

· 研究论文 ·

新型二硫杂环戊烯硫酮化合物的合成及其 对谷氨酸诱导损伤 HT22 细胞的保护作用

李玉姚^{1a}, 孙银星^{1a}, 程 坚^{1b}, 敖桂珍^{1a*}

(1. 苏州大学 a. 药学院; b. 神经科学研究所, 江苏 苏州 215123)

摘要: 在保留 ADT-OH 的 3*H*-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮结构的基础上, 用芳乙烯基替换 4-羟基苯环, 设计并合成了 6 个二硫杂环戊烯硫酮化合物 ($L_1 \sim L_6$, 其中 L_2 , L_3 , L_5 和 L_6 为新化合物), 其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HR-MS(ESI) 表征。采用 MTT 法研究了 $L_1 \sim L_6$ 对谷氨酸诱导损伤的海马神经元 HT22 细胞的影响。药理初筛结果表明: 给药浓度为 $10 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, L_1 , L_2 , L_4 和 L_6 均能提高受损 HT22 细胞的存活率 ($P < 0.01$); 给药浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, L_3 和 L_5 均可提高损伤 HT22 细胞的存活率 ($P < 0.01$)。

关键词: 5-对羟基苯基-3*H*-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮; H_2S 供体; 二硫杂环戊烯硫酮化合物; 合成; 神经保护作用

中图分类号: O626.2

文献标志码: A

DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.2017.05.16278

Synthesis of Novel 3*H*-1,2-dithiole-3-thione Compounds and Their Protective Effects on Glutamic Acid-induced Damage of HT22 Cells

LI Yu-yao^{1a}, SUN Yin-xing^{1a}, CHENG Jian^{1b}, AO Gui-zhen^{1a*}

(a. College of Pharmaceutical Science; b. Institute of Neuroscience, 1. Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The structure of ADT-OH was modified by replacing 4-OH phenyl with aryl vinyl, based on retaining its 3*H*-1,2-dithiocyclopentene-3-thione. Six 3*H*-1,2-dithiole-3-thione compounds ($L_1 \sim L_6$) were designed and synthesized. Among them, L_2 , L_3 , L_5 and L_6 were novel compounds. The structures were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HR-MS(ESI). Effects of $L_1 \sim L_6$ on glutamic acid-induced damage of HT22 cells were investigated by MTT method. The primary pharmacological results displayed that L_1 , L_2 , L_4 and L_6 significantly improved the survival rates of damaged HT22 cells at the concentration of $10 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$), L_3 and L_5 increased the survival rates of damaged HT22 cells at the concentration of $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$).

Keywords: ADT-OH; hydrogen sulfide donor; 3*H*-1,2-dithiole-3-thione compound; synthesis; neuro-protection

1996 年, Kimmura 发现内源性 H_2S 在大脑中扮演了神经调质的角色^[1]。此后, 诸多研究结果表明 H_2S 对神经调节具有多方面的生物效应, 如

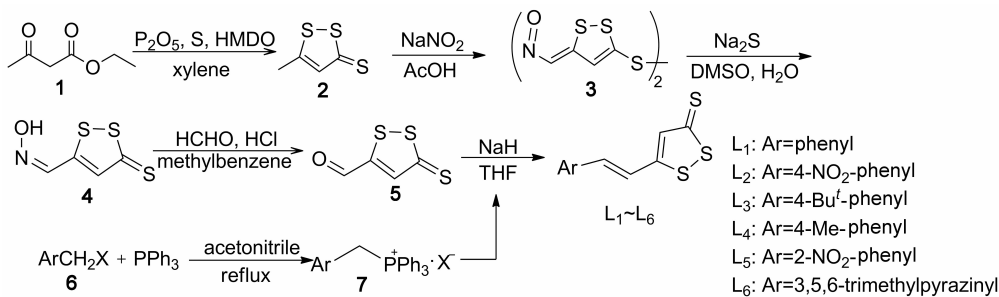
血管松弛^[2]、心肌缺血损伤保护^[3-4]及氧化应激细胞保护等^[5]。新型 H_2S 供体的研究已成为化学与神经学交叉学科的热点之一^[6]。 H_2S 供体释

收稿日期: 2016-11-01; 修订日期: 2017-01-16

基金项目: 苏州市科技计划项目 (N313202713)

作者简介: 李玉姚 (1989 -), 男, 汉族, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事药物合成的研究。E-mail: 18896587664@163.com

