

## nNOS PDZ 抑制剂的合成及其神经保护作用研究

马玉<sup>1</sup>, 丁屹<sup>1</sup>, 蔡鋈鑫<sup>1</sup>, 常磊<sup>1</sup>, 朱东亚<sup>1,2</sup>, 厉廷有<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>南京医科大学心血管转化医学协同创新中心, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:合成 nNOS PDZ 抑制剂并评价其神经保护作用。方法:根据 nNOS PDZ 结构域配体结合部位多碱性中心的结构特点设计并合成多系列双羧酸及其酯类化合物,用谷氨酸诱导的神经元细胞乳酸脱氢酶释放模型评价化合物的神经保护作用。结果:合成了 18 个目标化合物,其中 *N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(1)、*N*-(2-羧基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(2)、*N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-L-缬氨酸甲酯(7)、*N*-(2-羧基乙酰基)-L-缬氨酸(9)显示较强的神经保护作用。结论:nNOS PDZ 结构域抑制剂具有神经保护作用。

**[关键词]** 神经保护剂;nNOS;乳酸脱氢酶

**[中图分类号]** R918

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)03-314-09

doi:10.7655/NYDXBNS20140308

## Synthesis and neuroprotective effect of nNOS PDZ structural domain inhibitors

Ma Yu<sup>1</sup>, Ding Yi<sup>1</sup>, Cai Yunxin<sup>1</sup>, Chang Lei<sup>1</sup>, Zhu Dongya<sup>1,2</sup>, Li Tingyou<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disease Translational Medicine, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Objective: To synthesize nNOS PDZ structural domain inhibitors and evaluate their neuroprotective effects. **Methods:** Multiple-series of dicarboxylic acids and their ester compounds were designed and synthesized based on the structure characteristic of multi-basic groups of the nNOS PDZ ligand binding domain. The neuroprotective effects of the compounds were evaluated by glutamate-induced lactate dehydrogenase (LDH) release model of neurons. **Results:** Eighteen target compounds were synthesized including *N*-(2-methoxycarbonylacetyl)-D-valine methyl ester(1), *N*-(2-carboxylacetyl)-D-valine methyl ester(2), *N*-(2-methoxycarbonylacetyl)-L-valine methyl ester (7), *N*-(2-carboxylacetyl)-L-valine (9) showed potent neuroprotective effect. **Conclusion:** nNOS PDZ structural domain inhibitors are neuroprotective.

**[Key words]** neuroprotective reagents;nNOS;lactate dehydrogenase

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03):314-322]

神经保护剂是缺血性脑卒中治疗药物研制的一个热点。目前,针对脑梗死级联反应不同环节开发了众多保护试剂,除自由基清除剂依达拉奉外,都是动物有效、临床无效或效果很差,或因严重不良反应而不能应用于临床。因此,新型神经保护剂的开发和筛选是目前研究的重点<sup>[1-2]</sup>。

脑缺血发生时谷氨酸大量释放。大量释放的谷氨酸激活 *N*-甲基天冬氨酸受体 (*N*-methyl-D-aspartate receptor, NR),从 NR 内流的钙离子激活锚定在 NR 附近的神经元一氧化氮合酶 (neuronal nitric

oxide synthase, nNOS), 从而生成大量一氧化氮 (nitric oxide, NO), 继而引发脑缺血瀑布,引起脑缺血损伤。nNOS 过度激活之后大量生成的 NO, 在缺血性脑卒中起重要作用<sup>[3]</sup>。因此,抑制 nNOS 的过度激活或阻断 nNOS 和下游信号分子之间的信号传递在病理条件下具有神经保护作用<sup>[4]</sup>。研究表明, nNOS 通过其 PDZ 结构域和 nNOS 相关蛋白 (NOS1AP)、神经肌肉接头蛋白 (Syntrophin)、6-磷酸果糖激酶 (PFK) 等蛋白结合<sup>[5]</sup>, 其中 NOS1AP 是一个和心源性猝死<sup>[6]</sup>、糖尿病并发症<sup>[7]</sup>、精神分裂症有关的蛋白<sup>[8]</sup>。为研究这些结合是否和 NO 的神经损伤信号传递有关, 针对 nNOS PDZ 结构域配体结合口袋多碱性基团的特点, 本研究设计并合成了多系列二羧酸及其酯的化合物用于抑制 nNOS PDZ 和其他蛋白的相互

