

· 基础研究 ·

ZL006 衍生物的设计、合成及神经保护活性研究

陈天乐, 姜波, 余威, 赵怡凡, 陈维琳, 李飞*

南京医科大学药学院药物化学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探究突触后密度蛋白95(PSD95)-神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)解耦联剂ZL006(1)的构效关系, 探明其解耦联机制。方法: 以前期研究发现的PSD95-nNOS解耦联剂ZL006(1)为先导化合物, 通过对其亲脂端、连接臂和水杨酸结构3部分进行修饰, 设计合成了4个系列共21个ZL006衍生物, 其结构均经¹H NMR、¹³C NMR和ESI-MS确认。采用LDH实验测试目标化合物对谷氨酸诱导损伤的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的保护作用, 以CCK-8染色法测试了目标化合物的细胞毒性。结果: 大部分化合物对细胞具有保护活性, 其中化合物5e和27a与阳性对照化合物ZL006的神经保护活性相当(10 μmol/L时51.24%、48.42%), 化合物23表现出优于ZL006的细胞保护活性(10 μmol/L时54.34%, 1 μmol/L时29.58%), 并表现出较低的细胞毒性(25 μmol/L时2.85%)。结论: 研究丰富了PSD95-nNOS解耦联剂的结构类型, 并对其应用于神经保护提供了借鉴。

[关键词] ZL006; 结构修饰; 神经保护活性; 构效关系

[中图分类号] R914.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)05-691-11

doi: 10.7655/NYDXBNS20230515

Design, synthesis and biological evaluation of ZL006 Derivatives as neuroprotective agents

CHEN Tianle, JIANG Bo, YU Wei, ZHAO Yifan, CHEN Weilin, LI Fei*

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The aim of the study was to explore the structure-activity relationship of PSD95-nNOS decoupling agent ZL006 (1), and the mechanism of decoupling. **Methods:** Based on the PSD95-nNOS protein-protein interaction inhibitor ZL006 reported by our group, four series of 21 novel ZL006 derivatives were designed and synthesized by modifying its lipophilic part, linker and Salicylic acid structure. All the structures were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS. The protective effect of the target compounds on glutamate-induced damage of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) was tested by LDH experiment, and the cytotoxicity of the target compounds was tested by CCK-8 staining. **Results:** Most of the compounds had protective activity against cells, among which compounds 5e and 27a were comparable to the neuroprotective activity of the positive control compound ZL006 (51.24%, 48.42% at 10 μmol/L), and compound 23 showed better cytoprotective activity than ZL006 (54.34% at 10 μmol/L, 29.58% at 1 μmol/L) and showed lower cytotoxicity (2.85% at 25 μmol/L). **Conclusion:** This study not only enriches the diversity of chemical structures suitable for PSD95-nNOS protein-protein interaction but also provides a useful tool to further explore the neuroprotection therapeutic potential.

[Key words] ZL006; structural modification; neuroprotective activity; structure-activity relationship

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05): 691-700, 713]

N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate

[基金项目] 国家自然科学基金-面上项目(82171224); 国家自然科学基金青年基金项目(82103981); 江苏省高校自然科学基金研究面上项目(20KJB350001); 江苏省博士后科研资助计划项目(2021K505C)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: kldlf@njmu.edu.cn

receptor, NMDAR)在突触可塑性、大脑发育、学习和记忆中起着重要作用^[1-3]。但是,在发生缺血性卒中后会过度激活NMDAR,引发毒性级联反应,从而杀死神经元^[4-6]。脑缺血后,NMDAR过度激活,通过N-甲基-D-天冬氨酸受体2B亚型(GluN2B)-PSD95-nNOS通路,引起nNOS的过度活化,导致一氧化氮(nitric oxide, NO)过度释放,从而产生兴奋性毒性效

应^[7-8]。破坏 GluN2B-PSD95-nNOS 复合物可抑制 NMDAR 介导的 NO 产生并保护神经元免受兴奋性毒性损伤^[9-12]。因此,通过特异性抑制 PSD95-nNOS 结合,减少 NO 的产生,能够减轻卒中损伤。

本课题组前期研究发现的 PSD95-nNOS 解耦联剂 ZL006,有较好的神经保护作用并且无明显的镇静和记忆缺失等不良反应^[13-15]。目前 ZL006 等 PSD95-nNOS 解耦联剂与 PSD95-nNOS 的结合模式目前尚不明确^[16],本文以 ZL006 为先导化合物,对其亲脂端、连接臂和水杨酸结构进行结构修饰,设计并合成了4个系列共21个衍生物,采用谷氨酸诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型测试了化合物的体外细胞保护活性,同时采用 CCK-8 比色法测试了化合物的细胞毒性^[17-18],系统地探究了此类化合物的构效关系,为该类化合物作为 PSD95-nNOS 解耦联剂进一步优化提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

合成化合物 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 用 JEOL 400 MHz

核磁共振仪测定,质谱用 Agilent technologies 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 测定;熔点用 X-4 数字显示显微熔点仪测定;薄层层析板采用 HSGF 254 (烟台江友硅胶开发有限公司),于紫外灯下(波长 254 nm)显色,柱层析采用 200~300 目硅胶(烟台江友硅胶开发有限公司)。本文所用其他试剂均为分析纯,无水试剂均按常规方法处理,水为 2 次蒸馏水。

1.2 方法

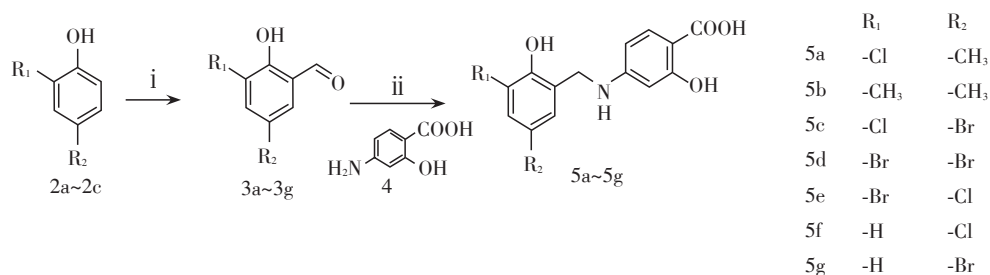
1.2.1 合成路线

1.2.1.1 ZL006 亲脂端结构修饰衍生物的合成

以 4-取代苯酚或 2,4-二取代苯酚为原料,通过达夫反应得到中间体 3a~3g,这些中间体通过醛胺缩合、硼氢化钠还原得到部分目标衍生物 5a~5g(图 1)。

以 3,5-二氯苯甲醛为原料,通过硝化反应得到中间体 7,再通过醛胺缩合、硼氢化钠还原得到化合物 8,最后通过铁粉还原得到目标化合物 9(图 2)。

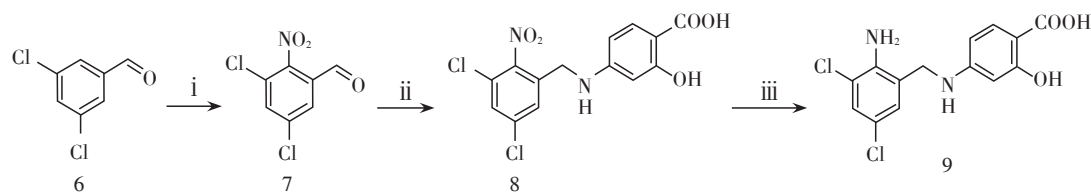
以 3,5-二氯水杨醛为原料,经甲基化反应,硼氢化钠还原,溴化反应得到中间体 13,中间体 13 与 4-氨基-2-羟基苯甲酸甲酯发生取代反应,再经过水



