

五环三萜葡萄糖缀合物的设计、合成及体外抗流感病毒活性研究

蔡 铭^a 邵 亮^a 杨 帆^a 张继虹^a 俞 飞^{*,a,b}^(a) 昆明理工大学医学院 昆明 650500)^(b) 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室 北京 100191)

摘要 前期研究发现齐墩果酸(OA)的 C28 位葡萄糖偶联物在细胞水平具有显著抗流感病毒的活性, 但不同五环三萜母核偶联葡萄糖抗流感病毒活性的影响并未阐明. 本研究采用不同五环三萜母核, 通过 Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物环加成反应(CuAAC), 与葡萄糖偶联制备得到化合物 4c~8d, 通过体外抗流感病毒 A/WSN/33 (H1N1)活性研究, 发现化合物 4d 具有显著的抗流感病毒活性(IC₅₀ 为 9.09 $\mu\text{mol/L}$), 且对 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)细胞无明显毒性(CC₅₀>100 $\mu\text{mol/L}$). 构效关系研究明确了葡萄糖模块以及五环三萜母核对化合物抗流感病毒活性的提升均具有重要作用. 本研究进一步完善了五环三萜及其衍生物抗流感病毒的构效关系, 为这类天然产物抗病毒的深入研究奠定了基础.

关键词 五环三萜; 流感病毒; 进入抑制剂; 构效关系

Design, Synthesis of Pentacyclic Triterpenoid Glucose Conjugate and *in vitro* Activity against Influenza VirusCai, Ming^a Shao, Liang^a Yang, Fan^a Zhang, Jihong^b Yu, Fei^{*,a,b}^(a) Medical Faculty, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)^(b) State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191)

Abstract Previous studies have revealed that oleanolic acid (OA) C28-glucose conjugate displayed potent anti-influenza viral activity *in vitro*. However, the effect of pentacyclic triterpene scaffold coupled with glucose on anti-influenza virus activity has not been clarified. Herein, as a continuous further study, a series of pentacyclic triterpene-glucose conjugates were prepared via CuAAC reaction, and the anti-influenza activity of these compounds was evaluated *in vitro*. Among them, compound 4d, an betulinic acid (BA)-glucose conjugate, showed potent anti-influenza virus activity (IC₅₀ value of 9.09 $\mu\text{mol/L}$), and no obvious cytotoxic effect on MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells was observed (CC₅₀>100 $\mu\text{mol/L}$). Structure-activity relationship studies showed that both triterpene scaffolds and glucose moiety have important effects on the anti-viral activity. Overall, this finding further extends the utility of triterpene derivatives in anti-influenza virus drug design.

Keywords pentacyclic triterpene; influenza virus; entry inhibitors; structure-activity relationship

流行性感冒(流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 其中甲型流感病毒(Influenza A Virus, IAV)主要通过空气飞沫传播, 具有爆发突然、蔓延迅速和传播面广的特点^[1-2]. 甲型流感病毒是一种单链核糖核酸病毒, 其表面蛋白主要包括血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA). 流感病毒血凝素蛋白首先

吸附在宿主细胞表面唾液酸受体上, 通过受体介导的内吞作用发生内化, 使得病毒包膜与核内体膜融合, 最终进入宿主细胞^[3-4]. 甲型流感病毒具有突变快、重组率高等特点, 已有多种对临床常用流感药物耐药的毒株出现^[5-7], 因此, 新机制、新结构的广谱抗流感药物亟待出现.

* Corresponding author. E-mail: feiyuz8@163.com

Received November 3, 2021; revised December 31, 2021; published online January 27, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22167018), the Foundation of State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs (No. K202003) and the Yunnan Fundamental Research Projects (Nos. 2019FB125, 2018FB145).

国家自然科学基金(No. 22167018)、天然药物及仿生药物国家重点实验室开放基金(No. K202003)和云南省科技厅科技计划(Nos. 2019FB125, 2018FB145)资助项目.

研究表明, γ -环糊精-五环三萜多价偶联物在较低的浓度时依然有很好抗流感病毒活性, 该类化合物能与流感病毒的血凝素蛋白结合, 干扰血凝素蛋白与唾液酸受体的识别, 阻止流感病毒进入^[8]. 此外, Yu 等^[9]报道以五环三萜化合物为先导化合物合成一系列五环三萜衍生物, 活性评价后发现齐墩果酸通过酰胺键偶联乙酰半乳糖时具有广谱抗流感作用, 且靶向流感病毒包膜表面的血凝素蛋白, 抑制流感病毒进入宿主细胞. 近期, Luo 等^[10]通过 Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物环加成反应(CuAAC)合成四种五环三萜唾液酰基偶联物, 研究发现齐墩果酸唾液酰基偶联物与血凝素蛋白亲和力最强, 抗流感病毒活性最佳, 表明五环三萜偶联唾液酰基糖肽分子可提高抗流感能力.

另外, 我们前期研究发现, 将具有一定抗流感病毒活性的齐墩果酸[Oleanolic acid, OA (**1**)] ($IC_{50}=72.27 \mu\text{mol/L}$), 经过系统的结构修饰及构效关系讨论发现, 其 28 位羧基和 3 位羟基通过 Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物环加成反应, 分别与葡萄糖、乙酰半乳糖偶联得到化合物 **2** 和 **3**(图 1), 化合物 **2** ($IC_{50}=5.48 \mu\text{mol/L}$) 和 **3** ($IC_{50}=12.45 \mu\text{mol/L}$) 的抗流感病毒活性较齐墩果酸有了显著提升. 其中, 化合物 **2** 表现出广谱的抗流感病毒作用^[11-12], Autodock 模拟显示葡萄糖模块能与流感病毒血凝素蛋白的唾液酸结合口袋中的 Lys156 等氨基酸形成氢键, 有效提高化合物与血凝素蛋白的结合强度.

基于以上研究结果, 本工作在保留葡萄糖模块的前提下, 通过更换不同的五环三萜母核结构, 设计并合成了一系列的五环三萜葡萄糖缀合物, 通过研究不同五环三萜母核对抗流感病毒活性的影响, 进一步完善这类天然产物抗流感病毒的构效关系, 为基于天然产物的广谱抗流感药物研究奠定基础.

1 结果与讨论

1.1 化学合成

化合物 **4d** 的合成路线如 Scheme 1 所示, 首先将白桦脂酸(Betulinic acid, BA)的 28 位羧基通过 *O*-苄并三氮唑-*N,N,N'*-四甲基脲四氟硼酸(TBTU)活化(化合物 **4a**)

后, 与炔丙胺偶联得到关键中间体 **4b**. 以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($V:V=1:1$) 为溶剂, *L*-抗坏血酸钠和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为催化剂, 利用 Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物环加成反应(CuAAC)^[13-15], 室温条件下将含有叠氮基团的葡萄糖模块与中间体 **4b** 偶联, 得到化合物 **4c**. 在甲醇钠作用下脱除葡萄糖上的乙酰基获得目标化合物 **4d**. 采用相同的反应路线, 以甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)、棘囊酸(Echinocystic acid, EA)、熊果酸(Ursolic acid, UA)和齐墩果酸异构体 δ -齐墩果酸(δ -Oleanolic acid)^[16]为母核, 便可分别制备不同五环三萜与葡萄糖的偶联物(**4c**~**8d**).

