

N-芳酰基取代的二氢吲哚-3-乙酸类衍生物的设计、合成与体外降糖活性研究^Δ

张吉泉^{1,2*}, 武婷婷¹, 马才玉¹, 马 晓¹, 王建塔¹, 汤 磊^{2#}(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学/贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0318-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.08

摘要 目的:设计、合成N-芳酰基取代的二氢吲哚-3-乙酸类衍生物,并评价其体外降糖活性。方法:以吲哚衍生物2-[5-(苄氧基)-1-(4-氯苯甲酰基)-2-甲基-1H-吲哚-3-基]乙酸(GY3)为先导化合物,以4-苄氧基苯肼盐酸盐及4-氧戊酸甲酯为原料,经Fischer吲哚环合、还原、酰胺化及水解等4步反应得到8种N-芳酰基(3-羟基苯甲酰基、3-氰基苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基、4-甲磺酰基苯甲酰基、4-乙酰氨基苯甲酰基、3-乙酰氨基苯甲酰基、异烟酰基、吡啶-2-甲酰基)取代的二氢吲哚-3-乙酸类衍生物。采用人肝癌细胞HepG2测试目标化合物的体外促葡萄糖消耗活性。结果:共合成8个N-芳酰基取代的二氢吲哚-3-乙酸类目标化合物,其结构均经质谱、核磁共振氢谱及碳谱确证。在1.0 μmol/L条件下,所合成化合物在HepG2细胞上的促葡萄糖消耗百分率为5.4%~9.1%,其中,2-[(2R,3S)-5-苄氧基-2-甲基-1-(4-甲磺酰基苯甲酰基)-2,3-二氢-吲哚-3-基]乙酸的降糖活性最好,其促葡萄糖消耗百分率为(9.10±1.81)%,与阳性对照药物二甲双胍接近[(10.58±1.68)%],但仍弱于先导化合物GY3[(12.15±0.78)%]。结论:二氢吲哚类化合物的N-芳酰基芳环上引入不同吸电子取代基团,如氰基、硝基、甲磺酰基等,其降糖活性不同程度下降,且弱于卤素取代基的GY3。

关键词 二氢吲哚-3-乙酸类衍生物;降糖活性;合成;构效关系

Design, Synthesis and *in vitro* Hypoglycemic Activity Study of N-aryl Substituted Indoline-3-acetic Acid Derivatives

ZHANG Jiquan^{1,2}, WU Tingting¹, MA Caiyu¹, MA Xiao¹, WANG Jianta¹, TANG Lei²(1. College of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Medical University/Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To design and synthesize N-aryl substituted indoline-3-acetic acid derivatives and evaluate their *in vitro* hypoglycemic activity. METHODS: Using indoline derivative 2-[5-(benzyloxy)-1-(4-chlorobenzoyl)-2-methyl-1H-indol-3-yl] acetic acid (GY3) as leading compound, 4-(benzyloxy) phenyl hydrazine hydrochloride and methyl 4-oxopentanoate as raw material, 8 kinds of N-aryl (3-hydroxybenzoyl, 3-cyanobenzoyl, 4-nitrobenzoyl, 4-methylsulfonylbenzoyl, 4-acetamidobenzoyl, 3-acetylaminobenzoyl, isoniacyl and pyridine-2-formyl) substituted indoline-3-acetic acid derivatives were synthesized via 4 steps reactions: Fischer indole cyclization, reduction, amidation and hydrolyzation. The human hepatoma HepG2 cell lines were used to investigate the glucose consumption activity of the target compounds. RESULTS: Totally 8 various N-aryl substituted indoline-3-acetic acids were synthesized and their structures were confirmed by mass spectrum (MS), nuclear magnetic resonance ¹H-NMR and ¹³C spectrum. Under the condition of 1.0 μmol/L, the percentage of glucose-promoting consumption of the synthesized compounds on HepG2 cells was 5.4%~9.1%. 2-[(2R, 3S)-5-benzyloxy-2-methyl-1-(4-methylsulfonyl benzoyl)-2,3-dihydro-indole-3-yl] acetic acid showed the best hypoglycemic activity. The percentage of glucose-promoting consumption was (9.1 ± 1.81)%, which was close to that of positive control metformin [(10.58 ± 1.68)%], but less potent than that of leading compound GY3 [(12.15 ± 0.78)%]. CONCLUSIONS: Different electron-withdrawing substituents are introduced into N-aryl aromatic rings of dihydroindole compounds, such as cyano, nitro, methyl sulfonyl; hypoglycemic activity decreases in varying degrees and is weaker than halogen substituents.

