DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.041
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1091-03

论著

新型LXRs配体——环氧胆烷酸甲酯一类物的化学合成

郑 辉,徐长荣,周向东 (第三军医大学基础医学部化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 合成两个新设计的具有环氧胆烷酸甲酯结构的化合物:3β-羟基-5α,6α-环氧胆烷酸甲酯、3β-羟基-5β,6β-环氧胆烷酸甲酯,以期从中发现新的LXRs亚型选择性配体。方法 用我国丰富的甾体资源——猪去氧胆酸为原料,分别经三步和四步化学反应合成。结果 以76%和42%的总收率合成了两个目标化合物,并经波谱分析证实。结论 用高立体选择性高收率地成功合成了目标化合物。为研制治疗动脉粥样硬化等心脑血管疾病的新药打下了基础。

关键词:LXRs;猪去氧胆酸;3β-羟基-5α,6α-环氧胆酸甲酯;3β-羟基-5β,6β-环氧胆酸甲酯
中图法分类号:O621.3;O629.22;R914 文献标识码:A

Chemical synthesis of methyl epoxycholanate analogues: novel ligands for liver X receptors

ZHENG Hui, XU Chang-rong, ZHOU Xiang-dong (Department of Chemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: Objective To synthesize two compounds with epoxycholanate structure: methyl 3β-hydroxy-5β, 6β-epoxycholanate and methyl 3β-hydroxy-5β, 6β-epoxycholanate for getting new ligands of liver X receptors (LXRs). Methods The compounds were synthesized from hyodeoxycholic acid in 3 and 4 steps and analyzed with spectroscopy. Results The compounds were synthesized in total yields of 76% and 43%, respectively, and confirmted with spectroscopy. Conclusion The compounds are synthesized with epoxycholanate structure stereocontrolledly and successfully, which founds a basis for new drug synthesis in the treatment of cardiovascular diseases, like atherosclerosis etc.

Key words: LXRs' ligand; hyodeoxycholic acid; methyl 3β-hydroxy-5α, 6α-epoxycholanate; methyl 3β-hydroxy-5β, 6β-epoxycholanate

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要致病因素和死亡因素[1]。肝孤儿受体LXRs(Liver X receptors)是新近发现的治疗动脉粥样硬化的分子靶,LXRs的配体激动剂是一类新型的治疗动脉粥样硬化的药物[2,3]。LXRs是核受体超家族中的成员,最初因其配体未知而被认为是孤儿受体。哺乳动物中的LXRs有LXRα和LXRβ两种亚型,其中LXRα主要在脂质代谢起重要作用的组织内表达,在肝脏内的表达水平最高,而LXRβ则广泛表达于各种组织[4]。与其它核受体一样,LXRs为配体依赖性核受体,与相应的配体结合而被活化,再与活化的RXR(维甲酸孤儿受体)结合形成兼容性异源二聚体,该异源二聚体与相应的DNA应答元件结合,调节靶基因的表达,发挥其生物效应[4]。最近已发现了几个LXRs的靶基因,如胆固醇7α-羟化酶基因CYP7A[5]、胆固醇酯转移蛋白基因(CETP)[6]、ABC-1[7]和ABC-8[8]基因、巨噬细胞中的载脂蛋白E(ApoE)基因[9]等,这些靶基因都通过信号转导参与体内胆固醇的代谢分解和逆向运输。因此,发现LXRs亚型特异性配体(激动剂或拮抗剂)成为研制新型治疗动脉粥样硬化及心脑血管疾病药物的首要目标。

最新的研究发现体内存在的24S,25-环氧胆固醇、24S-羟基胆固醇(脑甾醇)、22R-羟基胆固醇等氧化甾醇是LXRs的天然配体。根据对其构效关系的分析,我们以猪去氧胆酸为原料,设计并成功合成了两个具有5α,6α-环氧和5β,6β-环氧A,B-环结构的胆烷酸甲酯化合物:3β-羟基-5α,6α-环氧胆烷酸甲酯**2**和3β-羟基-5β,6β-环氧胆烷酸甲酯**3**,以期从中筛选出LXRα或LXRβ受体亚型选择性配体。

