

白藜芦醇类似物的合成及雌激素样活性研究

马臻^{1,2}, 王尊元², 郑晓亮², 沈正荣², 胡永洲^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310031; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要:目的 设计合成白藜芦醇的类似物, 进行体外雌激素样活性评价。方法 取代溴苄经磷酸化、缩合、脱甲基制得目标分子(1-9), 并用人乳腺癌细胞增殖试验测定其体外雌激素样活性。结果 目标化合物经核磁共振等确证其结构; 白藜芦醇类似物具有不同程度的雌激素样活性, 其中以 4,4'-二羟基二苯乙烯(2)最高。相对增殖率结果提示: 白藜芦醇、2 和 4 为雌激素受体的全激动剂, 3, 7, 8 和 9 为雌激素受体的部分激动剂, 1, 5 和 6 为雌激素受体的弱激动剂。结论 首次报道白藜芦醇类似物的体外雌激素样活性, 有进一步研发的价值。

关键词: 白藜芦醇; 类似物; 合成; 雌激素样活性

中图分类号: TQ467.92; TQ460.31 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)05-0362-04

Synthesis and estrogen-like activity of resveratrol analogues

MA Zhen^{1,2}, WANG Zun-yuan², ZHENG Xiao-liang², SHEN Zheng-rong², HU Yong-zhou^{1*} (1. Zhejiang University College of Pharmaceutical Sciences, Hangzhou 310031, China; 2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize resveratrol analogues, and evaluate their estrogen-like activity *in vitro*. **METHODS** The target compounds (1-9) were prepared from substituted benzyl bromide via phosphorylation, condensation and demethylation, then their estrogen-like activities on sensitive human mammary cancer (MCF-7) cell were determined by MTT assay. **RESULTS** All target compounds were confirmed by mp and ¹HNMR. All resveratrol analogues had different estrogenic activity. The results of relative proliferative effect (RPE) suggested that resveratrol, 2, 4 were full-agonists of estrogen receptor; 3, 7, 8, 9 were partial-agonists of estrogen receptor, 1, 5, 6 were weakly-agonists of estrogen receptor. Of the total, 2 showed the strongest effect in promoting MCF-7 cell growth. **CONCLUSION** It was the first report that resveratrol analogues had estrogen-like activity and they could be a new source of estrogenic agent.

KEY WORDS: resveratrol; analogues; synthesis; estrogen-like activity

白藜芦醇(resveratrol, E-3, 5, 4'-trihydroxystilbene, RES)是一种二苯乙烯类多酚物质, 具有多种药理作用, 如抗氧化、抗血小板聚集、抗炎、抗癌等多方面的作用^[1,2]。白藜芦醇可以从植物(如葡萄、虎杖等)中提取分离得到, 但植物中含量低, 提取工艺成本高, 产量大、纯度高的化学合成法具有不可比拟的优势。

考虑到白藜芦醇结构类似于合成的雌激素类化合物已

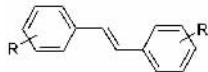
烯雌酚, 体外研究也已发现其具有一定的雌激素样活性^[3], 为寻求具有较强雌激素活性的化合物, 设计合成了一些白藜芦醇的类似物用于活性研究。这些类似物的结构见图 1。

在 2003 年曾报道白藜芦醇的全合成^[4]。类似物 1~9 的合成与白藜芦醇相似, 由相应的取代苄溴与亚磷酸三乙酯反应生成苄磷酸酯后再与相应的苯甲醛经 Wittig-Horner 反应缩合得到关键中间体, 后在吡啶盐酸盐或 BBr₃-CH₂Cl₂ 体

基金项目: 浙江省卫生厅重点项目(2002ZD001); 浙江省科技厅项目(2003F12020)

作者简介: 马臻, 女, 副研究员 Tel: (0571)88215626 E-mail: mazhen69@126.com * 通讯作者: 胡永洲

系中脱去甲基保护基得到。其反应式见图 2。



Compd.	R	R'
RES	3, 5-OH	4-OH
1	4-OH	H
2	4-OH	4-OH
3	3,5-OH	H
4	3,5-OH	3;5'-OH
5	3,4-OH	H
6	3,4-OH	4-OH
7	3,4-OH	3;5'-OH
8	3,4,5-OH	3;5'-OH
9	3,4,5-OH	4-OH

