Dorsmerunin A 的全合成及其抗炎活性研究

李敏欣[†] 邹秋萍[†] 杜文绒 高金春 李艳平* 毛泽伟*

(云南中医药大学中药学院 昆明 650500)

摘要 苯并呋喃是研发多种疾病药物的主要来源之一, 在合成药物化学领域受到越来越多的关注. Dorsmerunin A 是一种从桑科植物中分离出来的具有弱细胞毒活性的苯并呋喃类天然产物. 以 4-甲氧基水杨醛和 2-溴-4'-甲氧基苯乙酮为起始原料, 经分子内缩合、还原和脱保护等 4 步反应, 以 49% 总收率首次完成了 Dorsmerunin A 的全合成. 另外, 采用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型初步测试了 Dorsmerunin A 的体外抗炎活性及其作用机制, 结果表明该化合物在浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能有效抑制 NO 的生成, 且对炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 有显著抑制作用.

关键词 Dorsmerunin A; 全合成; 抗炎活性; 作用机制

Total Synthesis and Anti-inflammatory Evaluation of Dorsmerunin A

Li, Minxin[†] Zou, Qiuping[†] Du, Wenrong Gao, Jinchun
Li, Yanping* Mao, Zewei*

(School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500)

Abstract Benzofurans have been found to be one of the major sources of drug development for a variety of diseases, and have received increasing attention in the field of synthetic medicinal chemistry. Dorsmerunin A, a natural cytotoxic product of 2-benzylbenzofurans, was isolated from the roots of *Dorstenia kameruniana*. In this work, Dorsmerunin A was firstly synthesized in 49% total yield from 4-methoxysalicylaldehyde and 2-bromo-4'-methoxyacetophenone through intramolecular condensation, reduction and deprotection. The *in vitro* anti-inflammatory activity of Dorsmerunin A was initially tested using the murine macrophage RAW264.7 model, and the results showed that it showed good inhibitory effect on NO production at a concentration of 25 $\mu\text{mol/L}$, as well as proinflammatory factors (IL-6, IL-1 β and TNF- α).

Keywords Dorsmerunin A; total synthesis; anti-inflammatory activity; mechanism

活性天然产物是药物研发的重要来源. 据统计, 美国食品药品监督管理局(FDA)在 1981~2019 年期间批准上市的药物中, 有 30% 以上直接或间接来源于天然产物^[1-2]. 苯并呋喃及其类似物是一类重要的含氧杂环化合物, 广泛存在于自然界中, 具有抗炎、抗结核、抗菌、抗阿尔兹海默症、抗氧化和抗肿瘤等多种生物活性^[3-6]. 迄今为止, 已从自然界中分离鉴定出大量的取代苯并呋喃类化合物, 如 Dorsmerunins A~C^[7]和 Moracins A~Z^[8]等. 鉴于苯并呋喃类化合物良好的生理活性, 该类化合物在药物研发方面具有广阔的应用前景, 在国内外

均受到研究人员的青睐^[9-12]. 目前, 已上市的苯并呋喃类药物有很多^[13], 如用于治疗转移性结直肠癌的呋喃替尼、用于治疗哮喘和心绞痛的凯琳以及用于治疗高尿酸血症、痛风以及痛性关节炎等的苯溴马隆(图 1).

Dorsmerunin A 是 Yenesew 等^[7]从桑科植物 *Dorstenia kameruniana* 的根皮中分离得到的一个代表性的 2-苄基苯并呋喃天然产物, 其对白血病 CCRF-CEM 细胞及其多药耐药亚系 CEM/ADR5000 均有一定抑制作用. 由于 2-苄基苯并呋喃类化合物在自然界中并不常见, 且含量很低, 其生物活性研究的报道很少. 因此, 通过有机合

* Corresponding authors. E-mail: 804195936@qq.com; maozw@ynutcm.edu.cn

Received February 22, 2021; revised March 27, 2021; published online May 23, 2021.

Project supported by the Yunnan Provincial Science and Technology Department-Applied Basic Research Joint Special Funds of Yunnan University of Chinese Medicine (Nos. 202001AZ070001-007, 202001AZ070001-038) and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Yunnan University of Chinese Medicine (No. 2019066).

云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项(Nos. 202001AZ070001-007, 202001AZ070001-038)及云南中医药大学大学生创新创业训练计划(No. 2019066)资助项目.

