

## 冰片及其类似物对谷氨酸诱导神经元细胞损伤的保护作用

陈佳佳,刘金春,常磊,朱东亚,厉廷有\*

(南京医科大学药学院,江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的:探讨冰片及其类似物对谷氨酸诱导神经元细胞损伤的保护作用。方法:用谷氨酸刺激胎鼠原代神经元细胞,造成细胞损伤,导致乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放到细胞外,通过测定药物抑制LDH的漏出率评价药物对神经元细胞的保护作用。结果:冰片(1)、冰片基甲酸(3)、2-冰片基乙醇(4)、2-冰片基乙酸(5)、2-羧甲基异冰片(6)、2,6-二异丙基苯甲酸(8)、2-(2',6'-二异丙基)苯乙醇(9)、2-(2',6'-二异丙基苯基)乙酸(10)都显示对神经元细胞的保护作用,冰片胺(2)、薄荷酸(7)则表现为神经损伤作用。结论:冰片及多数类似物对谷氨酸诱导的神经元损伤具有保护作用,其中,2,6-二异丙基苯甲酸(8)在 $1 \times 10^{-5}$ ~ $1 \times 10^{-7}$  mol/L浓度范围内都显示较好的神经保护作用,值得深入研究。

[关键词] 冰片;神经保护剂;乳酸脱氢酶

[中图分类号] R918

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-630-06

doi:10.7655/NYDXBNS20130513

## Neuroprotective effect of borneol and its analogues on glutamic acid induced neuron injury

Chen Jiajia, Liu Jinchun, Chang Lei, Zhu Dongya, Li Tingyou\*

(School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** Objective: To evaluate the neuroprotective effect of borneol and its analogues on glutamic acid induced neuron damage. **Methods:** The lactate dehydrogenase (LDH) was leaked to extracellular space after the neurons were treated with glutamic acid. The neuroprotective effect of the test drugs was evaluated by the enzyme activity of the extracellular LDH. **Results:** Borneol(1), bornylformic acid (3), 2-bornylethanol (4), 2-bornylacetic acid (5), 2-carboxymethylisoborneol (6), 2,6-diisopropylbenzoic acid (8), 2-(2',6'-diisopropylphenyl)ethanol (9) and 2-(2',6'-diisopropylphenyl)acetic acid (10) showed neuroprotective effect, while bornylamine (2) and menthylformic acid (7) exhibited neuron injury. **Conclusion:** Borneol and most of its analogues showed neuron protective effect in glutamic acid induced LDH releasing model, among which, 2,6-diisopropylbenzoic acid (8) showed good neuroprotective effect in the concentration of  $1 \times 10^{-5}$ ~ $1 \times 10^{-7}$  mol/L. This deserves further research.

[Key words] borneol; neuroprotecting reagents; lactate dehydrogenase

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 630-635]

冰片,俗称龙脑,是一味传统中药,具有开窍醒神、清热止痛等功能,用于热病神昏、惊厥、中风祛痰、喉痹齿痛等治疗。冰片常用作“引药及佐药”,在心脑血管治疗中应用广泛<sup>[1]</sup>。近些年来,药效学研究表明,冰片本身具有脑缺血神经保护作用<sup>[2-4]</sup>。冰片可以改善脑缺血所致的神经功能损伤、保护受损神经元,其作用机制可能与抑制脂质过氧化反应、抑制脑缺血再灌注损伤所致脑内炎症反应、抑制血小板

聚集、抗血栓形成及脑内的能量代谢等有关。因此,冰片是一个具有抗脑缺血作用的先导化合物,对冰片类似物进行活性评价,是发现具有更强神经保护作用化合物的有效途径。本研究用谷氨酸刺激的神经元细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放模型评价冰片及其类似物对神经元细胞的保护作用。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

<sup>1</sup>H NMR用美国Varian 400 MHz核磁共振仪测定,四甲基硅烷(tetramethylsilane, TMS)为内标;质

[基金项目] 江苏省教育厅项目(ky109011108141102)

