

类姜黄素化合物的合成及对 蛋白质非酶糖基化抑制活性的研究^{*}

杜志云^{1,2}, 刘 忠², 邹 兰², 李满妹¹, 乔 薇¹, 马 林¹, 古练权²

(1 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

摘 要: 通过芳香醛和环己酮及丙酮在乙酸-HCl 催化缩合制备了两个系列 (A、C) 类姜黄素化合物, 多酚羟基类姜黄素不需经过羟基保护一步直接缩合制得。对所合成的类姜黄素化合物对牛血清白蛋白非酶糖基化的抑制活性进行了研究, 结果表明带酚羟基的类姜黄素均表现出一定的非酶糖基化的抑制活性, 四羟基类姜黄素 A₂ 及 C₂ 表现出极强的非酶糖基化的抑制活性, IC₅₀ 分别为 5.1 μmol/L 和 9.4 μmol/L。

关键词: 类姜黄素; 非酶糖基化抑制剂; 合成

中图分类号: O 621.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 02-0056-04

非酶糖基化 (Maillard 反应) 是一系列复杂的非酶促反应, 蛋白质和葡萄糖在体内发生非酶促反应形成 Schiff 碱和 Amadori 产物等早期产物, 进而经过氧化、重排、交联等过程, 形成不可逆的非酶糖基化终末产物 (AGEs)^[1]。研究表明, AGEs 是糖尿病并发症发生的主要因素, 具体表现为造成动脉粥样硬化、视网膜微血管瘤形成和肾病的发生等^[2]。因此, 抑制蛋白质非酶糖基化, 减少 AGEs 的形成是治疗糖尿病及其并发症最有效的手段之一。迄今已证明氨基胍 (amino guanidine, AG)、维生素 B₆、维生素 C、阿司匹林及甲福明等药均能抑制非酶糖基化产物的形成。但是这些药物大部分还处于体外实验和动物实验阶段, 进入了临床试验的只有 AG 一种, AG 虽有较好的抑制效果, 但是用量非常大。因此, 寻找具有抑制 AGEs 的形成潜力的先导化合物具有重要的意义。

二苯基酮的结构与姜黄素的化学结构类似, 常称之为类姜黄素。姜黄素 (见图 1) 为中药姜黄的主要成分, 是一种黄色色素, 它在作为调料、染色剂的同时, 有抗炎、抗氧化、防癌、抗癌的作用^[3-5]。我们之前报道了姜黄素对蛋白质非酶糖基化的抑制作用^[6]。为了寻求更好的蛋白质非酶糖基化的抑制剂, 本文通过芳香醛和相应酮在酸性条件下缩合反应合成了一系列类姜黄素化合物 (见图 2), 对多酚羟基类姜黄素的合成未经基团保护一步直接缩合制得, 合成简单, 产率高, 并研究了它们对蛋白质

非酶糖基化产物的抑制活性。

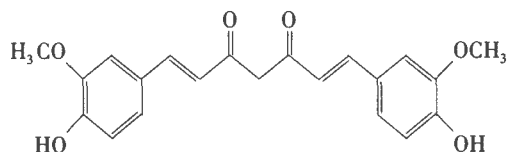
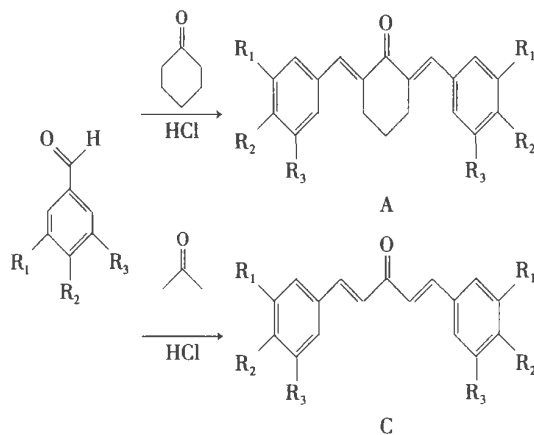


图 1 姜黄素的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of curcumin



A₁/C₁: R₁ = R₃ = H, R₂ = OH;

A₂/C₂: R₁ = R₂ = OH, R₃ = H;