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

图式 1 苯并呋喃类天然产物及药物

Scheme 1 Benzofuran natural products and drugs

成的方法对该类化合物进行合成, 为其生物活性研究提供物质基础具有重要的意义. Dorsmerunin A 是一个结构很独特的活性天然产物, 但目前还未有全合成的相关报道. 在前期研究中, 我们^[14-15]合成得到了 2-苯甲酰基苯并呋喃衍生物. 此外, 还通过 Wolff-Kishner-黄鸣龙反应对羰基进行还原, 得到了 2-苄基苯并呋喃化合物^[16]. 基于此, 我们拟对 Dorsmerunin A 的合成方法和生物活性进行研究. 本工作以 4-甲氧基水杨醛和 2-溴-4'-甲氧基苯乙酮为起始原料, 经分子内缩合、还原和脱保护等四步反应, 以 49% 总收率首次完成了 Dorsmerunin A 的全合成, 并采用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型初步测试了 Dorsmerunin A 的体外抗炎活性及其作用机制.

1 结果与讨论

1.1 Dorsmerunin A 的合成

如 Scheme 2 所示, 4-甲氧基水杨醛和 2-溴-4'-甲氧基苯乙酮参照文献^[14-15]的方法制备得到化合物 9. 在对化合物 9 中的羰基进行还原时, 首先采用 Wolff-Kishner-黄鸣龙还原法, 但反应效果较差, 中间体 10 的收率只有 40%. 因此, 对该反应条件进行了筛选, 包括试剂的用量、反应温度和加料顺序等. 结果发现, 不论是增加水合肼和 KOH 的用量(2~10 equiv.), 还是升高反应温度(120~160 °C), 化合物 10 的收率均没有提高. 当用 NaOH 作碱时, 反应效果也较差, 推测可能是由于富电子效应导致羰基活性降低. 另外, 在强碱高温条件下, 醚键也不稳定, 会部分水解, 导致产物复杂. 因此尝试用硼氢化钠和三乙基硅烷对羰基进行还原. 首先化合物 9 经硼氢化钠还原成醇, 然后在三氟乙酸-三乙基硅烷作用下脱除羟基, 两步反应以 70% 的收率得到关键中间体 10. 此方法易于操作, 且收率较高. 最后, 通过三溴化硼脱除甲基保护, 以 90% 收率得到目标化合物

Dorsmerunin A. 该合成路线具有步骤少、易纯化、操作简便和产率高等特点.

图式 2 Dorsmerunin A 的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of Dorsmerunin A

1.2 抗炎活性

细胞毒性检测结果如表 1 所示, 当化合物浓度在 1.5625、3.125、6.25、12.5 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率分别为 109.5%、97.25%、96.36%、81.81% 和 61.34%, 由此可知, Dorsmerunin A 毒性非常低.

表 1 Dorsmerunin A 的毒性

Table 1 Toxicity of Dorsmerunin A

Concentration/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Survival rate/%
1.5625	109.5
3.125	97.25
6.25	96.36
12.5	81.81
25	61.34

采用脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型(LPS-

RAW264.7)测试 Dorsmerunin A 的体外抗炎活性, 结果见图 1. 从图中可以看出, LPS 模型组与空白对照组相比, NO 含量明显增高, 而给药组降低 NO 含量, 并呈剂量依赖关系, 说明该化合物能够有效抑制 NO 的生成.

图 1 Dorsmerunin A 的体外抗炎活性

Figure 1 *In vitro* anti-inflammatory activity of Dorsmerunin A

初步的抗炎机制研究发现, Dorsmerunin A 对促炎因子 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 均有明显的抑制作用(图 2).

2 结论

以 4-甲氧基水杨醛和 2-溴-4'-甲氧基苯乙酮为原料, 经 4 步反应, 以 49% 总收率完成了 2-苄基苯并呋喃类天然产物 Dorsmerunin A 的全合成. 抗炎活性研究表明, 该化合物可以通过抑制促炎因子 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α , 从而显示出较好的抗炎活性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

RCT 基本型磁力搅拌器(德国 IKA 公司); N-1100 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社); OSB-2100 油浴锅(日本东京理化器械株式会社); SHZ-D III 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); CCA-20 低温冷却水

循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司); AutoSpec Premier P776 型双聚焦三扇型磁质谱仪; BSM-120.4 电子天平(上海卓精电子科技有限公司); 400 MHz 核磁共振谱仪(德国 Bruker 公司, 内标为 TMS); YANACO 显微熔点仪(温度未校正); 二氧化碳培养箱(美国 Thermo-fisher); Epoch 连续波长酶标仪; Shimadzu UV-2450 紫外分光光度计. 所用试剂与溶剂均为市售分析纯, 溶剂使用前经干燥处理.