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

谱分析采用美国 Agilent-6410 LC/MS 质谱仪;薄层层析用硅胶板为青岛化工研究所生产,用碘或硫酸显色。天然冰片购自江西吉安市天然冰片厂,薄荷和樟脑购自南京阿拉丁试剂公司,正叔丁基锂购自美国 Aldrich 公司,三氧化铬吡啶络合物(pyridinium chlorochromate, PCC)为自制试剂。冰片胺(2)从樟脑出发按文献方法合成<sup>[5]</sup>,冰片基氯从  $\alpha$ -蒎烯出发按文献方法制备<sup>[6]</sup>,薄荷基溴按文献方法从薄荷制备<sup>[7]</sup>,薄荷酸(7)从薄荷出发按文献方法合成<sup>[8]</sup>。其他所用试剂除特殊说明外均为市售试剂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 化合物的合成

#### 1.2.1.1 冰片基甲酸(3)的合成

参考文献[9],在氩气保护下切 1.5 g 新鲜钾块于 200 ml 三颈瓶中,加入无水 THF 50 ml、无水  $MgCl_2$  2.01 g (0.211 mol)和无水 KI 3.55 g(0.214 mol)。使用机械搅拌器快速搅拌混合物并加热回流 3 h。反应完毕,停止搅拌,混合物冷却至室温。取冰片基氯 1.83 g(9.58 mmol)溶于 10 ml 无水 THF 中,把溶液注射进镁粉和钾盐的混合溶液中。加热至回流,反应 6 h 后,冷却至室温。 $-20^{\circ}C$  下通入  $CO_2$ , 20 h 后,加入 50 ml 20%盐酸进行酸化。乙醚(100 ml  $\times$  3 次)进行提取,合并乙醚层,用 100 ml 10% NaOH 水溶液进行洗涤。碱溶液用浓盐酸进行酸化。酸溶液用乙醚(100 ml  $\times$  2 次)进行提取,合并乙醚层,水洗 2 次,饱和食盐水洗 1 次,无水  $Na_2SO_4$  干燥。滤去  $Na_2SO_4$ ,旋干溶剂,得到淡黄色晶体 1.17 g,即为冰片基甲酸。

#### 1.2.1.2 2-冰片基乙醇(4)的合成

在氩气保护下切 1.5 g 新鲜钾块于 200 ml 三颈瓶中,加入无水 THF 50 ml、无水  $MgCl_2$  2.01 g (0.211 mol)和无水 KI 3.55 g(0.214 mol)。使用机械搅拌器快速搅拌混合物并加热至回流。回流加热 3 h,反应完毕,停止搅拌时。混合物冷却至室温,取 1.83 g (9.58 mmol)冰片基氯溶于无水 THF 10 ml 中,把溶液注射进镁粉和钾盐的混合溶液中。加热至回流,反应 6 h 后,降温并用冰浴冷却。将环氧乙烷 6 ml (0.12 mol)溶于 20 ml 干燥 THF 后,冰浴下缓慢滴入反应液中,滴完后  $25^{\circ}C$  搅拌过夜。次日,加入饱和氯化铵溶液 50 ml,倾出上层黄色液体。下层浅灰色固体加入稀盐酸(1:1)100 ml,再加入饱和氯化铵溶液后,用乙酸乙酯萃取,萃取液与先前倾出的上层黄色液体合并,加入无水硫酸镁干燥。抽滤,抽干溶剂,经硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯 = 20:1),

得淡黄色液体 0.63 g。

#### 1.2.1.3 2-冰片基乙醛的合成

将冰片基乙醇 1.19 g(6.6 mmol)溶于二氯甲烷(50 ml)中,加入氯铬酸吡啶 3.08 g(14 mmol),室温搅拌 2 h,蒸除二氯甲烷,用乙酸乙酯(75 ml)稀释,水洗,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 50:1),得白色固体 0.85 g,即为 2-冰片基乙醛,产率 73%。产物不经分析直接用于下步合成。