1.2 生物活性

1.2.1 五环三萜葡萄糖缀合物体外抗流感病毒活性

如表 1 所示, 在 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度下, 不同母核五环三萜化合物的抑制流感病毒活性和细胞毒性不同, 化合物 **5**, **6** 和 **7** 虽有一定抗流感病毒活性, 但对 MDCK 细胞毒性较大. 化合物 **4** 和 **8** 虽无显著细胞毒性, 但抑制流感病毒作用较弱. 当不同母核五环三萜化合物偶联带有乙酰基的葡萄糖后, 化合物 **4c**, **5c** 和 **7c** 没有明显的抗流感病毒活性, 化合物 **6c** 对流感病毒虽具有一定抑制活性, 但表现出较为显著的细胞毒性. 另外, 除了化合物 **7d**, 化合物 **4d**, **5d**, **6d** 和 **8d** 均比化合物 **4c**, **5c**, **6c** 和 **8c** 的细胞毒性低, 抑制流感病毒活性强, 说明五环三萜葡萄糖缀合物脱乙酰保护基后抑制活性有所提高, 乙酰基的存在可能增加了对 MDCK 细胞的毒性.

综上所述, 棘囊酸(**5**)及其葡萄糖缀合物(**5c**, **5d**)抑制流感病毒活性有所下降或无活性, 可能是棘囊酸及其衍生物 C-16 位羟基的存在对化合物抗流感病毒活性有所影响. 化合物 **8d** 抑制流感病毒活性不及化合物 **2**, 可能是齐墩果酸烯烃位置的改变所致. 齐墩果酸上烯烃位置处于 C(12)~C(13)位, 其抗流感病毒明显比 δ -齐墩果酸上烯烃位置处于 C(13)~C(18)位时效果好, 进一步说明了齐墩果酸双键位置对活性起重要作用. 另外, 不同母核五环三萜化合物偶联葡萄糖后, 化合物 **4d** 和 **8d** 表现出低细胞毒性和高抑制流感病毒活性, 较其母核 **4** 和 **8**, 对流感病毒感染细胞的抑制率提高了近一倍, IC_{50} 分

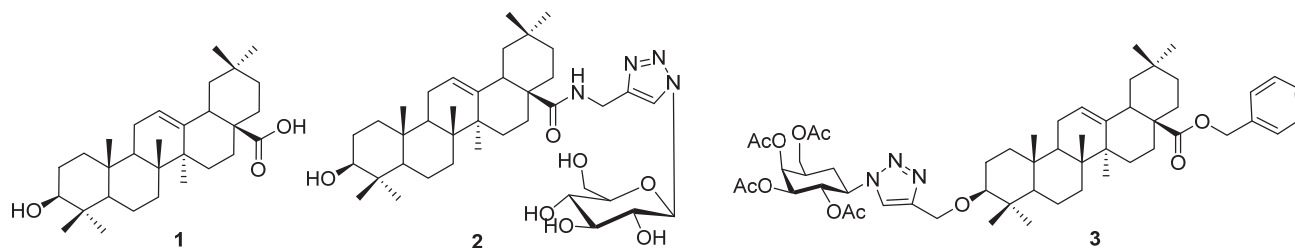
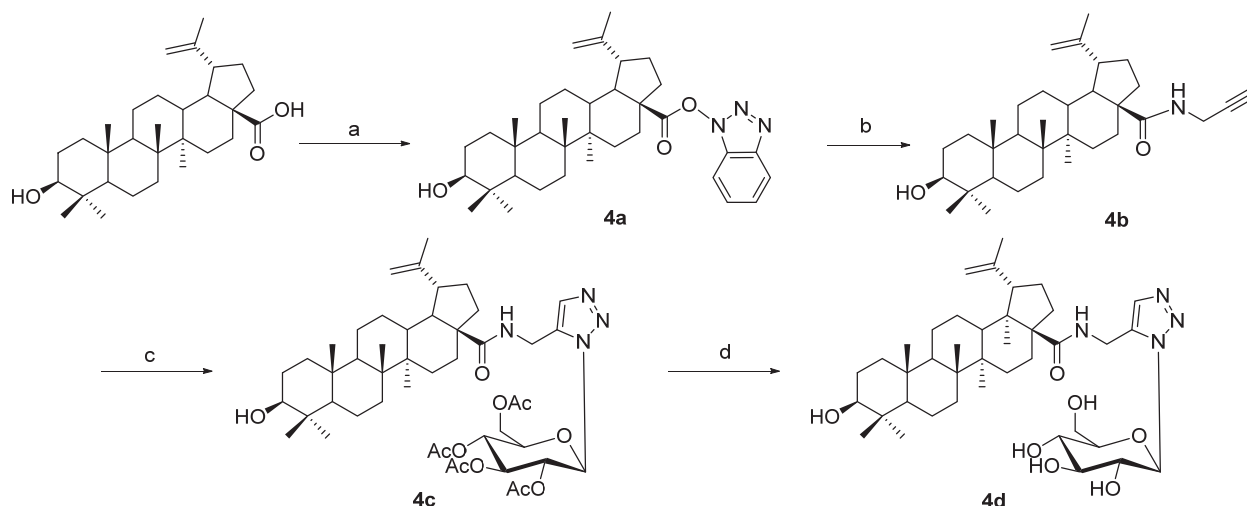


图 1 齐墩果酸及其衍生物的结构式
Figure 1 Structural formulas of oleanolic acid and its derivatives



Reagents and conditions: (a) TBTU, DIPEA, THF, r.t.; (b) 2-propynylamine, Na_2CO_3 , DMF, r.t., 2 h; (c) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na-L-ascorbate, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, r.t.; (d) MeONa, MeOH, r.t., 3 h

图式 1 白桦脂酸葡萄糖缀合物的合成

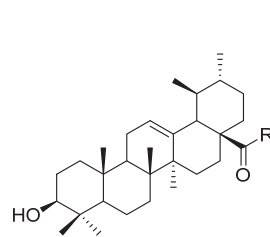
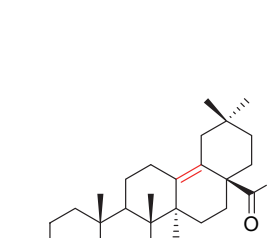
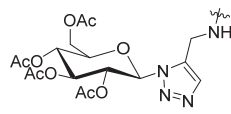
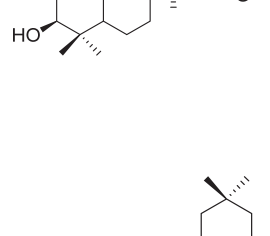
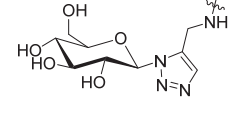
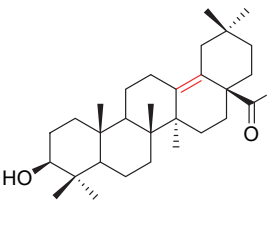
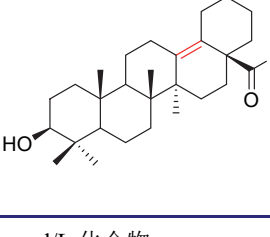
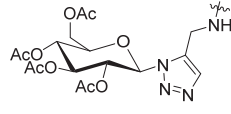
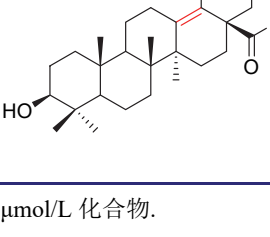
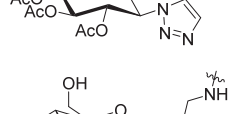
Scheme 1 Synthesis of betulinic acid (BA)-glucose conjugate