**[基金项目]** 南京医科大学心血管转化医学协同创新中心项目  
\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: litingyou@aliyun.com

作用,并用谷氨酸刺激的神经元细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)释放模型评价这些化合物对神经元细胞的保护作用<sup>[9]</sup>。研究表明,合成的多个化合物具有良好的神经保护作用。

## 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,四甲基硅烷为内标;质谱由美国Agilent-6410 LC/MS质谱仪测定;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。氨基酸购自吉尔生化,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 化合物合成

##### 1.2.1.1 *N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(1)的合成

-15℃下将1.50 g(9 mmol)D-缬氨酸甲酯盐酸盐加入到35 ml二氯甲烷中,滴加2.03 ml(18.45 mmol)*N*-甲基吗啉,滴完后搅拌5 min,再滴加1.02 ml(9.45 mmol)丙二酸单甲酯酰氯,搅拌30 min,然后30℃继续搅拌22 h。停止反应,将溶剂蒸干,加水8 ml,乙酸乙酯50 ml×4次萃取,10%柠檬酸25 ml×2次洗涤,饱和氯化钠洗涤,之后5%碳酸氢钠25 ml×2次洗涤,再用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干,浓缩液呈黄色。用流动相(乙酸乙酯:石油醚=1:2,体积比)进行柱层析,最终得到黄色液体1.03 g,产率49.5%。 $R_f = 0.5$ (乙酸乙酯:石油醚=1:2,碘显色)。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm):0.96(t,6H, $J = 6.48$  Hz),2.20(s,1H),3.37(s,2H),3.75(s,3H),3.77(s,3H),4.56(s,1H),7.52(s,1H),MS ESI  $m/z$  232(M+H<sup>+</sup>)。

##### 1.2.1.2 *N*-(2-羧基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(2)

0℃下将*N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(1) 1.92 g(8.3 mmol)溶于9 ml甲醇中,然后用恒压滴液漏斗滴加NaOH(1 mol/L)9.15 ml,0℃继续搅拌15 min后,30℃搅拌6 h。原料反应完全后,停止反应,旋蒸除去甲醇,剩余的液体用浓盐酸调pH值至2~3,乙酸乙酯50 ml×4次萃取,饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。残余物用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸=15:5:1,体积比),得到1.13 g黄色液体,产率62.7%。 $R_f = 0.45$ (乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸=15:5:1,体积比)。<sup>1</sup>H NMR(500 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm):0.94(d,3H, $J = 6.90$  Hz),0.96(d,3H, $J = 6.85$

Hz),2.22(hept,1H, $J = 1.80$  Hz),3.42(s,2H),3.77(s,3H),4.58~4.61(q,1H),7.11(s,1H),MS ESI  $m/z$  218(M+H<sup>+</sup>)。

##### 1.2.1.3 *N*-(2-羧基乙酰基)-D-缬氨酸(3)

0℃下将*N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-D-缬氨酸甲酯(2) 1.16 g(5 mmol)溶于11 ml甲醇中,然后用恒压滴液漏斗滴加NaOH(1 mol/L)11 ml,0℃继续搅拌15 min后,30℃搅拌6 h。薄层检测反应完全后,停止反应,旋蒸除去甲醇,剩余的液体用浓盐酸调pH值至2~3,乙酸乙酯50 ml×4次萃取,合并萃取液,依次用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱进行纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸=10:10:3,体积比),得到0.58 g黄色固体,产率57.1%。 $R_f = 0.35$ (乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸=10:10:3,体积比)。<sup>1</sup>H NMR(500 MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm):0.88(d,3H, $J = 3.20$  Hz),0.89(d,3H, $J = 3.25$  Hz),2.0(hept,1H, $J = 6.80$  Hz),3.28~3.31(m,2H),4.16~4.19(m,1H),8.18(d,1H, $J = 8.6$  Hz),12.50(s,2H),MS ESI  $m/z$  204(M+H<sup>+</sup>)。