1 实验步骤

所有反应均以薄层层析跟踪,使用烟台化工研究所生产的高效薄层层析硅胶板,磷钼酸显色。快速层析用青岛海洋化工厂生产的层析硅胶(10~40 μm);用石油醚(Pet)均为60 ℃~90 ℃。化合物熔点用Buch535熔点仪测定,所有熔点均未校正。所有化合物旋光值由Perkin-Elmer341旋光仪测定。红外光谱由Bio-Rad FTS-185红外光谱仪测定,用KBr压片。^{1}HNMR由Bruker AM300(300 MHz)型核磁共振仪测定,TMS作内标,未经特别说明,均用$CDCl_3$作溶剂,δ值单位为ppm。质谱由HP5973型质谱仪测定。元素分析由中国科学院上海有机化学研究所分析测试中心测定,合成路线见图1。

首先,将工业纯的猪去氧胆酸**1**,经乙酸乙酯回流去脂,浓硫酸—甲醇甲酯化后,在苯中回流生成含一苯分子的猪去氧胆酸甲酯结晶,氢氧化钾-甲醇水解后,用乙酸乙酯-乙酸(5∶1)重结晶得猪去氧胆酸纯品,再经甲酯化、石油醚重结晶得猪去氧胆酸甲酯**4**。

基金项目:中国科学院生命有机化学国家重点实验室基金资助项目(2000-08)
作者简介:郑 辉(1971-),男,四川省乐山市人,助教,主要从事有机合成和甾体化学方面的研究工作。电话:(023)68753702
收稿日期:2001-06-20;修回日期:2001-08-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

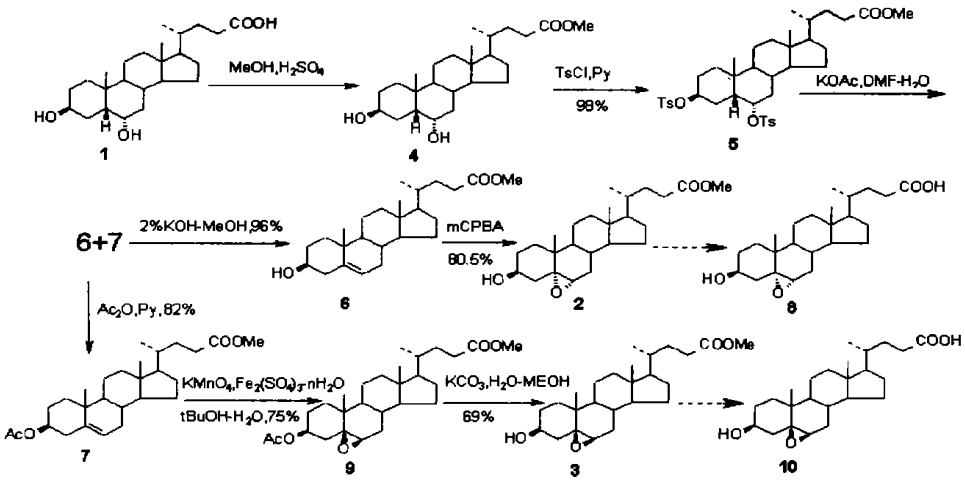


图 **1** 合成路线

Fig 1 The plan of synthesis

1.1 3,6—二对甲苯磺酰基猪去氧胆酸甲酯5的合成

按文献[10] 用猪去氧胆酸甲酯 **4** 合成化合物 **5**(针状晶体),收率98%。mp:174.3 ℃~175.1 ℃,文献[15] mp:165 ℃~167 ℃。

1.2 △5—3β—羟基胆烯酸甲酯 **6** 的合成

250 蛋形瓶中,加入14.6 g(149 mmol) 乙酸钾,7.0 ml 水和80 ml DMF,加热至105 ℃,加入10 g(14 mmol) **5**,保温5 h,冷至室温。倾入500 ml 冰冷的5%HCl 溶液中,有大量白色沉淀析出。减压过滤,用水洗至中性,烘干得粗品(**6**+**7**)混合物5.538 g。取3.027 g 上述混合物溶于30 ml 2%KOH-MeOH 溶液,室温搅拌2 h,倾入300 ml 含碎冰的10%HCl 溶液中,有大量沉淀析出,用水洗至中性,烘干重3.120 g,重结晶得化合物 **6** **2**.853g。收率96%。mp:143.4 ℃~144.3 ℃;$[\alpha]_D^{23}$-42.33°(C,1.99,$CHCl_3$);EI-MS(m/e):388(M),370(M-H_2O),355(M-H_2O-M_2),328(M+1-H_2O-MeCO);IR(KBr) cm^{-1}:3489(OH),1716(CO_2Me);^{1}HNMR(300 MHz,$CDCl_3$) δppm:0.69(3H,s,18-H_3),0.82(3H,d,J=6.36 Hz,21-H_3),1.02(3H,s,19-H_3),3.53(1H,m,3α-H),3.68(3H,s,$COOCH_3$),5.36(1H,d,J=3.35 Hz,6-H)元素分析($C_{25}H_4O_3$):计算值,C,77.27%;H,10.37%;实测值,C,77.37%;H,10.15%。

