19(m, 3H, ArH, CH, CH), 8.05 ~ 7.88(m, 3H, ArH), 6.37(s, 1H, ArH), 2.29(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₂BrO₄[M + H]⁺ 334.991 3, Found 334.990 4.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(3-溴苯基)-2-烯-1-酮(13) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(373 mg, 37.43%), mp: 160.4 ~ 162.3 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.14(d, *J* = 15.8 Hz, 1H, ArH), 7.94 ~ 7.81(m, 2H, ArH), 7.75(d, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.67(d, *J* = 8.1, 1H, CH), 7.44(t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 6.34(d, *J* = 1.0 Hz, 1H, ArH), 2.28(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₂BrO₄[M - H]⁺ 332.976 0, Found 332.976 2.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(2-溴苯基)-2-烯-1-酮(14) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(311 mg, 产率 31.21%), mp: 161.9 ~ 163.8 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.15 ~ 8.09(m, 2H, ArH), 7.86(d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.78(d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.53(t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.43(t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.35(s, 1H, ArH), 2.30(s, 3H, CH₃). HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₂BrO₄[M - H]⁺ 332.976 8, Found 332.976 7.

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(5-溴-2-氟苯基)-2-烯-1-酮(15) 按化合物(1)的制

备方法而得,得黄色固体(287 mg,27.33%),mp: 164.6~167.2℃;¹H NMR(300 MHz,DMSO-*d*₆) δ: 8.21(d,*J*=16.0 Hz,1H,CH),7.97(d,*J*=15.6 Hz,1H,CH),7.83~7.65(m,2H,ArH),7.33(t,*J*=9.8 Hz,1H,ArH),6.33(s,1H,ArH),2.27(s,3H,CH₃)。HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₉BrFO₄ [M-H]⁺ 350.967 4, Found 350.967 7。

1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(4-氨基苯基)-2-烯-1-酮(16) 中间体(*E*)-3-(3-(4-硝基苯基)丙烯酰基)-4-羟基-6-甲基-2*H*-吡喃-2-酮按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(1.23 g,68.65%),mp: 143.6~144.7℃;¹H NMR(300 MHz,DMSO-*d*₆) δ:12.55(s,1H,OH),8.41~8.26(m,1H,ArH),8.32(s,1H,),7.89(dd,*J*=9.1,4.2 Hz,ArH),7.47(dd,*J*=16.4,4.3 Hz,1H,CH),6.66(d,*J*=4.3 Hz,1H,CH),2.44(s,3H,CH₃)。HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₁NO₆ [M-H]⁺ 300.305 4, Found 300.305 3。将上述制备的中间体1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮-3-(4-硝基苯基)-2-烯-1-酮(500 mg,1.66 mmol)与二氯亚锡二水合物(1.87 g)溶于乙酸乙酯25 mL中,78℃回流4 h,静置,冷却后,反应液用乙酸乙酯120 mL稀释后,加入饱和碳酸氢钠水溶液至无絮状物生成,乙酸乙酯萃取,收集有机层,减压蒸馏除去溶剂后,乙醇重结晶,得红色固体(376 mg,83.51%),mp: 164.6~167.2℃;¹H NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:8.18(d,*J*=15.5 Hz,1H,CH),7.99(d,*J*=15.6 Hz,1H,CH),7.58(d,*J*=8.2 Hz,2H,Ar-H),6.71(d,*J*=8.3 Hz,2H,Ar-H),5.97(s,1H,Ar-H),4.14(s,2H,NH₂),2.30(s,3H,CH₃)。HRMS(ESI): Calcd. for C₁₅H₁₂NO₄ [M-H]⁺ 270.072 2, Found 270.078 1。

1,4-二(1-(3-乙酰基-4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮)-2-烯-1-酮)-苯(17) 按化合物(1)的制备方法而得,得黄色固体(329 mg,50.94%),mp: >250℃;¹H NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:8.37(d,*J*=15.5 Hz,2H,CH,CH),7.95(d,*J*=15.5 Hz,2H,CH,CH),7.74(s,4H,Ar-H),5.99(s,2H,Ar-H),2.30(s,6H,CH₃,CH₃)。HRMS(ESI): Calcd. for C₂₄H₁₇O₈ [M-H]⁺ 433.092 9, Found 433.092 0。

2.3 细胞毒性评价

采用 MTT 法评价本研究 17 个化合物对

HCT116 细胞的抗增殖活性。实验结果见表 1。其中大部分化合物的 IC₅₀ > 50 μmol/L,表明该系列化合物的细胞毒性较弱,其能够保证化合物在激活 Nrf2 的浓度范围内不产生明显的细胞毒性作用,符合 Nrf2 激活剂的安全性要求。