#### 1.2.1.4 2-冰片基乙酸(5)的合成

2-冰片基乙醛 0.71 g (4.0 mmol) 溶于叔丁醇 50 ml、四氢呋喃 10 ml 的混合溶剂中,冰浴下加入到磷酸二氢钠 3.3 g (28 mmol) 和亚氯酸钠 2.4 g (80%, 21 mmol) 的 36 ml 水溶液中,冰浴下搅拌 20 min,升至室温搅拌 3 h。将反应液倾入饱和氯化铵溶液 150 ml 中,用乙酸乙酯 200 ml 提取,水洗 2 次,饱和食盐水洗 2 次,无水硫酸钠干燥。过滤,浓缩,柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 8:1),得白色固体 0.45 g。

#### 1.2.1.5 2-羧甲基异冰片(6)的合成

萘 3.2 g(25 mmol)溶于 25 ml 无水 THF 中,加入切成小块的锂 0.35 g(50 mmol)。在氮气保护下,室温搅拌 2 h。于  $25^{\circ}C$  滴加二乙胺 5.17 ml (50 mmol)。1 h 后,反应液降温至  $-20^{\circ}C$ ,滴加乙酸 1.15 ml(20 mmol)溶于 6 ml THF 的溶液。滴加毕,再反应 1 h。滴加 3.08 g(20 mmol)樟脑溶于 10 ml 无水 THF 的溶液,滴加在 1 h 内完成。滴加完成后,加热至  $40^{\circ}C \sim 50^{\circ}C$ ,反应 2 h。反应液用饱和  $NH_4Cl$  溶液分解,然后加入含 10 g NaOH 的碱溶液。用乙醚进行萃取。取水相,用 10%的浓盐酸溶液进行酸化,至 pH 值 < 3。用乙醚萃取 3 次,合并有机相,水洗 2 次,饱和食盐水洗 1 次,无水  $Na_2SO_4$  干燥。过滤,旋干溶剂,得到淡黄色黏稠液体 3.28 g。

#### 1.2.1.6 2,6-二异丙基碘苯的合成

参考文献[10],量取 2,6-二异丙基苯胺 3.2 ml (15.8 mmol)于 100 ml 三颈圆底烧瓶中,加入 30 ml 水,机械搅拌下加入浓盐酸 15 ml。加完后,在冰水浴下用恒压滴液漏斗缓慢滴加亚硝酸钠 1.18 g (17.4 mmol)溶于 4 ml 的水溶液。 $4^{\circ}C$  下再反应 1 h。称取碘 4.40 g(21.28 mmol)和碘化钾 6.04 g(36 mmol)溶于 10 ml 冰水中。将混合液投入反应体系中,30 min 后加入水 40 ml,二氯甲烷 100 ml,室温过夜,加入水合硫代硫酸钠 6.30 g(25.4 mmol),搅拌反应 20 min。滤去黑色沉淀物,溶液用分液漏斗分液,

水相用氯仿(60 ml × 2次)萃取,合并有机相,用10% 硫代硫酸钠溶液50 ml洗涤,饱和食盐水洗涤,无水硫酸镁干燥。滤去干燥剂,蒸去溶剂,用硅胶柱进行柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 200:1),得淡黄色的液体1.54 g。

#### 1.2.1.7 2,6-二异丙基苯甲酸(8)的合成

参考文献[10],取2,6-二异丙基碘苯1.44 g (5 mmol)于100 ml三颈瓶中,加入无水四氢呋喃3 ml,在双排管体系中用氮气充分置换。以丙酮为冷却剂,用液氮把反应体系降到-78℃。搅拌下用注射器滴加2 mol/L的正丁基锂溶液5 ml(10 mmol),注射完毕后,保持-78℃反应1 h。把温度缓慢升至室温,30 min后通入CO<sub>2</sub>反应20 h。加入2 N盐酸溶液5 ml,搅拌后用乙醚萃取,合并有机相,蒸干溶剂。残留物用2 N NaOH溶液5 ml溶解,用乙醚洗涤。水相用2 N盐酸溶液10 ml中和,用乙醚萃取,合并萃取液,无水硫酸钠干燥,过滤,蒸干得白色晶体0.54 g。