通信联系人: 敖桂珍, 副教授, E-mail: aoguizhen2007@sohu.com



Scheme 1

放 H₂S 的机制多样,其对神经系统的影响也不同。选择合适的 H₂S 供体对准确开展药理机制的研究具有重要意义。

5-对羟基苯基-3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮 (ADT-OH) 为一种重要的硫化氢缓释供体。本课题组前期研究发现,ADT-OH 能够保护谷氨酸损伤的 HT22 海马神经元细胞^[7];抑制脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞的炎症应答^[8];ADT-OH 衍生物 ADT 在小鼠脑中动脉堵塞模型上能减少脑梗死体积,保护血脑屏障^[9]。在此基础上,本文在保留 ADT-OH 的 3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮结构的基础上,用芳乙烯基替换 ADT-OH 的 4-羟基苯环,设计并合成了 6 个二硫杂环戊烯硫酮化合物 ($L_1 \sim L_6$, Scheme 1),其中 L_2 , L_3 , L_5 和 L_6 为新化合物,其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HR-MS (ESI) 表征。采用 MTT 法研究了 $L_1 \sim L_6$ 对谷氨酸诱导损伤的海马神经元 HT22 细胞的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XT-5 型显微熔点仪 (温度未校正);ABI Vari-an UNTIY INOVA 400 MHz 型核磁共振仪 (CDCl₃ 为溶剂,TMS 为内标);ALT Micromass TOF-MS 型质谱仪;Bio-Tek 型酶标仪。

5-硫代-5H-1,2-二硫杂环戊二烯-3-甲醛 (5) 按文献^[10]方法合成;RPMI-1640 培养基,MTT, Sigma 公司;胰蛋白酶,吉诺生物医药技术有限公司;其余所用试剂均为分析纯。

1.2 合成

(1) 三苯基膦盐 (7) 的合成

将 **6** 4 mmol 和三苯基膦 1.049 g (4 mmol) 加至乙腈 (50 mL) 中,回流反应 24 ~ 48 h。旋干得白色或淡黄色粉末状固体 **7**。

(2) $L_1 \sim L_6$ 的合成 (以 L_1 为例)

将 **7** 325 mg (0.75 mmol) 和氢化钠 17 mg (0.7 mmol) 加至无水 THF (15 mL) 中,氮气保护,搅拌下于 0 °C 反应 1 h。加入 **5** 80 mg (0.5 mmol) 的无水 THF (15 mL) 溶液,反应 2 h。加水 15 mL,用乙酸乙酯 (3 × 30 mL) 萃取,有机相减压蒸干,残余物经硅胶柱层析 (洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯 = 10/1, V/V) 纯化得 5-(2-苯乙烯基)-3H-1,2-二硫杂环戊二烯-3-硫酮 (L_1)。

用类似的方法合成 $L_2 \sim L_6$ 。

L_1 : 黄色固体,收率 45%, m. p. 117 ~ 120 °C; ¹H NMR δ: 7.54 (d, J = 6.5 Hz, 2H, ArH), 7.45 ~ 7.40 (m, 3H, ArH), 7.32 (d, J = 16.1 Hz, 1H, C = CH), 7.16 (s, 1H, C = CH), 7.13 (d, J = 16.2 Hz, 1H, C = CH); ¹³C NMR δ: 215.02, 169.78, 138.31, 137.61, 134.54, 130.45, 129.14, 127.76, 120.06; HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₁H₈S₃ { [M + H]⁺ } 236.986 6, found 236.986 9。

L_2 : 黄褐色固体,收率 47%, m. p. 207 ~ 210 °C; ¹H NMR δ: 8.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.70 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.34 (d, J = 16.2 Hz, 1H, C = CH), 7.28 (s, 1H, C = CH), 7.20 (s, 1H, C = CH); ¹³C NMR δ: 215.12, 167.58, 148.32, 140.59, 138.88, 134.92, 128.24, 124.42, 124.16; HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₁H₇NO₂S₃ { [M + H]⁺ } 281.971 7, found 281.971 4。

L_3 : 黄色固体,收率 51%, m. p. 150 ~ 153 °C; ¹H NMR δ: 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.30 (d, J = 16.1 Hz, 1H, C = CH), 7.15 (s, 1H, C = CH), 7.10 (d, J = 16.1 Hz, 1H, C = CH), 1.34 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR δ: 214.85, 170.22, 154.21, 138.29, 137.30, 131.80, 127.64, 126.12, 119.21, 34.96, 31.08; HR-MS (ESI)