Table 1 Antiproliferative activity of target compounds against cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compd.	IC ₅₀ /(μmol/L)
1	>100
2	>100
3	>100
4	72.30 ± 1.31
5	45.13 ± 1.27
6	58.36 ± 2.04
7	67.13 ± 4.01
8	61.03 ± 1.24
9	41.87 ± 2.56
10	75.14 ± 2.98
11	75.10 ± 5.20
12	52.76 ± 3.47
13	69.49 ± 4.05
14	49.07 ± 2.19
15	55.26 ± 1.98
16	>100
17	>100

2.4 化合物 ARE 诱导活性评价

本研究采用 ARE 荧光素酶报告基因实验评价化合物的 Nrf2-ARE 诱导活性。本实验所用细胞株为 HepG2-ARE-C8。该细胞株在 ARE(Nrf2 调节的二相酶启动子处有一段共有的序列)下游稳定转入一段荧光素酶基因。如化合物能激活 Nrf2-ARE 系统,促进下游基因转录,那么它也将激活荧光素酶基因的转录与表达。荧光素酶催化荧光素底物氧化反应,产生荧光信号。即可通过检测光强度来评价化合物对 Nrf2-ARE 系统的诱导性,诱导倍数=(化合物光强度-空白光强度)/(DMSO 光强度-空白光强度)。各化合物的诱导倍数见表 2。由表中数据可知:其中化合物 12,15,16,17 的诱导倍数略高于先导化合物 CPUY191001;化合物 2,3,10 的诱导倍数明显高于先导化合物 CPUY191001;而其余化合物的诱导倍数不及先导化合物 CPUY191001。据此得出初步的构效关系:(1)右侧结构对化合物的活性有不同影响。当 R 为脂肪环时,化合物 9 的活性显著弱于先导化合物,而当 R 为苯并杂环时,化合物 10 在浓度为 20 μmol/L 时的活性明显优于先导化合物;(2)α,

β -不饱和羰基在吡啶环上的位置不同时,化合物表现出不同的活性(5 位 > 4 位 > 6 位 > 3 位),对应的化合物分别为化合物 **3**,**4**,**5**,**1**,且化合物 **3** 在浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导倍数是先导化合物的 2 倍,即当 α , β -不饱和羰基在吡啶环的 5 位时活性最优。究其原因可能是因为该结构中 α , β -不饱和羰基与吡啶环共轭时,不同位置取代导致吡啶骨架上的吡咯环上电子云富集程度发生变化, α , β -不饱和羰基片段亲电性也发生变化;(3) 溴原子在右侧苯环不同位置取代时,其活性表现为 (**12**) > (**14**) > (**13**),且对位取代的化合物 **12** 的活性表现出浓度依赖性,在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导倍数显著大于先导化合物;此外,双卤素 2-氟-5-溴取代的化合物 **15**,与化合物 **12** 相比,在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 活性

得到保持,且低浓度时(1 $\mu\text{mol/L}$)诱导倍数达到了 3 倍多;由此可见,在苯环上引入氟原子对活性有利;(4) 先导化合物右侧苯环替换成萘环或者苯并噻吩环时,两者活性均减弱,而其他环系化合物与先导化合物比较,活性得到保持或者上升,据此我们推测化合物与 Keap1 的结合区域可能是一个狭长的口袋,萘环与苯并噻吩这种大体积的刚性环不利于与 Keap1 结合而引起活性下降;(5) 本课题组前期研究发现,当苯环替换成无取代基的噻吩环时,其在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导倍数接近于 4^[12],而在本研究中,当噻吩环的 5 位上有甲基取代时(化合物 **2**),5 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导倍数就已经超过了 4,其 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导倍数略有上升。

Table 2 Induction of ARE activity in HepG2-ARE-C8 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compd.	1 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$
1	0.25 \pm 0.56	1.52 \pm 0.34	2.90 \pm 0.07
2	2.34 \pm 0.75	4.69 \pm 1.62	5.58 \pm 0.91
3	1.22 \pm 0.45	1.84 \pm 0.84	6.80 \pm 2.04
4	5.54 \pm 1.01	4.34 \pm 0.61	3.30 \pm 1.22
5	0.26 \pm 0.06	0.88 \pm 0.07	3.36 \pm 0.22
6	2.08 \pm 0.35	1.94 \pm 0.09	2.84 \pm 0.83
7	1.95 \pm 0.22	2.02 \pm 0.01	1.98 \pm 0.04
8	0.77 \pm 0.03	1.43 \pm 0.89	2.68 \pm 0.79
9	0.73 \pm 0.06	1.12 \pm 0.11	2.88 \pm 0.40
10	1.10 \pm 0.17	1.76 \pm 0.13	5.33 \pm 0.48
11	1.24 \pm 0.54	2.00 \pm 0.21	3.14 \pm 0.28
12	1.41 \pm 0.38	2.35 \pm 0.14	4.90 \pm 0.13
13	0.72 \pm 0.06	0.98 \pm 0.12	2.04 \pm 0.41
14	1.44 \pm 0.75	1.59 \pm 0.82	2.99 \pm 0.19
15	3.01 \pm 0.00	4.05 \pm 0.15	4.48 \pm 0.39
16	1.35 \pm 0.21	3.05 \pm 0.07	4.26 \pm 0.48
17	1.09 \pm 0.53	3.08 \pm 0.79	3.98 \pm 0.43
CPUY191001	1.66 \pm 0.79	2.25 \pm 0.67	3.90 \pm 0.07
<i>t</i> BHQ	6.60(100 $\mu\text{mol/L}$)		

