

含 3,4-二羟基的查尔酮类似物合成及对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

吴守彪¹, 吴嘉慧², 翁约约³, 李震岳³

(1. 浙江省温州市第六人民医院药剂科 325060; 2. 温州医科大学附属第一医院神经外科, 浙江温州 325015; 3. 浙江省温州市中心医院药剂科 325000)

[摘要] **目的** 合成新型 3,4-二羟基的查尔酮类似物并研究其对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用。**方法** 用不同的取代苯甲醛和 3,4-二羟基苯乙酮为原料进行羟醛缩合反应, 合成多种含有 3,4-二羟基的查尔酮新类似物。采用噻唑蓝(MTT) 法检测查尔酮类似物对 PC12 细胞的毒性作用, 运用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除实验检测查尔酮类似物直接清除自由基的作用; 并用 MTT 法检测查尔酮类似物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用并筛选出活性较好的化合物 5, 运用免疫荧光实验和 Western blot 研究活性化合物 5 对核因子 E2 相关因子 2(NRF2) 抗氧化信号通路的作用。**结果** 合成 5 个新型 3,4-二羟基查尔酮类似物, 并筛选出细胞毒性低且细胞保护作用较好的活性化合物 5, 该化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞的损伤具有良好的保护作用, 呈现出浓度依赖性。活性化合物 5 可激活 NRF2 抗氧化信号通路, 上调谷氨酰胺半胱氨酸合成酶催化亚基(GCLC)和血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白的表达。**结论** 新型活性化合物 5 对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤表现出良好的保护作用且呈浓度依赖性, 为得到具有较好活性的抗氧化查尔酮药物奠定了基础。

[关键词] 查尔酮; 合成; 细胞保护作用; 氧化损伤

[中图分类号] R914.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)06-0879-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Primary investigation on synthesis of 3,4-dihydroxy chalcone analogues and its protective effect on H_2O_2 -induced PC12 cell injury

WU Shoubiao¹, WU Jiahui², WENG Yueyue³, LI Zhenyue³

(1. Department of Pharmacy, Wenzhou Municipal Sixth People's Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325060, China; 2. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325015, China; 3. Department of Pharmacy, Wenzhou Municipal Central Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize the new type 3,4-dihydroxy chalcone analogues and to study its protective effect on H_2O_2 -induced PC12 cell injury. **Methods** Different substituted benzaldehydes and 3,4-dihydroxyacetophenone were used as the raw materials to conduct the aldol condensation reaction for synthesizing multiple new chalcone analogues containing 3,4-dihydroxy. The MTT assay was used to detect the cytotoxicity of chalcone analogues on PC12 cells. The DPPH assay was used to check the effect of chalcone analogues for directly scavenging the free radicals. Moreover the MTT assay was to detect the protective effect of chalcone analogues on H_2O_2 -induced PC12 cell injury and screen the compound 5 with better activity. The effect of active compound 5 on the antioxidant signaling pathway of NRF2 was investigated by using Western blot and immunofluorescence assay, respectively. **Results** The five new type 3,4-dihydroxychalcone analogues were synthesized, and the active compound 5 possessing low cytotoxicity and good cytoprotective effect was screened out, which had good protective effect on H_2O_2 -induced damage of PC12 cells, showing a concentration-dependent manner. The active compound 5 could activate the NRF2 antioxidant signaling pathway and up-regulated the expression of GCLC and HO-1 proteins. **Conclusion** The new type active compound 5 shows a good protective effect on H_2O_2 -induced oxidative damage of PC12 cells in a concentration-dependent manner, which laid a prophase foundation for obtaining anti-oxidant chalcone drugs with better activity.