表 1 五环三萜葡萄糖缀合物结构式及抗流感病毒活性初步评价结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)^a

Table 1 Structural formula of pentacyclic triterpene-glucose conjugate and preliminary evaluation results of its anti-influenza virus activity ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

化合物结构式	化合物	细胞存活率/%	流感病毒抑制率/%
	4	106.12 ± 8.38	59.00 ± 10.18
	4c	91.27 ± 0.03	8.46 ± 23.27
	4d	106.53 ± 9.50	92.94 ± 1.45
	5	4.08 ± 0.34	99.48 ± 1.08
	5c	110.24 ± 0.002	NT
	5d	105.15 ± 11.41	54.16 ± 11.54
	6	3.98 ± 1.90	95.14 ± 7.36
	6c	56.04 ± 0.008	58.51 ± 4.72
	6d	74.02 ± 6.92	80.65 ± 16.47

续表

化合物结构式	化合物	细胞存活率/%	流感病毒抑制率/%
 R = $\frac{3}{4}$ -OH	7	3.30 ± 0.06	99.85 ± 0.31
 R = 	7c	103.68 ± 0.02	10.43 ± 5.20
 R = 	7d	4.18 ± 1.45	97.41 ± 3.72
 R = $\frac{3}{4}$ -OH	8	102.05 ± 10.33	70.99 ± 14.04
 R = 	8c	73.23 ± 3.62	96.62 ± 15.17
 R = 	8d	101.63 ± 6.89	91.68 ± 8.14

^a 100 μmol/L 化合物。**表 2** 五环三萜葡萄糖缀合物抗 A/WSN/33 (H1N1) 活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)**Table 2** Activity of the pentacyclic triterpene-glucose conjugate anti-influenza virus A/WSN/33 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compound	CC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)	IC ₅₀ ^b /(μmol·L ⁻¹)	SI ^c
OSV-p ^d	>100	1.82	>54.59
2 ^d	>100	5.47	>18.28
4d	>100	9.09	>10.99
8d	>100	12.56	>7.96

^a 50% 细胞毒性浓度, ^b 50% 半数抑制浓度, ^c SI: CC₅₀/IC₅₀, ^d 阳性对照。

别为 9.09 和 12.56 μmol/L (表 2), 相对来说, 化合物 **4d** 抗流感病毒活性更好, 进一步证明了葡萄糖模块对五环三萜化合物抗流感活性的提升起着重要作用。

流感病毒 A/WSN/33 (H1N1) 感染 MDCK 细胞后会引发明显的细胞病变 (Cytopathic effect, CPE), 流感病毒抑制剂可以有效抑制细胞病变的产生。如图 2A 所示, 与 DMSO 对照组相比较, 100 μmol/L 浓度下化合物 **4d** 可以显著降低流感病毒引起的细胞病变。

1.2.2 血凝抑制实验

含有血凝素 (HA) 蛋白的流感病毒可使人或部分动物红细胞表面的唾液酸凝集, 这种现象被称为血凝。针对血凝素的抗体或者能占据血凝素唾液酸结合位点的抑制剂, 在一定浓度下抑制血凝的发生, 这种抑制剂称为血凝抑制^[17-18]。因此, 采用血凝抑制试验能够验证化合物是否靶向流感病毒血凝素蛋白。如图 2B 所示, 化合物 **4d** 能有效抑制流感病毒血凝素引起的血凝, 与血凝素抗体具有类似的效果, 表明化合物 **4d** 可能是通过

与流感病毒血凝素蛋白结合, 阻断流感病毒与宿主细胞上的唾液酸受体相互作用, 达到抑制流感病毒感染宿主细胞的效果。

1.2.3 基于分子对接的五环三萜葡萄糖缀合物与流感病毒血凝素蛋白相互作用研究

进一步, 采用分子对接实验模拟了目标化合物与流感病毒血凝素蛋白的结合模式。首先, 利用 “AutoDock 4.2” 程序, 将血凝素蛋白 (蛋白质编码: 1RVT) 的唾液酸结合口袋与 10 种五环三萜葡萄糖缀合物进行分子对接。通过其最低结合自由能来评价化合物与流感病毒血凝素蛋白之间的相互作用, 该值综合考虑了氢键、疏水作用力和范德华力的相互作用。绝对值越大, 小分子配体与目标蛋白的对接越稳定, 亲和力越好。如表 3 和辅助材料中 S1 和 S2 所示, 五环三萜葡萄糖缀合物通过氢键、 π -Alkyl 等多种分子间作用力与流感病毒血凝素蛋白结合, 并且化合物 **4d**~**8d** 的结合自由能低于其前体化合物 **4c**~**8c**, 可能是葡萄糖上的羟基被乙酰基保护, 会阻碍羟基与血凝素结合位点上的氨基酸残基形成氢键, 从而不能与结合位点紧密结合。从分子对接结合模式上, 可以看出化合物 **4d** 与血凝素蛋白的结合更为紧密, 具有最低的结合自由能, 与细胞水平对流感病毒的抑制率趋势一致。

如图 3 所示, 化合物 **4d** 的 C3-OH 与 Tyr 256 形成氢键, Phe 117 可以与 **4d** 的 C-29 双键形成 π -Alkyl 相互作用, 而葡萄糖的 C'2-OH 和 C'4-OH 可以与 Glu 116 形成氢键相互作用。此外, 三氮唑基团与 Lys 172 具有较强的 π -cation 相互作用, 从而进一步增强了化合物 **4d** 与

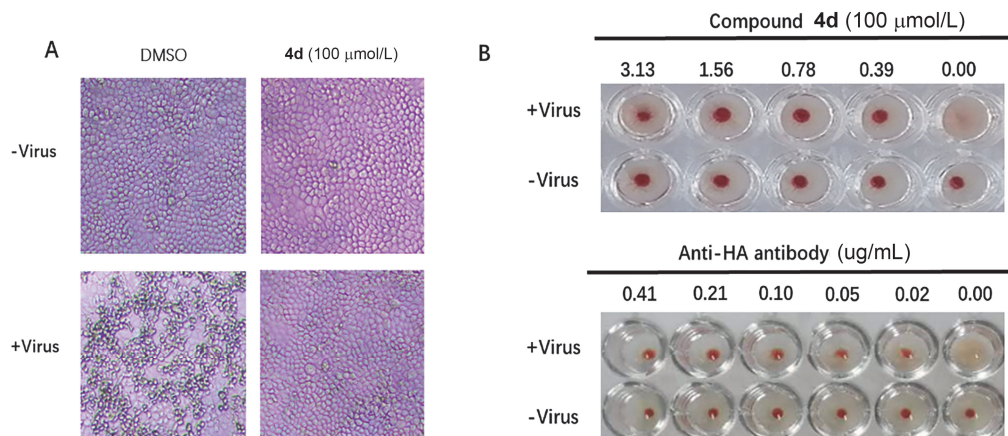


图 2 (A)化合物 4d 有效抑制 A/WSN/33 诱导的细胞病变; (B)化合物 4d 和血凝素抗体可以抑制 A/WSN/33 引起的鸡红细胞凝集
Figure 2 (A) Compound 4d can effectively inhibit CPE induced by A/WSN/33; (B) Compound 4d and HA antibody can inhibit hemagglutination caused by A/WSN/33