#### 1.2.1.8 2-(2,6-二异丙基)苯乙醇(9)的合成

参考文献[11],取2,6-二异丙基碘苯2.88 g (10 mmol)于100 ml三颈瓶中,加入无水四氢呋喃3 ml,在双排管体系中用氮气充分置换。以丙酮为冷却剂,用液氮把反应体系降到-78℃。搅拌下用注射器滴加2 mol/L的正丁基锂溶液10 ml(20 mmol),注射完毕后,保持-78℃反应1 h。把温度缓慢升至-10℃,将环氧乙烷7 ml(0.14 mol)溶于20 ml干燥四氢呋喃的溶液,缓慢滴入反应液中,滴完后室温搅拌过夜。次日,加入饱和氯化铵溶液50 ml,加入稀盐酸(1:1)100 ml,用乙酸乙酯萃取(60 ml × 3次)。合并萃取液,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,蒸干,残余物用硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 200:1)得白色棉状固体0.53 g。

#### 1.2.1.9 2,6-二异丙基苯乙醛的合成

将2,6-二异丙基苯乙醇1.36 g (6.6 mmol)溶于50 ml二氯甲烷中,加入氯铬酸吡啶3.08 g(14 mmol)。室温搅拌2 h,蒸除二氯甲烷,用75 ml乙酸乙酯稀释,水洗,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 50:1),得白色固体0.85 g,产率63%。产物直接用于下一步反应。

#### 1.2.1.10 2-(2,6-二异丙基苯基)乙酸(10)的合成

参考文献[11],将2,6-二异丙基苯乙醛0.82 g (4.0 mmol)溶于50 ml叔丁醇、10 ml四氢呋喃的混合溶剂中,冰浴下加入3.3 g磷酸二氢钠(28 mmol)和2.4 g亚氯酸钠(80%,21 mmol)的36 ml水溶液中。

冰浴下搅拌20 min,升至室温搅拌3 h,倾入饱和氯化铵溶液150 ml中,乙酸乙酯200 ml提取,水洗2次,饱和食盐水洗2次,无水硫酸钠干燥过滤,浓缩,柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 8:1),得白色固体0.42 g。

### 1.2.2 神经保护作用测试方法

#### 1.2.2.1 原代神经元的培养

取孕龄为15~16 d的ICR小鼠,颈椎脱臼后,将子宫与胎盘分离,依次将取出的胎鼠置于0.1%的新洁尔灭溶液、75%酒精中消毒。左手固定胎鼠,右手用眼科镊将颅盖骨分离,露出大脑半球,用眼科镊小心夹取两侧大脑皮层,置于放有10 ml D-hanks的平皿中。全部取完后剥去脑膜置于另外1个放有10 ml D-hanks的平皿中,然后再吸取5 ml D-hanks洗涤1次。用弯镊将皮层剪碎,取出置于37℃孵箱的0.125%的胰酶(2 ml 0.25%胰酶 + 2 ml D-hanks)加到平皿中,再转移至小烧杯中,混匀后,在孵箱中消化10 min。从孵箱取出后,加入5 ml DMEM + 10%FBS终止消化,吹打混匀后,转移至离心管中,1 500 r/min,离心5 min。弃去上清,再加入4 ml DMEM + 10%FBS,吹打混匀后,再次离心,1 500 r/min,5 min。将上清弃去,加入2 ml神经元培养基(98 ml Neurobasal Medium、2 ml B27、50 μmol/L L-glutamine 400 μl、青霉素50 μl、链霉素50 μl),吹打使细胞分散,过400目筛。稀释10倍后,进行细胞计数,然后进行接种,24孔板每孔接种300 μl,标记好后置于孵箱中培养。1 d后换培养基,吸走120 μl,再加450 μl。第4天再次换液,吸走200 μl,再加300 μl。第7天,谷氨酸造模。