[Key words] chalcone; synthesis; cytoprotective effect; oxidative damage

天然产物及其合成类似物已被证明是药物开发中的宝贵资源^[1-2]。查尔酮是一种广泛分布于各种花卉、水果和蔬菜中黄酮类化合物,据报道它具有许多生物学特性,包括抗氧化、抗菌、抗癌、抗血管生成和抗炎等活性^[3]。在所有的生物活性中,抗氧化活性被广泛研究。同时,许多具有多羟基的查尔酮类化合物具有直接清除自由基的作用,尤其是含有 3,4-二羟基苯基结构的化合物表现出高效的抗氧化活性^[4-5]。此外,研究表明存在于查尔酮骨架中的 α,β -不饱和酮部分能够诱导核因子 E2 相关因子 2(NRF2) 抗氧化信号通路的激活^[6]。而且,文献报道查尔酮上的 α,β -不饱和和双键可以增加 3,4-二羟基苯基结构的稳定性^[7]。LIMASSET 等^[8]对 3 种查尔酮化合物的抗氧化作用进行研究,发现查尔酮结构中的酚羟基是清除自由基的功能基团。清除自由基的能力与分子中酚羟基的数目,取代位置和苯环取代基的位置、长短密切相关。因此,本文在 3,4-二羟基查尔酮的基础上进行修饰改造,希望通过改变苯环上的侧链结构以寻求高效低毒的新型抗氧化小分子化合物。

本文用不同的取代苯甲醛和 3,4-二羟基苯乙酮为原料进行羟醛缩合反应,合成一系列含 3,4-二羟基的查尔酮新类似物,检测其对 H_2O_2 诱导神经元 PC12 细胞损伤的抗氧化活性,为得到高效低毒的抗氧化候选药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

取代苯甲醛和 3,4-二羟基苯乙酮购自上海阿拉丁有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自吉诺生物医药技术有限公司;噻唑蓝(MTT)试剂购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(FCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;PC12 细胞购自武汉大学细胞存储中心;NRF2 抗体和 TritonX-100 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;血红素加氧酶-1(HO-1)和谷氨酸半胱氨酸合成酶催化亚基(GCLC)抗体购自中美生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 查尔酮类似物的合成

取 15.0 mmol 不同的取代苯甲醛和 10.0 mmol 的 3,4-二羟基苯乙酮置于反应瓶中,加入 20 mL 无水乙醇使其溶解,在 H_2SO_4 酸性催化下反应,78 °C 油浴反应,TLC 点板监测反应进程。反应结束后旋干乙醇,干法上柱后用硅胶柱层析纯化(洗脱剂为石油醚与乙酸乙酯的混合溶剂)得到查尔酮类似物 1~5。

1.2.2 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除率

利用化合物对 DPPH 的清除能力初步测试其抗氧化活性,具体方法如下:用乙醇制备查尔酮类似物溶液(20 mg/mL)和 DPPH 溶液(0.15 mmol/L),在 80 μ L 查尔酮类似物溶液中加入 120 μ L(0.15 mmol/L)的 DPPH 溶液(A_i)。对照组为 80 μ L 查尔酮类似物溶液加入 120 μ L 乙醇溶液(A_j)。空白组为 80 μ L

乙醇溶液加入 120 μ L DPPH 溶液(Ac)。这些混合物在 25 °C 下孵育 30 min,然后在 517 nm 测量光密度(OD)。实验重复 3 次。DPPH 的清除能力(%) = $[1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$ 。测试时用 TBHQ 作对照。

1.2.3 化合物对 PC12 细胞的毒性作用

PC12 细胞(5×10^3 个/孔)接种在 96 孔板中,用 DMEM 培养液培养于 37 °C 培养箱过夜。加入化合物(10 μ mol/L)24 h 后,用 MTT 溶液(5 mg/mL)在 37 °C 中处理 4 h。最后将甲瓩晶体溶解于 120 μ L DMSO 中,在 490 nm 测量 OD 值。细胞存活率为 DMSO 与对照组的 OD 值的百分比。

1.2.4 化合物的抗氧化活性

PC12 细胞(5×10^3 个/孔)接种在 96 孔板中,用 DMEM 培养液培养于 37 °C 培养箱过夜。加入化合物(10 μ mol/L)24 h 后,再加入 H_2O_2 (450 μ mol/L)损伤 24 h。24 h 后细胞用 MTT 溶液在 37 °C 中处理 4 h。最后将甲瓩晶体溶解于 120 μ L DMSO 中,在 490 nm 测量 OD 值。细胞存活率为 DMSO 与对照组的 OD 值的百分比。

1.2.5 活性化合物 5 对 PC12 细胞的保护作用

采用 MTT 检测细胞存活率,加入不同浓度(2.5, 5.0 和 10.0 μ mol/L)的化合物 5,24 h 后再加入 H_2O_2 (450 μ mol/L)损伤 24 h。参照 1.2.4 测定细胞生存率。