A₃/C₃: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OCH₃;

A₄/C₄: R₁ = R₃ = C(CH₃)₃, R₂ = OH;

A₅/C₅: R₁ = R₂ = OCH₃, R₃ = H;

A₆/C₆: R₁ = R₃ = OCH₃, R₂ = OH

图 2 类姜黄素化合物的合成

Fig. 2 Synthesis of curcumin analogs

^{*} 收稿日期: 2005-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20032021)

作者简介: 杜志云 (1969 年出生), 男, 博士研究生, 通讯联系人: 马林, E-mail: cesma@zsu.edu.cn

1 实验部分

1.1 实验仪器和试剂

FLS 920 时间分辨与稳态荧光光谱仪; 岛津荧光光谱仪; JEOL-FX-90Q 型核磁共振仪; X-4 显微熔点仪 (温度计未校正); GuntW 28 恒温水浴锅; 牛血清白蛋白 V (华美生物工程公司), 果糖 (美国), NaN_3 , 20 mmol/L 碳酸缓冲溶液 ($\text{pH}=9.0$) 的配制。其它试剂均为 AR。

1.2 姜黄素类似物的合成

将相应的芳香醛 (0.01 mol) 及环己酮 丙酮 (0.005 mol) 置于圆底烧瓶中, 加入 20 mL 饱和 HCl 的冰醋酸, 于室温 ($25 \sim 30^\circ\text{C}$) 搅拌 30 min 后放置 2 d。于反应瓶中加入 20 mL 水, 过滤沉淀得到粗产品。用合适的溶剂进行处理或重结晶得到姜黄素类似物 A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A_5 , A_6 和 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 。

2,6-双(4-羟基苯亚甲基)环己酮 (A_1): 用甲醇重结晶, 产率为 95%, $\theta_{\text{mp}} > 300^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 9.88 (br 2H, -OH); 7.52 (s 2H, -CH=); 7.38 (d $J=8.1$ Hz 4H, ar), 6.82 (d $J=8.1$ Hz 4H, ar), 2.84 (t $J=5.7$ Hz 4H, -CH₂-C-CH₂-); 1.72 (q $J=5.7$ Hz 2H, -C-CH₂-C-). ESIMS (m/z): 305 ($[\text{M}-1]^-$)。

2,6-双(3,4-二羟基苯亚甲基)环己酮 (A_2): 用乙醇重结晶, 产率为 90%, $\theta_{\text{mp}} > 300^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 9.43 (br 2H, -OH); 9.12 (br 2H, -OH); 7.43 (s 2H, -CH=); 6.96 (s 2H, ar), 6.85 (d $J=8.1$ Hz 2H, ar), 6.78 (d $J=8.1$ Hz 2H, ar); 2.83 (t $J=6.7$ Hz 4H, -CH₂-C-CH₂-); 2.04 (q $J=6.7$ Hz 2H, -C-CH₂-C-). ESIMS (m/z): 337 ($[\text{M}-1]^-$)。

2,6-双(3-甲氧基-4-羟基苯亚甲基)环己酮 (A_3): 直接水洗烘干, 产率为 98%, $\theta_{\text{mp}} = 178 \sim 179^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 9.48 (br 2H, -OH); 7.53 (s 2H, -CH=); 7.08 (s 2H, H₂); 7.01 (d 2H $J=8.1$ Hz ar); 6.82 (d 2H $J=8.1$ Hz ar); 3.79 (s 6H, OCH₃); 2.87 (t $J=6.7$ Hz 4H, H₂C-C-CH₂); 1.71 (q $J=6.7$ Hz 2H, C-CH₂-C). ESIMS (m/z): 365 ($[\text{M}-1]^-$)。

2,6-双(3,5-二叔丁基苯亚甲基)环己酮 (A_4): 用丙酮水 (体积比为 4:1) 重结晶, 产率为 65%, $\theta_{\text{mp}} = 188 \sim 190^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.77 (s 2H, -C=), 7.35 (s 4H, ar), 5.45 (br 2H, -OH), 2.94 (t $J=6.7$ Hz 4H, H₂C-C-CH₂); 1.83 (q $J=6.7$ Hz 2H, C-CH₂-C), 1.47 (s 36H, C-CH₃)。ESI-MS (m/z): 529 ($[\text{M}-1]^-$)。