反应条件和试剂:①Heterin, AcOH, 75~125 °C, 2 h; H₂SO₄; 75 °C, 3 h; ②iiA: 4-amino-2-hydroxybenzoic acid, EtOH, r.t., 1 h; iiB: BH₃Na, EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min。

图 1 路线 1: 化合物 5a~5g 的合成

Figure 1 Route 1: synthesis of compounds 5a~5g



反应条件和试剂:①H₂SO₄, HNO₃, 0 °C, 30 min; ②iiA: 4-amino-2-hydroxybenzoic acid, EtOH, r.t., 1 h; iiB: BH₃Na, EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min; ③Fe, AcOH, 85 °C, 1 h

图 2 路线 2: 化合物 9 的合成

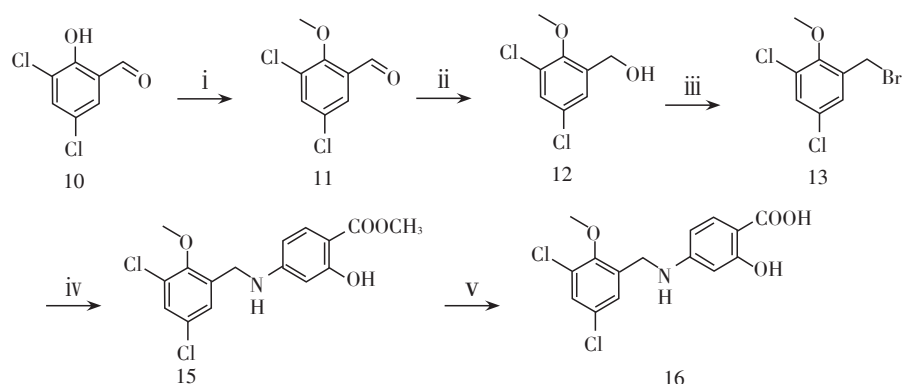
Figure 2 Route 2: synthesis of compounds 9

解反应得到目标化合物 16(图 3)。

1.2.1.2 ZL006 水杨酸结构修饰衍生物的合成

以 4-氨基水杨酸酯或 5-氨基水杨酸为原料,与

化合物 10 通过醛胺缩合,硼氢化钠还原得到部分目标化合物 18a~18c,再以 18b 为原料,通过氨解反应得到化合物 19 和 20(图 4)。



反应条件和试剂:①CH₃I, K₂CO₃, dry DMF, r.t., 12 h; ②BH₃Na, EtOH, r.t., 1 h; ③PBr₃, 0 °C; r.t., 6 h; ④Methyl 4-amino-2-hydroxybenzoate, K₂CO₃, CP, r.t., 18 h; ⑤MeOH, NaOH, 45 °C, 3 h。

图3 路线3:化合物16的合成

Figure 3 Route 3:synthesis of compounds 16

以3-氨基苯酚为原料,与化合物10通过醛胺缩合,硼氢化钠还原得到中间体22,中间体22经磺酸化得到目标化合物23(图5)。

以化合物24a~24c为原料,与化合物10经醛胺缩合,硼氢化钠还原得到目标化合物25a~25c(图6)。

1.2.1.3 ZL006连接链结构修饰衍生物的合成

以不同取代的3,5-二氯取代酮为原料,与4-氨基水杨酸发生酮胺缩合,再通过硼氢化钠还原得到

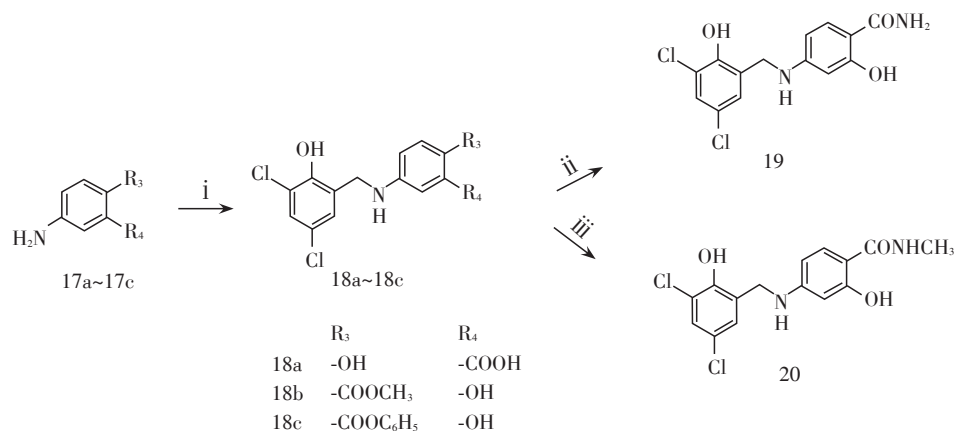
目标化合物27a~27b(图7)。

以化合物18b为原料,经过甲基化反应和水解反应,得到连接链N上带甲基的目标化合物29(图8)。

1.2.2 化学合成

1.2.2.1 化合物5a~5g的合成

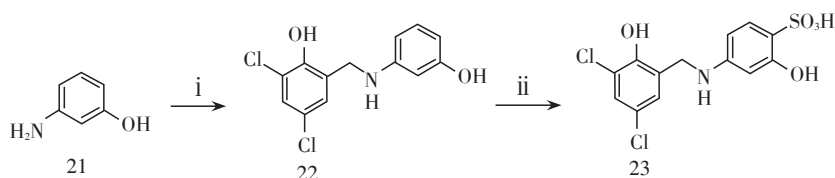
在150 mL圆底烧瓶中,加入化合物2a(1.23 g, 8.7 mmol)和乌洛托品(2.44 g, 17.4 mmol),加入乙酸(6 mL)溶液,升高温度至70 °C,等到反应液澄清后,



反应条件和试剂:①iA: 3,5-dichloro-2-hydroxybenzaldehyde, EtOH, r.t., 1 h; iB: BH₃Na, EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min; ②ammonia, MeOH, r.t., 14 h; ③Methylamine, MeOH, 95 °C, 4 h。

图4 路线4:化合物18a~18c、19、20的合成

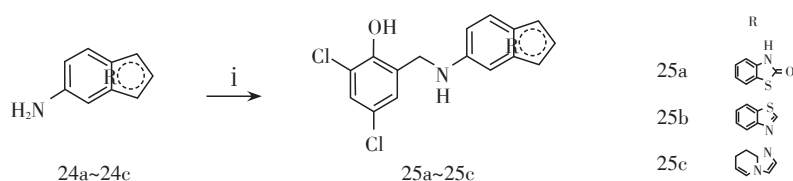
Figure 4 Route 4:synthesis of compounds 18a~18c, 19 and 20