KEYWORDS Indoline-3-acetic acid derivative; Hypoglycemic activity; Synthesis; Structure-activity relationship

Δ 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No.8170-3356);贵州省科技计划项目(No.黔科合[2016]平台人才5402,黔科合[2016]支撑2819);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-28号)

* 副教授,博士。研究方向:药物化学。电话:0851-86908318。E-mail: zjqgmc@163.com

通信作者:教授,博士。研究方向:抗糖尿病药物。电话:0851-86908318。E-mail: tlei1974@163.com

糖尿病是由胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗引起的高血糖为主要表现的一种临床综合征。随着人们生活水平的不断提高,糖尿病的患病率呈快速上升趋势,在全球范围内已成为危害人类健康的第三大慢性病。我国糖尿病患者高达1.14亿,已经成为全球糖尿病疾病负担最重的国家之一,如何控制糖尿病及其并发症已成

为迫切需要解决的重要问题^[1]。因此,继续研发作用机制新颖、降糖活性优异且安全性高的新型抗2型糖尿病药物具有重要的意义。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞内重要的能量感受器,在各组织中广泛分布,可调节机体的能量代谢状态。在糖代谢方面,AMPK的激活可以抑制肝葡萄糖生成过量、降低血糖浓度^[2-3]。同时,还可以通过诱导葡萄糖转运蛋白(GLUT)向细胞膜转位以及转录因子的磷酸化,从而开启GLUT基因的表达来促进周围组织对葡萄糖的摄取^[2]。此外,激活的AMPK还可以改善胰岛素抵抗^[4]。在脂代谢方面,活化的AMPK磷酸化羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(HMGR),可抑制胆固醇的合成^[5];激活AMPK也可以通过磷酸化乙酰辅酶A羧化酶(ACC)阻碍乙酰辅酶A向丙二酰辅酶A转变,从而促进脂肪酸在线粒体内的氧化代谢、抑制脂肪的合成^[6]。还有研究表明,一线糖尿病治疗药物二甲双胍及噻唑烷二酮类(TZDs)胰岛素增敏剂均可通过间接激活AMPK来发挥降糖作用^[7-8]。本课题组前期基于吲哚结构设计、合成了多个系列衍生物,从中筛选出代表化合物2-[5-(苄氧基)-1-(4-氯苯甲酰基)-2-甲基-1H-吲哚-3-基]乙酸(GY3),研究发现其具有体内外降糖活性,且该化合物对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)没有激活作用,因而可避免PPAR γ 完全激动药相关的副作用^[9]。作用机制研究发现,GY3可通过激活AMPK信号通路发挥降糖作用^[10]。但GY3分子代谢不稳定,会发生N-去苄甲酰化,从而降低其降糖活性^[11]。有研究表明,C-2,3位双键还原类化合物具有较好的体内外降糖活性^[12]。基于AMPK激动药在糖脂代谢性疾病上巨大的治疗潜力,本课题组以GY3为先导化合物,研究以4-苄甲氧基苯肼盐酸盐及4-氧戊酸甲酯为起始原料,经Fischer吲哚合成法关环、双键还原、酰胺缩合及水解等4步反应,得到8个反式二氢吲哚-3-乙酸衍生物。期望在丰富先导化合物GY3构效关系的同时,通过活性筛选发现降糖活性好、体内安全性高的新型吲哚衍生物。GY3与二氢吲哚-3-乙酸类衍生物的结构示意图见图1。

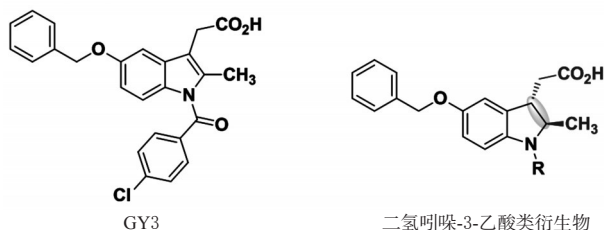


图1 GY3与二氢吲哚-3-乙酸类衍生物的结构示意图
Fig 1 Chemical structures of GY3 and indoline-3-acetic acid derivatives