1.2.6 活性化合物 5 对 NRF2 核移位的作用

PC12 细胞(3×10^5 个/孔)接种在 6 孔板中,用 DMEM 培养液培养于 37 °C 培养箱过夜。活性化合物 5 作用 24 h 后,在室温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min 并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,接着再用 0.1% TritonX-100 作用 15 min,最后在 1% BSA 中封闭 1 h。经 PBS 洗涤后,用 NRF2 抗体在 4 °C 下孵育过夜,荧光二抗在室温下孵育 1 h 后细胞核用 4,6-脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色,最后通过荧光显微镜观察。

1.2.7 Western blot 检测 GCLC 和 HO-1 蛋白的表达

将 PC12 细胞(3×10^5 个/孔)接种在 6 孔板中,用 DMEM 培养液培养于 37 °C 培养箱过夜。活性化合物 5 作用 24 h 后,收样进行 Western blot 实验。蛋白质通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,再用 5% 脱脂乳液封闭。一抗分别为 HO-1、GCLC、GAPDH,之后用过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温下孵育 1 h。最后通过 Image J 软件检测靶蛋白。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 查尔酮类似物的合成

采用 H_2SO_4 作为催化剂,通过羟醛缩合反应,共合成 5 个含有 3,4-二羟基查尔酮类新化合物(图 1 和表 1),通过 TLC 检测和熔点测定来检验纯度,化合物通过质谱和核磁共振氢谱进行构像表征,发现酚羟基的化学位移 δ 值在 8 ppm 附近,中间的 α,β -不饱和酮连接部分的化学位移 δ 值在 7.5 ppm 附近。当苯环上的 R 取代基为吸电子基时,苯环整体的化学位移 δ 值往高场移动,苯环上甲氧基的化学位移 δ 值在 3.9 ppm 附近,查尔酮类化合物的合成路线及化合物的结构见图 1、表 1。

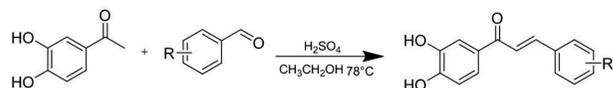
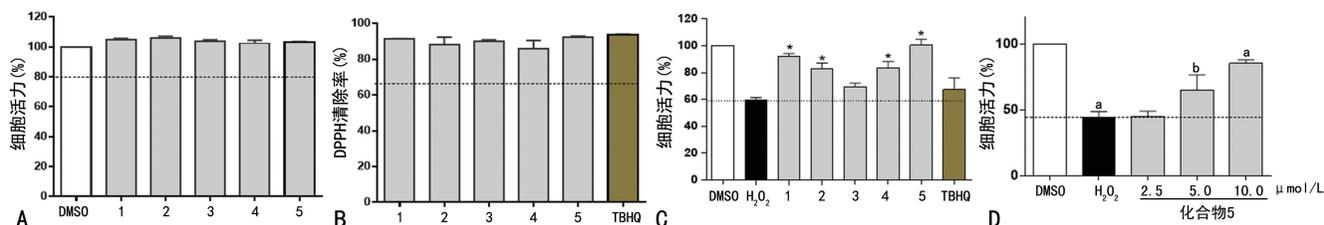