表 1 L₁ ~ L₆对谷氨酸诱导损伤的小鼠海马神经元 HT22 细胞的保护作用
Table 1 Effects of L₁ ~ L₆ on glutamic acid induced damage of HT22 cell

Comp	α/%				
	Glutamate *	1 μmol · L ⁻¹	10 μmol · L ⁻¹	50 μmol · L ⁻¹	100 μmol · L ⁻¹
L ₁	18.14 ± 2.52	17.66 ± 2.17	48.28 ± 4.04 **	40.64 ± 4.60 **	40.78 ± 1.64 **
L ₂	20.62 ± 3.71	18.51 ± 2.67	57.72 ± 2.25 **	54.91 ± 5.51 **	43.83 ± 0.99 **
L ₃	18.40 ± 1.68	56.57 ± 3.49 **	35.29 ± 2.59 **	23.78 ± 1.78	29.29 ± 3.08 **
L ₄	22.35 ± 3.94	28.40 ± 5.65	60.82 ± 1.82 **	45.73 ± 2.28 **	54.06 ± 4.43 **
L ₅	22.17 ± 2.99	35.38 ± 7.96 **	26.98 ± 3.94	16.20 ± 2.13	15.95 ± 2.22
L ₆	20.84 ± 3.49	25.73 ± 5.68	44.87 ± 3.46 **	64.27 ± 14.77 **	79.57 ± 8.59 **
ADT-OH	20.69 ± 1.25	33.42 ± 2.23	52.18 ± 3.48 **	103.99 ± 4.62 **	76.43 ± 2.78 **

* 10 mmol · L⁻¹; ** *P* < 0.01 *vs* glutamate group。

m/z: Calcd for C₁₅H₁₆S₃ { [*M* + *H*]⁺ } 293.049 2, found 293.048 6。

L₄: 黄褐色固体, 收率 46%, *m. p.* 126 ~ 128 °C; ¹H NMR δ: 7.44(d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH), 7.29(d, *J* = 16.1 Hz, 1H, C = CH), 7.22(d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.15(s, 1H, C = CH), 7.09(d, *J* = 16.1 Hz, 1H, C = CH), 2.39(s, 3H, CH₃); ¹³C NMR δ: 214.91, 170.20, 141.08, 138.43, 137.29, 131.85, 129.89, 127.78, 119.06, 29.69; HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₁₂H₁₀S₃ { [*M* + *H*]⁺ } 250.978 8, found 250.978 5。

L₅: 黄色固体, 收率 42%, *m. p.* 195 ~ 198 °C; ¹H NMR δ: 8.10(d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.87(d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C = CH), 7.73 ~ 7.68 (m, 2H, ArH), 7.61 ~ 7.56 (m, 1H, ArH), 7.19(s, 1H, C = CH), 7.07(d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C = CH); ¹³C NMR δ: 215.26, 168.02, 138.76, 133.78, 133.19, 130.69, 130.36, 128.84, 125.32, 124.65; HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₁₁H₇NO₂S₃ { [*M* + *H*]⁺ } 281.971 7, found 281.972 1。

L₆: 黄色固体, 收率 55%, *m. p.* 178 ~ 181 °C; ¹H NMR δ: 7.80(d, *J* = 15.4 Hz, 1H, C = CH), 7.45(d, *J* = 15.4 Hz, 1H, C = CH), 7.24(s, 1H, C = CH), 2.62(s, 3H, CH₃), 2.55(s, 3H, CH₃), 2.54(s, 3H, CH₃); ¹³C NMR δ: 215.17, 169.09, 152.65, 150.16, 148.65, 142.47, 138.44, 131.86, 124.61, 22.07, 21.74, 20.70; HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₁₂

H₁₂N₂S₃ { [*M* + *H*]⁺ } 281.024 1, found 281.024 2。

1.3 化合物对谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤的保护作用测定^[7]

空白组只加培养基。谷氨酸组 HT22 细胞用 10 mmol · L⁻¹ 谷氨酸处理; 样品测试组用 10 mmol · L⁻¹ 谷氨酸和终浓度分别为 1, 10, 50 和 100 μmol · L⁻¹ 的受试化合物处理。用酶联测试仪测定波长 570 nm 处每孔的吸收度(OD 值), 计算细胞存活率 α(α = 实验组平均 OD 值/空白组 OD 值 × 100%)。实验重复 3 次, 采用 SPSS 进行统计。