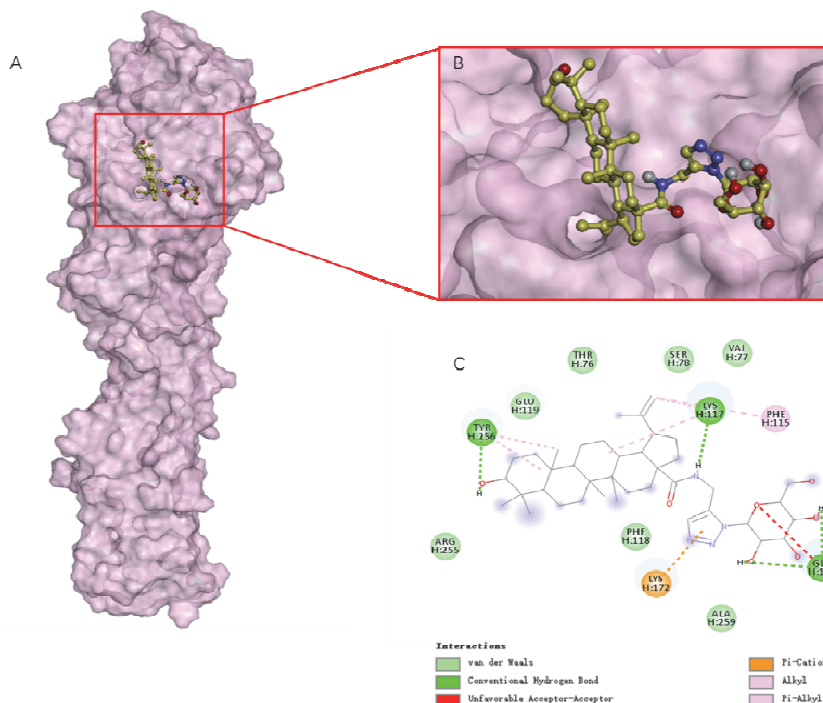


图 3 化合物 4d 与血凝素蛋白分子对接模拟: (A)化合物 4d 在血凝素蛋白中的结合位点; (B)化合物 4d 与血凝素蛋白相互作用的三维模型图; (C)化合物 4d 与血凝素蛋白相互作用的二维模型图
Figure 3 Molecular docking simulation of compound 4d targeting HA protein: (A) the binding site of compound 4d in HA protein; (B) the 3D model diagram of the interaction between compound 4d and HA protein; (C) the 2D model diagram of the interaction between compound 4d and HA protein

血凝素蛋白的结合亲和力, 最低结合自由能为 -24.98 kJ/mol. 与化合物 2 结合模式相比, 化合物 4d 并没有结合在唾液酸结合袋, 而是结合在化合物 2 的结合位点附近, 这也就解释了化合物 4d 的体外抑制活性($IC_{50}=9.09$ μmol/L)略低于化合物 2 ($IC_{50}=5.47$ μmol/L).

2 结论

5 种不同母核的五环三萜化合物利用 Cu(I)催化的

炔烃-叠氮化物环加成反应(CuAAC)偶联葡萄糖模块, 合成了 10 种五环三萜葡萄糖缀合物, 并对其进行了结构表征. 体外抗流感病毒活性评价发现, 在 100 μmol·L $^{-1}$ 浓度下, 五环三萜化合物偶联葡萄糖后, 细胞毒性降低, 且化合物白桦脂酸和 δ -齐墩果酸及其葡萄糖(4d, 8d)缀合物优于其母核(4, 8)的抑制活性. 其中, 白桦脂酸葡萄糖缀合物 4d 细胞毒性低($CC_{50}>100$ μmol·L $^{-1}$), 对流感病毒 A/WSN/33 (H1N1)的抑制率高($IC_{50}=9.09$

表 3 五环三萜葡萄糖缀合物与血凝素蛋白最低自由结合能与功能基团特征

Table 3 Minimum free binding energy and chemical feature of pentacyclic triterpene-glucose conjugates binding to HA protein

Compd.	Binding energy ^a /(kJ·mol ⁻¹)	Chemical feature ^b
4c	-22.01	CHB ^c , π -Alkyl
5c	-14.69	CHB, π -DHB ^d , Alkyl
6c	-22.30	CHB, Alkyl
7c	-21.46	CHB, π -DHB, π -Alkyl
8c	-21.42	CHB, π -Sigma, π -Alkyl
4d	-24.98	CHB, π -Cation, π -Alkyl
5d	-21.55	CHB, π -Anion, π -Alkyl
6d	-22.93	CHB, π -Cation, π -Alkyl
7d	-22.55	CHB, π -Alkyl
8d	-23.10	CHB, π -Anion, Alkyl

^a最低结合自由能, ^b功能基团特征, ^c氢键相互作用, ^d π -氢键供体相互作用.

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 血凝抑制实验阐明, 化合物 4d 可能是靶向流感病毒血凝素蛋白, 从而达到抑制流感病毒入侵的目的. 进一步通过分子对接实验表明, 五环三萜葡萄糖缀合物(4c~8d)与流感病毒血凝素蛋白有较好的结合效果, 并通过氢键、 π -Alkyl 等多种相互作用结合, 表明白桦脂酸和 δ -齐墩果酸缀合葡萄糖模块有利于提高其母核的抗病毒活性, 而甘草次酸、熊果酸和刺囊酸与葡萄糖的缀合物(5d, 6d, 7d)可能由于其母核结构特征, 并不利于与血凝素靶蛋白活性位点结合, 因此抗病毒活性较差, 另外, 乙酰化后的缀合物(4c~7c)细胞毒性明显增强, 且抑制活性弱. 构效关系研究表明, 将五环三萜化合物偶联葡萄糖, 可明显提高其抗流感病毒活性, 且不同五环三萜母核对抗流感病毒活性有着重要影响.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

HRMS 采用正 ESI 模式下的 APEX IV FT-MS (7.0 T)光谱仪(Bruker)获得. NMR 采用 Bruker Avance III-600 MHz 型核磁共振仪测定, ¹H NMR 化学位移参照内标 TMS (δ_{H} 0.00)或溶剂信号(MeOD δ_{H} 3.31, CDCl₃ δ_{H} 7.26, D₂O δ_{H} 4.79); ¹³C NMR 化学位移参照溶剂信号(CDCl₃ δ_{C} 77.00, MeOD δ_{C} 49.00). 所有溶剂均为分析纯常规试剂, 购自广东光华化学厂, 未经其他处理直接使用; 其他试剂购自安耐吉试剂公司等; 柱层析硅胶(精制型)200~300 目, 购自青岛海洋化工有限公司; 薄层色谱(TLC)采用 Silica gel 60 F₂₅₄ plate (layer thickness 0.2 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany); 显色剂采用 CMC 显色剂[500 mL H₂O, 28 mL H₂SO₄, 0.5 g Ce(NH₄)₂-(NO₃)₆ 和 24.0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O]或茚三酮显色剂(100 mL 无水乙醇, 1.5 g 茚三酮), 使用时用薄层板蘸取少量显色剂, 吹干并加热炙烤后, 化合物分别显现蓝色