1 材料

1.1 仪器

Mercury 400 核磁共振(NMR)仪(美国 Varian 公司);ZF-2 三用紫外仪(上海安亭仪器厂);WRX-4 显微熔点仪(上海易测仪器设备有限公司);Xevo G2-XS QToF 高分辨质谱仪(美国 Waters 公司)。

1.2 试剂

4-苄甲氧基苯肼盐酸盐和GY3(贵州医科大学药学院自制,批号:20150421、20150315,纯度:97%、99.5%);乙酰丙酸(批号:GC170160,纯度:98%)、氰基硼氢化钠(批号:GI060128,纯度:95%)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,批号:GI070108,纯度:99%)、盐酸二甲双胍(批号:FK200050,纯度:98%)均购自萨恩化学技术(上海)有限公司;N-甲基吗啉(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20101213);磷酸、氢氧化钠、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙酸、碳酸氢钠、无水硫酸钠、CH₃CN、CH₃OH及盐酸等均为分析纯。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞所。

2 方法与结果

2.1 合成路线

二氢吲哚-3-乙酸类衍生物的合成路线图见图2。

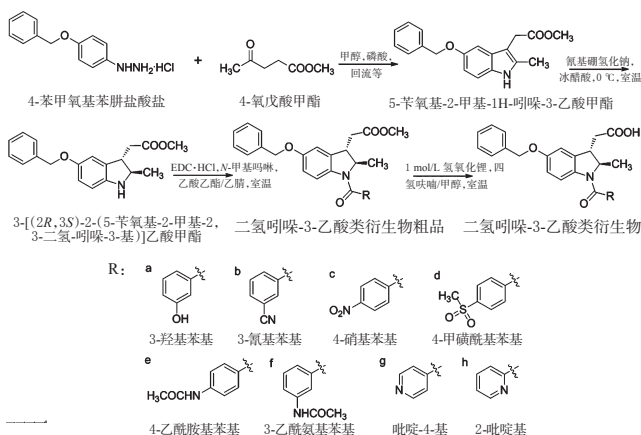


图2 二氢吲哚-3-乙酸类衍生物的合成路线

Fig 2 Synthetic route of indoline-3-acetic acid derivatives

2.2 合成步骤及鉴定

2.2.1 5-苄氧基-2-甲基-1H-吲哚-3-乙酸甲酯(化合物4)的合成 于500 mL反应瓶中加入4-苄甲氧基苯肼盐酸盐(化合物2,10.00 g,40 mmol)、甲醇(150 mL),搅拌下加入4-氧戊酸甲酯(化合物3,5.00 mL,48.80 mmol)、磷酸(6.30 mL,0.12 mol),加热回流反应24 h,薄层色谱(TLC)监测反应完全。冷却至室温,减压蒸干溶剂,残留物中加入乙酸乙酯(200 mL)、水(100 mL),用2.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节pH至8~9,分出有机层,依次

用水(100 mL)、饱和氯化钠(100 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤并减压蒸去溶剂,残留物经硅胶柱层析[石油醚-乙酸乙酯(4:1, V/V)]得红棕色固体 9.82 g, 收率 79.6%。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.78(s, 1H), 7.49(d, J=7.2 Hz, 2H), 7.39(t, J=7.2 Hz, 2H), 7.34~7.33(m, 1H), 7.14(d, J=8.4 Hz, 1H), 7.09(d, J=2.4 Hz, 1H), 6.85(dd, J=2.4 Hz, 1H), 5.12(s, 2H), 3.66~3.65(m, 5H), 2.38(s, 3H); 电喷雾质谱(ESI-MS): 质荷比(m/z)310.1[M+H]⁺, 确认为化合物 4。