1.3 3β-羟基-5α,6α-环氧胆烷酸甲酯2的合成

25 ml 蛋形瓶中,加入300 mg(0.773 mmol) **6**,用11 ml $CHCl_3$ 溶解,冷至-15 ℃,加入200 mg(80%,0.928 mmol) mCPBA,搅拌过夜,自然升至室温。加入1.149 g 亚硫酸钠,搅拌30 min。50 ml EtOAc 提取,有机层用2×30 ml 饱和 $NaHCO_3$,2×25 ml 饱和NaCl 洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,除去溶剂得粗品528 mg。快速柱层析(pet:EtOAc/4:1)得化合物 **2** **254** mg,收率81.5%。mp:143.4 ℃~144.3 ℃;$[\alpha]_D^{20}$-46°(C,0.25,$CHCl_3$);MS-EI(m/z):404(M),386(M-H_2O);IR(KBr) cm^{-1}:3344(OH),1739(肩峰);^{1}HNMR(300MHz,$CDCl_3$) δppm:0.61(3H,s,18-H_3),0.90(3H,d,J=6.36Hz,21-H_3),1.06(3H,s,19-H_3),2.90(1H,m,6β-H),3.66(3H,s,-$COCH_3$),3.90(1H,m,3α-H);元素分析($C_{25}H_{40}O_4$·0.5H_2O):计算值C,72.63%;H,9.96%;实测值C,72.76%;H,9.70%。

1.4 △5-3β-乙酰氧基胆烯酸甲酯7的合成

500 ml 圆底烧瓶中加入38.96 g(397.5 mmol) 乙酸钾,18.7 ml 水,214.5 ml DMF,升温至105 ℃,加入26.809 g(37.5 mmol) **5**,在105 ℃~110 ℃保温5 h,冷至室温,倾入冰冷的5%HCl 中,有大量白色固体析出,抽滤,用水充分洗至中性,干燥得粗品,粗品置于250 ml 蛋形瓶中,加入120 ml 乙酸酐和120 ml 吡啶,室温放置24 h,反应液倒入冰冷的5%HCl 中,剧烈搅拌1 h,过滤,用少量稀HCl 洗涤残余吡啶至气味消失,再用大量水洗涤至中性,得化合物 **7** **13**.3 g,收率82%。mp:152.2 ℃~153.1 ℃;$[\alpha]_D^{23}$— 22.15°(C,0.781,$CHCl_3$);IR(KBr) cm^{-1}:1732(—COO);MS-EI(m/e):430(M^+),388(M^++1—CH_3CO),370(M^+—HOAc),355(M^+-HOAc-Me),339(M^+-HOAc-MeO);^{1}HNMR(300 MHz,$CDCl_3$) δppm:0.66(3H,s,18-H_3),0.91(3H,d,J=6.4Hz,21-H_3),0.97(3H,s,19-H_3),2.02(3H,s,3($OCOCH_3$)),3.65(3H,s,$COOCH_3$),4.58(1H,m,3αH),5.36(1H,d,J=4.22Hz,6-H);元素分析($C_{25}H_{40}O_3$):计算值,C,77.27%;H,10.37%;实测值C,77.37%,H,10.15%。