3 结 论

本研究合成了一类含 α , β -不饱和酮结构的类查尔酮类化合物,应用类查尔酮化合物骨架,通过结构改造合成了多个衍生物,这些衍生物的化学结构中含有双键,因双键左右两侧连接的基团均为大位阻基团,鉴于化合物结构的稳定性,所以本研究所合成的化合物均以 *E* 构型形式存在。该系列化合物中的 α , β -不饱和酮结构可共价修饰 Keap1 蛋白, Nrf2 与 Keap1 解离, Nrf2 进入到细胞核中,与 ARE 结合,上调细胞保护因子的表达,进而保护细

胞。MTT 实验结果显示,所合成的 17 个化合物 IC₅₀ 都比较高,表明该类化合物细胞毒性较弱,在激活 Nrf2 下游基因的浓度范围内是安全的。荧光素酶报告基因数据表明:化合物 **2**,**3**,**10** 在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 ARE 的诱导活性显著优于先导化合物 **CPUY191001**,且具有浓度依赖性,此外化合物 **3** 在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的 ARE 诱导倍数是先导化合物的 2 倍,活性最优。综上所述,本研究中的化合物 **2**,**3**,**10** 在抗炎、抗癌等治疗药物的研究领域具有一定的应用前景。

参考文献

- [1] Ohnuma T, Nakayama S, Anan E, *et al.* Activation of the Nrf2/ARE pathway via S-alkylation of cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein by falcariindiol, a conjugated diacetylene compound [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **244** (1): 27-36.
- [2] Ting H, Deep G, Agarwal C, *et al.* The strategies to control prostate cancer by chemoprevention approaches [J]. *Mutat Res*, 2014, **760**: 1-15.
- [3] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathways in stress response and cancer evolution [J]. *Genes Cell*, 2011, **16** (2): 123-140.
- [4] Shay KP, Michels AJ, Li W, *et al.* Cap-independent Nrf2 translation is part of a lipoic acid-stimulated detoxification stress response [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1823** (6): 1102-1109.
- [5] Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, *et al.* Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, **24** (4): 559-567.
- [6] Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, **65**: 645-657.
- [7] Reisman SA, Buckley DB, Tanaka Y, *et al.* CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, **236** (1): 109-114.
- [8] Copple IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway—a promising therapeutic target [J]? *Adv Pharmacol*, 2012, **63**: 43-79.
- [9] Marcotte D, Zeng W, Hus JC, *et al.* Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, **21** (14): 4011-4019.
- [10] Rex M, Yuesheng Z, Paonessa JD, *et al.* Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of dithiolethiones as inducers of cytoprotective phase 2 enzymes [J]. *J Med Chem*, 2010, **53** (12): 4761-4767.
- [11] Xi MY, Sun ZY, Sun HP, *et al.* Synthesis and bioevaluation of a series of α -pyrone derivatives as potent activators of Nrf2/ARE pathway (part I) [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, **66**: 364-371.
- [12] Zhang DD. Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2006, **38** (4): 769-789.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》荣获 “2016 年度中国高校优秀科技期刊”称号

近日,据中国高校科技期刊研究会发布的“2016 年度优秀科技期刊入选名单”公示,《中国药科大学学报》被评为“2016 年度中国高校优秀科技期刊”。

此次评选活动旨在不断提高高校科技期刊的学术影响力和编辑出版质量,对高校科技期刊在科研活动和学术交流中所起的作用及其质量做出客观、全面的评价。参选期刊在编校差错率低于万分之三的前提下入围,由数十位评审专家组成的评委会就期刊学术质量和编辑出版质量进行严格的综合审查,利用全文数据库、检索数据库和评价机构等的有关评价成果客观打分,并结合期刊的学术影响力、行业影响力进行遴选。

《中国药科大学学报》编辑部长期以来坚持严谨求实的工作作风、高度重视刊物学术质量,本次获奖是编委会和编辑部为药学学术成果传播共同努力工作的结果。值本刊创刊 60 周年之际,希望广大作者、读者继续关注和支持《中国药科大学学报》,使本刊学术水平和编辑质量更上一个新台阶。

(本刊编辑部)