2.2.2 3-[(2R, 3S)-2-(5-苄氧基-2-甲基-2, 3-二氢-吡啶-3-基)]乙酸甲酯(化合物 5)的合成 参考文献[12], 于 50 mL 反应瓶中加入中间体化合物 4(1.50 g, 4.85 mmol)、冰醋酸(20 mL), 搅拌溶解, 于冰浴(0 °C)下分次加入氰基硼氢化钠(1.52 g, 24.24 mmol), 加毕于室温中反应 4 h; 再加入水(30 mL)淬灭反应, 蒸去溶剂, 残留物加水(20 mL)、乙酸乙酯(30 mL), 用饱和碳酸氢钠调 pH 至 9, 分出有机层, 水层继续用乙酸乙酯(30 mL)萃取。合并有机层, 分别用水(20 mL)、饱和氯化钠(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 回收溶剂, 得淡黄色油状物 1.48 g, 经硅胶柱层析[石油醚-乙酸乙酯(3:1, V/V)]分离得淡黄色油状物 0.32 g。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.43~7.30(m, 5H), 6.76(d, J=2.4 Hz, 1H), 6.68(dd, J=8.4 Hz, 2.8 Hz, 1H), 6.53(d, J=8.4 Hz, 1H), 4.96(s, 2H), 3.70(s, 3H), 3.61~3.58(m, 1H), 3.45~3.23(m, 1H), 2.62(dd, J=16.0 Hz, 7.6 Hz, 1H), 2.52(dd, J=16.0 Hz, 7.6 Hz, 1H), 1.25(d, J=6.0 Hz, 3H); ESI-MS: m/z 312.1[M+H]⁺, 确认为化合物 5。

2.2.3 二氢吡啶-3-乙酸类衍生物粗品的合成 取 5(0.31 g, 1.00 mmol)溶解于乙酸乙酯(5 mL)和乙腈(10 mL)溶液中, 再分别加入 3-羟基苯甲酸(0.27 g, 2.00 mmol)或 3-氰基苯甲酸(0.29 g, 2.00 mmol)或 4-硝基苯甲酸(0.34 g, 2.00 mmol)或 4-甲磺酰基苯甲酸(0.40 g, 2.00 mmol)或 4-乙酰氨基苯甲酸(0.36 g, 2.00 mmol)或 3-乙酰氨基苯甲酸(0.36 g, 2.00 mmol)或异烟酸(0.25 g, 2.00 mmol)或 2-吡啶甲酸(0.25 g, 2.00 mmol), 再加入 EDC·HCl(0.40 g, 2.20 mmol)、N-甲基吗啉(0.25 mL, 2.20 mmol)室温搅拌反应 12 h。反应液中加入乙酸乙酯(20 mL), 分别用 1 mol/L 盐酸(10 mL×3 次)、饱和碳酸氢钠(10 mL×3 次)、水(10 mL×3 次)、饱和氯化钠(10 mL×3 次)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤并减压蒸去溶剂, 得二氢吡啶-3-乙酸类衍生物粗品。

2.2.4 二氢吡啶-3-乙酸类衍生物的纯化 取二氢吡啶-3-乙酸类衍生物粗品(0.81 mmol), 溶解于四氢呋喃(9 mL)和甲醇(3 mL)混合溶剂中, 于冰盐浴下加入 1 mol/L 氢氧化锂(4.00 mL, 4.00 mmol), 低温下搅拌反应

10 min 后, 升至室温再搅拌反应 3 h, 用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 3~4, 减压蒸除溶剂, 残留物用乙酸乙酯(20 mL)萃取, 有机层依次用水(10 mL)、饱和氯化钠(10 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤并减压蒸去溶剂, 残留物经硅胶柱层析[石油醚-乙酸乙酯(1:1, V/V)]分离得目标化合物二氢吡啶-3-乙酸类衍生物。制得的 8 个二氢吡啶-3-乙酸类衍生物分别为①1a。2-[(2R, 3S)-5-苄氧基-1-(3-羟基苯甲酰基)-2-甲基-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ②1b。2-[(2R, 3S)-1-(3-氰基苯甲酰基)-5-苄氧基-2-甲基-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ③1c。2-[(2R, 3S)-5-苄氧基-2-甲基-1-(4-硝基苯甲酰基)-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ④1d。2-[(2R, 3S)-5-苄氧基-2-甲基-1-(4-甲磺酰基苯甲酰基)-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ⑤1e。2-[(2R, 3S)-1-(4-乙酰氨基苯甲酰基)-5-苄氧基-2-甲基-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ⑥1f。2-[(2R, 3S)-1-(3-乙酰氨基苯甲酰基)-5-苄氧基-2-甲基-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ⑦1g。2-[(2R, 3S)-5-苄氧基-2-甲基-1-(吡啶-4-甲酰基)-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸; ⑧1h。2-[(2R, 3S)-5-苄氧基-2-甲基-1-(吡啶-2-甲酰基)-2, 3-二氢-吡啶-3-基]乙酸。

