

合成与应用

7-羧酸类蛇床子素衍生物的合成及其抑制 AKR1C3 活性研究

李启鑫^{1,2}, 李丽明¹, 郑雪花², 姚梓青², 许志森², 孙明娜^{*1,2}

(1.广州医科大学附属中医医院, 广东 广州 510000; 2.广州医科大学 药学院

a.广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, b.呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 511436)

摘要:合成 7-羧酸类蛇床子素衍生物, 评价该类化合物对醛酮还原酶 1C3 (AKR1C3) 催化活性的影响。蛇床子素在三溴化硼的催化下脱除甲基, 生成 7-羟基-8-溴代烷基香豆素中间体 1。在碳酸铯的碱性条件下, 中间体 1 的 7-位羟基与不同的溴代酸酯发生 Williamson 醚化反应, 同时, 8-位溴代烷基在该碱性条件下发生消除溴化氢的反应, 生成 7-位酯类蛇床子素衍生物。随后, 酯类衍生物在氢氧化锂的作用下水解, 进而酸化后得到 7-位含有羧基的蛇床子素衍生物; 利用 HR-MS, ¹HNMR 及 ¹³CNMR 确证化合物的结构; 通过中通量抑酶活性测试方法评价所合成化合物对 AKR1C3 催化活性的影响, 并计算其 IC₅₀ 值。以蛇床子素为起始原料, 经脱甲基、取代、水解反应合成了 8 个 7-羧酸类蛇床子素衍生物, 其中, 7-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基) 庚酸显示出良好的 AKR1C3 抑制活性, 可为后续研究提供一定的依据。

关键词:蛇床子素; 醛酮还原酶 1C3; 羧酸; 合成; 衍生物; 香豆素

中图分类号:R91 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2025)03-0098-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0483

Synthesis and AKR1C3 Inhibitory Activity of 7-Carboxylic Acid Osthole Derivatives Li Qi-xin^{1,2}, Li Li-ming¹, ZHENG Xue-hua², YAO Zi-qing², XU Zhi-sen², SUN Ming-na^{*1,2} (1.The Affiliated TCM Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China; 2a.Key Laboratory of Molecular Target & Clinical Pharmacology, 2b.the State Key Laboratory of Respiratory Disease, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: 7-Carboxylic acid derivatives of osthole were synthesized and their inhibitory effect on the catalytic activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) was evaluated. The demethylation of osthole was catalyzed by boron tribromide to produce the 7-hydroxyl-8-bromoalkylcoumarin intermediate 1. Then, under a basic condition in the presence of cesium carbonate, the 7-hydroxyl group of intermediate 1 reacted with various bromo acid esters via the Williamson etherification, while the 8-bromoalkyl group underwent elimination of hydrogen bromide, finally yielding 7-ester derivatives of osthole. These ester derivatives were subsequently hydrolyzed in the presence of lithium hydroxide, followed by acidification to obtain osthole derivatives containing a carboxyl group at the 7-position. The chemical structures of target compounds were confirmed by HR-MS, ¹HNMR and ¹³CNMR. The effects of the compounds on the catalytic activity of AKR1C3 were evaluated using the medium flux enzyme activity inhibition tests, and the IC₅₀ values were calculated. Eight of 7-carboxylic acid derivatives of osthole were synthesized through demethylation, substitution, and hydrolysis, using osthole as the starting material. Among them, 7-((8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl) oxy) heptanoic acid exhibited good inhibitory activity against AKR1C3, which could provide some basis for subsequent research.

Key words: osthole; aldo-keto reductase 1C3; carboxylic acid; synthesis; derivative; coumarin

醛酮还原酶 (Aldo-Keto Reductases, AKRs) 作为一个庞大的超家族, 能够催化醛和酮类化合物的还原反应^[1]。AKR1C3 是人类 AKR1 超家族的核心

收稿日期: 2024-12-13; 修回日期: 2024-12-18

基金项目: 广州市教育局 2024 年高校科研项目 (2024312183); 广州医科大学科研能力提升项目 (02-410-2405014); 广州医科大学大学生科研创新能力提升项目 (02-408-240603029); 2023 年广东省级大学生创新创业训练计划项目 (S202310570077, S202310570078)。

作者简介: 李启鑫 (2002-), 男, 广东梅州人, 硕士生, 主要研究方向为药物化学。

通讯作者: 孙明娜, E-mail: mingnas85@163.com。

成员之一,是一种存在于人类细胞的多功能转化酶,能够催化人体睾酮以及 17β 雌二醇的合成或分解,具有多种重要的生理作用^[2]。另外,AKR1C3 可以通过调节雄性激素、孕激素等相关激素的合成以及改变激素与其对应受体结合的量,从而提高多种激素相关癌症的发生机率。例如,AKR1C3 可以调节前列腺素 $F_{2\alpha}$ (Prostaglandin $F_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) 的增加或减少来促进或抑制癌细胞的增殖^[3]。研究表明,AKR1C3 在转移性和复发性前列腺异种移植瘤以及去势抵抗性前列腺癌患者骨转移肿瘤中高度表达^[4,5],可通过经典途径和后门途径促进弱雄激素转化为更高活性的雄激素(即睾酮和二氢睾酮),促进危害性更高的去势抵抗性前列腺癌进展。此外,AKR1C3 介导的激素转化可促进乳腺癌细胞增殖^[6],在乳腺癌耐药中也扮演着重要角色,被证明与蒽环类药物,如阿霉素和柔红霉素等的代谢有关。阿霉素(DOX)耐药乳腺癌细胞系 MCF-7/DOX 与亲本 MCF-7 细胞相比,AKR1C3 水平升高,且 AKR1C3 过表达介导的 DOX 耐药性与 PTEN/Akt 通路的激活有关^[7]。蒽环类药物与特异性 AKR1C3 抑制剂(如 2'-羟基黄烷酮)联合用药可能是成功治疗 AKR1C3 过度表达肿瘤的有效策略^[8]。由此可见,AKR1C3 在前列腺癌、乳腺癌等激素依赖性癌症的进展和耐药过程中起着重要作用,被认为是治疗肿瘤的重要靶点,研究 AKR1C3 抑制剂类抗肿瘤药物具有较好的应用前景。