反应条件和试剂:①iA: 3,5-dichloro-2-hydroxybenzaldehyde, EtOH, r.t., 1 h; iB: BH₃Na, EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min; ②H₂SO₄, 0 °C, 3 h。

图5 路线5:化合物23的合成

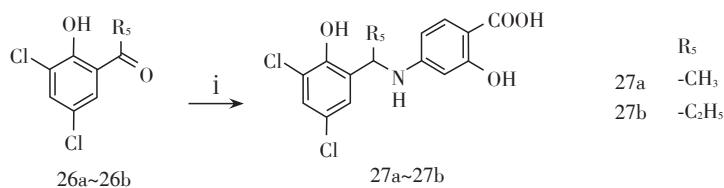
Figure 5 Route 5:synthesis of compounds 23



反应条件和试剂: ①iA: 3,5-dichloro-2-hydroxybenzaldehyde, EtOH, r.t., 1 h; iB: BH_3Na , EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min。

图6 路线6: 化合物25a~25c的合成

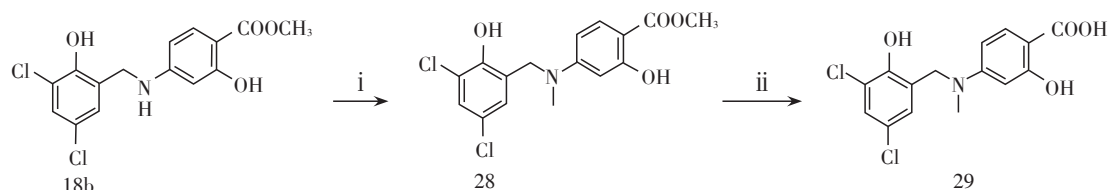
Figure 6 Route 6: synthesis of compounds 25a~25c



反应条件和试剂: ①iA: 4-amino-2-hydroxybenzoic acid, EtOH, r.t., 1 h; iB: BH_3Na , EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min。

图7 路线7: 化合物27a~27b的合成

Figure 7 Route 7: synthesis of compounds 27a~27b



反应条件和试剂: ①iA: CH_2O , EtOH, r.t., 1 h; iB: BH_3Na , EtOH, r.t., 1 h; HCl, r.t., 20 min; ②MeOH, NaOH, 45 °C, 3 h。

图8 路线8: 化合物29的合成

Figure 8 Route 8: synthesis of compounds 29

升高温度至 125 °C。搅拌 2 h 后, 降温至 70 °C, 向反应液中滴加 33% 硫酸 (6 mL), 继续搅拌 3 h, TLC 检测反应, 反应结束后, 用乙酸乙酯 (20 mL×3) 萃取。有机相用水 (10 mL×3) 洗涤, 再用饱和氯化钠溶液 (20 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥有机相, 经硅胶柱色谱 (展开剂: 纯石油醚) 纯化得到化合物 3a 直接用于下一步反应。

按相同的方法, 分别以化合物 2b、2c 为原料, 得到相应的产物化合物 3b、3c 直接用于下一步反应。

将化合物 3a (0.85 g, 5 mmol) 和 4-氨基水杨酸 (0.77 g, 5 mmol) 分别溶解在热乙醇 (15 mL) 溶液中, 将其中一个溶液倒入另一份溶液中, 搅拌 1 h 后, 有大量黄色固体析出, 抽滤, 用少量乙醇冲洗滤饼。将滤饼加入到乙醇 (10 mL) 溶液中, 分批次加入硼氢化钠 (0.38 g, 10 mmol), 溶液由浑浊变得澄清, TLC 检测反应, 反应结束后, 加入 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 5 左右, 抽滤, 取滤液, 加入超纯水 (25 mL), 有白色固体析出, 抽滤, 用大量超纯水冲洗滤饼, 干燥后得到化合物 5a。

按相同的方法, 分别以化合物 3b~3g 为原料, 得

到相应的产物化合物 5b~5g。

4-((3-氯-2-羟基-5-甲基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸 (5a): 白色固体, 产率 68%。m.p. 146~148 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.41 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.41 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.14 (dd, $J=8.9, 2.2$ Hz, 1H), 5.87 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.12 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.6, 164.0, 155.4, 148.5, 131.6, 129.9, 128.8, 128.6, 127.9, 121.1, 106.0, 100.8, 97.1, 41.7, 20.5; ESI-MS m/z : 306.2 [M-H]⁻。

2-羟基-4-((2-羟基-3,5-二甲基苄基)氨基)苯甲酸 (5b): 白色固体, 产率 64%。m.p. 132~134 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.41 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.39 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.89 (brs, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.14 (dd, $J=8.8, 2.1$ Hz, 1H), 5.88 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.7, 164.0, 155.6, 150.9, 131.5, 130.4, 128.2, 126.7, 125.9, 125.1, 106.0, 100.5, 97.0, 41.8, 20.8, 17.0; ESI-MS m/z : 310.2 [M+

Na]⁺。

4-((5-溴-3-氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(5c):白色固体,产率84%。m.p. 150~152 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.43(brs, 1H), 9.77(s, 1H), 7.47(d, J=2.2 Hz, 1H), 7.43(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.19(d, J=2.0 Hz, 1H), 7.03(t, J=5.8 Hz, 1H), 6.14(dd, J=8.8, 1.7 Hz, 1H), 5.87(d, J=1.2 Hz, 1H), 4.25(d, J=5.7 Hz, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 164.0, 155.1, 151.0, 131.8, 130.8, 130.7, 127.4, 124.5, 112.6, 106.0, 101.2, 97.3, 41.8; ESI-MS m/z: 372.1[M+H]⁺。

4-((3,5-二溴-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(5d):灰白色固体,产率70%。m.p. 162~164 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.43(s, 1H), 9.62(s, 1H), 7.58(d, J=2.2 Hz, 1H), 7.43(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.22(d, J=2.1 Hz, 1H), 7.04(s, 1H), 6.14(dd, J=8.8, 1.9 Hz, 1H), 5.87(d, J=1.7 Hz, 1H), 4.27(s, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 164.0, 155.0, 151.5, 133.3, 131.8, 131.3, 130.2, 113.0, 111.9, 105.9, 101.2, 97.3, 41.7; ESI-MS m/z: 416.0[M-H]⁻。

4-((5-氯-3-溴-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(5e):白色固体,产率69%。m.p. 150~152 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.42(s, 1H), 9.79(s, 1H), 7.46(d, J=2.3 Hz, 1H), 7.43(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.19(d, J=2.2 Hz, 1H), 7.04(s, 1H), 6.14(dd, J=8.8, 1.9 Hz, 1H), 5.87(d, J=1.8 Hz, 1H), 4.25(s, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 164.0, 155.1, 150.5, 131.8, 131.2, 130.5, 129.7, 122.6, 111.2, 105.9, 101.2, 97.2, 41.4; ESI-MS m/z: 372.0[M-H]⁻。