①1a, 黄色固体, 收率: 68.3%。熔点(mp): 85~86 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.34~7.26(m, 6H), 7.17(t, J=7.6 Hz, 1H), 6.92~6.79(m, 5H), 5.07(s, 2H), 3.09(t, J=6.8 Hz, 1H), 2.62~2.57(m, 3H), 1.25~1.19(m, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 175.8, 171.5, 159.7, 156.6, 141.8, 136.8, 135.1, 133.8, 128.7, 128.5, 128.2, 127.8, 127.7, 127.2, 118.6, 114.1, 113.1, 112.1, 70.5, 60.6, 39.7, 21.1, 14.2; ESI-MS: m/z 440.1[M+Na]⁺, 确定为 1a。

②1b, 白色固体, 收率: 37.7%。mp: 146~149 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 8.15~8.08(m, 1H), 7.86~7.66(m, 4H), 7.33~7.25(m, 5H), 6.92(t, J=2.4 Hz, 2H), 5.04(s, 2H), 4.08~4.04(m, 1H), 2.77(d, J=5.6 Hz, 1H), 2.35~2.29(m, 2H), 1.30~1.02(m, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 180.1, 175.7, 165.9, 156.4, 137.2, 133.3, 129.9, 129.8, 129.0, 128.1, 127.5, 127.3, 117.6, 117.5, 114.3, 113.6, 112.9, 112.8, 70.0, 63.2, 51.6, 39.0, 34.5, 21.7; ESI-MS: m/z 449.1[M+Na]⁺, 确认为 1b。

③1c, 黄色固体, 收率: 86.3%。mp: 203~206 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 12.06(s, 1H), 8.33(d, J=8.4 Hz, 2H), 8.06~7.76(m, 3H), 7.39~7.33(m, 5H), 7.09~7.03(m, 2H), 5.08(s, 2H), 4.01(dd, J=7.2, 14.0 Hz, 1H), 3.11~3.03(m, 1H), 2.51(d, J=14.0 Hz, 2H), 1.19~1.16(m, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 173.4, 173.0, 155.8, 148.1, 142.9,

137.0, 135.5, 134.6, 128.5, 127.6, 126.8, 123.9, 118.1, 113.2, 112.1, 111.1, 69.6, 60.3, 31.8, 20.7, 14.1; ESI-MS: m/z 469.1[M+Na]⁺, 确认为1c。

④1d, 白色固体, 收率: 39.4%。mp: 218~220 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.12~8.06 (m, 2H), 7.76 (s, 2H), 7.49~7.34 (m, 7H), 6.97~6.87 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.49 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 3.99~3.98 (m, 1H), 3.17 (s, 3H), 2.97~2.93 (m, 1H), 2.67~2.59 (m, 1H), 1.27~0.98 (m, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 177.9, 177.8, 153.1, 141.0, 139.7, 132.4, 131.8, 131.5, 131.2, 130.8, 129.6, 122.8, 116.5, 111.4, 110.3, 107.1, 74.2, 65.2, 42.8, 35.8, 24.2, 17.2; ESI-MS: m/z 502.1[M+Na]⁺, 确认为1d。

⑤1e, 白色固体, 收率: 72.3%。mp: 212~213 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.69 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.48~7.40 (m, 5H), 7.35~7.27 (m, 4H), 7.01 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.91~6.72 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.96~3.92 (m, 1H), 3.18 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 2.69~2.53 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.28~1.16 (m, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 175.7, 175.1, 171.8, 157.8, 142.0, 140.2, 138.6, 128.9, 128.6, 128.1, 123.6, 120.6, 115.5, 114.1, 113.4, 112.3, 111.0, 71.4, 64.9, 62.7, 41.4, 32.9, 23.9; ESI-MS: m/z 481.1[M+Na]⁺, 确认为1e。