蛇床子素(Osthole),化学名为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素,结构式如图 1 所示,是蛇床子等中药的重要活性成分,具有抗肿瘤、抗骨质疏松、抗炎、抗菌、抗变应性、抗病毒等作用^[9]。多项研究表明,蛇床子素作为自然存在的香豆素类化合物,在抗肿瘤方面表现出明显的活性,主要包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌等。最近研究表明,蛇床子素可通过多种信号传导途径调节多种癌细胞(如肺癌细胞、前列腺癌细胞等)的凋亡、增殖、侵袭和转移等过程^[10]。本课题组前期对蛇床子素的多种生物学活性进行了深入调查分析,主要包括抗肿瘤、抗炎、神经保护、成骨、心血管保护、抗菌和抗寄生虫活性,并针对其来源途径、结构修饰等方面研究进行了较详细的总结^[9]。目前针对蛇床子素的结构修饰研究主要有以下 3 种:内酯环修饰、7-甲氧基的修饰和 8-位异戊烯基的修饰,主要目的是增效减毒、优化性质,如溶解性、稳定性、生物

利用度等。在前期研究中,本课题组合成了蛇床子素 8 位衍生物并研究了其 AKR1C3 抑制作用^[11]。

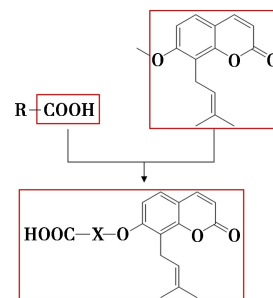


图 1 7-羧酸类蛇床子素衍生物的化学结构

Fig.1 Chemical structure of 7-carboxylic acid osthole derivatives

经调研发现,许多 AKR1C3 抑制剂结构中含有羧酸基团。羧酸基团是与 AKR1C3 催化活性中心的催化残基 Tyr55 和 His117 形成氢键的关键药效团^[12,13]。因此,本文设计以蛇床子素为基础结构,对其 7 位甲氧基进行改造,通过对羟基衍生,合成含有羧酸基团的新型蛇床子素衍生物(图 1),探究修饰后化合物对 AKR1C3 催化活性的影响,期望为筛选高效、特异的 AKR1C3 抑制剂提供实验依据和理论基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

87-1A 型磁力搅拌器、DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器、ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪、SHZ-DI 型循环真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);YZPS-12 型平行合成反应器(岩征仪器(北京)公司);XHDL-20 型低温冷却循环泵(上海霄汉实业发展有限公司);400 MHz TMS 型内标核磁共振波谱仪(日本捷欧路公司);Q Exactive Focus 型四极杆-轨道阱液质联用仪、Fluoroskan Ascent FL 型荧光化学发光微孔板读数仪(美国赛默飞世尔科技公司);BAS1245 型电子分析天平、BSA223S 型万分之一天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);81-2B 型离心机(江苏新康医疗器械有限公司)。

4-溴丁酸乙酯、5-溴戊酸乙酯、6-溴己酸乙酯、7-溴庚酸乙酯、8-溴辛酸乙酯、溴代对甲基肉桂酸甲酯、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(上海毕得医药科技股份有限公司);4-(3-溴丙基)苯甲酸甲酯(上海吉至生化科技有限公司);4-(溴甲基)苯甲酸甲酯(阿法埃莎(中国)化

学有限公司);三溴化硼、三乙胺(安徽泽升科技有限公司);碳酸铯、氢氧化锂(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲醇(广州化学试剂厂);9,10-菲醌、NADPH、甲氯酚那酸(德国 Merck 公司);酶活性测试用二甲亚砜、磷酸二氢盐、氢氧化钠(上海麦克林生化科技股份有限公司);AKR1C3 酶(自制)。所用试剂均为分析纯。