图 1 1~9 的结构

Fig 1 Structure of 1-9

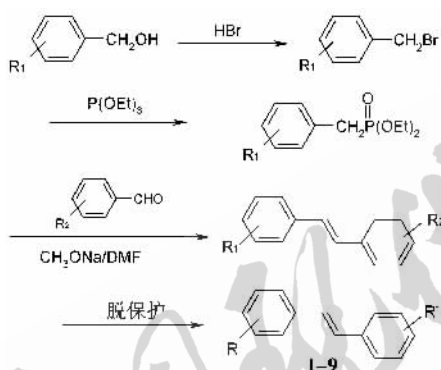


图 2 1~9 的合成路线

Fig 2 Synthetic route of 1-9

为探讨白藜芦醇及其衍生物的雌激素样活性,用人乳腺癌 MCF-7 细胞体外增殖实验研究和评价雌激素活性。

1 化合物的合成(以化合物 4 的合成为例)

熔点用 Fisher-Joins Melting Apparatus 测定,温度计未经校正;¹H-NMR 用 Bruker Avanced 400 测定,400 MHz, TMS 为内标, DMSO-d₆ 或 (CD₃)₂CO 为溶剂。

1.1 3,5-二甲氧基苯甲醇的合成

反应瓶中加入 NaBH₄ (0.76 g, 20 mmol), 无水四氢呋喃 (THF, 20 mL); 于室温搅拌下, 将含 3,5-二甲氧基苯甲酸 (1.82 g, 10 mmol) 的无水 THF 溶液 (20 mL), 逐滴加入反应瓶中, 有气体缓慢产生。取 I₂ (1.90 g, 7.5 mmol) 溶于无水 THF (20 mL), 逐滴加至反应瓶中, 有气体缓慢产生。滴毕, 室温反应约 3h。缓慢滴加稀 HCl 至无气泡产生, 浓缩除去 THF, 用乙醚溶解, 依次用稀 NaOH 溶液洗, 水洗, 干燥, 浓缩, 冷却, 得类白色晶体 1.51 g, 收率 90%, mp 44 ~ 46°C (文献^[4]: mp 46 ~ 47°C)。

1.2 3,5-二甲氧基苄溴的合成

将 3,5-二甲氧基苯甲醇 (8.40 g, 0.05 mol) 溶于甲苯 (75 mL) 的溶液置于反应瓶中, 搅拌下加入 40% HBr (20 mL,

0.136 mol), 于 80 °C 油浴中反应 3 h。反应毕, 减压浓缩, 回收甲苯。滤取析出的固体, 用水洗涤至中性, 得棕色固体 9.00 g, 收率 78%。用甲醇重结晶, 得棕色片状晶体, mp 69 ~ 71°C (文献^[4]: 71 ~ 72°C)。

1.3 3,3',5,5'-四甲氧基二苯乙烯的合成

反应瓶中加入 3,5-二甲氧基苄溴 (9.24 g, 0.04 mol)、亚磷酸三乙酯 (15.41 g, 0.09 mol), 于油浴 130 ~ 140 °C 搅拌反应 2 h。反应毕, 减压蒸除过量的亚磷酸三乙酯, 冷至室温后, 置冰水浴中依次加入无水 DMF (20 mL)、甲醇钠 (2.16 g, 0.04 mol) 和 3,5-二甲氧基苯甲醛 (6.64 g, 0.04 mol), 冰水浴中反应 1 h 后, 室温搅拌过夜。反应液倒入 500 mL 冰水中, 搅拌, 过滤, 水洗, 干燥, 得类白色粉末状固体 10.56 g, 收率: 88%, mp 135 ~ 136 °C (文献^[5]: mp 136 ~ 138 °C)。

1.4 脱甲基反应

在反应瓶中加入二氯甲烷 (5 mL)、3,3',5,5'-四甲氧基二苯乙烯 (0.30 g, 1 mmol), 搅拌溶解。滴加 BBr₃ (1 mol · L⁻¹ 二氯甲烷溶液) 10 mL, 室温下搅拌反应, TLC 检测反应终点。反应液倾入 30 mL 冰水中, 用乙酸乙酯萃取 (20 mL × 2), 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 减压蒸去溶剂, 得淡黄色固体产物 0.21 g, 收率 86%。用石油醚-乙酸乙酯 (1:1) 柱层析, 得针状结晶 4, mp 300 °C (dec) (文献^[5]: mp 320 °C (dec))。

同法可制得类似物 1~9, 白藜芦醇及类似物 1~9 的理化常数、氢谱数据见表 1。

2 药理实验部分

2.1 细胞与试剂

雌激素敏感的人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海细胞库, DMEM 培养基和胰蛋白酶 (trypsin) 购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 无酚红 DMEM 培养液购自 HyClone 公司, 活性炭/葡聚糖法去激素处理新生牛血清购自复旦大学放射医学研究所, 噻唑蓝 (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 购自 Sigma 公司。