4-((5-氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(5f):白色固体,产率73%。m.p. 142~144 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.42(s, 1H), 9.91(s, 1H), 7.41(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.11-7.04(m, 2H), 7.01(t, J=6.0 Hz, 1H), 6.84-6.75(m, 1H), 6.14(dd, J=8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.88(d, J=1.7 Hz, 1H), 4.16(d, J=5.9 Hz, 2H); ¹³C NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 164.1, 155.3, 154.4, 131.7, 128.0, 127.9, 127.8, 123.0, 117.1, 106.0, 100.9, 97.1, 40.8; ESI-MS m/z: 392.1[M-H]⁻。

4-((5-溴-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(5g):粉白色固体,收率72%。m.p. 146~148 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.42(brs, 1H), 9.95(s, 1H), 7.41(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.20-7.15(m, 2H), 7.00(brs, 1H), 6.76(d, J=8.7 Hz, 1H), 6.14(dd, J=8.8,

2.1 Hz, 1H), 5.88(d, J=2.0 Hz, 1H), 4.16(s, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 164.0, 155.3, 154.9, 131.7, 130.8, 128.3, 117.6, 110.6, 105.9, 100.9, 97.0, 40.7; ESI-MS m/z: 336.1[M-H]⁻。

1.2.2.2 化合物9的合成

将化合物6(2.2 g, 12.6 mmol)加入到浓硫酸(8 mL)溶液中,温度维持在0 °C,再向溶液中缓慢滴加硝酸(1.5 mL),在0 °C下搅拌30 min, TLC检测反应,反应结束后,缓慢向反应液中加入冰水,抽滤,用冰水冲洗滤饼,烘干得到化合物7直接用于下一步反应。

化合物7(1.1 g, 5 mmol)和4-氨基水杨酸(0.77 g, 5 mmol)分别溶解在热乙醇(15 mL)溶液中,将其中一个溶液倒入另一份溶液中,搅拌1 h后,有黄色固体析出,抽滤,用少量乙醇冲洗滤饼,取滤饼加入到乙醇(10 mL)溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.38 g, 10 mmol),溶液由浑浊变得澄清, TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至5左右,抽滤,取滤液,加入超纯水(25 mL),有黄色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥后得到化合物8直接用于下一步反应。

将化合物8(0.37 g, 1 mmol)溶于3 mL乙酸溶液中,加入铁粉(0.28 g, 5 mmol)后,升温至85 °C,搅拌1 h, TLC检测反应,反应结束后,通过硅藻土过滤并用热的乙酸乙酯冲洗滤渣,向滤液中加入超纯水(20 mL),用乙酸乙酯(10 mL×3)萃取,收集有机相,用饱和氢氧化钠溶液(10 mL×3)洗涤,再用饱和氯化钠溶液(10 mL×3)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,溶剂蒸除后得到化合物9直接用于下一步反应。

4-((2-氨基-3,5-二氯苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(9):褐色固体,产率37%。m.p. 163~164 °C; ¹H NMR(400 MHz, Chloroform-d) δ 7.55(d, J=7.4 Hz, 1H), 7.42(d, J=1.4 Hz, 1H), 7.13(q, J=1.1 Hz, 1H), 6.21(dd, J=7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.09-6.02(m, 2H), 5.93(d, J=1.5 Hz, 1H), 5.69(d, J=9.0 Hz, 1H), 4.50(dd, J=8.2, 1.0 Hz, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, Chloroform-d) δ 171.56, 163.26, 151.51, 141.84, 131.94, 127.83, 126.57, 123.82, 122.15, 105.83, 103.50, 101.46, 45.22; ESI-MS m/z: 325.1[M-H]⁻。

1.2.2.3 化合物16的合成

将化合物10(1.92 g, 10 mmol)溶于10 mL N,N-二甲基甲酰胺溶液中,依次加入碳酸钾(1.52 g, 11 mmol),碘甲烷(1.56 g, 11 mmol),室温搅拌12 h,

TLC检测反应,反应结束后,加入饱和碳酸氢钠溶液(30 mL)搅拌20 min,加入乙酸乙酯(30 mL×3)萃取,合并有机层用饱和氯化钠溶液(20 mL×3)洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩后,经硅胶柱色谱(展开剂:石油醚:乙酸乙酯=100:1)纯化得到化合物11直接用于下一步反应。

将化合物11(1.9 g, 9.3 mmol)溶于30 mL乙醇溶液中,分批次加入硼氢化钠(1.14 g, 30 mmol),常温反应8 h, TLC检测反应,反应结束后,加入超纯水(20 mL),有白色固体析出,抽滤,用超纯水冲洗滤饼,干燥后得到化合物12直接用于下一步反应。

将化合物12(1.8 g, 8.7 mmol)溶于20 mL四氢呋喃溶液中,保持温度在0 °C,缓慢滴加三溴化磷(4.7 g, 17.4 mmol),恢复到室温,搅拌6 h后, TLC检测反应,反应结束后,缓慢向反应液中滴加2 mol/L氢氧化钠溶液,调节pH至7左右,用乙酸乙酯(20 mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL×3)洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩后经硅胶柱色谱(展开剂:纯石油醚)纯化得到化合物13直接用于下一步反应。

将化合物13(2.2 g, 8.2 mmol)和化合物14(1.05 g, 6.8 mmol)溶于30 mL丙酮溶液中,加入碳酸钾(1.12 g, 8.2 mmol),常温搅拌18 h后, TLC检测反应,反应结束后,加入超纯水(30 mL),用乙酸乙酯(20 mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL×3)洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩后经硅胶柱色谱(展开剂:石油醚:乙酸乙酯=20:1)纯化得到化合物15直接用于下一步反应。

将化合物15(0.34 g, 1 mmol)溶于20 mL甲醇溶液中,在0 °C下加入2 mol/L氢氧化钠溶液(5 mL),升温至85 °C搅拌3 h。TLC检测反应,反应结束后,将甲醇蒸除后,用1 mol/L稀盐酸调节pH至6左右,用乙酸乙酯(10 mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL×3)洗涤,无水硫酸钠干燥,蒸除溶剂后得到化合物16。

4-((3,5-二氯-2-甲氧基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(16):淡黄色油状物,产率62%。¹H NMR(400 MHz, Chloroform-d) δ 7.55(d, J=7.4 Hz, 1H), 7.32(d, J=1.4 Hz, 1H), 7.18(dt, J=1.9, 1.0 Hz, 1H), 6.21(dd, J=7.5, 1.5 Hz, 1H), 5.93(d, J=1.5 Hz, 1H), 5.85(t, J=8.1 Hz, 1H), 4.49(dd, J=8.2, 1.0 Hz, 2H), 3.77(s, 3H); ¹³C NMR(101 MHz, Chloroform-d) δ 171.72, 163.26, 154.41, 151.69, 131.64, 130.45, 129.78, 129.64, 127.60, 125.05, 105.83, 103.50,