3.2 Dorsmerunin A 的合成

3.2.1 6-甲氧基-2-[5'-(甲氧基)苯甲酰基]苯并呋喃(9)的合成

将 4-甲氧基水杨醛(1.52 g, 10 mmol)、2-溴-4'-甲氧基苯乙酮(2.29 g, 10 mmol)和碳酸钾(2.76 g, 20 mmol)置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 丙酮, 于 60 °C 反应 8 h. 薄层色谱(TLC)检测反应完成冷却至室温, 真空浓缩后, 加入 50 mL 乙酸乙酯溶解, 并用水洗涤(20 mL $\times$ 3). 有机相经无水硫酸钠干燥后真空浓缩, 残余物经简单硅胶柱层析得到白色固体 2.20 g, 收率 78%, 表征数据与文献[17]一致. m.p. 133~135 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.03 (d, J =8.9 Hz, 2H), 7.73 (d, J =8.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.36 (d, J =1.9 Hz, 1H), 7.14 (d, J =8.9 Hz, 2H), 7.02 (dd, J =2.2, 2.2 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.7, 163.6, 161.2, 157.3, 151.9, 131.9, 129.9, 124.5, 120.5, 117.0, 114.7, 114.5, 96.3, 56.3, 56.1.

3.2.2 6-甲氧基-2-[5'-(甲氧基)苄基]苯并呋喃(10)的合成

取化合物 9 (847 mg, 3 mmol)置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 无水甲醇溶解, 分批加入硼氢化钠(227 mg, 6 mmol), 并在室温下反应过夜. 薄层色谱(TLC)检测反应完成后, 向反应瓶中缓慢滴加 10 mL 饱和 NH_4Cl 水溶液搅拌至澄清. 再加入 50 mL 二氯甲烷萃取, 有机相用水洗涤 (20 mL $\times$ 3)后经无水硫酸镁干燥, 真空浓缩. 残余物溶于 20 mL 无水二氯甲烷, 依次加入三氟乙

图 2 Dorsmerunin A 的初步抗炎机制

Figure 2 Preliminary anti-inflammatory mechanism of Dorsmerunin A

酸(684 mg, 6 mmol)和三乙基硅烷(698 mg, 6 mmol), 室温反应 12 h. TLC 检测原料消失后, 向反应瓶中滴加稀 NaOH 水溶液至碱性. 然后用二氯甲烷萃取(10 mL $\times$ 3), 有机相经无水硫酸钠干燥后真空浓缩, 残余物经硅胶柱层析(洗脱剂为二氯甲烷/甲醇, $V:V=20:1$)纯化得到 562 mg 淡黄色固体, 两步收率 70%, 表征数据与文献[18]一致. m.p. 91~92 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.40 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.82 (dd, $J=2.2, 2.3$ Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 158.5, 157.6, 157.5, 155.7, 130.2, 129.9, 122.0, 121.0, 114.4, 111.7, 103.1, 96.4, 56.0, 55.5, 33.6.

3.2.3 Dorsmerunin A (1)的合成

称取中间体 10 (1.34 g, 5 mmol)于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 无水二氯甲烷溶解. 在冰水浴下滴加 2 mol/L 的三溴化硼溶液(10 mL, 20 mmol), 并在室温下继续反应 12 h. TLC 检测反应完成后, 向反应瓶中缓慢滴加 20 mL 冰水, 并用正丁醇萃取(20 mL $\times$ 3). 有机相用水洗涤(30 mL $\times$ 3), 再经无水硫酸钠干燥后真空浓缩, 残余物经简单硅胶柱层析分离到 1.08 g 淡黄色油状液体, 收率 90%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{acetone}-d_6$) δ : 8.33 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.30 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.75 (dd, $J=2.1, 2.2$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 3.96 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{acetone}-d_6$) δ : 158.1, 156.9, 156.8, 155.7, 130.7, 129.4, 122.2, 121.3, 116.1, 112.4, 103.4, 98.3, 34.4; HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_3$ ($M-H$) $^-$ 239.0714, found 239.0719.

3.3 抗炎活性测试

3.3.1 细胞毒性检测

将冻存好的 RAW 264.7 细胞从液氮罐中拿出, 迅速解冻, 吸入含 10 mL DMEM 培养基(含质量分数分别为 10%和 1%的 FBS 和双抗)的培养皿中. 将培养皿置于体积分数为 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养. 每天对细胞进行换液或传代, 实验用细胞代数 2~15 代. 将细胞从培养箱中取出, 每个培养皿中加入 5 mL 左右磷酸缓冲液(PBS), 用移液枪轻轻吹打细胞, 直至培养皿上的细胞被全部吹打下来. 细胞计数后按照所需细胞密度(1×10^5)进行稀释, 之后按照每孔 100 μL 加入细胞悬液. 振荡均匀, 置于体积分数为 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养 24 h. 将 96 孔板中的细胞悬液吸走, 每孔加入 100 μL 已配制好的不同浓度的样品溶液. 继续放入培养箱中培养 24 h. 取出 96 孔板, 避光加入噻唑蓝(MTT)(每孔 10 μL), 继续放入培养箱培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150

μL 二甲基亚砜(DMSO)溶液. 振荡均匀, 490 nm 处测定 OD 值, 计算细胞存活率.