1.5 3β-乙酰氧基-5β,6β-环氧胆烷酸甲酯 **8** 的合成

25 ml 蛋形瓶中,加入事先研磨成细粉的由430 mg $KMnO_4$ 和215 mg $Fe_2(SO_4)_3$·XH_2O 组成的混合物,加入0.022 ml H_2O,0.108 ml t-BuOH,搅拌均匀后,加入含430 mg(1 mmol) **7** 的 CH_2Cl_2 溶液5 ml,室温下搅拌2 h,TLC 表明,原料消失。加入10 ml 无水乙醚,剧烈搅拌15 min,过滤,30 ml 无水乙醚洗涤。有机相用30 ml 去离子水,2×30 ml 饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,除去溶剂得白色固体414 mg。取203 mg 粗品,快速柱层析(Pet:EtOAc/8:1)得化合物 **8** **150** mg,产率73.9%。mp:167.2~167.4 ℃;$[\alpha]_D^{20}$+4°C,0.05,$CHCl_3$);EI-MS(m/z):446(M),386(M-HOAc);IR(KBr) cm-1:1733(肩峰);^{1}HNMR(300MHz,$CDCl_3$) δppm:0.64(3H,s,18-H_3),0.90(3H,d,J=6.52Hz,21-H_3),1.00(3H,s,19-H_3),2.03(3H,s,-$COCH_3$),3.08(3H,m,6α-H);3.66(3H,s,24-$COOCH_3$),4.771(1H,m,3β-H);元素分析($C_{27}H_{42}O_5$):计算值C,72.61%;H,9.48%;实测值C,72.45%;H,9.62%。

1.6 3β-羟基-5β,6β-环氧胆酸甲酯 **3** 的合成

25 ml 蛋形瓶中,加入400 mg(0.897 mmol)原料 **9** 用30 ml CH_3OH 溶解,加入3 ml 水,再加入265 mg 固体 K_2CO_3(1.920 mmol),室温搅拌反应2 h,TLC 表明原料完全消失,加入50 ml EtOAc 溶解,有机层用2×30 ml 去离子水,3×30 ml 饱和食盐水洗

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

涤. 无水 Na_2SO_4 干燥, 除去溶剂得粗品 458 mg, 快速柱层(Pet: EtOAc= 2: 1)得化合物 **3** 249 mg, 收率 68.8%。mp: 141.5 ℃ ~ 142 ℃; $[\alpha]_D^{20}$ -1° C, 0.3, $CHCl_3$); EI-MS(m/z): 404(M), 386 (M-H_2O); IR (KBr) cm^{-1}: 3344 (OH), 1706 (COOMe); ^{1}HNMR (300MHz, $CDCl_3$) δppm: 0.64 (3H, s, 18-H_3), 0.90 (3H, d, J= 6.38Hz, 21-H_3), 0.99 (3H, s, 19-H_3), 3.06 (1H, m, 6α-H), 3.65(3H, s, $-COCH_3$), 3.72 (1H, m, 3α-H); 元素分析 ($C_{25}H_{40}O_4$): 计算值, C, 74.22%; H, 9.97%; 实测值, C, 73.98%; H, 9.79%。

2　结果与讨论

目前所发现的 LXRs 配体——氧化甾醇的侧链都含有不同的手性碳原子[2, 10, 11]。要构成这些侧链, 需要较为复杂的延伸侧链的方法和引入手性碳的不对称合成方法[12], 我们已经报道了用猪去氧胆酸为原料合成 LXRs 激动剂——24S, 25-环氧胆固醇和脑甾醇的工作[13]。作为设计合成 LXRs 配体工作的延续, 本研究报道具有环氧胆烷酸结构的两个新化合物: 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **2** 和 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **3** 的设计合成。这两个新化合物具有结构简单、较易合成的特点。因此, 我们的目的是以我国富有的、但大多被废弃并造成环境污染的重要甾体资源——猪去氧胆酸为原料, 立体选择性、高效合成这两个化合物, 以期从中发现 LXRs 亚型选择性配体。我们设计的合成路线如图 1 所示, 其关键步骤是高立体选择性的引入 5β, 6β-环氧和 5β, 6β-环氧。

合成 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **2** 的关键步骤是在 6 的 $\triangle^5$-位立体选择性的引入 5β, 6β-环氧。在合成 **6** 的基础上, 将 **6** 在 **-15** ℃ ~ rt 下与 mCPBA (间氯过氧苯甲酸)反应, 过夜, 以 80.5%的收率获得了目标化合物: 3β-羟基-5α, 6α-环氧胆烷酸甲酯 **2**, ^{1}HNMR 谱上仅有积分为一个 H 的 δppm 为 2.90 的多重峰, 应为 6β-H, 而没有 δppm > 3.00 的峰(6α-H)。由此表明: 该化合物为单纯的 3β-羟基-5α, 6α-环氧胆烷酸甲酯, 而没有其 5β, 6β-环氧异构体存在。