101.45, 61.01, 43.48; ESI-MS m/z: 342.2[M+H]⁺。

1.2.2.4 化合物18a~18c, 19, 20的合成

将化合物17a(0.65 g, 2 mmol)溶于10 mL乙醇溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.38 g, 10 mmol),溶液由浑浊变得澄清, TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至5左右,抽滤,取滤液,加入超纯水(25 mL),有白色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥后得到化合物18a。

按相同的方法,分别以化合物17b, 17c为原料,得到相应的产物化合物18b、18c。

5-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸(18a):白色固体,产率64%。m.p. 210~212 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.52(brs, 1H), 7.55(d, J=2.4 Hz, 1H), 7.30(d, J=2.3 Hz, 1H), 6.91(d, J=2.9 Hz, 1H), 6.83(dd, J=8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.72(d, J=8.8 Hz, 1H), 4.19(s, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.5, 153.7, 151.7, 141.2, 133.0, 131.7, 130.3, 122.6, 118.2, 113.1, 112.6, 112.3, 111.8, 43.5; ESI-MS m/z: 328.1[M+H]⁺。

4-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸甲酯(18b):白色固体,产率66%。m.p. 150~152 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.56(d, J=2.4 Hz, 1H), 7.44(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.20(d, J=2.3 Hz, 1H), 6.17(dd, J=8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.89(d, J=1.7 Hz, 1H), 4.28(s, 2H), 3.74(s, 3H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 170.4, 163.4, 155.2, 151.5, 133.3, 131.3, 131.3, 130.2, 113.2, 111.8, 106.4, 100.6, 97.3, 52.2, 41.7; ESI-MS m/z: 342.1[M+H]⁺。

4-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲酸苯酯(18c):棕色固体,产率51%。m.p. 134~136 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.44(s, 1H), 9.80(brs, 1H), 7.69(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.44-7.37(m, 3H), 7.31-7.23(m, 2H), 7.21-7.17(m, 2H), 7.08(d, J=2.6 Hz, 1H), 6.27(dd, J=8.9, 2.1 Hz, 1H), 5.97(d, J=1.8 Hz, 1H), 4.30(d, J=5.7 Hz, 2H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 168.3, 163.9, 155.8, 150.8, 150.1, 132.1, 130.5, 130.0, 127.9, 126.8, 126.4, 123.9, 122.6, 122.3, 100.0, 41.5; ESI-MS m/z: 404.2[M+H]⁺。

将化合物18b(0.34 g, 1 mmol)溶于10 mL甲醇溶液中,加入氨水10 mL,在室温条件下搅拌14 h, TLC检测反应,反应结束后,蒸除甲醇和氨水,将得到的黄褐色固体在乙酸乙酯中打浆纯化,得到化合物19。

4-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯甲

酰胺(19):棕色固体,产率53%。m.p. 146~148 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.82(s, 1H), 9.72(s, 1H), 9.47(s, 1H), 7.71(d, J=9.1 Hz, 1H), 7.64(t, J=5.9 Hz, 1H), 7.39(d, J=2.5 Hz, 1H), 7.10(d, J=2.5 Hz, 1H), 6.37(d, J=7.9 Hz, 1H), 5.95(s, 1H), 4.31(d, J=5.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR(125 MHz, DMSO- d_6) δ 169.87, 160.50, 150.67, 130.39, 129.28, 127.66, 121.70, 114.09, 105.76, 102.65, 44.21; ESI-MS m/z: 327.2[M+H] $^+$ 。

将化合物18b(0.34 g, 1 mmol)溶于10 mL甲醇溶液中,加入甲氨水溶液10 mL,升温至95 °C,反应4 h, TLC检测反应,反应结束后,蒸除甲醇和甲氨水溶液,将得到的褐色固体在乙酸乙酯中打浆纯化,得到化合物20。

4-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基-N-甲基苯甲酰胺(20):棕色固体,产率56%。m.p. 160~162 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.72(s, 1H), 8.26(d, J=4.5 Hz, 1H), 7.44(d, J=8.7 Hz, 1H), 7.35(d, J=1.5 Hz, 1H), 7.07(d, J=1.6 Hz, 1H), 6.74(t, J=6.0 Hz, 1H), 6.08(d, J=8.8 Hz, 1H), 5.82(s, 1H), 4.23(d, J=5.9 Hz, 2H), 2.70(d, J=4.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR(101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.8, 163.2, 153.3, 150.0, 131.1, 128.6, 127.7, 126.8, 123.9, 122.2, 105.0, 103.8, 98.2, 41.5, 26.2; ESI-MS m/z: 341.2[M+H] $^+$ 。

1.2.2.5 化合物23的合成

将化合物21(0.55 g, 5 mmol)和化合物10(0.95 g, 5 mmol)分别溶解在热乙醇(15 mL)溶液中,将其中一个溶液倒入另一份溶液中,搅拌1 h后,有大量橙黄色固体析出,抽滤,用少量乙醇冲洗滤饼,干燥滤饼后,将滤饼加入到15 mL乙醇溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.57 g, 15 mmol),溶液由浑浊变得澄清, TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至7左右,加入超纯水(25 mL),用乙酸乙酯(15 mL \times 3)萃取,用饱和氯化钠溶液(10 mL \times 3)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,溶剂蒸除后得到化合物22直接用于下一步反应。

在0 °C下,向化合物22(0.53 g, 1.9 mmol)中缓慢滴加浓硫酸(5 mL),逐渐升至室温,搅拌3 h后, TLC检测反应,反应结束后,缓慢向反应液中滴加冰水(25 mL),有棕色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥后得到化合物23。

4-((5-溴-3-氯-2-羟基苄基)氨基)-2-羟基苯磺酸(23):棕色固体,产率49%。m.p. 206~208 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.32(d, J=2.6 Hz,

1H), 7.08(d, J=4.6 Hz, 1H), 7.06(s, 1H), 6.00(dd, J=8.4, 2.5 Hz, 1H), 5.78(d, J=2.2 Hz, 1H), 4.18(s, 2H); ^{13}C NMR(101 MHz, DMSO- d_6) δ 155.02, 150.81, 149.95, 131.50, 128.47, 127.50, 126.70, 123.88, 122.14, 120.36, 104.52, 98.64, 42.00; ESI-MS m/z: 362.1[M-H] $^-$ 。

1.2.2.6 化合物25a~25c的合成

将化合物24a(0.33 g, 2 mmol)和3,5-二氯水杨醛(0.38 g, 2 mmol)分别溶解在热乙醇(5 mL)溶液中,将其中一个溶液倒入另一份溶液中,搅拌1 h后,有黄褐色固体析出,抽滤,用少量乙醇冲洗滤饼,干燥滤饼后,将滤饼加入到乙醇(8 mL)溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.21 g, 5.5 mmol),溶液由浑浊变得澄清, TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至7左右,抽滤,取滤液,加入超纯水(15 mL),有淡黄色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥后得到目标化合物25a。