2,6-双(3,4-二甲氧基苯亚甲基)环己酮 (A_5): 用乙醇水 (体积比为 1:3) 洗, 烘干; 产率为 95%, $\theta_{\text{mp}} = 138 \sim 140^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 7.58 (s 2H, -CH=); 7.13 (d $J=8.1$ Hz 4H, ar), 7.02 (s 2H, ar), 3.79 (s 12H, OCH₃); 2.91 (t $J=6.7$ Hz 4H, -CH₂-C-CH₂-); 1.73 (q $J=6.7$ Hz 2H, -C-CH₂-C-). ESIMS (m/z): 395 ($[\text{M}+1]^+$)。

2,6-双(3,5-二甲氧基-4-羟基苯亚甲基)环己酮 (A_6): 用乙醇重结晶, 62%, $\theta_{\text{mp}} = 134 \sim 135^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 8.89 (br 2H, -OH); 7.55 (s 2H, -CH=); 6.83 (s 4H, ar), 3.71 (s 12H, OCH₃); 2.93 (t $J=6.7$ Hz 4H, -CH₂-C-CH₂-); 1.74 (q $J=6.7$ Hz 2H, -C-CH₂-C-). ESIMS (m/z): 425 ($[\text{M}-1]^-$)。

1,5-双(4-羟基苯基)-1,4-戊二烯-3-酮 (C_1): 用冰水洗除溶剂, 真空干燥, 产率为 95%, $\theta_{\text{mp}} = 243 \sim 245^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 10.01 (br 2H, -OH), 7.64 (d $J=16$ Hz 2H, -CH=C-), 7.60 (d $J=8.1$ Hz 4H, ar), 7.08 (d $J=16$ Hz 2H, -C=CH-), 6.82 (d $J=8.1$ Hz 4H, ar)。ESI-MS (m/z): 265 ($[\text{M}-1]^-$)。

1,5-双(3,4-二羟基苯基)-1,4-戊二烯-3-酮 (C_2): 用乙醇重结晶, 真空干燥, 产率为 90%, $\theta_{\text{mp}} = 150 \sim 154^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 9.58 (br 2H, -OH), 9.11 (br 2H, -OH), 7.54 (d $J=16$ Hz 2H, -CH=C-), 7.13 (s 2H, ar), 7.06 (d $J=8.1$ Hz 2H, ar), 6.98 (d $J=16$ Hz 2H, -C=CH-), 6.78 (d $J=8.1$ Hz 2H, ar)。ESI-MS (m/z): 297 ($[\text{M}-1]^-$)。

1,5-双(3-甲氧基-4-羟基苯基)-1,4-戊二烯-3-酮 (C_3): 用冰水洗除溶剂, 真空干燥, 产率为 98%, $\theta_{\text{mp}} = 99 \sim 100^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H NMR}$ (MSDO- d_6 , 300 MHz) δ 9.60 (br 2H, -OH), 7.63 (d $J=16$ Hz 2H, -CH=C-), 7.35 (s 2H, ar), 7.18 (d $J=8.1$ Hz 2H, ar), 7.12 (d $J=16$ Hz 2H, -C=CH-), 6.81 (d $J=8.1$

H z 2H, a r o m), 3.84 (s 6H, OCH₃)。 ESI MS (*m/z*): 325([M - 1]⁻)。

1, 5 双 (3, 5-二叔丁基-4-羟基苯基)-1, 4-戊二烯-3-酮 (C₄): 用冰乙醇-水重结晶, 真空干燥, 产率为 81%, θ_{mp}=222~226 °C。

¹H NMR (MSDO- d₆, 300 MHz) δ: 7.64 (d *J*=16 H z 2H, -CH=C-), 7.50 (s 4H, a r o m), 7.14 (d *J*=16 H z 2H, -C=CH-), 1.40 (s 36H, C-CH₃)。 ESI MS (*m/z*): 489([M - 1]⁻)。