受试物: RES, RES 类似物 1~9, 阳性对照: 17β-雌二醇 (17β-E2), 己烯雌酚 (DES)。

2.2 人乳腺癌细胞增殖试验 (E-screen Assay)^[6]

常规培养的 MCF-7 细胞以胰蛋白酶消化后, 将细胞悬液 (1.5 × 10⁴ 个/mL × 100 μL/孔) 种入 96 孔细胞培养板内 (Nunclon), 37°C 孵育 24 h 后换无酚红 DMEM 培养液 (含 10% 活性炭/葡聚糖法去激素处理新生牛血清) 继续培养 48 h, 然后给予不同浓度受试物, 每 3 d 换液 1 次, 培养 6 d 后以 MTT 法检测细胞增殖率。

以增殖力 (proliferative potency, PE) 和相对增殖效率 (relative proliferative effect, RPE) 评价化合物雌激素活性的强度。

PE = (受试物引起最大增殖时的细胞数) / (阴性对照的细胞数)

RPE = (受试物的 PE - 1) / (E2 的 PE - 1) × 100%

表1 白藜芦醇及类似物1~9的理化常数、氢谱数据

Tab 1 The physical-chemical contents and the ¹H-NMR spectra data of target compounds

Compd	mp /°C	¹ H-NMR (DMSO-d ₆)δppm
RES	253 ~ 255	9.54 (1H, s, 4-OH), 9.19 (2H, s, 3,5-OH), 7.39 (2H, d, J = 8.6Hz, 2;6-H), 6.81, 6.93 (each 1H, d, J = 16.3Hz, -CH = CH-), 6.75 (2H, d, J = 8.6Hz, 3;5-H), 6.38 (2H, d, J = 2.1Hz, 2,6-H), 6.11 (1H, t, J = 2.1Hz, 4-H)
1	185 ~ 187	9.64 (1H, s, 4-OH), 7.54 (2H, d, J = 7.7Hz, 2,6-H), 7.44 (2H, d, J = 8.2Hz, 2;6-H), 7.35 (2H, t, J = 7.6Hz, 3;5-H), 7.22 (1H, t, J = 6.8Hz, 4-H), 7.02, 7.16 (each 1H, d, J = 16.4Hz, -CH = H-), 6.79 (2H, d, J = 8.0Hz, 3,5-H)
2	288 ~ 289	9.51 (2H, s, 4,4'-OH), 7.36 (4H, d, J = 7.6Hz, 2,6,2;6'-H), 6.91 (2H, s, -CH = CH-), 6.76 (4H, d, J = 8.4Hz, 3,5,3;5'-H)
3	157 ~ 158	8.86 (2H, s, 3,5-OH), 7.54 (2H, d, J = 7.6Hz, 2;6-H), 7.33 (2H, t, J = 7.6Hz, 3;5-H), 7.22 (1H, t, J = 7.6Hz, 4-H), 7.04, 7.09 (each 1H, d, J = 16.5Hz, -CH = CH-), 6.57 (2H, d, J = 2.0Hz, 2,6-H), 6.29 (1H, t, J = 2.0Hz, 4-H) 溶剂:(CD ₃) ₂ CO
4	300 (dec.)	9.22 (4H, s, 3,5,3;5'-OH), 6.82 (2H, s, -CH = CH-), 6.39 (4H, d, J = 2.1Hz, 2,6,2;6'-H), 6.14 (2H, s, 4,4'-H)
5	132 ~ 134	7.48 (2H, d, J = 7.4Hz, 2;6-H), 7.34 (2H, t, J = 7.5Hz, 3;5-H), 7.24 (1H, t, 4-H), 7.08 (1H, s, 2-H), 7.05, 6.93 (each 1H, d, J = 16.4Hz, CH = CH-), 6.96 (1H, d, J = 7.1Hz, 6-H), 6.85 (1H, d, J = 8.2 Hz, 5-H)
6	193 ~ 195	7.46 (2H, d, J = 8.4Hz, 2;6-H), 7.17 (1H, s, 2-H), 7.03, 6.97 (each 1H, d, J = 16.2Hz, -CH = CH-), 6.98 (1H, d, J = 8.2Hz, 6-H), 6.88 (1H, d, J = 8.0Hz, 5-H), 6.87 (2H, d, J = 8.8Hz, 3;5-H), 溶剂:(CD ₃) ₂ CO
7	231 ~ 232	9.17 (2H, s, 2 × OH), 9.07 (1H, s, OH), 8.89 (1H, s, OH), 6.96 (1H, d, J = 1.8Hz, 2-H), 6.85, 6.71 (each 1H, d, J = 16.7Hz, -CH = CH-), 6.82 (1H, dd, J = 1.96Hz, J = 8.1Hz, 6-H), 6.71 (1H, d, J = 8.1 Hz, 5-H), 6.37 (2H, s, 2;6-H), 6.11 (1H, t, J = 1.9Hz, 4-H) 溶剂:(CD ₃) ₂ CO
8	245 (dec.)	9.16 (2H, s, 2 × OH), 8.85 (2H, s, 2 × OH), 8.27 (1H, s, OH), 6.74, 6.65 (each 1H, d, J = 16.7Hz, -CH = CH-), 6.48 (2H, s, 2,6-H), 6.36 (2H, d, J = 1.8Hz, 2;6-H), 6.11 (1H, s, 4-H)
9	200 (dec.)	9.17 (2H, s, 2 × OH), 9.07 (1H, s, OH), 8.28 (1H, s, OH), 7.30 (2H, d, J = 8.4Hz, 2;6-H), 6.80, 6.72 (each 1H, d, J = 16.0Hz, -CH = CH-), 6.74 (2H, d, J = 8.4Hz, 3;5-H), 6.50 (2H, s, 2,6-H), 溶剂:(CD ₃) ₂ CO