按相同的方法,分别以化合物24b、24c为原料,得到相应的产物化合物25b、25c。

6-((3,5-二氯-2-羟基苄基)氨基)苯并[d]噻唑-2(3H)-酮(25a):淡黄色固体,产率75%。m.p. 190~192 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.33(s, 1H), 7.12(s, 1H), 6.82(d, J=8.5 Hz, 1H), 6.67(s, 1H), 6.49(d, J=8.7 Hz, 1H), 4.19(s, 2H); ^{13}C NMR(101 MHz, DMSO- d_6) δ 169.89, 150.17, 145.01, 131.57, 127.51, 127.40, 126.82, 124.98, 123.80, 122.10, 112.73, 112.25, 105.84, 42.68; ESI-MS m/z: 339.0[M-H] $^-$ 。

2-((苯并[d]噻唑-5-基氨基)甲基)-4,6-二氯苯酚(25b):灰白色固体,产率71%。m.p. 142~144 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.15(s, 1H), 7.75(d, J=8.7 Hz, 1H), 7.34(d, J=2.7 Hz, 1H), 7.16(s, 1H), 6.99(s, 1H), 6.86(d, J=8.7 Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 4.30(s, 2H); ^{13}C NMR(101 MHz, DMSO- d_6) δ 156.21, 155.35, 150.19, 148.00, 131.41, 127.58, 126.79, 123.89, 122.75, 122.24, 121.46, 115.10, 103.75, 42.33; ESI-MS m/z: 325.1[M-H] $^-$ 。

2,4-二氯-6-((咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)氨基)苯酚(25c):黑色固体,产率72%。m.p. 146~146 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.65(s, 1H), 7.47(s, 1H), 7.36(s, 1H), 7.32(d, J=11.8 Hz, 2H), 7.19(s, 1H), 6.90(d, J=9.6 Hz, 1H), 4.16(s, 2H); ^{13}C NMR(101 MHz, DMSO- d_6) δ 150.26, 141.50, 136.70, 132.36, 130.67, 127.71, 126.90, 123.83, 122.15,

120.26, 117.39, 113.54, 105.24, 42.96; ESI-MS m/z : 306.1[M-H]⁻。

1.2.2.7 化合物27a~27b的合成

将化合物26a(1.03 g, 5 mmol)和4-氨基-2-羟基苯甲酸(0.77 g, 5 mmol)溶于20 mL乙醇溶液中,升温至85 °C,并向溶液中加入少量的甲酸,搅拌5 h后,冷却到室温,有黄色固体析出,抽滤,用少量乙醇冲洗滤饼,干燥滤饼后,将滤饼加入到乙醇(7 mL)溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.19 g, 5 mmol),溶液由浑浊变得澄清,TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至5左右,抽滤,取滤液,加入超纯水(15 mL),有棕黄色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥后得到化合物27a。

按相同的方法,以化合物26b为原料,得到相应的产物化合物27b。

4-((1-(3,5-二氯-2-羟基苯基)乙基)氨基)-2-羟基苯甲酸(27a):棕黄色固体,产率79%。m.p. 62~64 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.70(s, 1H), 8.87(s, 1H), 7.28(d, J=2.6 Hz, 1H), 7.15(d, J=2.6 Hz, 1H), 6.73(t, J=8.0 Hz, 1H), 6.04(d, J=7.0 Hz, 1H), 5.90(dt, J=8.0, 2.0 Hz, 2H), 5.82(t, J=2.1 Hz, 1H), 4.66(t, J=6.6 Hz, 1H), 1.30(d, J=6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR(101 MHz, DMSO-d₆) δ 158.6, 149.6, 149.2, 137.7, 130.0, 127.2, 125.1, 124.1, 122.2, 104.8, 104.4, 100.3, 47.4, 22.8; ESI-MS m/z : 342.2[M+H]⁺。

4-((1-(3,5-二氯-2-羟基苯基)丙基)氨基)-2-羟基苯甲酸(27b):黄褐色固体,产率56%。m.p. 76~78 °C; ¹H NMR(400 MHz, Chloroform-d) δ 7.68(d, J=7.5 Hz, 1H), 7.30(d, J=1.4 Hz, 1H), 7.26(t, J=1.2 Hz, 1H), 6.54(d, J=11.5 Hz, 1H), 6.29(dd, J=7.4, 1.5 Hz, 1H), 6.03(d, J=1.4 Hz, 1H), 5.01(dtd, J=11.5, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 2.04-1.86(m, 2H), 0.95(t, J=8.0 Hz, 3H); ¹³C NMR(101 MHz, Chloroform-d) δ 171.64, 163.41, 151.78, 151.56, 131.70, 129.68, 129.35, 128.90, 128.40, 121.29, 105.74, 103.06, 100.65, 55.56, 28.13, 10.58; ESI-MS m/z : 356.2[M+H]⁺。

1.2.2.8 化合物29的合成

将化合物18b(0.34 g, 1 mmol)溶于3 mL乙醇溶液中,加入甲醛水溶液1.5 mL,常温搅拌5 h, TLC检测反应,反应结束后,有白色固体析出,抽滤,用少量乙醇冲洗滤饼,经硅胶柱色谱(展开剂:石油醚:乙酸乙酯=10:1)纯化得到化合物28直接用于下一步反应。

将化合物28(0.35 g, 1 mmol)加入到乙醇(7 mL)溶液中,分批次加入硼氢化钠(0.19 g, 5 mmol),溶液由浑浊变得澄清,TLC检测反应,反应结束后,加入2 mol/L盐酸溶液调节pH至7左右,抽滤,取滤液,加入超纯水(15 mL),有白色固体析出,抽滤,用大量超纯水冲洗滤饼,干燥滤饼后,将滤饼加入到甲醇(10 mL)中,在0 °C下加入2 mol/L氢氧化钠溶液(7 mL),升温至45 °C搅拌3 h。TLC检测反应,反应结束后,将甲醇蒸除后,用1 mol/L的稀盐酸调节pH至5左右,有白色固体析出,抽滤,干燥得目标化合物29。

4-((3,5-二氯-2-羟基苄基)(甲基)氨基)-2-羟基苯甲酸(29):白色固体,收率83%。m.p. 76~78 °C; ¹H NMR(400 MHz, Chloroform-d) δ 9.91(s, 1H), 7.70(d, J=7.5 Hz, 1H), 7.30(d, J=1.4 Hz, 1H), 7.09(dt, J=1.9, 1.1 Hz, 1H), 6.37(dd, J=7.5, 1.6 Hz, 1H), 6.30(d, J=1.5 Hz, 1H), 4.61(d, J=0.9 Hz, 2H), 3.05(s, 3H); ¹³C NMR(101 MHz, Chloroform-d) δ 171.73, 162.99, 151.91, 150.41, 131.47, 129.36, 128.20, 127.89, 127.44, 121.72, 105.89, 102.18, 101.28, 51.14, 38.67; ESI-MS m/z : 340.1[M-H]⁻。