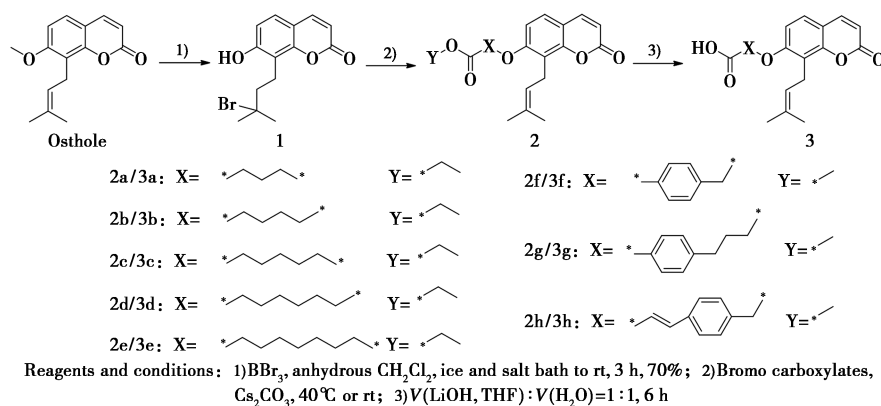


图 2 目标化合物的合成路线

Fig.2 Synthetic routes of the target compounds

1.2.1.1 化合物 1 的制备

称取 244 mg (1.0 mmol) 蛇床子素置于 100 mL 三颈烧瓶中,将反应瓶连接带有氮气管的三通,反复抽真空、充氮气 3 次。将反应瓶置于冰盐浴中 10~15 min,使反应体系降至约 0 °C,注入 4 mL 无水 DCM,待蛇床子素完全溶解后滴加 5 mL (1 mol/L) 三溴化硼二氯甲烷溶液。冰盐浴中保温反应, TLC 监测反应完全(约 3 h)后,用一次性注射器向反应瓶中加入 4 mL 水,淬灭三溴化硼。然后使用 10 mL DCM 萃取 3 次,合并 DCM 层,干燥,抽滤,滤液在 40 °C 下减压浓缩,用石油醚/乙酸乙酯混合溶剂重结晶,过滤即得 161 mg 中间体 1,产率 70%。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz), δ : 10.53 (s, 1H); 7.92 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz); 7.39 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz); 6.85 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz); 6.20 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz); 2.99~2.83 (m, 2H); 2.07~1.92 (m, 2H); 1.83 (s, 6H)。与文献[14]报道数据一致。

1.2.1.2 4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)丁酸乙酯(2a)的制备

称量 115 mg (0.5 mmol) 中间体 1、143 μL (1.0 mmol) 4-溴丁酸乙酯置于 25 mL 圆底烧瓶中,加入 489 mg (1.5 mmol) 碳酸铯,加入 2 mL 无水 DMF,在 40 °C 下搅拌反应(持续约 7 h)。TLC

1.2 实验方法

1.2.1 目标化合物的合成

目标化合物合成路线如图 2 所示:蛇床子素在三溴化硼的作用下脱甲基生成 8-(3-溴-3-甲基丁基)-7-羟基-2H-色烯-2-酮(1);化合物 1 与不同的卤代酸酯进行取代反应生成化合物 2a~2h;后者在氢氧化锂的条件下水解并酸化后得到羧酸类衍生物 3a~3h,即得到目标化合物。

监测反应,待反应中间体 1 完全转化后,向反应瓶中先加入 5 mL 去离子水,用乙酸乙酯萃取 (15 mL $\times$ 3),收集有机相。干燥后进行柱层析分离纯化得化合物 2a。白色固体,产率 70%。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.59 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz); 7.25 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); 6.80 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); 6.21 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz); 5.19 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz); 4.17~4.08 (m, 4H); 3.52 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz); 2.54 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz); 2.19~2.03 (m, 2H); 1.82 (s, 3H); 1.66 (s, 3H); 1.25 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz)。HR-MS, $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 345.168 5 (345.169 7) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

1.2.1.3 5-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)戊酸乙酯(2b)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得淡黄色固体,产率 65%。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.60 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz); 7.26 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); 6.79 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); 6.23 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz); 5.22 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz); 4.16~4.11 (m, 2H); 4.07 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz); 3.54 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz); 2.40 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz); 1.89~1.83 (m, 4H); 1.83 (s, 3H); 1.66 (s, 3H); 1.26 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz)。HR-MS, $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 381.166 4 (381.167 2) [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 。

1.2.1.4 6-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)己酸乙酯(2c)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得白色固体,产率 76%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.23(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 6.89(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.42(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 5.84(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 4.85(t, 1H, $J=7.3$ Hz); 3.76(q, 2H, $J=7.1$ Hz); 3.68(t, 2H, $J=6.3$ Hz); 3.16(d, 2H, $J=7.3$ Hz); 1.97(t, 2H, $J=7.4$ Hz); 1.53~1.46(m, 2H); 1.46(s, 3H); 1.38~1.31(m, 2H); 1.29(s, 3H); 1.21~1.13(m, 2H); 0.88(t, 3H, $J=7.1$ Hz)。HR-MS, $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 395.182 1(395.182 9) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

1.2.1.5 7-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)庚酸乙酯(2d)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得淡黄色固体,产率 83%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.60(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 7.26(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.80(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.22(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.22(t, 1H, $J=8.7$ Hz); 4.13(q, 2H, $J=8.6$ Hz); 4.04(t, 2H, $J=6.4$ Hz); 3.54(d, 2H, $J=7.2$ Hz); 2.31(t, 2H, $J=7.5$ Hz); 1.88~1.85(m, 2H); 1.83(s, 3H); 1.72~1.65(m, 2H); 1.66(s, 3H); 1.57~1.50(m, 2H); 1.47~1.40(m, 2H); 1.25(t, 3H, $J=14.3$ Hz)。HR-MS, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 387.215 5(387.216 6) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.6 8-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)辛酸乙酯(2e)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得淡黄色固体,产率 89%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.60(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 7.25(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.79(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.21(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.22(t, 1H, $J=7.3$ Hz); 4.12(q, 2H, $J=7.1$ Hz); 4.03(t, 2H, $J=6.4$ Hz); 3.53(d, 2H, $J=7.3$ Hz); 2.29(t, 2H, $J=7.5$ Hz); 1.87~1.79(m, 2H); 1.83(s, 3H); 1.67~1.60(m, 2H); 1.65(s, 3H); 1.53~1.46(m, 2H); 1.39~1.35(m, 4H); 1.24(t, 3H, $J=7.1$ Hz)。HR-MS, $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 423.213 3(423.214 2) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