同样, 合成设计的化合物 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **3** 的关键步骤是在 **7** 的 $\triangle^5$-位立体选择性的引入 5β, 6β-环氧。我们选用乙酰氧基保护的 3β-羟基化合物 **7** 作为底物, 进行立体控制的引入 5β, 6β-环氧, 即将化合物 **4** 在 $KMnO_4-Fe_2(SO_4)_3 \cdot XH_2O$ 反应体系中, 于室温下反应 2 h, 以 75%的收率得新化合物 3β-乙酰氧基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **8**, ^{1}HNMR 图谱中, 有一个积分为一个 H, δppm 为 3.08 的多重峰, 应为应是 6α-H, 其附近没有 δppm < 3.00 的 6β-H 峰, 由此表明: 该化合物为单纯的 3β-乙酰氧基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **8**, 而没有其 5α, 6α-环氧异构体存在。得到化合物 **8** 后, 将 **8** 在甲醇-水-碳酸钾下水解, 以 68.8% 的收率得目标化合物: 3-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **3**, ^{1}HNMR 图谱中仅有 δppm 为 3.06 的 6α-H 存在, 由此表明: 该化合物为单纯的 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **3**, 而没有其异构体 5β, 6β-环氧。为获得更多的化合物来研究胆烷酸侧链的构效关系, 我们将 **2** 和 **8** 在 5%KOH-MeOH 中搅拌反应, 以期获得化合物 3β-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸 **9** 和 3β-羟基-5β, 6β--环氧胆烷酸 **10**。但化合物 **9**、**10** 极不稳定, 在柱层析分离过程中或冷藏密闭放置时均发生分解, 未能得到 **9**、**10** 的纯品。

至此, 我们从猪去氧胆酸甲酯 **4** 出发, 经三步反应, 以 76%总收率, 立体控制的合成了目标分子, 新化合物: 3-羟基-5β, 6β-环氧胆烷酸甲酯 **2**; 经四步反应, 以 42% 的总收率立体控制的合成了另一目标分子, 新化合物: 3β-羟基-5α, 6α-环氧胆烷酸甲酯 **3**, 为发现 LXRs 亚型选择性配体打下了基础, 也为充分利用猪去氧胆酸提供了潜在的应用前景。其中化合物 **2**、**3**、**8** 的合成未见报道。化合物 **2**、**3**、**8** 的生物测试工作正在进行之中。

(致谢: 本工作获得中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室基金资助。感谢杨秉辉、张冬辉先生在图谱测试中给予的帮助。)

参考文献:

[1] 吴葆杰. 抗动脉粥样硬化药的进展情况[A]. 见: 金正均, 汪永铭, 苏定冯, 主编. 药理学进展[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 96-99.

[2] Janowski B A, Grogan M J, Jones S A, *et al*. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(1): 266-271.

[3] Ferber; D. Possible New Way to Lower Cholesterol[J]. Science, 2000, 289(5 484): 1 446-1 447.

[4] Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, *et al*. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(10): 7 025-7 035.

[5] Lehman J M, Kliewer S A, Moore L B, *et al*. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway[J]. J Biol Chem, 1997, 272(6): 3 137-3 140.

[6] Luo Y, Tall A R. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element[J]. J Clin Invest, 2000, 105(4): 513-520.

[7] Repa J J, Turley S D, Lobaccaro J M A, *et al*. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers[J]. Science, 2000, 289(5 484): 1 524-1 529.

[8] Venkateswaran A, Repa J J, Lobaccaro J M A, *et al*. Human White/Murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. a transcriptional role for specific oxysterols[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14 700-14 707.

[9] Laffitte B A, Repa J J, Joseph S B, *et al*. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 507-512.

[10] Spencer T A, Li D, Russel J S, *et al*. Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXR[J]. J Med Chem, 2001, 44(6): 886-897.

[11] Hiipakka, R A, Liao S T. Selective activation of liver X receptor alpha by 6α-hydroxy bile acids and analogs[J]. Steroids, 2000, 65(8): 423-427.

[12] Corey E J, Grogan M J. Stereocontrolled syntheses of 24(S), 25-epoxycholesterol and related oxysterols for studies on the activation of LXR receptors[J]. Tetrahedon Lett, 1998, 39(51): 9 351-9 354.

[13] Zhou X D, Zhou W S. A new Highly stereoselective synthesis of cerebrosterol: an agonist of the nuclear receptor LXRs. Tetraheadron, 2001, 57(39): 8 291-8 286.

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net