图 1 查尔酮类化合物的合成路线

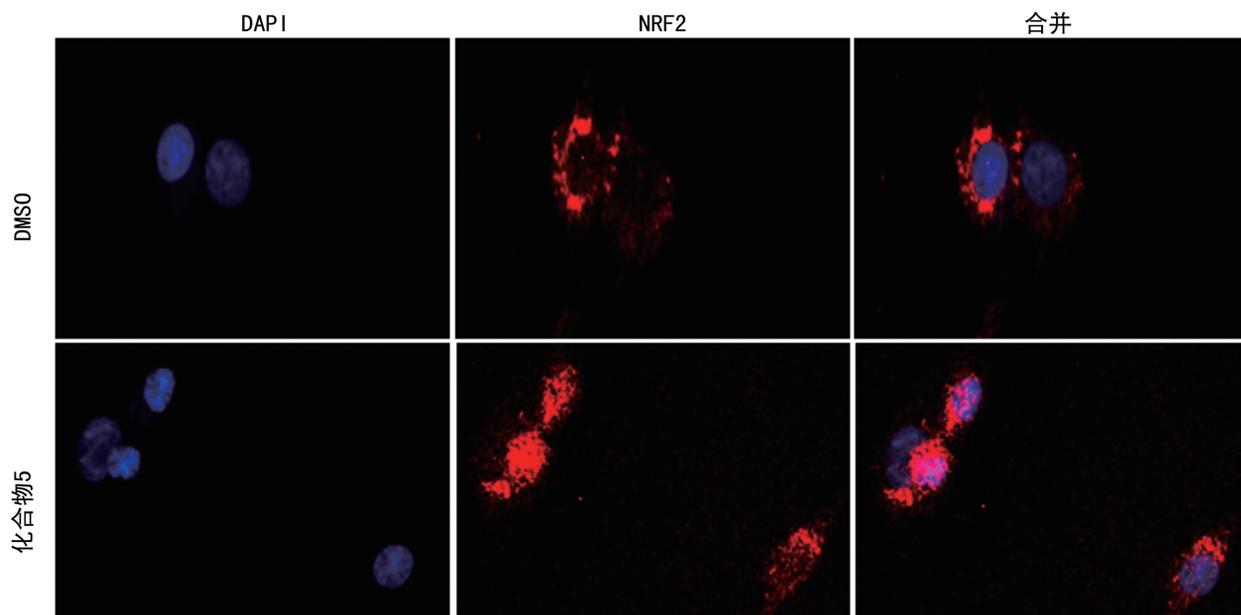
2.2 查尔酮类似物保护 PC12 细胞免受 H_2O_2 损伤

检测化合物对 PC12 细胞的毒性试验结果表明,相对 DMSO,10 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物对 PC12 细胞没有细胞毒性。用 DPPH 清除实验检测化合物清除自由基的作用,以 TBHQ 作为阳性对照化合物,结果发现



A: 查尔酮类似物(10 $\mu\text{mol/L}$)对 PC12 细胞的毒性作用;B: 查尔酮类似物(20 mg/mL)的 DPPH 自由基清除实验;C: 查尔酮类似物(10 $\mu\text{mol/L}$)对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞的损伤的保护作用;D: 活性化合物 5 (2.5,5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$)对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞的损伤的保护作用。^a: $P < 0.01$,与 DMSO 比较;^b: $P < 0.05$,与 H_2O_2 比较。

图 2 查尔酮类似物对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞保护作用



蓝色:细胞核;红色:NRF2。

图 3 免疫荧光检测 NRF2 核移位

化合物具有直接清除自由基的作用。将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物提前孵育细胞 24 h 后加入 H_2O_2 ,结果表明化合物能够减轻 H_2O_2 诱导的细胞损伤。综合以上实验结果,优选出活性化合物 5 进行进一步的抗氧化活性研究。结果表明,化合物 5 能够呈浓度依赖性地保护 PC12 细胞,见图 2。