3.3.2 NO 含量检测

以脂多糖诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞为炎症模型, 以 MTT 检测细胞活力, 用 Griess 试剂显色法测定细胞模型中 NO 的产生. 取 RAW 264.7 细胞吹打均匀, 按细胞密度为 3×10^5 个/孔将细胞悬液加入 24 孔板中, 接种后置于 37 °C 培养箱中培养 24 h. 炎症模型组用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 进行诱导, 记为 LPS 组, 实验组则加入测试样品, 未处理的细胞记为空白对照组. 取出已培养了 24 h 的 RAW 264.7 细胞, 弃上清, 每孔加入 500 μL 样品溶液(每个样品设置 3 组), 置于 37 °C 培养箱中孵育 24 h, 取出 24 孔板, 吸取上清按照 NO 试剂盒说明书用酶标仪测定在 540 nm 处的 OD 值, 计算 NO 含量.

3.3.3 炎症因子的检测

采用酶标仪按 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 说明书进行检测.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 1, 9 和 10 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图及化合物 1 的 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629.
- [2] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 770.
- [3] Wang, W.; Li, N.; Wang, J.; Chen, G.; Huang, R.; Zhao, W.; Li, J.; Si, Y. *Phytochemistry* **2016**, 131, 107.
- [4] Wang, W. J.; Wang, L.; Liu, Z.; Jiang, R. W.; Liu, Z. W.; Li, M. M.; Zhang, Q. W.; Dai, Y.; Li, Y. L.; Zhang, X. Q.; Ye, W. C. *Phytochemistry* **2016**, 122, 238.
- [5] He, R.; Zhang, Y.; Wu, L.; Nie, H.; Huang, Y.; Liu, B.; Deng, S.; Yang, R.; Huang, S.; Nong, Z.; Li, J.; Chen, H. *Phytochemistry* **2017**, 138, 170.
- [6] Ruiz-Vázquez, L.; Mesia, L. R.; Reina-Artiles, M.; López-Rodríguez, M.; González-Platas, J.; Giménez, C.; Cabrera, R.; González-Coloma, A. *Phytochem. Lett.* **2018**, 28, 47.
- [7] Adem, F. A.; Kuete, V.; Mbaveng, A. T.; Heydenreich, M.; Ndakala, A.; Irungu, B.; Efferth, T.; Yenesew, A. *Fitoterapia* **2018**, 128, 26.
- [8] Naik, R.; Harmalkar, D. S.; Xu, X.; Jang, K.; Lee, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 90, 379.
- [9] Wang, X. Q.; Liu, L. X.; Li, Y.; Sun, C. J.; Chen, W.; Li, L.; Zhang, H. B.; Yang, X. D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 111.
- [10] Shamsuzzaman, H. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 483.
- [11] Gao, H.; Zhang, X.; Pu, X. J.; Zheng, X.; Liu, B.; Rao, G. X.; Wan, C. P.; Mao, Z. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 806.
- [12] Wang, M. X.; Deng, Y. H.; Shao, Z. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, 40, 812 (in Chinese).
(王美馨, 邓玉华, 邵志会, 有机化学, **2020**, 40, 812.)
- [13] Nevagi, R. J.; Dighe, S. N.; Dighe, S. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 561.
- [14] Mao, Z. W.; Zheng, X.; Lin, Y. P.; Hu, C. Y.; Wang, X. L.; Wan, C. P.; Rao, G. X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 3421.

- [15] Ma, Y.; Zheng, X.; Gao, H.; Wan, C.; Rao, G.; Mao, Z. *Molecules* **2016**, *21*, 1684.
- [16] Mao, Z. W.; Jiang, Y.; Rao, G. X. *J. Yunnan Univ., Nat. Sci. Ed.* **2015**, *24*, 16 (in Chinese).
(毛泽伟, 姜圆, 饶高雄, 云南民族大学学报(自然科学版), **2015**, 24, 16.)
- [17] Gouthami, P.; Chavan, L. N.; Chegondi, R.; Chandrasekhar, S. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 3325.
- [18] Huang, C. Y.; Kuo, C. W.; Kavala, V.; Yao, C. F. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 2720.

(Zhao, C.)