或黄棕色斑点. 展开剂采用石油醚/乙酸乙酯混合溶剂或二氯甲烷/无水甲醇, 所有混合溶剂之比均为体积之比; 犬肾 MDCK 细胞来自昆明理工大学药物转化研究实验室细胞库; 采用 Olympus CKX53 型倒置显微镜观察细胞状态; 采用 SpectraMax M2 型多功能酶标仪检测细胞活力; CellTiter-Glo[®]细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司; 胰酶细胞消化液购自 Biosharp 公司; 胎牛血清、DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)培养基购自 Gibco 公司; 青链霉素混合液(100x)购自 Solarbio 公司; 96 孔细胞培养板、加样槽、100 mm 细胞培养皿、50 mL 离心管和 15 mL 离心管等均购自无锡耐思生物科技有限公司.

3.2 化学合成

3.2.1 化合物 4b~8b 制备流程 A

将五环三萜化合物(0.5 mmol)用 10 mL 四氢呋喃溶解, 随后加入 TBTU (0.6 mmol), 搅拌下加入 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA) (1 mmol). 室温下搅拌 3 h, 加入 2-炔丙胺(0.1 mL, 1.5 mmol), 室温反应过夜, TLC 检测, 浓缩溶剂后乙酸乙酯溶解, 用 1 mol/L HCl 和饱和 NaCl 萃取两次. 合并有机相, 有机相用无水 Na₂SO₄干燥, 过滤浓缩, 硅胶柱层析分离(*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=2:1)纯化, 得到化合物 4b~8b, 其中, 化合物 4b, 5b 和 7b 有文献报道^[8].

(3 β ,20 β)-3-羟基-11-氧代-齐墩果烷-12-烯-29-酰胺丙炔(6b): 白色固体, 138 mg, 产率 90%. m.p. 136.6~138.3 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.69, 0.81, 0.82, 1.01, 1.13, 1.13, 1.14, (7 $\times$ CH₃), 0.60~1.90 (m, other aliphatic ring protons), 1.91 (d, *J*=10.74 Hz, 1H), 2.01~2.08 (m, 2H), 2.16 (q, *J*=12.66 Hz, 1H), 2.25 (t, *J*=2.52 Hz, 1H), 2.34 (s, 1H), 2.77~2.80 (m, 1H), 3.23 (q, *J*=11.04 Hz, 1H), 4.02 (d, *J*=24 Hz, 1H), 4.12 (d, *J*=30 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 5.90 (t, *J*=5.04 Hz, 1H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 15.5, 16.3, 17.4, 18.6, 23.3, 26.3, 26.4, 27.2, 28.1, 28.4, 29.3 (2C), 31.4, 31.9, 32.7, 37.0, 37.3, 39.1 (2C), 41.7, 43.1, 43.5, 45.3, 48.0, 54.9, 61.8, 71.7, 77.0, 78.7, 79.7, 128.5, 169.1, 175.5, 200.2; ESI-HRMS calcd for C₃₃H₅₀NO₃ [M+H]⁺ 508.3785, found 508.3787.

δ -齐墩果烷-18-烯-3-羟基-28-酰胺丙炔(8b): 白色固体, 78 mg, 产率 86.7%. m.p. 145.6~147.3 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.72, 0.75, 0.87, 0.89, 0.93, 0.97, 1.7 (7 $\times$ CH₃), 0.60~2.10 (m, other aliphatic ring protons), 2.20 (t, *J*=2.46 Hz, 1H), 2.39 (q, *J*=6.12 Hz, 1H), 2.46 (d, *J*=13.86 Hz, 1H), 2.81 (q, *J*=15.6 Hz, 1H), 3.22 (q, *J*=11.52 Hz, 1H), 3.91~3.95 (m, 1H), 4.12~4.17 (m,

1H), 6.11 (t, $J=4.92$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 15.4, 16.4, 17.6, 18.2, 21.2, 21.5, 23.8, 25.1, 26.2, 27.2, 28.0, 29.3, 32.0, 33.0, 33.1, 34.0, 35.1, 36.6, 37.1, 38.8 (2C), 41.1, 41.2, 44.3, 48.6, 50.1, 55.1, 71.5, 78.8, 79.5, 127.9, 142.4, 175.8. ESI- HRMS calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{NO}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 516.3812, found 516.3817.

3.2.2 化合物 4c~8c 制备流程 B

将化合物 4b~8b (0.16 mmol) 和叠氮化乙酰葡萄糖 (0.19 mmol) 溶于 CH_2Cl_2 (5 mL) 和 H_2O (5 mL) 中, 加入 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (30 mg, 0.19 mmol) 和 *L*-抗坏血酸钠 (75 mg, 0.38 mmol), 室温搅拌反应至反应完全 (TLC 检测). 用水和二氯甲烷萃取两次, 合并的有机相水洗后用饱和 NaCl 洗一次, 有机相用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤浓缩, 硅胶柱层析分离 (V (石油醚): V (乙酸乙酯)=2:1), 得到目标化合物 4c~8c.

白桦脂酸-29-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷))(4c): 由化合物 4b (99 mg, 0.16 mmol)、叠氮化乙酰葡萄糖 (90 mg, 0.19 mmol) 制备. 白色固体, 147 mg, 产率 85%. m.p. 158.6~161.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.75, 0.80, 0.81, 0.95, 0.95, 1.68 ($6\times\text{CH}_3$), 1.87, 2.03, 2.07, 2.10 (s, $4\times\text{CH}_3\text{CO}$), 0.65~1.95 (m, other aliphatic ring protons), 2.37~2.41 (m, 1H), 3.11~3.18 (m, 2H), 3.98~4.01 (m, 1H), 4.13 (dd, $J=1.6$, 12.6 Hz, 1H), 4.34 (dd, $J=4.7$, 12.7 Hz, 1H), 4.46~4.52 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 5.25 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.37~5.44 (m, 2H), 5.84 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.32 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 14.6, 15.3, 15.9, 16.1, 18.2, 19.4, 20.1, 20.5, 20.5, 20.7, 20.8, 25.5, 27.3, 27.9, 29.3, 30.8, 33.5, 34.3, 34.6, 37.1, 37.7, 38.2, 38.6, 38.8, 40.7, 42.4, 46.7, 50.0, 50.5, 55.3, 55.6, 61.3, 67.5, 70.3, 72.5, 75.1, 78.9, 85.8, 109.4, 120.7, 145.9, 150.8, 168.7, 169.3, 170.0, 170.5, 176.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 867.5114, found 867.5108.