表 1 查尔酮类化合物的结构

化合物	R
1	2-OCH ₃
2	4-F
3	2,4,5-OCH ₃
4	3-Cl
5	2,5-OCH ₃

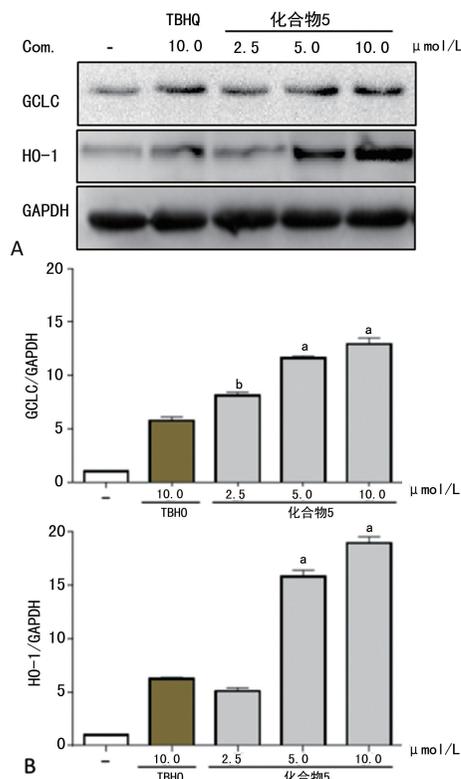
2.3 活性化合物 5 诱导 NRF2 核转位

与空白对照组相比,化合物 5 处理后的细胞核内有强荧光,化合物 5 能够诱导 NRF2 移位,见图 3。

2.4 活性化合物 5 诱导 GCLC 和 HO-1 蛋白的表达

Western blot 检测结果见图 4,活性化合物 5 能

够浓度依赖性地提高 GCLC 和 HO-1 蛋白表达,起到抗氧化作用。



A: Western blot 检测 GCLC 和 HO-1 蛋白电泳图; B: GCLC 和 HO-1 蛋白表达水平统计图; ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与 DMSO 比较。

图 4 活性化合物 5 对 GCLC 和 HO-1 蛋白的影响

3 讨 论

Keap1-NRF2-ARE 介导的信号通路是细胞内抗氧化应激和维持氧化还原平衡的重要通路之一^[9-10]。当细胞受到亲电试剂或(和)抗氧化剂等外界刺激时,会改变 Keap1 的巯基残基结构,这种残基结构改变导致 NRF2 从 Keap1 解离,从而增加 NRF2 稳定性并进一步促进 NRF2 从细胞质移位到细胞核,继而 NRF2 结合到 DNA 上的抗氧化反应元件 ARE,启动细胞保护基因的转录,其中包括 HO-1。研究发现含有 α , β -不饱和酮基能够共价修饰 Keap1 的巯基从而促使 NRF2 入核。查尔酮属于黄酮类化合物,存在于花、水果和蔬菜中,其结构上含有 α , β -不饱和酮基,因此,查尔酮可以作为 NRF2 诱导剂^[11-12]。

本研究采用不同的取代苯甲醛和 3,4-二羟基苯乙酰羟醛缩合合成新型含 3,4-二羟基的查尔酮类似物,并进行了相关抗氧化活性的研究。结果表明所合成的类似物对 PC12 没有细胞毒性,且有促进细胞生长的作用。DPPH 实验结果表明所合成的所有新类似物都具有直接清除自由基的作用。 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤模型表明了类似物能够保护细胞免受 H_2O_2 损伤,优选的活性化合物 5 的细胞保护作用呈浓度依赖。进一步的机制研究表明活性化合物能够

激活 NRF2 抗氧化信号通路的 GCLC 和 HO-1 蛋白的表达。

综上所述,含有 3,4-二羟基的查尔酮类似物具有良好的抗氧化作用。活性化合物 5 能够直接清除自由基和激活 NRF2 抗氧化信号通路间接清除自由基。本研究为查尔酮类抗氧化化合物的研究提供了一定的研究基础。

参考文献

- [1] KINGSTON D G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(3): 496-511.
- [2] MISHRA B B, TIWARI V K. Natural products: an evolving role in future drug discovery[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4769-4807.
- [3] DIMMOCK J R, ELIAS D W, BEAZELY M A, et al. Bioactivities of chalcones[J]. *Current Med J Chem*, 2000, 6(12): 1125-1149.
- [4] 黄珊珊,袁汝强,刁云鹏,等. 5-氯水杨醛缩 2,4-二羟基苯酰肼的抗菌抗氧化活性研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2015, 27(3): 256-259.
- [5] CHIRUTA C, SCHUBERT D, DARGUSCH R. Chemical modification of the multitarget neuroprotective compound fisetin[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(1): 378-389.
- [6] KUMAR V, KUMAR S, HASSAN M, et al. Novel chalcone derivatives as potent NRF2 activators in mice and human lung epithelial cells[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(12): 4147-4159.
- [7] KOZOWSKI D, TROUILLAS P, CALLISTE C, et al. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones[J]. *J Phys Chem A*, 2007, 111(6): 1138-1145.
- [8] LIMASSET B, DOUCEN C, DORE J C, et al. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils[J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 46(7): 1257-1271.
- [9] NING X, GUO Y, WANG X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3,4-dihydroxystyryl aralkyl sulfones and sulfoxides as novel multifunctional neuroprotective agents[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(10): 4302-4312.
- [10] 吴相侠,刘斯,宋馨然,等. 牦牛(下转第 886 页)