3 结果与讨论

本研究选用的 E-screen 法是一种经典的体外评价化合物雌激素样活性的方法。MCF-7 细胞是人乳腺癌细胞株,能特异地与雌激素或雌激素样活性物质作用而增殖。MCF-7

细胞雌激素样增殖试验非常灵敏,简便易行。

不同浓度的 17β-E2、DES、白藜芦醇及其类似物对 MCF-7 细胞的增殖作用见表 2,表 3。

不同浓度 17β-E2、DES 均可引起 MCF-7 细胞显著增殖,

表2 白藜芦醇及类似物对 MCF-7 细胞的增殖作用

Tab 2 Cell proliferation of MCF-7 cells affected by Resveratrol and its analogues

Proliferation /%	Concentration (mol · L ⁻¹)						
	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
E2	107.4 ± 1.7	116.6 ± 1.4	193.4 ± 2.8	182.8 ± 3.1	179.6 ± 4.9	—	—
RES	—	—	123.3 ± 14.0	128.8 ± 10.1	134.1 ± 7.8	147.1 ± 12.7	168.1 ± 14.7
1	—	—	102.7 ± 2.0	109.0 ± 1.9	121.3 ± 1.8	117.5 ± 3.1	109.2 ± 2.8
2	—	—	104.4 ± 4.5	109.2 ± 2.5	121.2 ± 2.2	186.7 ± 5.2	107.4 ± 4.6
3	—	—	123.9 ± 3.9	124.6 ± 3.3	129.5 ± 3.2	136.7 ± 4.4	157.0 ± 9.8
4	—	—	164.9 ± 5.6	178.0 ± 9.6	179.4 ± 12.8	174.2 ± 10.9	170.3 ± 3.1
5	—	—	102.9 ± 2.0	109.5 ± 2.8	110.8 ± 1.6	119.2 ± 3.0	124.6 ± 4.0
6	—	—	104.7 ± 3.3	109.0 ± 1.9	116.9 ± 2.8	120.3 ± 1.3	123.2 ± 9.5
7	—	—	106.6 ± 3.3	109.2 ± 5.9	114.5 ± 4.3	156.1 ± 12.5	93.4 ± 1.7
8	—	—	114.6 ± 5.3	122.1 ± 2.2	128.0 ± 3.4	146.6 ± 5.2	138.7 ± 5.0
9	—	—	109.9 ± 4.4	112.5 ± 3.4	122.9 ± 4.1	135.0 ± 4.4	143.7 ± 5.5
DES	—	—	188.3 ± 11.2	195.4 ± 9.4	188.1 ± 12.5	180.5 ± 15.5	148.7 ± 8.1

表3 白藜芦醇及类似物引起最大增殖的 PE 及 RPE

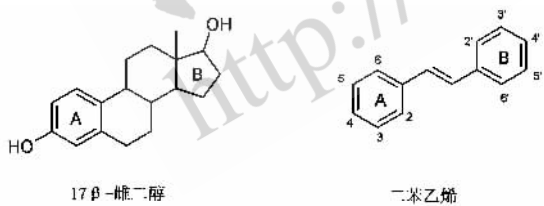
Tab 3 PE and RPE of Resveratrol and its analogues in the E-screen Assay of maximal proliferation