1.2.1.7 4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)苯甲酸甲酯(2f)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得白色固体,产率 60%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 8.11(d, 1H,

$J=1.3$ Hz); 8.02(d, 1H, $J=8.0$ Hz); 7.65(d, 1H, $J=1.5$ Hz); 7.61(d, 1H, $J=9.2$ Hz); 7.49(d, 1H, $J=7.7$ Hz); 7.26(s, 1H); 6.85(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.25(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.25~5.22(m, 1H); 5.22(s, 2H); 3.93(s, 3H); 3.60(d, 2H, $J=7.3$ Hz); 1.75(s, 3H); 1.67(s, 3H)。HR-MS, $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 379.152 8(379.154 0) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.8 4-(3-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)丙基)苯甲酸甲酯(2g)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得白色固体,产率 65%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.97(d, 2H, $J=8.0$ Hz); 7.61(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 7.28~7.24(m, 3H); 6.75(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.24(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.26(t, 1H, $J=7.3$ Hz); 4.04(t, 2H, $J=6.1$ Hz); 3.90(s, 3H); 3.58(d, 2H, $J=7.1$ Hz); 2.91(t, 2H, $J=7.6$ Hz); 2.21~2.15(m, 2H); 1.86(s, 3H); 1.67(s, 3H)。HR-MS, $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 429.166 0(429.167 2) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

1.2.1.9 3-(4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)苯基)丙烯酸甲酯(2h)的制备

参照 1.2.1.2 的合成方法,得白色固体,产率 60%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.70(d, 1H, $J=16.0$ Hz); 7.61(d, 1H, $J=4.8$ Hz); 7.55(d, 2H, $J=8.0$ Hz); 7.44(d, 2H, $J=7.9$ Hz); 7.25(d, 1H, $J=5.6$ Hz); 6.84(dd, 1H, $J=8.4, 4.8$ Hz); 6.46(d, 1H, $J=16.0$ Hz); 6.25(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.24(t, 1H, $J=7.3$ Hz); 5.20(s, 2H); 3.81(s, 3H); 3.60(d, 2H, $J=7.1$ Hz); 1.77(s, 3H); 1.67(s, 3H)。HR-MS, $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 427.150 8(427.151 6) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

1.2.1.10 4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)氧基)丁酸(3a)的制备

称量 35 mg(0.1 mmol)化合物 2a 置于 25 mL 圆底烧瓶中,加入 5 mL 无水 THF,搅拌至固体完全溶解后,加入 5 mL 蒸馏水,然后在搅拌下加入 24 mg(1 mmol)氢氧化锂,室温下搅拌反应。TLC 监测化合物 2a 完全转化后,减压蒸出 THF,用 2 mol/L 稀盐酸调节反应液的 pH 5~6,析出固体,抽滤、干燥后得淡黄色固体,产率 80%。

^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 7.95(d, 1H, J =9.5 Hz); 7.52(d, 1H, J =8.7 Hz); 7.02(d, 1H, J =8.7 Hz); 6.26(d, 1H, J =9.4 Hz); 5.13(t, 1H, J =7.2 Hz); 4.10(t, 2H, J =6.2 Hz); 3.40(d, 2H, J =7.2 Hz); 2.42(t, 2H, J =7.3 Hz); 2.02~1.95(m, 2H); 1.76(s, 3H); 1.62(s, 3H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 174.08, 160.32, 152.21, 144.72, 131.68, 127.15, 121.32, 116.22, 112.64, 112.26, 108.65, 67.5, 30.03, 25.48, 24.26, 21.54, 17.72。 HR-MS, $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 317.137 8(317.138 9) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.11 4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)丁酸(3b)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得淡黄色固体,产率 90%。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 12.05(s, 1H); 7.96(d, 1H, J =9.5 Hz); 7.53(d, 1H, J =8.7 Hz); 7.04(d, 1H, J =8.7 Hz); 6.26(d, 1H, J =9.4 Hz); 5.15(t, 1H, J =9.2 Hz); 4.10(t, 2H, J =6.1 Hz); 3.41(d, 2H, J =7.2 Hz); 2.29(t, 2H, J =7.3 Hz); 1.87~1.75(m, 2H); 1.77(s, 3H); 1.72~1.65(m, 2H); 1.62(s, 3H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 174.37, 160.35, 159.09, 152.23, 144.76, 131.70, 127.14, 121.28, 116.18, 112.58, 112.20, 108.71, 68.07, 33.28, 28.16, 25.49, 21.55, 21.21, 17.74。 HR-MS, $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 331.153 5(331.154 5) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.12 6-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)己酸(3c)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得淡黄色固体,产率 85%。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 12.02(s, 1H); 7.96(d, 1H, J =9.5 Hz); 7.53(d, 1H, J =8.7 Hz); 7.03(d, 1H, J =8.7 Hz); 6.26(d, 1H, J =9.4 Hz); 5.14(t, 1H, J =7.2 Hz); 4.08(t, 2H, J =6.2 Hz); 3.41(d, 2H, J =7.2 Hz); 2.23(t, 2H, J =7.2 Hz); 1.79~1.70(m, 2H); 1.77(s, 3H); 1.62(s, 3H); 1.59~1.53(m, 2H); 1.49~1.41(m, 2H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 174.41, 160.34, 159.1, 152.22, 144.75, 131.64, 127.13, 121.30, 116.17, 112.55, 112.18, 108.72, 68.25, 33.66, 28.45, 25.50, 25.17, 24.23, 21.54, 17.73。 HR-MS, $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 345.169 0(345.170 2) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.13 7-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)庚酸(3d)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得淡黄色固体,产率 87%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.60(d, 1H, J =9.4 Hz); 7.27~7.25(m, 1H); 6.80(d, 1H, J =8.6 Hz); 6.23(d, 1H, J =9.4 Hz); 5.22(t, 1H, J =7.3 Hz); 4.05(t, 2H, J =6.3 Hz); 3.54(d, 2H, J =7.3 Hz); 2.38(t, 2H, J =7.4 Hz); 1.88~1.81(m, 2H); 1.83(s, 3H); 1.70~1.66(m, 2H); 1.66(s, 3H); 1.57~1.50(m, 2H); 1.47~1.40(m, 2H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 174.46, 160.34, 144.75, 131.61, 127.13, 121.32, 116.15, 112.54, 112.17, 68.30, 33.57, 28.56, 28.26, 25.49, 25.29, 24.48, 21.54, 17.72。 HR-MS, $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_5$, 实测值(计算值), m/z : 359.184 3(359.185 8) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.2.1.14 8-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)辛酸(3e)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得淡黄色固体,产率 82%。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.60(d, 1H, J =9.5 Hz); 7.26(d, 1H, J =8.5 Hz); 6.80(d, 1H, J =8.6 Hz); 6.23(d, 1H, J =9.4 Hz); 5.23(t, 1H, J =7.3 Hz); 4.04(t, 2H, J =6.3 Hz); 3.54(d, 2H, J =7.3 Hz); 2.36(t, 2H, J =7.4 Hz); 1.87~1.80(m, 2H); 1.83(s, 3H); 1.70~1.63(m, 2H); 1.66(s, 3H); 1.54~1.47(m, 2H); 1.47~1.39(m, 4H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 174.51, 159.14, 152.22, 144.75, 131.61, 127.14, 121.31, 112.16, 108.68, 68.34, 33.65, 28.66, 28.57, 28.49, 25.50, 25.44, 24.45, 21.55, 17.72。 HR-MS, $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NaO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 395.182 2(395.183 4) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