CX3CR1、CD11b/c、NMDAR 表达的调节有关。说明乌头可显著性下调寒痹模型组大鼠的痛觉过敏,明显促进热痹模型大鼠的痛觉过敏的形成,因而适用于治疗寒痹证,佐证了中医治疗原则“寒者热之”。

参考文献

- [1] 吴迪,王键. 痹证理论及其中医证候治研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(7): 147-150.
- [2] 李鑫,魏艳霞,林也. 风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(12): 1496-1501.
- [3] 周瑾,潘扬,袁振华,等. 乌头汤证治及临床应用[J]. 河南中医, 2017, 37(12): 2058-2060.
- [4] 钱兆丰,王付. 王付运用乌头汤经验探索[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(7): 86-89.
- [5] 黄茜,孙明丽,李腾飞,等. 乌头生物碱镇痛作用及机制研究进展[J]. 神经药理学报, 2017, 7(3): 21-32.
- [6] 张天睿,张硕峰,宋敬怡,等. 祖师麻肠溶微丸对结扎坐骨神经所致痛觉敏感大鼠背根神经 P2X4 受体及 P38MAPK 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 37-40.
- [7] 曹丽君,王瑞,刘永惠. 刘永惠教授临床辨治痹证经验[J]. 河北中医, 2018, 40(4): 485-488.
- [8] 刘风雨,万有. 神经病理性疼痛治疗的新靶点: Cav3. 2T 型钙离子通道[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(6): 401, 406.

- [9] 王乙茹,王浩伟,袁红斌. 神经病理性疼痛的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2018, 39(2): 165-169.
- [10] 孙彩霞,苏兆亮,许化溪. 神经病理性疼痛中枢敏化的免疫炎症机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3): 331-333.
- [11] BRADESI S, BRADESI S. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception[J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(5): 499-511.
- [12] 端木程琳,乔丽娜,闫娅霞. 针刺镇痛与脊髓胶质细胞参与慢性痛作用机制研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 153-156.
- [13] 董源基,喻志源,谢敏杰,等. 脊髓损伤和炎症[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(3): 142-145.
- [14] REYNOLDS G P, NEIL J C. Modelling the cognitive and neuropathological features of schizophrenia with phencyclidine[J]. J Psychopharmacol, 2016, 30(11): 1141.
- [15] ZHOU H X, WOLLMUTH L P. Advancing NMDA receptor physiology by integrating multiple approaches[J]. Trend Neur, 2017, 40(3): 129-137.
- [16] 黄喜,陈慧英,韦廷佳,等. NMDA 受体靶向拮抗剂的研究进展[J]. 生理科学进展, 2018, 49(3): 212-216.

(收稿日期:2019-06-10 修回日期:2019-10-26)

(上接第 871 页)

- [12] WEI H Y, WONG K L, SHIMASAKI N, et al. Corrigendum: CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34310.
- [13] LI X Y, WU L, LI S W, et al. Effect of CD16a, the surface receptor of Kupffer cells, on the growth of hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6): 1465-1474.
- [14] 张林,侯艳红,张健,等. 增强 CD16 分子表达对 CIK 细胞杀伤胃癌细胞能力影响的研究[J]. 临床消化病杂志, 2013, 25(3): 147-150.
- [15] HERTER S, BIRK M C, KLEIN C, et al. Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity[J]. J Immunol, 2014, 192(5): 2252-2260.

- [16] CHUNG S, LIN Y L, REED C, et al. Characterization of in vitro antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of therapeutic antibodies-impact of effector cells[J]. J Immunol Methods, 2014, 407(3): 63-75.
- [17] SCONOCCHIA G, ZLOBEC I, LUGLI A, et al. Tumor infiltration by FC gamma R III (CD16)⁺ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma[J]. Int J Cancer, 2011, 128(11): 2663-2672.
- [18] CANOSSI A, AURELI A, DEL BEATO T, et al. Role of KIR and CD16A genotypes in colorectal carcinoma genetic risk and clinical stage[J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 239.

(收稿日期:2019-06-03 修回日期:2019-10-27)