#### 1.2.2.2 谷氨酸损伤模型

先将24孔板每孔定容至300 μl,然后每孔给药0.3 μl,每个药物浓度设3个平行孔,30 min后,每孔再给谷氨酸和甘氨酸各3 μl,期间观察细胞状态,30 min后全量换液,置于孵箱8 h后收集培养基(胞外)。再用PBS洗涤2次后,加入300 μl双蒸水,然后于-80℃反复冻融3次后收集(胞内)。-20℃保存。

#### 1.2.2.3 LDH漏出率的测定

LDH漏出率测定的操作步骤如表1所示。完成步骤5、6后均混匀,37℃水浴15 min。

加完NaOH溶液后再次混匀,将样品分别加入到96孔板,每孔200 μl,然后在酶标仪上测440 nm时的各孔吸光度。漏出率 = 胞外测定值 / (胞外测定值 + 胞内测定值) × 100%。

#### 1.2.2.4 神经元细胞损伤抑制率的计算

根据下述公式计算化合物对谷氨酸诱导的神经

表 1 漏出率测定的操作步骤

Table 1 The procedure of determination of the LDH leaking ratio

步骤	试剂	标准管(μl)	标准空白管(μl)	测定管(μl)	测定空白管(μl)
1	双蒸水	26	42	0	10
2	2 mmol/L 丙酮酸	16	0	0	0
3	待测样品	0	0	32	32
4	基质缓冲液	50	50	50	50
5	辅酶 I	0	0	10	0
6	2,4-二硝基苯肼	50	50	50	50
7	0.4 mol/L NaOH 溶液	500	500	500	500

元细胞损伤的抑制率:抑制率=(谷氨酸组漏出率-化合物组漏出率)/(谷氨酸组漏出率-对照组漏出率)×100%。

### 1.3 统计学方法

应用 Excel 分析软件计算测定结果的标准差,实验数据采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。用 Grubbs 检验法对测定数据的有效性进行分析,以显著性水平  $\alpha=0.05$  作为评价数据有效性的标准。

## 2 结果

本研究从冰片、薄荷、2,6-二异丙基苯胺出发合成了冰片基甲酸(3)等 9 个目标化合物,其中部分目标化合物的性状、收率、质谱、核磁等信息见表 2。

冰片及目标化合物用 LDH 漏出抑制模型进行

了体外的神经保护活性评价。LDH 漏出率测定结果显示:冰片(1)、冰片基甲酸(3)、2-冰片基乙醇(4)、2-冰片基乙酸(5)、2-羧甲基异冰片(6)、2,6-二异丙基苯甲酸(8)、2-(2',6'-二异丙基)苯乙醇(9)、2-(2',6'-二异丙基苯基)乙酸(10)在测试的浓度  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7}$  mol/L 范围内都显示对神经元细胞的保护作用,然而冰片胺(2)、薄荷酸(7)则表现为神经损伤作用,其中 2,6-二异丙基苯甲酸(8)在测试的浓度范围内都显示较强的神经保护作用(表 3)。

## 3 讨论

生理情况下,中枢神经系统中的谷氨酸大多位于突触前的囊泡中,在突触间隙的含量维持在微摩尔水平,脑缺血发生时,细胞外的谷氨酸浓度会显著

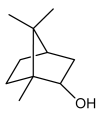
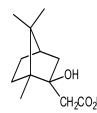
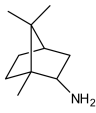
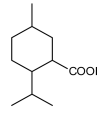
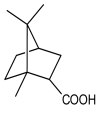
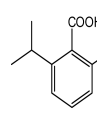
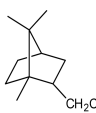
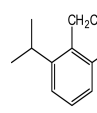
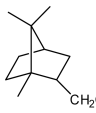
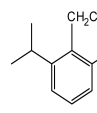
表 2 部分目标化合物的性状、收率及分析数据