⑥1f, 白色固体, 收率: 45.1%。mp: 131~133 °C。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD+CDCl₃) δ (ppm): 8.09 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.71~7.59 (m, 3H), 7.44~7.30 (m, 6H), 7.28~7.24 (m, 1H), 6.89~6.78 (m, 2H), 4.97 (s, 2H), 3.32~3.28 (m, 1H), 3.14 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 2.54 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.20~1.10 (m, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD+CDCl₃) δ (ppm): 177.8, 174.4, 141.2, 141.0, 140.8, 133.7, 133.3, 132.5, 132.4, 131.9, 131.5, 131.4, 129.1, 126.3, 126.1, 122.1, 118.0, 116.2, 111.0, 74.4, 67.4, 48.4, 38.1, 27.4, 13.8; ESI-MS: m/z 459.1[M+H]⁺, 确认为1f。

⑦1g, 白色固体, 收率: 55.3%。mp: 163~165 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.90 (d, $J=4.5$ Hz, 2H), 7.82~7.78 (m, 2H), 7.69~7.65 (m, 2H), 7.51~7.46 (m, 1H), 7.48~7.31 (m, 5H), 6.85 (m, 1H), 6.82 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.69~4.67 (m, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.11~3.04 (m, 1H), 2.59~2.56 (m, 1H), 1.07 (d, $J=6.4$ Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.5, 168.0, 150.1, 143.6, 135.1, 134.8, 134.2, 129.5, 127.1, 125.4, 125.0, 118.5, 115.6, 110.8, 72.9, 65.6, 43.8, 36.5, 20.8; ESI-MS: m/z 425.1[M+Na]⁺, 确认为1g。

⑧1h, 白色固体, 收率: 48.0%。mp: 166~169 °C;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.94 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.93~7.76 (m, 1H), 7.77 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.50~7.47 (m, 1H), 7.41~7.29 (m, 5H), 6.91 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.67~4.65 (m, 1H), 3.23 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 3.02~2.94 (m, 1H), 2.57~2.52 (m, 1H), 1.06 (d, $J=6.4$ Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.4, 165.2, 156.5, 153.5, 147.5, 138.9, 136.9, 135.2, 128.1, 127.6, 127.5, 125.4, 124.5, 119.2, 114.1, 111.6, 70.3, 62.0, 44.8, 39.3, 21.4; ESI-MS: m/z 425.1[M+Na]⁺, 确认为1h。

2.3 体外降糖活性测试

本研究以 HepG2 细胞作为模型, 根据受试化合物的促葡萄糖消耗百分率为指标来评价降糖活性^[13]。试验设溶剂对照组 (二甲基亚砜)、阳性对照组 (二甲双胍, 1 μ mol/L) 和不同受试化合物组。二甲双胍用二甲基亚砜配制成 0.2 mol/L 的贮备液, 受试化合物用二甲基亚砜配制成 100 mmol/L 或 10 mmol/L, 临用前用二甲基亚砜等比稀释成 1.0 μ mol/L。HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖型 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育, 隔天更换新鲜培养液, 2~3 d 传代 1 次。试验时, HepG2 细胞接种于 96 孔板, 并设无细胞空白对照组。待细胞生长至 70%~80% 融合度, 弃去原培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 遍, 换上含 0.2% 牛血清白蛋白、1 nmol/L 胰岛素的无血清 1640 培养液, 并进行分组加药。通过葡萄糖氧化酶-过氧化物酶比色法 (GOD-POD 法) 测定 HepG2 细胞葡萄糖消耗量, 计算促葡萄糖消耗百分率 (%) = (溶剂对照组葡萄糖含量 - 加药组葡萄糖含量) / 溶剂对照组葡萄糖含量 \times 100%。不同化合物在 HepG2 细胞上的促葡萄糖消耗百分率见表 1。