Test Material	PE	RPE/%
E2	1.93	100.0
RES	1.68	72.9
1	1.21	22.8
2	1.87	92.8
3	1.57	61.0
4	1.79	85.1
5	1.25	26.3
6	1.23	24.8
7	1.56	60.1
8	1.47	49.9
9	1.44	46.8
DES	1.95	102.2

引起最大增殖时的浓度分别为 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。不同浓度的白藜芦醇及其类似物均可不同程度的引起 MCF-7 细胞增殖,其促增殖作用 RES,3,5,6 和 9 在 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2,7 和 8 在 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1 和 4 在 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时随浓度增高而增高,引起最大增殖的浓度分别为 RES, 3, 5, 6, 9: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2, 7, 8: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1, 4: $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

实验结果显示:白藜芦醇及九个类似物均有不同程度的雌激素活性。相对增殖效率结果提示,RES,2,4 及 DES 为雌激素受体的全激动剂,3,7,8 和 9 为雌激素受体的部分激动剂,1,5 和 6 为雌激素受体的弱激动剂。其中类似物 2,4 的相对增殖率高于白藜芦醇,并以 2 最高,其相对增殖率接近阳性对照药物 17β -雌二醇和己烯雌酚,提示有进一步研发的价值。

初步构效关系分析:



将白藜芦醇类似物 1~9 与 17β -雌二醇结构相比较,可以发现它们都有平面的芳环结构,且芳环上至少有一个羟基取代。尽管 A 环和 B 环的连接碳链与 17β -雌二醇不一样,但能引起雌激素活性的适宜的羟基位置都一样。白藜芦醇

及类似物 B 环上 4-OH 对应于 17β -雌二醇 3-OH,它与受体形成氢键,直接影响与受体的结合;B 环上再增加羟基,对雌激素活性并无大的帮助。白藜芦醇及类似物 4-OH 对应于 17β -雌二醇 17-OH, A 环上的羟基位置有一定的灵活性,可以是 3-或 5-。除此之外 A 环、B 环两个羟基间距约为 1.2 nm,对于其雌激素活性也很重要。通过计算机软件我们测定了类似物 1-9 两羟基间距,其中 2 两羟基间距 1.199 nm,与理论值接近,实验结果也显示 2 雌激素活性最强。当然,这仅仅是体外对一种雌激素敏感细胞株的初步研究。人雌激素受体分为 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 两种亚型。我们设想通过雌激素受体选择性结合实验,进一步深入研究,以期研发一种选择性的雌激素受体调节剂。这一工作正在进行之中。

白藜芦醇作为一种对生物体有重要的防病抗病作用的植物雌激素,动物实验及流行病学研究显示对心血管疾病、骨质疏松症,雌激素依赖的肿瘤、老年痴呆等多种绝经后女性常见病具有潜在的治疗意义。作者认为,深入研究白藜芦醇及类似物的雌激素样活性,通过与体内不同雌激素受体位点结合而表现雌激素激动或拮抗活性,发现疗效更好的化合物,对预防和治疗心血管疾病、骨质疏松症、激素依赖性肿瘤以及老年痴呆症具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] ZHAO X, LU Y, CHEN Z N. Progress of chemistry and pharmacology of resveratrol [J]. Chinese Herbal Medicine, 1998, 29 (12): 837-839.
- [2] LIU Z P, HUO J S. Biology effect of resveratrol [J]. Foreign Med Sci (Sec Hygiene)(国外医学·卫生学分册), 2002, 29 (3): 146-148.
- [3] EL-MOWAFY A M, ABOU-ZEID L A, EDIAFIOGHO I. Recognition of resveratrol by the human estrogen receptor alpha: a molecular modeling approach to understand its biological actions [J]. Med Princ. Pract, 2002, 11(2): 86-92.
- [4] WANG Z Y, MA Z, LI Q, et al. Synthesis of resveratrol [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2003, 34(9): 428-429.
- [5] ALI M A, KONDO K, TSUDA Y. Synthesis and nematocidal activity of hydroxystilbenes [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40(5): 1130-1136.
- [6] SOTO A M, SONNENSCHN C, CHUNG K L, et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants [J]. Environ Health Perspect, 1995, 103: 113-122.

收稿日期:2006-04-14