Table 2 Property, yield and analytical data of part of the target compounds

化合物	性状	得量(g)	收率(%)	MS(ESI) [M+H] <sup>+</sup> m/z	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
3	淡黄色晶体	1.17	62	183.11	δ: 1.04 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.22~1.48 (m, 5H), 1.58~1.63 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.91~2.05 (m, 1H), 2.33~2.46 (m, 2H), 11.92 (s, 1H)
4	淡黄色液体	0.63	32	183.16	δ: 0.60~0.82 (m, 4H), 0.82~1.08 (m, 7H), 1.12~1.22 (m, 1H), 1.22~1.40 (m, 1H), 1.56~1.70 (m, 2H), 2.10~2.25 (m, 2H), 2.86~2.97 (m, 1H), 3.10~3.30 (m, 3H)
5	白色固体	0.45	58	197.12	δ: 0.80~1.02 (m, 9H), 1.30~1.55 (m, 2H), 1.70~2.20 (m, 7H), 2.30~2.40 (m, 1H)
6	淡黄色粘稠液体	3.28	82	213.13	δ: 0.87 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96~1.07 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.25~1.36 (m, 1H), 1.41~1.49 (m, 1H), 1.52 (d, 1H, J=13.5 Hz), 1.68~1.77 (m, 2H), 2.14 (d, 1H, J=3.62 Hz), 2.57 (d, 1H, J=15.5 Hz), 2.63 (d, 1H, J=15.5 Hz)
8	白色晶体	0.54	54	207.09	δ: 1.28 (s, 12H), 2.82~2.96 (m, 2H), 7.16~7.20 (s, 2H), 7.26~7.36 (m, 1H), 13.05 (s, 1H)
9	白色棉状固体	0.53	28	207.19	δ: 1.22 (d, 12H, J=6.90 Hz), 2.82~2.96 (m, 2H), 3.66~3.74 (m, 2H), 3.89~3.95 (m, 2H), 7.09~7.21 (m, 2H), 7.26~7.36 (m, 1H)
10	白色固体	0.42	48	221.17	δ: 0.95~1.20 (m, 12H), 2.85~3.15 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 7.10~7.30 (m, 3H)

表3 各种化合物作用下 LDH 漏出抑制率

Table 3 The inhibiting ratios of LDH leaking induced by the testing drugs

化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)	化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)
1 	$1 \times 10^{-7}$	35.00±2.10	6 	$1 \times 10^{-7}$	22.00±1.70
	$1 \times 10^{-6}$	9.74±0.44		$1 \times 10^{-6}$	8.59±0.56
	$1 \times 10^{-5}$	-1.92±0.27		$1 \times 10^{-5}$	3.17±0.18
2 	$1 \times 10^{-7}$	-10.10±1.30	7 	$1 \times 10^{-7}$	-16.70±1.40
	$1 \times 10^{-6}$	-23.90±1.90		$1 \times 10^{-6}$	-25.10±2.30
	$1 \times 10^{-5}$	3.51±0.53		$1 \times 10^{-5}$	5.51±0.89
3 	$1 \times 10^{-7}$	26.70±1.90	8 	$1 \times 10^{-7}$	25.40±3.40
	$1 \times 10^{-6}$	15.20±0.81		$1 \times 10^{-6}$	31.30±2.60
	$1 \times 10^{-5}$	2.33±0.37		$1 \times 10^{-5}$	36.80±4.60
4 	$1 \times 10^{-7}$	3.02±0.27	9 	$1 \times 10^{-7}$	13.20±0.73
	$1 \times 10^{-6}$	15.60±1.10		$1 \times 10^{-6}$	15.00±0.67
	$1 \times 10^{-5}$	25.80±3.20		$1 \times 10^{-5}$	27.90±1.10
5 	$1 \times 10^{-7}$	14.90±0.22	10 	$1 \times 10^{-7}$	4.72±0.33
	$1 \times 10^{-6}$	7.61±0.34		$1 \times 10^{-6}$	27.10±1.70
	$1 \times 10^{-5}$	5.85±0.67		$1 \times 10^{-5}$	17.50±1.90