1.2.3 化合物对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)抗增殖实验

细胞毒性通过CCK-8细胞增殖检测法进行检测,阴性组、阳性组、待测样品组的待测物均先溶于DMSO(终浓度不超过0.5%),用生理盐水稀释至终浓度为1 mmol/L。将细胞消化、计数,配制细胞悬液7×10⁴个/mL,96孔细胞培养板中每孔加入100 μL细胞悬液;将96孔细胞培养板置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h。

用培养基稀释药物至所需工作液浓度(25 μmol/L),每孔加入100 μL相应的含药培养基,同时设立阴性对照组;将96孔细胞培养板置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h,再将96孔板进行CCK-8染色,λ=450 nm,测定吸光度。代入公式:抑制率=(D_{阴性对照}-D_{实验})/D_{阴性对照}×100%计算抑制率。

1.2.4 化合物对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)保护活性测试

谷氨酸诱导损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用通过LDH试剂盒进行检测。阴性组、阳性组、待测样品组的待测物均先溶于DMSO(终浓度不超过0.5%),用生理盐水稀释至终浓度为1 mmol/L。将细胞消化、计数,配制细胞悬液1.4×10⁵个/mL,96孔细胞培养板中每孔加入50 μL细胞悬液,将96孔细

胞培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。

用培养基稀释药物至所需工作液浓度(10.0 μmol/L, 1.0 μmol/L, 0.1 μmol/L), 每孔加入50 μL相应的含药培养基预孵育30 min后, 于每孔(低对照孔除外)加入谷氨酸(工作浓度5 mmol/L), 将96孔细胞培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h, 再将96孔板进行LDH染色, λ=490 nm, 测定吸光度。代入公式: 细胞损伤率=(*D*_{实验}-*D*_{低对照})/(*D*_{高对照}-*D*_{低对照})×100%; 细胞保护率=(模型组损伤率-实验组损伤率)/模型组损伤率×100%, 计算得细胞保护率。

2 结果

大部分目标化合物在谷氨酸诱导的SH-SY5Y细胞损伤模型中表现出一定的保护活性, 部分化合

物在低剂量时依旧保持着一定活性。其中, 化合物5e和27a表现出与ZL006相当的细胞保护活性, 在10 μmol/L的给药浓度下, 化合物5e的细胞保护率为(51.24 ± 0.74)%, 化合物27a的细胞保护率为(48.42 ± 1.01)%; 而化合物23在10 μmol/L浓度下表现出略优于ZL006的细胞保护活性(54.34 ± 0.59)%, 在1 μmol/L浓度下, 化合物23则表现出远高于阳性对照化合物ZL006(1)的细胞保护活性[(29.58 ± 0.48)% vs. (16.43 ± 1.01)%]。此外, 目标化合物5e、27a和23在25 μmol/L给药浓度下, 对SH-SY5Y细胞均表现出较低的毒性(25 μmol/L时3.55%、2.42%、2.85%), 这提示该类化合物可作为安全有效的神经保护剂进行后续研究(表1)。

根据细胞保护活性测试结果可知, 将左侧疏水

表1 目标化合物对SH-SY5Y的细胞保护和抗增殖活性

Table 1 Thecytoprotective and antiproliferation activities against SH-SY5Y of target compounds($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	毒性(%)	细胞保护率(%)			化合物	毒性(%)	细胞保护率(%)		
	25 μmol/L	10.0 μmol/L	1.0 μmol/L	0.1 μmol/L		25 μmol/L	10.0 μmol/L	1.0 μmol/L	0.1 μmol/L
5a	4.76	22.43 ± 0.98	8.01 ± 0.42	7.37 ± 1.97	18c	4.15	12.50 ± 1.02	—	—
5b	3.63	31.73 ± 0.98	5.12 ± 1.55	—	19	3.97	16.35 ± 0.73	0.97 ± 1.74	—
5c	3.81	3.20 ± 2.80	0.35 ± 1.92	4.62 ± 1.92	20	2.68	38.14 ± 0.44	14.75 ± 1.74	—
5d	3.63	12.45 ± 3.40	—	—	23	2.85	54.34 ± 0.59	29.58 ± 0.48	1.93 ± 0.89
5e	3.55	51.24 ± 0.74	7.11 ± 0.89	—	25a	8.06	14.99 ± 2.37	—	—
5f	2.85	22.06 ± 1.77	8.18 ± 1.92	—	25b	6.71	8.23 ± 4.07	11.17 ± 5.65	2.94 ± 2.10
5g	4.50	12.82 ± 0.70	8.33 ± 0.84	5.76 ± 2.95	25c	2.85	8.95 ± 3.67	3.20 ± 2.88	0.65 ± 1.46
9	2.42	14.08 ± 1.83	2.46 ± 1.13	—	27a	2.42	48.42 ± 1.01	10.13 ± 1.01	—
16	2.08	1.42 ± 2.21	4.62 ± 0.30	—	27b	2.25	7.91 ± 1.01	6.96 ± 1.01	1.90 ± 2.95
18a	2.85	28.07 ± 0.14	—	—	29	2.85	0.35 ± 2.95	—	—
18b	1.55	—	—	—	1	—	53.80 ± 1.73	16.43 ± 1.01	5.70 ± 1.30

端苯环上C-2位羟基移除(化合物9)或替换成其他基团(化合物16)活性显著下降; 当C-5位氯原子替换为溴原子(化合物5a)或甲基(化合物5c)时, 活性明显降低, 提示C-2位的羟基和C-5位氯原子是活性必需基团; C-3位为卤素取代时活性保持(化合物5e), 而当卤素移除时, 活性显著下降; 将水杨酸结构的羟基和羧基颠倒后(化合物18a)活性显著下降, 将水杨酸结构的羧基进行酯化(化合物18b、18c)、酰胺化(化合物19、20)以及环化(化合物25a~25c)都使活性下降, 令人惊喜的是当羧酸替换为磺酸取代基时(化合物23)时, 细胞保护活性尤其在低浓度时优于先导化合物1, 提示该位置引入具有负电中心的基团有利于活性提升; 在连接链的C上引入甲基活性保持(化合物27a), 但当引入乙基时(化合物

27b)活性显著降低, 这提示该处不宜引入体积过大的基团, 而将连接链的氨基封闭后活性也显著降低(化合物29)。初步的构效关系分析(图9)为后续化合物结构优化提供了参考, 进一步的化合物优化正在进行中。

3 讨论

基于本课题组前期报道的PSD95-nNOS解耦联剂ZL006, 对其进行结构分析, 对其进行3部分结构修饰, 合理设计并合成了21个全新结构的衍生物, 并进行了初步构效关系研究。其中化合物23对谷氨酸诱导损伤的SH-SY5Y细胞表现出较好的保护活性[10 μmol/L时(54.34 ± 0.59)%, 1 μmol/L时(29.58 ± 0.48)%], 并且表现出较好的安全性。研