3 β ,16 α -二羟基齐墩果-12-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷))(5c): 由化合物 5b (102 mg, 0.16 mmol)、叠氮化乙酰葡萄糖 (90 mg, 0.19 mmol) 制备. 白色固体, 157 mg, 产率 89%. m.p. 164.8~167.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.71, 0.78, 0.90, 0.91, 0.99, 1.36 ($7\times\text{CH}_3$), 1.87, 2.03, 2.07, 2.09 (s, $4\times\text{CH}_3\text{CO}$), 0.76~2.38 (m, other aliphatic ring protons), 2.75~2.76 (m, $J=10.9$ Hz, 1H), 3.22 (dd, $J=2.9$, 10.1 Hz, 1H), 4.00~4.03 (m, 1H), 4.15 (d, $J=12.6$ Hz, 1H), 4.26~4.32 (m, 3H), 4.37 (br s, 1H), 4.55 (dd, $J=5.8$, 15.2 Hz, 1H), 5.23~5.27 (m, 1H),

5.40~5.47 (m, 2H), 5.55 (br s, 1H), 5.86 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J=4.6$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 15.5, 15.6, 16.8, 18.2, 20.2, 20.5 (2C), 20.7, 23.3, 25.2, 26.8, 27.1, 28.0, 28.9, 30.2, 32.4, 32.5, 35.1, 35.1, 35.2, 36.9, 38.5, 38.7, 39.6, 41.7, 41.8, 46.7, 46.8, 49.1, 55.1, 61.4, 67.5, 70.3, 72.5, 75.0, 75.3, 78.8, 85.7, 120.9, 123.6, 143.5, 145.2, 168.8, 169.3, 170.0, 170.5, 178.0; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 883.5063, found 883.5064.

(3 β ,20 β)-3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-29-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷))(6c): 由化合物 6b (101 mg, 0.16 mmol)、叠氮化乙酰葡萄糖 (90 mg, 0.19 mmol) 制备. 白色固体, 85 mg, 产率 90%. m.p. 245.6~248.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.79, 0.80, 1.00, 1.10, 1.11, 1.13 ($7\times\text{CH}_3$), 1.87, 2.03, 2.07, 2.09 (s, $4\times\text{CH}_3\text{CO}$), 0.76~2.38 (m, other aliphatic ring protons), 2.76~2.79 (m, $J=10.9$ Hz, 1H), 3.22 (q, $J=12$ Hz, 1H), 3.99~4.03 (m, 1H), 4.13 (d, $J=14.6$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J=12.7$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 5.20~5.29 (m, 1H), 5.42 (d, $J=27.9$ Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.85 (d, $J=21.5$ Hz, 1H), 6.45 (t, $J=10.8$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 16.4, 17.5, 18.6, 20.2, 20.5, 20.7, 23.4, 26.4 (2C), 27.3, 28.1, 28.4, 29.3, 31.5, 31.8, 32.7, 34.9, 37.0, 37.4, 39.1, 39.2, 41.5, 43.1, 43.6, 45.3, 47.8, 54.9, 61.4, 61.8, 67.6, 70.3, 72.5, 75.1, 76.8, 77.0, 77.2, 78.8, 85.8, 120.6, 128.6, 145.5, 168.8, 168.9, 169.3, 170.0, 170.6, 176.0, 200.0; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 881.4906, found 881.4916.

熊果酸-12-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖苷))(7c): 由化合物 7b (99 mg, 0.16 mmol)、叠氮化乙酰葡萄糖 (90 mg, 0.19 mmol) 制备. 白色固体, 157 mg, 产率 89%. m.p. 157.6~161.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.71, 0.78, 0.86, 0.92, 0.94, 0.99, 1.10 ($7\times\text{CH}_3$), 1.88, 2.03, 2.07, 2.09 (s, $4\times\text{CH}_3\text{CO}$), 0.73~2.01 (m, other aliphatic ring protons), 3.22 (dd, $J=4.6$, 11.2 Hz, 1H), 3.99~4.02 (m, 1H), 4.15 (dd, $J=2.0$, 12.7 Hz, 1H), 4.25 (dd, $J=4.6$, 15.2 Hz, 1H), 4.30 (dd, $J=4.9$, 12.7 Hz, 1H), 4.61 (dd, $J=6.1$, 15.2 Hz, 1H), 5.25 (t, $J=10.0$ Hz, 1H), 5.35 (t, $J=3.4$ Hz, 1H), 5.41~5.47 (m, 1H), 5.85 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.60 (t, $J=5.3$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 15.4, 15.5, 16.5, 17.1, 18.2, 20.1, 20.5, 20.5, 20.6, 21.1, 23.2, 23.3, 24.8, 27.1, 27.7, 28.0, 30.7, 32.6, 34.8, 36.8, 36.8, 38.5, 38.6, 38.8, 39.4, 39.6, 42.2, 47.4, 47.5, 53.4,

55.0, 61.4, 67.5, 70.2, 72.6, 74.9, 78.8, 85.6, 120.8, 126.0, 139.2, 145.2, 168.6, 169.2, 169.9, 170.4, 178.2; ESI-HRMS calcd for $C_{47}H_{70}N_4O_{11}$ $[M+H]^+$ 867.5114, found 867.5110.

δ -齐墩果烷-18-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -D-葡萄糖苷))(8c): 由化合物 8b (100 mg, 0.16 mmol)、叠氮化乙酰葡萄糖(90 mg, 0.19 mmol)制备. 白色固体, 80 mg, 产率 91%. m.p. 129.7~133.3 °C; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.69, 0.75, 0.80, 0.85, 0.86, 0.97, 1.15 ($7\times CH_3$), 1.86, 2.02, 2.06, 2.08 (s, $4\times CH_3CO$), 0.67~2.01 (m, other aliphatic ring protons), 2.38 (d, $J=13.32$ Hz, 2H), 2.77 (q, $J=15.48$ Hz, 1H), 3.21 (q, $J=11.46$ Hz, 1H), 3.96~3.98 (m, 1H), 4.10 (q, $J=12.84$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J=12.84$ Hz, 1H), 4.38 (q, $J=15.12$ Hz, 1H), 4.57 (q, $J=15.12$ Hz, 1H), 5.21~5.24 (m, 1H), 5.40 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 5.82 (d, $J=8.94$ Hz, 1H), 6.50 (t, $J=5.88$ Hz, 1H), 7.83 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 16.4, 17.5, 18.2, 20.1, 20.5, 20.7, 21.1, 21.5, 23.8, 25.1, 26.2, 27.2, 28.0, 32.1, 32.8, 33.0, 34.0, 35.0, 35.3, 36.7, 37.1, 38.8, 38.8, 41.0, 41.2, 44.2, 48.5, 50.2, 55.1, 61.4, 67.5, 70.3, 72.5, 75.0, 76.8, 77.0, 77.2, 78.8, 85.8, 121.0, 127.9, 142.3, 145.7, 168.6, 169.3, 170.0, 170.6, 176.4; ESI-HRMS calcd for $C_{47}H_{70}N_4O_{11}$ $[M+H]^+$ 867.5114, found 867.5110.