升高。研究表明,高浓度的谷氨酸(100~500  $\mu\text{mol/L}$ )可引起神经细胞的死亡<sup>[12]</sup>。

现代药理学研究发现,冰片具有抗脑缺血的神经营养作用<sup>[2-4]</sup>。本研究用谷氨酸诱导的神经细胞损伤模型,以 LDH 的释放抑制率为指标,对冰片及其类似物的体外神经保护作用进行了评价,以期发现具有更好神经保护作用的化合物。

结果表明冰片(1)在低浓度( $1 \times 10^{-7}$  mol/L)具有较强的神经保护作用,LDH 释放抑制率高达 35.0%(表 3)。但冰片的神经保护作用随浓度增加逐渐减弱,当浓度是  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 时,冰片不再具有神经保护作用。冰片的其他类似物,冰片基甲酸(3)、2-冰片基乙酸(5)、2-羧甲基异冰片(6),在测试的浓度区间内( $1 \times 10^{-7}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  mol/L)都显示一定的神经保护作用,并和冰片一样随浓度增加神经保护作用变弱,且这些化合物的最大神经保护作用都比冰片弱。2-冰片基乙醇(4)也显示一定的神经保护作用,其保护作用随浓度增加而增强,在测试的最高浓度  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 时 LDH 释放抑制率达到 25.8%。冰片的羟基被氨基取代生成的冰片胺(2)在测试的浓度范围内都显示神经损伤作用。这些结果表明,冰片的羟基和羧基(3)、羟乙基(4)、羧甲基(5)具有一定的官能团相容性,但不能置换为氨基(2)。基于冰片的羟基可被较多基团替代,本研究推测冰片桥环的异丙基结构可能是其发挥活性必须的,因此本研究测试了有异丙基结构的薄荷酸(7)、2,6-二异丙基甲酸(8)及其类似物(9、10)。测试结果表

明,薄荷酸(7)在测试浓度( $1 \times 10^{-7}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  mol/L)范围内具有神经毒性。与此相反,2,6-二异丙基甲酸(8)及其类似物(9、10)都显示良好的神经保护作用,尤其是化合物(8)在测试的浓度范围之内都显示出较高的神经保护作用,且其在  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 剂量时的保护作用(36.8%)比冰片的最高保护作用(35.0%)还高,且化合物(8)的保护作用和剂量之间是呈正相关的,而冰片(1)的效应和作用之间是呈负相关的,因此,化合物(8)和冰片(1)相比具有更高的使用安全性。从结果中还发现,具有相同羟乙基基团的化合物(4、9)都具有良好且大小相似的保护作用,且剂量和效应之间都是正相关的。综合上述分析认为具有良好神经保护作用且剂量和效应呈正相关的化合物(8、4、9)是今后进一步研究的良好先导化合物。

研究发现冰片是  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 的正向调节剂并可直接活化 GABA<sub>A</sub> 受体<sup>[13-14]</sup>。GABA<sub>A</sub> 受体活化可抑制脑缺血引起的神经元过度兴奋从而起神经保护作用。本研究发现冰片在低浓度下( $1 \times 10^{-7}$  mol/L)具有较强的神经保护作用,这可能和激活 GABA<sub>A</sub> 受体有关。程新萍等<sup>[15]</sup>发现在较高的浓度下( $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L)冰片对 GABA<sub>A</sub> 受体具有抑制作用,这和本研究中发现的冰片在较高浓度下失去神经保护作用相对应。异丙酚(2,6-二异丙基苯酚)也是一种作用于 GABA<sub>A</sub> 受体的麻醉剂,和冰片一样可增强 GABA 的作用并可直接活化 GABA<sub>A</sub> 受体<sup>[16-17]</sup>。有研究表明,冰片、薄