1, 5 双 (3, 4-二甲氧基苯基)-1, 4-戊二烯-3-酮 (C₅): 用冰水洗除溶剂, 真空干燥, 产率为 98%, θ_{mp}=89~90 °C。

¹H NMR (MSDO- d₆, 300 MHz) δ: 7.68 (d *J*=16 H z 2H, -CH=C-), 7.38 (s 2H, a r o m), 7.31 (d *J*=8.1 H z 2H, a r o m), 7.21 (d *J*=16 H z 2H, -C=CH-), 7.01 (d *J*=8.1 H z 2H, a r o m), 3.84 (s 6H, OCH₃), 3.81 (s 6H, OCH₃)。 ESI MS (*m/z*): 355([M +1]⁺)。

1, 5 双 (4-羟基-3, 5-二甲氧基苯基)-1, 4-戊二烯-3-酮 (C₆): 用冰水-丙酮 (体积比为 4:1) 洗除溶剂, 真空干燥, 产率为 65%, θ_{mp}=230~231 °C。

¹H NMR (MSDO- d₆, 300 MHz) δ: 9.00 (br 2H, -OH), 7.63 (d *J*=16 H z 2H, -CH=C-), 7.17 (d *J*=16 H z 2H, -C=CH-), 7.07 (s 4H, a r o m), 3.83 (s 12H, OCH₃)。 ESI MS (*m/z*): 385([M - 1]⁻)。

1.3 蛋白质的糖化的测试

1.3.1 蛋白质的糖化溶液体系 参照 YUANXIA SUN^[7] 方法, 在 800 μL 的 10 g/L 牛血清白蛋白溶液中加入 100 μL 浓度为 100 mmol/L 的 NaN₃ 溶液, 然后加入 1 600 μL 浓度为 500 mmol/L 的果糖溶液, 再依次加入 0 4 10 20 40 60 μL 10 mmol/L 的样品 DMSO 溶液, 浓度为 10 mmol/L, 并用 20 mmol/L 碳酸缓冲溶液 (pH=9.0) 将溶液稀释至 4 mL, 每个浓度设置 2 个平行样; 另设对照: ①以同体积的缓冲溶液代替样品, ②不加果糖和样品溶液的纯蛋白组。溶液配制之后, 置于 50 °C 的恒温箱避光孵育 10 d 后取样进行荧光分析。

1.3.2 化合物对 AGEs 形成的抑制活性测定 取 1.5 mL 的糖基化溶液用缓冲稀释到 3 mL, 用 FLS920 荧光光谱仪, 激发波长为 340 nm, 发射波长为 420 nm, 狭缝为 1.5 nm, 扫描发射光谱和 420 nm 的强度扫描得出样品管 A (*F*) 值。应用以下公式计算化合物对牛血清白蛋白糖基化反应的抑制作用, 用抑制百分率 (IR) 表示:

$$IR = 1 - \frac{\text{样品管 } A(F) - \text{对照管 } 2A(F)}{\text{对照管 } 1A(F) - \text{对照管 } 2A(F)} \times 100\%$$

然后以抑制百分率对抑制剂浓度作图, 根据抑制曲线求得各种化合物的 IC₅₀ 值。

2 结果与讨论

通过芳香醛与环己酮和丙酮在酸催化条件下缩合制备了两个系列的类姜黄素化合物。文献 [8] 报道关于多羟基类姜黄素的合成, 首先需对多羟基芳香醛与二氢吡喃反应进行羟基保护, 再与酮在碱性条件下缩合, 再脱保护基团。采用冰乙酸-盐酸催化, 直接用多羟基芳香醛与酮缩合反应, 一步得到多羟基类姜黄素。

把上述化合物按照 1.3 所述方法进行 AGEs 的抑制测试, 以抑制百分比对抑制剂浓度作图而求得它们的 IC₅₀ 值, 结果见表 1。从表 1 可以得知, 类姜黄素 A、B 系列中, 对蛋白质抑制活性 IC₅₀ 值的大小顺序为 A₂ < C₂ < A₁ < C₁ < A₃ < C₃ < A₆ < C₆ < A₄ / C₄、A₅ < C₅, 其中 A₂ 的活性最强, 比姜黄素的活性强 5 倍, 比氨基胍的活性强近 100 倍。

表 1 姜黄素及类姜黄素对蛋白质非酶糖基化的抑制活性 (P < 0.01)