3.2.3 化合物 4d~8d 制备流程 C

将化合物 4c~8c 用甲醇溶解, 再加入甲醇钠(0.18 mmol), 在室温下搅拌 3 h 后, TLC 检测, 蒸干溶剂后, 反应瓶中滴加 1 mol/L HCl 10 mL, 抽滤, 取滤纸上的固体进行干燥, 得白色固体 4d~8d.

白桦脂酸-29-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(β -D-葡萄糖苷))(4d): 化合物 4c (78 mg, 0.09 mmol)经制备流程 C 制备, 不作进一步提纯. 白色固体, 64 mg, 产率 91%. m.p. 158.6~161.3 °C. 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 0.75, 0.80, 0.81, 0.95, 0.95, 1.68 ($6\times CH_3$), 1.87, 2.03, 2.07, 2.10 (s, $4\times CH_3CO$), 0.65~1.95 (m, other aliphatic ring protons), 2.37~2.41 (m, 1H), 3.11~3.18 (m, 2H), 3.98~4.01 (m, 1H), 4.13 (dd, $J=1.6$, 12.6 Hz, 1H), 4.34 (dd, $J=4.7$, 12.7 Hz, 1H), 4.46~4.52 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 5.25 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.37~5.44 (m, 2H), 5.84 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.32 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 14.6, 15.3, 15.9, 16.1, 18.2, 19.4, 20.1, 20.5, 20.5, 20.7, 20.8, 25.5, 27.3, 27.9, 29.3, 30.8, 33.5, 34.3, 34.6, 37.1, 37.7, 38.2, 38.6, 38.8, 40.7, 42.4, 46.7, 50.0, 50.5, 55.3, 55.6, 61.3, 67.5, 70.3, 72.5, 75.1, 78.9, 85.8, 109.4, 120.7, 145.9,

150.8, 168.7, 169.3, 170.0, 170.5, 176.3; ESI-HRMS calcd for $C_{47}H_{70}N_4O_{11}$ $[M+H]^+$ 867.5114, found 867.5108.

$3\beta,16\alpha$ -二羟基齐墩果-12-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(β -D-葡萄糖苷))(5d): 化合物 5c (82 mg, 0.09 mmol)经制备流程 C 制备, 不作进一步提纯. 白色固体, 67 mg, 产率 92%. m.p. 198.3~200.6 °C; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 0.66, 0.78, 0.89, 0.94, 0.96, 0.97, 1.37 ($7\times CH_3$), 0.76~2.00 (m, other aliphatic ring protons), 2.35 (t, $J=13.2$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J=3.2$, 13.6 Hz, 1H), 3.15 (dd, $J=4.9$, 11.4 Hz, 1H), 3.47~3.58 (m, 3H), 3.71 (dd, $J=5.3$, 12.1 Hz, 1H), 3.83~3.89 (m, 2H), 4.31 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 4.35 (brs, 1H), 4.43 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 5.47 (brs, 1H), 5.57 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 16.2, 16.3, 17.7, 19.5, 24.5, 25.4, 27.3, 27.9, 28.7, 31.2, 31.7, 33.3, 33.9, 36.0 (2C), 36.3, 38.1, 39.8, 39.9, 40.8, 42.3, 42.8, 48.0, 48.2, 50.0, 56.8, 62.4, 70.9, 74.0, 75.6, 78.4, 79.7, 81.1, 89.5, 123.5, 124.3, 144.9, 145.9, 180.2; ESI-HRMS calcd for $C_{39}H_{62}N_4O_8$ $[M+H]^+$ 715.4640, found 715.4644.

($3\beta,20\beta$)-3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-29-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(β -D-葡萄糖苷))(6d): 化合物 6c (68 mg, 0.09 mmol)经制备流程 C 制备, 不作进一步提纯. 白色固体, 56 mg, 产率 91%. m.p. >250 °C; 1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 0.65, 0.66, 0.84, 0.97, 0.99, 1.14, 1.27 ($7\times CH_3$), 0.61~2.05 (m, other aliphatic ring protons), 3.02 (q, $J=16.2$ Hz, 1H), 3.16 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 3.32~3.56 (m, 4H), 3.47~3.58 (m, 3H), 3.71 (q, $J=23.0$ Hz, 2H), 4.35 (dd, $J=15.3$, 45.2 Hz, 2H), 5.47 (t, $J=12.0$ Hz, 2H), 7.98 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 16.1, 16.3, 17.2, 18.4, 23.1, 26.0, 26.1, 27.0, 28.2, 28.4, 28.6, 31.5, 32.2, 34.6, 36.7, 37.3, 38.6, 40.8, 42.9, 44.9, 47.5, 54.2, 60.8, 61.2, 69.6, 72.2, 76.6, 77.1, 80.0, 87.3, 121.6, 127.6, 145.5, 170.0, 175.5, 199.4; ESI-HRMS calcd for $C_{39}H_{60}N_4O_8$ $[M+H]^+$ 713.4484, found 713.4488.

熊果酸-12-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-(β -D-葡萄糖苷))(7d): 化合物 7c (130 mg, 0.09 mmol)经制备流程 C 制备, 不作进一步提纯. 白色固体, 105 mg, 产率 85%. m.p. 196.5~198.9 °C; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 0.66, 0.78, 0.90, 0.91, 0.95, 0.97, 1.12 ($7\times CH_3$), 0.53~1.88 (m, other aliphatic ring protons), 1.64 (q, $J=8.8$ Hz, 2H), 2.03~2.18 (m, 2H), 3.15 (q, $J=11.5$ Hz, 1H), 3.45~3.60 (m, 3H), 3.71 (q, $J=12.1$ Hz, 2H), 3.86 (dd, $J=9.1$, 23.0 Hz, 2H), 4.30~4.46 (m, 2H), 5.34 (t, $J=3.4$ Hz, 1H), 5.56 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz,

CD₃OD) δ : 28.8, 31.2, 31.9, 34.1, 35.8, 36.0, 38.1, 39.8, 40.8, 43.2, 54.1, 56.7, 62.4 (2C), 70.9, 74.0, 78.4, 79.7, 81.1, 89.5, 123.6, 124.3, 127.4, 139.8, 144.9, 180.4; ESI-HRMS calcd for C₃₉H₆₂N₄O₇ [M+H]⁺ 699.4691, found 699.4698.

δ -齐墩果烷-18-烯-3-羟基-28-*O*-(4-亚甲基-1,2,3-三唑-1-1-(β -D-葡萄糖苷))(8d): 化合物 **8c** (60 mg, 0.09 mmol)经制备流程 C 制备, 不作进一步提纯. 白色固体, 43 mg, 产率 88%. m.p. 180.6~182.6 °C; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 0.76, 0.84, 0.91, 0.96, 1.19, 1.31, 1.34 (7× CH₃), 0.75~1.85 (m, other aliphatic ring protons), 2.28 (d, *J*=13.56 Hz, 1H), 2.52 (d, *J*=14.04 Hz, 1H), 2.87 (q, *J*=14.52 Hz, 1H), 3.16 (q, *J*=11.64 Hz, 1H), 3.48~3.59 (m, 3H), 3.71 (q, *J*=12.24 Hz, 1H), 3.82~3.89 (m, 2H), 4.45 (dd, *J*=5.52, 15.12 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J*=5.76, 15.12 Hz, 1H), 5.59 (d, *J*=9.24 Hz, 1H), 7.22 (t, *J*=6.00 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 16.2, 17.1, 18.3, 19.4, 22.0, 22.4, 23.8, 24.6, 26.6, 27.6, 28.0, 28.6, 30.7, 31.8, 32.6, 34.0, 34.3, 35.5, 36.0, 36.4, 37.8, 38.4, 39.9, 40.2, 42.1, 42.4, 45.6, 49.9, 51.8, 56.7, 62.4, 70.9, 74.1, 78.4, 79.6, 81.1, 89.5, 123.4, 128.6, 143.9, 146.0, 178.9; ESI-HRMS calcd for C₃₉H₆₂N₄O₇ [M+H]⁺ 699.4691, found 699.4689.