荷、异丙酚等化合物在GABA<sub>A</sub>受体上有相同的作用位点<sup>[13]</sup>,化合物(8、9、10)的神经保护作用或许也可能通过GABA<sub>A</sub>受体起作用。但冰片(1)的神经保护作用与浓度是负相关的,而化合物(8、9、10)的神经保护作用与浓度基本上是呈正相关的,这又提示它们和受体之间可能存在不同的作用方式或不同的作用靶点,具体作用机制有待深入研究。

[参考文献]

- [1] 施文甫,罗安民. 冰片在脑部疾病中的应用[J]. 贵阳中医学院学报,2010,32(1):59-61
- [2] 何晓静,肇丽梅,刘玉兰. 冰片注射液对小鼠实验性脑缺血的保护作用[J]. 华西药理学杂志,2005,20(4):323-325
- [3] 何晓静,秦献辉,刘玉兰. 冰片注射液的抗脑缺血作用[J]. 山西医药杂志,2007,36(9):794-795
- [4] 段石顽,王欣,王斌,等. 麝香、冰片、薯蓣皂苷及栀子苷对大鼠脑缺血再灌注急性期炎症损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):43-46
- [5] Kiyooka SI, Takeshima K, Yamamoto H, et al. Asymmetric hydrogenolysis of hydrazones. Synthesis of optical active  $\alpha$ -alanine[J]. Bull Chem Soc Japan, 1976, 49(7):1897-1900
- [6] Walling C, Buckler SA. The hydroperoxides from l-bornyl chloride obtained by oxidation of the Grignard reagent[J]. J Am Chem Soc, 1955, 77(20):6039-6041
- [7] 欧阳歆,张祚,欧年发. 高立体选择性地合成薄荷基溴和新薄荷基溴[J]. 有机化学,2010,30(1):120-123
- [8] 田红玉,丁瑞,孙宝国,等. 凉味剂N-乙基-L-薄荷基甲酰胺的合成[J]. 精细化工,2008,2(11):1097-1113
- [9] Flautt TJ, Erman WF. The nuclear magnetic resonance spectra and stereochemistry of substituted bornanes[J]. J Am Chem Soc, 1963, 85(20):3212-3218
- [10] Jikihara T, Shirasaka T, Suzuki K, et al. Carboxamide and urea derivatives having ACTA-inhibiting activity: Europe, EU0591830A1[P]. 1994-04-13
- [11] Lee H, Tsenw HT, Picard JA, et al. N-Acyl sulfamic acid esters (or thioesters), N-acyl sulfonamides, and N-sulfonyl carbamic acid esters (or thioesters) as hypercholesterolemic agents: World, WO 9426702[P]. 1994-11-24
- [12] Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death[J]. Annu Rev Neurosci, 1990, 13:171-182
- [13] Watt EE, Betts BA, Kotev FO, et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA<sub>A</sub> receptor with the intravenous agent, propofol[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 590(1-3):120-126
- [14] Granger RE, Campbell EL, Johnston GA. (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptors[J]. Biochem Pharm, 2005, 69(7):1101-1111
- [15] 程新萍,孙灏,余晓华. 合成冰片对大鼠海马神经元GABA<sub>A</sub>受体介导电流的作用[J]. 中国药理学与临床, 2006, 22(5):14-16
- [16] Krasowski MD, Jenkins A, Flood P, et al. General anesthetic potencies of a series of propofol analogs correlate with potency for potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) current at the GABA<sub>A</sub> receptor but not with lipid solubility[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297(1):338-351
- [17] Krasowski MD, Hong X, Hopfinger AJ, et al. 4D-QSAR analysis of a set of propofol analogues: mapping binding sites for an anesthetic phenol on the GABA<sub>A</sub> receptor[J]. J Med Chem, 2002, 45(15):3210-3221

[收稿日期] 2012-12-14

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。