2 结果与讨论

2.1 合成

合成 L₂ 时, 最开始采用的是 Knoevenagel 缩合法, 即 **2** 与对硝基苯甲醛在哌啶催化下, 回流进行缩合反应。化合物经¹H NMR 鉴定为 L₂ 顺反异构体的混合物, *M*(反式) : *M*(顺式) = 3 : 1, 反应产率也较低(< 20%)。采用该方法合成其他目标化合物时, 立体选择性也较差。最后改用 Wittig 缩合法, **5** 与 **7** 反应所得产物均为反式, 立体选择性较好。

2.2 化合物对谷氨酸诱导损伤的 HT-22 细胞保护作用

表 1 为 L₁ ~ L₆ 对谷氨酸诱导损伤的小鼠海马神经元 HT22 细胞的保护作用。由表 1 可见, 空白对照组的细胞存活率为 100%。glutamate 组的 HT-22 细胞单独经 10 mmol · L⁻¹ 谷氨酸处理

后,存活率 $< 25\%$,说明 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸已对 HT-22 细胞造成了损伤。样品组的 HT-22 细胞经 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸和不同浓度的目标化合物处理后,细胞存活率均能够明显提高,说明 $\text{L}_1 \sim \text{L}_6$ 可以保护谷氨酸诱导损伤的 HT-22 神经细胞。其中, L_1 , L_2 , L_4 和 L_6 的给药浓度为 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,均可提高受损 HT22 细胞的存活率 ($40.64\% \sim 79.57\%$) ($P < 0.01$),具有较好的神经保护作用,但低于 ADT-OH。 L_5 只在低浓度 ($1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时才表现出神经保护作用,细胞存活率为 35.38% ($P < 0.01$)。 L_3 在用药浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HT22 细胞存活率为 56.57% , 高于 ADT-OH (33.42%), $P < 0.05$, 神经保护作用较强。

3 结论

合成了 6 个二硫杂环戊烯硫酮化合物 ($\text{L}_1 \sim \text{L}_6$, 其中 L_2 , L_3 , L_5 和 L_6 为新化合物)。采用 MTT 法研究了 $\text{L}_1 \sim \text{L}_6$ 对谷氨酸诱导损伤的海马神经元 HT22 细胞的影响。药理初筛结果表明: 给药浓度为 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, L_1 , L_2 , L_4 和 L_6 均能提高受损 HT22 细胞的存活率 ($P < 0.01$); 给药浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, L_3 和 L_5 均可提高损伤 HT22 细胞的存活率 ($P < 0.01$)。 $\text{L}_1 \sim \text{L}_6$ 具有较好的神经保护作用,对神经保护作用的研究具有一定意义。

参考文献

- [1] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. Journal Of Neuroscience, 1996, **16**(3):1066 – 1071.
- [2] Kohn C, Dubrovskaya G, Huang Y, *et al.* Hydrogen sulfide; Potent regulator of vascular tone and stimulator of angiogenesis[J]. International Journal of Biomedical Science, 2012, **8**(2):81 – 86.
- [3] Lee Predmore B, Joseph L D, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, **17**(1):119 – 140.
- [4] King A L, Lefer D J. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia-reperfusion injury[J]. Experimental Physiology, 2011, **96**(9):840 – 846.
- [5] Kimura Y, Goto Y I, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2010, **12**(1):1 – 13.
- [6] Martelli A, Testai L, Marino A, *et al.* Hydrogen sulphide: Biopharmacological roles in the cardiovascular system and pharmaceutical perspectives [J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, **19**(20):3325 – 3336.
- [7] Cheng J, Ao G Z, Jia J, *et al.* Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress[J]. Neurochemistry International, 2013, **62**(8):1072 – 1078.
- [8] Ao G Z, Jia J, Cheng J, *et al.* CaMKK β -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, **21**(12):1741 – 1758.
- [9] Wang Y, Jia J, Ao G Z, *et al.* Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia[J]. Journal Neurochemistry, 2014, **129**(5):827 – 838.
- [10] Abazid M, Bertrand H O, Christen M O, *et al.* A general synthesis of new dithiolethione derivatives 5-(1-hydroxyimino alkyl)-1,2-dithiole-3-thiones and 5-acyl-1, 2-dithiole-3-thiones [J]. Phosphorus Sulfur And Silicon And The Related Elements, 1994, **88**(1 – 4):195 – 206.

热烈祝贺《合成化学》再次入选中国科学引文数据库

经过中国科学引文数据库 (Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD) 的定量遴选、学科专家评审和中国科学引文数据库来源期刊遴选委员会的评议,《合成化学》再次被中国科学引文数据库 (2017 – 2018 年度) 收录。