1.2.1.15 4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)苯甲酸(3f)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得白色固体,产率 60%。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 8.07(d, 1H, J =7.2 Hz); 7.96(d, 1H, J =9.5 Hz); 7.91(d, 1H, J =7.8 Hz); 7.71(d, 1H, J =7.5 Hz); 7.55(d, 1H, J =8.1 Hz); 7.53(d, 1H, J =8.3 Hz); 7.13(d, 1H, J =8.7 Hz); 6.28(d, 1H, J =9.5 Hz); 5.34(s, 2H); 5.16(t, 1H, J =7.2 Hz); 3.45(d, 2H, J =7.1 Hz); 1.67(s, 3H); 1.61(s, 3H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 167.11, 160.25, 158.53, 152.24, 144.93, 144.66, 137.50, 131.93,

131.06, 128.88, 128.84, 128.32, 127.08, 121.09, 116.57, 112.91, 112.52, 109.22, 69.42, 25.45, 21.64, 17.68。HR-MS, $C_{22}H_{21}O_5$, 实测值(计算值), m/z : 365.137 6(365.138 9) $[M+H]^+$ 。

1.2.1.16 4-(3-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)丙基)苯甲酸(3g)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得白色固体,产率 60%。 1H NMR($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ : 7.96(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 7.87(d, 2H, $J=8.1$ Hz); 7.52(d, 1H, $J=8.7$ Hz); 7.34(d, 2H, $J=8.1$ Hz); 7.00(d, 1H, $J=8.7$ Hz); 6.27(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 5.16(t, 1H, $J=7.2$ Hz); 4.08(t, 2H, $J=6.0$ Hz); 3.43(d, 2H, $J=7.1$ Hz); 2.84(t, 2H, $J=7.8$ Hz); 2.12~2.05(m, 2H); 1.78(s, 3H); 1.61(s, 3H)。 ^{13}C NMR($DMSO-d_6$, 101 MHz), δ : 167.28, 160.33, 158.99, 152.24, 146.69, 144.73, 131.67, 129.54, 129.54, 128.58, 128.58, 128.54, 127.17, 121.42, 116.21, 112.27, 112.27, 108.64, 67.51, 31.50, 30.07, 25.50, 21.56, 17.80。HR-MS, $C_{24}H_{25}O_5$, 实测值(计算值), m/z : 393.168 2(393.170 2) $[M+H]^+$ 。

1.2.1.17 3-(4-(8-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮氧基)丙基)苯基)丙烯酸(3h)的制备

参照 1.2.1.10 的合成方法,得白色固体,产率 62%。 1H NMR($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ : 7.95(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 7.71(d, 2H, $J=7.6$ Hz); 7.58(d, 1H, $J=16.2$ Hz); 7.53(d, 1H, $J=4.9$ Hz); 7.51(d, 1H, $J=4.8$ Hz); 7.47(d, 1H, $J=5.0$ Hz); 7.11(d, 1H, $J=8.6$ Hz); 6.56(d, 1H, $J=16.0$ Hz); 6.28(d, 1H, $J=9.5$ Hz); 5.28(s, 2H); 5.15(t, 1H, $J=7.0$ Hz); 3.45(d, 2H, $J=6.9$ Hz); 1.70(s, 3H); 1.61(s, 3H)。 ^{13}C NMR($DMSO-d_6$, 101 MHz), δ : 167.73, 160.30, 158.58, 152.24, 144.73, 144.66, 143.09, 138.66, 134.05, 131.89, 128.33, 127.88, 127.77, 121.18, 116.57, 112.88, 112.49, 110.51, 109.23, 69.56, 25.50, 21.65, 17.75。HR-MS, $C_{24}H_{23}O_5$, 实测值(计算值), m/z : 391.153 0(391.154 5) $[M+H]^+$ 。