表 1 不同化合物在 HepG2 细胞上的促葡萄糖消耗百分率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Percentage of glucose-promoting consumption of different compounds in the HepG2 cell lines ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	终浓度	促葡萄糖消耗百分率, %
1a	1.0 μ mol/L	6.72 \pm 0.37
1b	1.0 μ mol/L	8.26 \pm 1.51
1c	1.0 μ mol/L	8.76 \pm 0.25
1d	1.0 μ mol/L	9.10 \pm 1.81
1e	1.0 μ mol/L	7.36 \pm 0.95
1f	1.0 μ mol/L	5.43 \pm 0.32
1g	1.0 μ mol/L	6.01 \pm 0.82
1h	1.0 μ mol/L	2.13 \pm 3.44
GY3	1.0 μ mol/L	12.15 \pm 0.78
二甲基亚砜	0.5% (V/V)	
二甲双胍	1.0 μ mol/L	10.58 \pm 1.68

从表 1 中结果可以看出, N-芳酰基取代的芳环上吸

电子基团取代后降糖活性总体上均小于卤素取代(GY3)。其中,对位吸电子基团取代活性略强于间位吸电子基团取代(1c vs. 1b, 1e vs. 1f),强吸电子基团甲磺酰基取代化合物1d的促糖消耗活性最好,但仍弱于先导化合物GY3及阳性对照药物二甲双胍。

3 讨论

HepG2细胞与人肝细胞表型特征较为相似,基本保留了正常肝细胞的胰岛素受体和胰岛素样生长因子,能全面反映肝细胞对周围环境中葡萄糖的摄入和消耗^[12],常用于化合物的体外降糖活性评价。

本研究所设计的化合物主要是在GY3的芳酰基芳环上引入吸电子基团,考察衍生物的降糖活性。虽然从结果上看,所合成衍生物的活性均低于先导化合物GY3,但本研究结果丰富了基于GY3结构改造的构效关系。

参考文献

- [1] GUARIGUATA L, WHITING DR, HAMBLETON I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2):137-149.
- [2] RANA S, BLOWERS EC, NATARAJAN A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(1):2-29.
- [3] 李云巍,李玲.双(α -呋喃甲酸)氧钒与二甲双胍联用对糖尿病模型小鼠的降糖作用研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(7):886-889.
- [4] RUDERMAN NB, CARLING D, PRENTKI M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7):2764-2772.
- [5] MADSEN A, BOZICKOVIC O, BJUNE JI, et al. Metformin inhibits hepatocellular glucose, lipid and cholesterol biosynthetic pathways by transcriptionally suppressing steroid receptor coactivator 2 (SRC-2) [J]. *Sci Rep*, 2015. DOI:10.1038/srep16430.
- [6] LIN ZJ, ZHANG B, LIU XQ. Advance of researches on AMPK-ACC signaling pathway in metabolic diseases[J]. *Chin J Diabetes*, 2013, 21(5):474-477.
- [7] COUGHLAN KA, VALENTINE RJ, RUDERMAN NB, et al. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes: Targets Ther*, 2014. DOI:10.2147/DMSO.S43731.
- [8] COLETTA DK, SRIWIJITKAMOL A, WAJCBERG E, et al. Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(4):723-732.
- [9] ZHANG JQ, WANG JT, WU HS, et al. Design, synthesis and insulin-sensitizing activity of indomethacin and diclofenac derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(12):3324-3327.
- [10] SI MM, YAN YY, TANG L, et al. A novel indole derivative compound GY3 improves glucose and lipid metabolism via activation of AMP-activated protein kinase pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/3):480-488.
- [11] 马晓,张吉泉,王建塔,等.二氢吡啶-3-羧酸衍生物及其在药物中的应用:中国,201610020860.0[P]. 2016.
- [12] FAN LL, WANG JT, MA X, et al. Design, synthesis and biological evaluation of GY3-based derivatives for anti-type 2 diabetes activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(7):1500-1505.
- [13] LOVATI MR, MANZON C, CASTIGLIONI S, et al. Lupin seed γ -conglutin lowers blood glucose in hyperglycaemic rats and increases glucose consumption of HepG2 cells[J]. *Br J Nutr*, 2012, 107(1):67-73.

(收稿日期:2018-07-31 修回日期:2018-11-29)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