Tab. 1 The non enzymatic glycation inhibition activities of curcumin and its analogs				
化合物	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μmol · L ⁻¹)
A ₁	H	OH	H	18.5 -
A ₂	OH	OH	H	5.1
A ₃	OCH ₃	OH	H	19.2
A ₄	C(CH ₃) ₃	OH	C(CH ₃) ₃	>100
A ₅	OCH ₃	OCH ₃	H	- ¹⁾
A ₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	73.2
C ₁	H	OH	H	16.2
C ₂	OH	OH	H	9.4
C ₃	OCH ₃	OH	H	23.4
C ₄	OC(CH ₃) ₃	OH	OC(CH ₃) ₃	>100
C ₅	OCH ₃	OCH ₃	H	-
C ₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	63.0
姜黄素				30.5
氨基胍				483.0

1) - 为不抑制

对不同结构的类姜黄素的生物活性比较, 带酚羟基的化合物对非酶糖基化的抑制活性较强, 没有酚羟基的化合物 (A₅、C₅) 没有抑制活性, 酚羟基邻位增加甲氧基使得其抑制活性降低。在酚羟基邻位增加叔丁基 (A₄、C₄), 其活性降低很多, 可能邻位叔丁基的空间位阻大, 对羟基进行了屏蔽;

另外, 邻位增加叔丁基后, 化合物的水溶性较差, 也可能是导致其测试的活性较差。在邻位增加羟基的化合物 (A_2 、 C_2), 其对非酶糖基化的抑制活性很强。带羟基的类姜黄素均表现出一定的非酶糖基化的抑制活性, 可能与其抗自由基活性有关。类姜黄素作为非酶糖基化的抑制剂, 具有结构新颖, 合成简单, 产率高的特点。特别是四羟基类姜黄素的非酶糖基化的抑制活性最高, 可期望成为治疗糖尿病综合症的药物前体。

参考文献:

- [1] METZ T O, ALDERSON N L, THORPE S R. Pyridoxamine an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 419: 41–49.
- [2] BERHAUSA A, HOFMANN M A, ZIEGLER R. AGEs and their interaction with AGE receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept[J]. Cardiovascular Research, 1998, 37: 586–600.
- [3] HONGW K, SPORN M B. Recent advances in chemoprevention of cancer[J]. Science, 1997, 278: 1073–1077.
- [4] SHARMA O P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds[J]. Biochem Pharmacol, 1976, 25: 1181–1182.
- [5] AUTO R J, GEORGE J, BABU K V D, RAJASEKHARAN K N, et al. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids[J]. Mutation Research, 1996, 127–131.
- [6] 李满妹, 杜志云, 刘忠, 等. 姜黄素类化合物对体外蛋白糖质非酶糖基化的抑制作用[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(3): 63–66.
- [7] SUN Y X, HAYAKAWA S, IZUMORI K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the millard reaction: effect on protein structure and gel properties[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 1293–1299.
- [8] ARTICO M, SANTO R D, COSTI R, et al. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling[J]. J Med Chem, 1998, 41: 3948–3960.

Synthesis and Non-enzymatic Glycation Inhibition Activities of Curcumin Analogs

DU Zhiyun^{1,2}, LIU Zhong², ZOU Lan², LIMan-mei¹, QIAO Wei¹, MA Lin¹, GU Lian-quan²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract Two classes of curcumin analogs (A , C) were synthesized by coupling the appropriate aromatic aldehyde with cyclohexanone or acetone under the catalysis of glacial acetic acid saturated with anhydrous HCl. The polyhydroxyl curcumin analogs were synthesized by one step without protection of the phenolic hydroxyl groups of aromatic aldehyde. The non-enzymatic glycation inhibition activities of synthetic curcumin analogs were evaluated *in vitro*. Results indicated that curcumin analogs with phenolic group showed potent activities. Curcumin analogs with tetrahydroxyl groups A_2 and C_2 showed much higher non-enzymatic glycation inhibition activities with IC_{50} of $5.1 \mu\text{mol/L}$ and $9.4 \mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words curcumin analogs; non-enzymatic glycation inhibition; synthesis