1.2.2 酶活性实验

参考文献[15]方法,以甲氯芬那酸(MCF)为阳性对照药,采用多功能微孔板检测仪检测化合物(1 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 在 AKR1C3 催化的 9,10-菲

醌还原反应中,对辅酶 NADPH 消耗速率的影响,获得酶促反应的抑制率。进而测试化合物在多个浓度下对 AKR1C3 催化还原反应的抑制率,利用非线性回归计算化合物的半数抑制浓度 IC_{50} 。

1.2.3 化合物 3d 与 AKR1C3 的分子对接

从 PDB 数据库中搜索并下载 AKR1C3 的 PDB 信息(PDBID:4DBS),应用 Discovery Studio 软件,进行 AKR1C3 蛋白分子的预处理,包括去除配体、去水、加氢、加力场等。以 AKR1C3 原晶体中的配体结合口袋作为分子对接的活性口袋,半径设定为 10 Å,其他对接参数采用默认值,将晶体结构中的原配体对接到 AKR1C3 活性口袋中,计算对接构象和晶体构象的 RMSD 值,验证对接方法的可靠性。同理,将准备好的化合物 3d 对接到定义好的 AKR1C3 活性口袋中,分析对接结果,并利用 Pymol 软件分析进行可视化制图。

2 结果与讨论

2.1 蛇床子素脱甲基反应

在用 BBr_3 催化蛇床子素 7-位甲基脱除的反应中,本文起初设计的是希望生成 7-羟基中间体 4,而后再与溴代酸酯发生取代反应(图 3)。但在实际反应结束时,加水淬灭过量的 BBr_3 后,获得的化合物并非中间体 4,经文献检索和图谱数据对比(图 4a),发现是化合物 1^[14]。推测可能是在淬灭 BBr_3 的过程中,生成的氢溴酸与化合物 4 发生了加成反应从而生成化合物 1。然而,在实验过程中发现中间体 1 在加水淬灭后的溶液中不稳定,易发生 8 位溴代侧链与 7 位羟基间的取代反应而生成环合产物 5,该化合物的氢谱数据与文献报道的数据一致^[16,17](图 4b)。若将溶液置于 4 °C 冰箱,可以减缓化合物 5 的生成。此外,在 BBr_3 淬灭过程中,若加水速度过快,会导致反应液温度急剧上升,化合物 5 的生成也会增多。经文献检索发现,蛇床子素在用 $AlCl_3$ 脱甲基后,在 $Zn(OTf)_2/TsOH \cdot H_2O$ 的条件下反应可以生成化合物 5^[16]。再者,Gopalakrishnan 等^[17]报道,在室温下使用 $AlCl_3/EtSH$ 试剂对蛇床子素进行脱甲基反应,可通过醚交换反应直接环化,生成化合物 5。而蛇床子素与 $AlCl_3$ -DMS 复合物反应,得到化合物 4。结合文献[14,16,17]报道,本文推测在用 BBr_3 催化蛇床子素脱甲基反应时,淬灭过程中 BBr_3 与水反应生成氢溴酸,氢溴酸与中间体 4 的 8-位异戊烯基双键加成生成化合物 1,后者易发

生分子内的亲核取代反应生成化合物 5。故为了减少化合物 5 的生成,本文脱甲基反应结束加水淬灭后,立即萃取、干燥,并进行下一步反应。

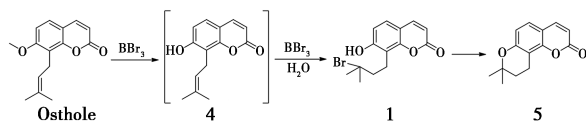
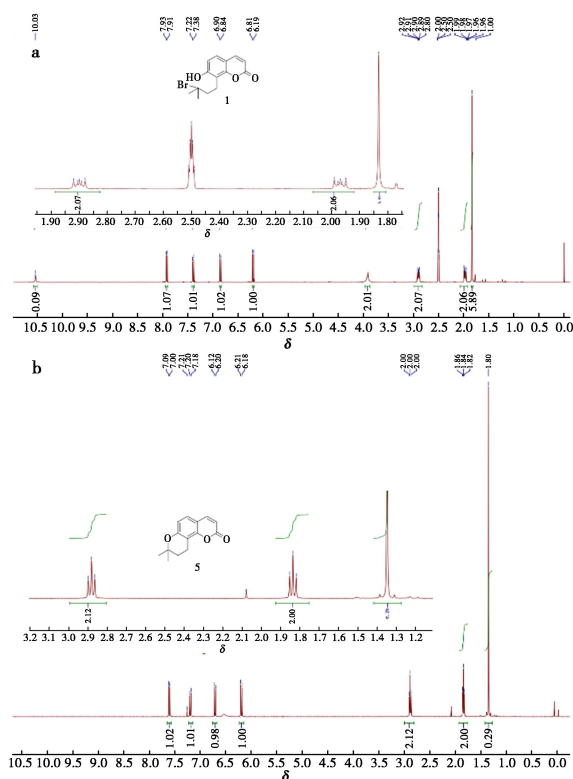