3.3 化合物的体外抗流感病毒活性测试

3.3.1 化合物细胞毒性实验

将 MDCK 细胞以 3×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C, 浓度为 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h. 待细胞密度为 80%~90%, 吸去上清, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 加入体积分数为 0.25% TPCK (Technological Pedagogical Content Knowledge)处理、体积分数为 1% 的待测化合物的维持液(100 μ L), 每个化合物 3 个重复孔, 最后两个孔分别为 OSV-p 和 DMSO. 于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h. 使用 CellTiter-Glo[®]细胞活力检测试剂盒检测细胞活力, 使用 SpectraMax M2 多功能酶标仪读取细胞活力值[相对细胞活力=化合物组/对照组(DMSO 组)×100%].

3.3.2 化合物抑制流感病毒的致病变效应

将 MDCK 细胞以 3×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h. 待细胞密度为 80%~90%, 吸去上清, 用 PBS 清洗 2 次. 每孔加入体积分数为 1%待测化合物、体积分数为 0.25% TPCK 处理的 DMEM (100 μ L), 或 1%待测化合物、0.1% MOI(感染复数)=0.1 的 A/WSN/33 (H1N1)和 0.25% TPCK 处理的 DMEM (100 μ L), 培养 48 h 后, 于倒置显微镜下观察细胞病变效应并详细记录.

3.3.3 化合物体外抗流感病毒活性的评价

将 MDCK 细胞以 3×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h, 待细胞密度为 80%~90%. 吸去上清, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 0.1%的 MOI (感染复数)=0.1 的 A/WSN/33 (H1N1), 1%待测化合物以及 0.25% TPCK 处理的 DMEM (100 μ L), 每个化合物 3 个重复孔, 最后两列孔分别为 OSV-p 和 DMSO. 于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h. 使用 CellTiter-Glo[®]细胞活力检测试剂盒检测细胞活力, 使用 SpectraMax M2 多功能酶标仪读取细胞活力值. 与 DMSO 组比较, 流感病毒抑制率是指化合物起到抑制病毒生长作用的比率. 流感病毒抑制率(%)=[1-(化合物组平均 OD 值-化合物加病毒组平均 OD 值)/阴性对照组和病毒组的 OD 值差值]×100%.

3.4 血凝抑制实验

将 U 型血凝板中每孔加入 25 μ L 生理盐水, 在第 1 孔加入 25 μ L 化合物 **4d**, 2 倍比梯度稀释至第 11 孔, 第 12 孔为空白对照. 混匀后从左到右按顺序向各孔之中加入 25 μ L 配好的病毒储备液. 于室温(20~25 °C)孵育 30 min, 然后每孔加入 50 μ L 鸡血红细胞(1%), 静置 25 min 后, 观察血凝结果并记录实验结果.

3.5 分子对接实验

用程序 AutoDock 4.2 对 10 个五环三萜葡萄糖缀合物与血凝素蛋白进行分子对接试验. 从 RCBS 蛋白数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)中选择流感病毒 HA 晶体结构(蛋白代码: 1RVT), 进行分子对接, 用 ADT 生成覆盖整个血凝素蛋白头部和部分茎的点网格(Box size: 126×126×126 issues with a shared space 0.0375 nm). 五环三萜葡萄糖缀合物的三维结构由 Chemoffice 15.1 软件绘制, 化合物 **4c**~**8d** 与 HA 蛋白的结合构象采用 Lamarckian Genetic Algorithm 算法得到化合物 **4c**~**8d** 与血凝素结合构象, 用 PyMOL 2.3.1.0 对结构进行了可视化分析与验证, 利用分子对接软件 Discovery Studio 2016 制作分子对接模拟图.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **6b**, **8b**, **4c**~**8d** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Li, H.; Li, M.; Xu, R.; Wang, S.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Zhou, D.; Xiao, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 560.
- [2] Chintakrindi, A. S.; Gohil, D. J.; Chowdhary, A. S.; Kanyalkar, M. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115191.
- [3] Cline, T. D.; Karlsson, E. A.; Seufzer, B. J.; Schultz-Cherry, S. J. *Virology* **2013**, *87*, 1411.
- [4] Chintakrindi, A. S.; Gohil, D. J.; Kothari, S. T.; Chowdhary, A. S.;

- Kanyalkar, M. A. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27*, 1013.
- [5] Naesens, L.; Stevaert, A.; Vanderlinden, E. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *30*, 106.
- [6] Lee, N.; Hurt, A. C. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2018**, *31*, 520.
- [7] Yen, H. L.; Hoffmann, E.; Taylor, G.; Scholtissek, C.; Monto, A. S.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8787.
- [8] Tian, Z.; Si, L.; Meng, K.; Meng, K.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Zhou, D.; Xiao, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *134*, 133.
- [9] Yu, M.; Si, L.; Wang, Y.; Wu, Y.; Yu, F.; Jiao, P.; Shi, Y.; Wang, H.; Xiao, S.; Fu, G.; Tian, K.; Wang, Y.; Guo, Z.; Ye, X.; Zhang, L.; Zhou, D. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10058.
- [10] Luo, M.; Wu, X.; Li, Y.; Guo, F. *Molecules* **2021**, *26*, 895.
- [11] Su, Y.; Meng, L.; Sun, J.; Li, W.; Shao L.; Chen, K.; Zhou, D.; Yang, F.; Yu, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111622.
- [12] Shao, L.; Yang, F.; Li, W. J.; Yu, F. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 2454 (in Chinese).
(邵亮, 杨帆, 李维嘉, 俞飞, 有机化学, **2021**, *41*, 2454.)
- [13] Nouri-Felekari, M.; Nezafati, N.; Moraveji, M.; Hesarak, S.; Ramezani, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *183*, 2030.
- [14] Agrahari, A. K.; Bose, P.; Jaiswal, M. K.; Rajkhowa, S.; Singh, A. S.; Hotha, S.; Mishra, N.; Tiwari, V. K. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7638.
- [15] Devaraj, N. K.; Finn, M. G. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6697.
- [16] Chen, D.; Zhang, P.; Sun, Y.; Wang, P.; Zhang, C.; Kong, L.; Zhang, J.; Sun, H.; Wen, X. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 11154.
- [17] Li, H.; Li, M.; Xu, R.; Wang, S.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Zhou, D.; Xiao, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 560.
- [18] Spackman, E.; Sitaras, I. *Methods. Mol. Biol.* **2020**, *2123*, 11.

(Lu, Y.)