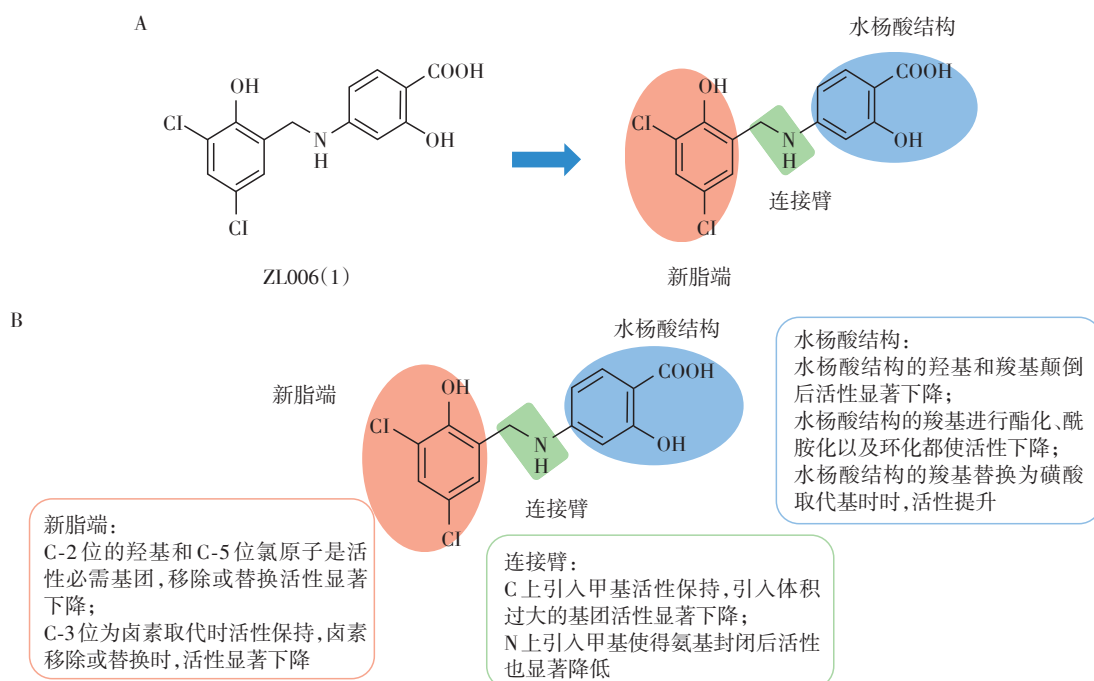


图9 ZL006衍生物的设计(A)及ZL006衍生物的构效关系(B)

Figure 9 The design of ZL006 derivatives(A) and Structure activity relationship of ZL006 derivatives(B)

究表明,该类化合物可进一步进行探索和结构优化研究,对靶向PSD95-nNOS解耦联剂的神经保护药物的开发具有一定的意义和价值。

[参考文献]

- [1] VOLIANSKIS A, FRANCE G, JENSEN M S, et al. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors[J]. *Brain Res*, 2015, 1621:5-16
- [2] ZOICAS I, KORNHUBER J. The role of the N-Methyl-D-aspartate receptors in social behavior in rodents[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5599
- [3] GOLDSMITH P J. NMDAR PAMs: Multiple Chemotypes for Multiple Binding Sites[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019; 19(24):2239-2253
- [4] LUO Y, MA H, ZHOU J J, et al. Focal cerebral ischemia and reperfusion induce brain injury through $\alpha 2\delta$ -1-Bound NMDA receptors[J]. *Stroke*, 2018, 49(10):2464-2472
- [5] SUN Y, CHEN Y, ZHAN L, et al. The role of non-receptor protein tyrosine kinases in the excitotoxicity induced by the overactivation of NMDA receptors[J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27(3):283-289
- [6] DEEP S N, MITRA S, RAJAGOPAL S, et al. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca^{2+} influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(29):11154-11165
- [7] 戴鹏,李飞. 基于NMDAR信号通路的神经保护剂的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(11):1265-1268
- [8] 黄荣,马娟,牛博,等. miR-23a-5p对脑缺血再灌注氧化损伤的抑制作用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11):1612-1616,1627
- [9] LEE W H, XU Z, ASHPOLE N M, et al. Small molecule inhibitors of PSD95-nNOS protein-protein interactions as novel analgesics[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 97:464-475
- [10] SUN H S, DOUCETTE T A, LIU Y, et al. Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat[J]. *Stroke*, 2008, 39(9):2544-2553
- [11] COOK D J, TEVES L, TYMIANSKI M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain[J]. *Nature*, 2012, 483(7388):213-217
- [12] COLCIAGHI F, NOBILI P, CIPELLETTI B, et al. Targeting PSD95-nNOS interaction by Tat-N-dimer peptide during status epilepticus is neuroprotective in MAM-pilocarpine rat model[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 153:82-97
- [13] ZHOU L, LI F, XU H B, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95[J]. *Nat Med*, 2010, 16(12):1439-1443
- [14] CHEN D Y, ZHAO T, NI K D, et al. Metabolic investigation on ZL006 for the discovery of a potent prodrug for the treatment of cerebral ischemia[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(9):2152-2155
- [15] LI J, ZHANG L, XU C, et al. A pain killer without analgesic tolerance designed by co-targeting PSD-95-nNOS in

(下转第713页)

- simple, inexpensive and practical severity markers of obstructive sleep apnea syndrome: a meta - analysis [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(12):6509-6521
- [15] BIKOV A, MESZAROS M, SCHWARZ E I. Coagulation and fibrinolysis in obstructive sleep apnoea [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6):2834
- [16] ASPEY B S, JESSIMER C, PEREIRA S, et al. Do leukocytes have a role in the cerebral no-reflow phenomenon? [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989, 52(4):526-528
- [17] PHILLIPSON M, KUBES P. The neutrophil in vascular inflammation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1381-1390
- [18] WALZIK D, JOISTEN N, ZACHER J, et al. Transferring clinically established immune inflammation markers into exercise physiology: focus on neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and systemic immune-inflammation index [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2021, 121(7):1803-1814
- [19] STOLL G, NIESWANDT B. Thrombo - inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(8):473-481
- [20] SHAIK N F, REGAN R F, NAIK U P. Platelets as drivers of ischemia/reperfusion injury after stroke [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(5):1576-1584
- [收稿日期] 2023-01-19
(本文编辑:唐震)

(上接第700页)

- teraction and $\alpha 2$ -containing GABAARs [J]. *Theranostics*, 2021(12):5970-5985
- [16] BACH A, PEDERSEN S W, DORR L A, et al. Biochemical investigations of the mechanism of action of small molecules ZL006 and IC87201 as potential inhibitors of the nNOS-PDZ/PSD-95-PDZ interactions [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:12157
- [17] YAO Y, JI Y, REN J, et al. Inhibition of autophagy by CRMP2-derived peptide ST2-104(R9-CBD3) via a CaM-KK β /AMPK/mTOR pathway contributes to ischemic post-conditioning - induced neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1):123
- [18] YAN M, LIU A L, ZHOU S J, et al. Characterization of a synthetic steroid 24-keto-cholest-5-en-3 β , 19-diol as a neuroprotectant [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(6):486-495
- [收稿日期] 2023-02-13
(本文编辑:唐震)