图 3 床子素脱甲基后生成吡喃并香豆素 5

Fig.3 Demethylation of osthole to yield pyranocoumarin 5



a. 化合物 1 的 ^1H NMR 及数据; b. 化合物 5 的 ^1H NMR 及数据

图 4 化合物 1 和 5 的 NMR 数据对比

Fig.4 Comparison of NMR data between compound 1 and 5

2.2 化合物对醛酮还原酶活性的影响

利用高通量抑酶活性测试实验检测了阳性对照药物 MCF 以及目标化合物 3a~3h 对 AKR1C3 的抑制活性。粗测结果(图 5)显示,化合物 3a~3h 在浓度为 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 AKR1C3 的还原催化活性抑制率均超过 50%,且化合物 3a、3b 和 3d 表现出与 MCF 相似或更高的 AKR1C3 抑制活性。在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,化合物 3a、3b 及 3d 的抑制率高于 MCF (81.3%),分别为 87.1%、86.8% 和 82.2%,且当浓度增大到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,目标化合物对酶的抑制率均升高。对所合成化合物进行的多浓度下活性测试结果如表 1 所示^[18],与对照品 MCF 相比 (IC_{50} 值为 0.512 $\mu\text{mol/L}$),化合物 3a、

3b 和 3d 对 AKR1C3 活性的抑制作用基本相当,其 IC_{50} 值均在 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 左右,其中化合物 3d 的 IC_{50} 值为 0.464 $\mu\text{mol/L}$ 。由此可见,7-羧酸类蛇床子素衍生物具有良好的 AKR1C3 抑制作用。

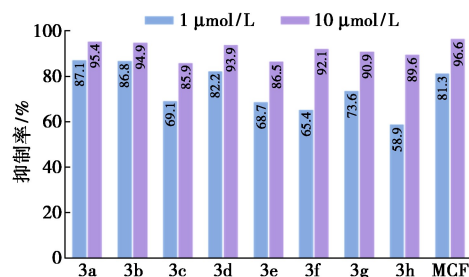


图 5 蛇床子素衍生物对 AKR1C3 活性的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effects of Osthole derivatives against AKR1C3

表 1 蛇床子素衍生物抑制 AKR1C3 活性的 IC_{50} 值^注

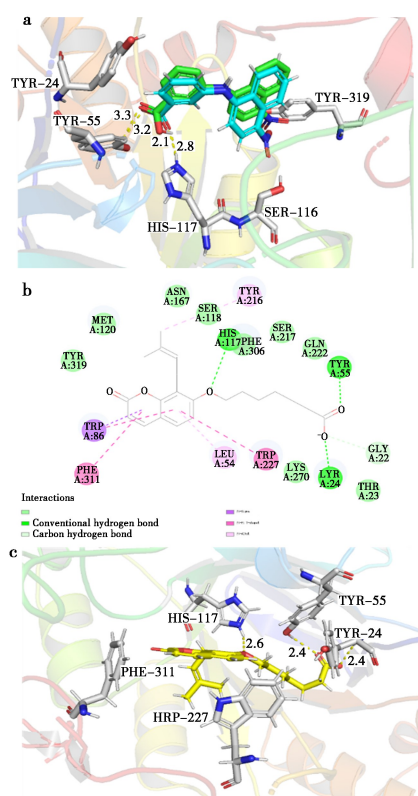
Tab.1 IC_{50} values of inhibiting activity of Osthole derivatives against AKR1C3

Compound	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Compound	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
3a	0.535±0.085 7	3f	1.526±0.141 9
3b	0.501±0.057 5	3g	0.788±0.045 9
3e	0.817±0.085 3	3h	1.507±0.185 5
3d	0.464±0.060 7	MCF	0.512±0.080 0 ¹⁾
3e	0.679±0.113 1		

注:1) 对照品 MCF 的 IC_{50} 值 0.512±0.080 源自参考文献 [18]。

2.3 化合物 3d 与 AKR1C3 的分子对接结果

分子对接结果显示,AKR1C3 (PDBID:4DBS) 与化合物 3d 及原晶体复合物中配体化合物的结合能,以“-CDDOCK INTERACTION ENERGY”表示,分别为 52.599 1 和 43.142 6 kcal/mol。由图 6a 所示,将原配体重新对接于 AKR1C3 中,与原始晶体结构中的配体位置相近,两种构象的 RMSD 值为 1.371 8,表明本文采用的对接方法可靠。AKR1C3 的结合口袋可以分为催化活性口袋(OS)、类固醇通道(SC)和选择性口袋(SP1、SP2、SP3),其中 OS 口袋主要由 Try55 和 His117 组成。由图 6b、6c 所示,化合物 3d 的 7-位侧链中的羧基与 AKR1C3 中的 Tyr55 和 Tyr24 形成氢键作用,且侧链中与香豆素环相连的氧原子与 His117 形成氢键结合,香豆素环与 Phe-311 和 Trp227 的氨基酸形成 $\pi-\pi$ 堆积,此外,香豆素环及其 8-位异戊烯基与 Leu54、Trp86 及 Try216 间具有疏水相互作用,由此可见,化合物 3d 与 AKR1C3 具有良好的结合作用。



a. 原配体与 AKR1C3 对接结果与原始构象图, 绿色骨架为对接后的原配体构象, 蓝色骨架为原晶体结构中的配体构象;
b. 化合物 3d 与 AKR1C3 的对接结果 2D 图; c. 化合物 3d 与 AKR1C3 的对接结果 3D 模型图, 黄色骨架为化合物 3d, 白色骨架为氨基酸残基, 氢键以虚线表示

图 6 化合物 3d 与 AKR1C3 的分子对接结果

Fig.6 Molecular docking between compound 3d and AKR1C3

3 结论

本文以蛇床子素为原料, 通过脱甲基、亲核取代以及水解反应合成 8 个 7-羧酸类蛇床子素衍生物。对合成的目标产物进行酶活测试结果显示, 与对照药物 MCF 相比, 目标产物 3a、3b 和 3d 对 AKR1C3 具有较高的抑制活性, 其 IC_{50} 值均在 $0.500 \mu\text{mol/L}$ 左右, 其中化合物 3d 的抑制活性最高, IC_{50} 值为 $0.464 \mu\text{mol/L}$ 。因此, 此类蛇床子素衍生物可为进一步研究新型 AKR1C3 抑制剂提供一定的借鉴。

参考文献:

- [1] Sun M N, Jiang X Y, Zeng S Y, Huang P, Zheng X H, Liu H, Zhang C. *Chem. Reagents*, 2022, **45**(4): 160-166.
孙明娜, 江晓怡, 曾思莹, 黄萍, 郑雪花, 刘欢, 张超. *化学试剂*, 2023, **45**(4): 160-166.
- [2] Liu Y, He S Y, Chen Y, Liu Y J, Feng F, Liu W Y, Guo Q L, Zhao L, Sun H P. *J. Med. Chem.*, 2020, **63**(20): 11 305-

11 329.

- [3] Penning T M. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2019, **489**: 82-91.
- [4] Li M, Zhang L M, Yu J H, Wang X X, Cheng L, Ma Z W, Chen X G, Wang L Z, Goh B C. *Front Pharmacol.*, 2024, **15**: 1 378 292/1-1 378 292/18.
- [5] Liu C F, Armstrong C M, Lou W, Lombard A, Evans C P, Gao A C. *Mol. Cancer Ther.*, 2017, **16**: 35-44.
- [6] Paschalis A, Welti J, Neeb A J, Yuan W, Figueiredo I, Pereira R, Ferreira A, Riisnaes R, Rodrigues D N, Jiménez-Vacas J M, Kim S, Uo T, Micco P D, Tumber A, Islam M S, Moesser M A, Abboud M, Kawamura A, Gurel B, Christova R, Gil V S, Buroni L, Crespo M, Miranda S, Lambros M B, Carreira S, Tunariu N, Alimonti A, Al-Lazikani B, Schofield C J, Plymate S R, Sharp A, De-Bono J S, SU2C/PCF International Prostate Cancer Dream Team. *Cancer Res.*, 2021, **81**(4): 1 087-1 100.
- [7] Zhong T, Xu F F, Xu J H, Liu L, Chen Y. *Biomed. Pharmacother.*, 2015, **69**: 317-325.
- [8] Hofman J, Malcekova B, Skarka A, Novotna E, Wsol V. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2014, **278**(3): 238-248.
- [9] Sun M N, Sun M J, Zhang J Y. *Med. Chem. Res.*, 2021, **30**(10): 21-28.
- [10] Shokoohinia Y, Jafari F, Mohammadi Z, Bazvandi L, Hosseinzadeh L, Chow N, Bhattacharyya P, Farzaei M H, Farooqi A A, Nabavi S M, Yerer M B, Bishayee A. *Nutrients*, 2018, **10**(1): 36-39.
- [11] ZL202110464698.2. Sun M N, Zheng X H, Zhang J Y, Feng X. 2021-04-28.
ZL202110464698.2. 孙明娜, 郑雪花, 张建业, 冯晓. 2021-04-28.
- [12] Sun M J, Zhou Y, Zhuo X F, Wang S, Jiang S S, Peng X H, Kang K, Zheng X H, Sun M N. *Chem. Biodivers.*, 2020, (12): e20 005/1-e20 005/10.
- [13] Flanagan J U, Yosaatmadja Y, Teague R M, Chai M Z L, Turnbull A P, Squire C J. *PLoS One*, 2012, **7**: e43 965/1-e43 965/16.
- [14] ZL201310526070.6. Zhang W H, Zhang Y Q, Liu P, Xu Z C. 2013-10-30.
ZL201310526070.6. 章维华, 张雅琴, 刘品, 徐子超. 2013-10-30.
- [15] Zheng X H, Zhao Y N, Wang X Y, Pan S Q, Zhang C. *J. Chin. Med. Mater.*, 2018, **41**(8): 1 851-1 856.
郑雪花, 赵奕宁, 王小雨, 潘淑琼, 张超. *中药材*, 2018, **41**(8): 1 851-1 856.
- [16] Huang W W, Huang Y, Cui J Y, Wu Y H, Zhu F L, Huang J, Ma L. *Bio. Med. Chem. Lett.*, 2002, **61**: 128 547/1-128 547/7.
- [17] Gopalakrishnan G, Kasinath V, Singh N D P, Thirumuran R, Raj S S S, Shanmugam G. *Molecules*, 2000, **5**: 880-885.
- [18] Liu H, Yao Z Q, Sun M N, Zhang C, Huang Y Y, Luo H B, Wu D Y, Zheng X H. *Chem. Bio. Interact.*, 2023, **385**: 110 654/1-110 654/6.