##### 1.2.1.4 *N*-(3-甲氧羰基丙酰基)-D-缬氨酸甲酯(4)

-15℃下将D-缬氨酸甲酯盐酸盐2.01 g(12 mmol)溶于40 ml二氯甲烷中,然后加入三乙胺3.42 ml(24.6 mmol),搅拌10 min后,再加入丁二酸单甲酯酰氯1.55 ml(12.6 mmol),-15℃继续搅拌20 min,然后25℃搅拌12 h。停止反应,将溶剂蒸干,加水20 ml,用乙酸乙酯60 ml×4次萃取,合并萃取液,依次用10%柠檬酸20 ml×2次,5%碳酸氢钠20 ml×2次,饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥。过滤,滤液蒸干。残余物用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚=2:3,体积比),得到2.03 g黄色固体,产率69.0%。 $R_f = 0.65$ (乙酸乙酯:石油醚=2:3,体积比)。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm):0.91(d,3H, $J = 6.84$  Hz),0.94(d,3H, $J = 6.81$  Hz),2.09~2.21(m,1H),2.53~2.59(m,2H),2.61~2.73(m,2H),3.69(s,3H),3.74(s,3H),4.53~4.58(q,1H),6.13~6.16(d,1H, $J = 8.22$  Hz),MS ESI  $m/z$  246(M+H<sup>+</sup>)。

##### 1.2.1.5 *N*-(3-羧基丙酰基)-D-缬氨酸甲酯(5)

冰水浴下将D-缬氨酸甲酯盐酸盐1.01 g(6 mmol)溶于50 ml二氯甲烷中,滴加三乙胺1 ml(7.2 mmol),滴完后搅拌10 min,然后缓慢滴加溶于30 ml二氯甲烷的4-二甲氨基吡啶0.88 g(7.2 mmol),最后加入丁二酸酐0.72 g(7.2 mmol),冰水浴下继续搅

拌 10 min, 然后 25℃ 搅拌 20 h。蒸掉部分二氯甲烷, 加入 10% 碳酸氢钠溶液 50 ml, 水层用盐酸调 pH 至 3, 再用乙酸乙酯 70 ml × 3 次萃取, 饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。残余物用硅胶柱层析纯化(流动相: 乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 10:10:1, 体积比), 得到黄色液体 1.01 g, 产率 72.8%。R<sub>f</sub> = 0.55(乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 10:10:1, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.92 (t, 6H, J = 7.05 Hz), 2.12~2.19 (m, 1H), 2.56~2.60 (t, 2H, J = 6.45 Hz), 2.69~2.75 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.54~4.59 (m, 1H), 6.36 (s, 1H), MS ESI m/z 232(M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.6 *N*-(3-羧基丙酰基)-D-缬氨酸 (6)

称取 2.34 g (20 mmol) 丁二酸酐和 2.02 g (20 mmol) D-缬氨酸于 50 ml 茄形瓶中, 加入 20 ml 冰醋酸溶解, 加热至 55℃ 搅拌 6 h。停止反应, 将溶剂蒸干, 加 20 ml 水, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取, 饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。残余物加入乙酸乙酯 50 ml, 加热使全溶, 趁热过滤, 滤液自然冷却, 析出固体, 重复此操作 2 次, 最后得到白色固体 2.66 g, 产率 61.2%。R<sub>f</sub> = 0.75(三氯甲烷: 甲醇: 冰醋酸 = 90:8:2, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 0.86 (d, 3H, J = 1.17 Hz), 0.88 (d, 3H, J = 1.17 Hz), 2.02 (hept, 1H, J = 6.18 Hz), 2.35~2.47 (m, 4H), 4.12~4.17 (q, 1H), 7.96~7.99 (d, 1H, J = 8.67 Hz), 12.25 (s, 2H), MS ESI m/z 218 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.7 *N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-L-缬氨酸甲酯 (7)

-15℃ 下将 1.31 g (10 mmol) L-缬氨酸甲酯加入到 35 ml 二氯甲烷中溶解, 滴加 1.15 ml (10.5 ml) *N*-甲基吗啉, 滴完后搅拌 5 min, 再滴加 1.15 ml 丙二酸单甲酯酰氯, 搅拌 30 min, 然后 30℃ 继续搅拌 22 h。停止反应, 将溶剂蒸干, 加水 8 ml, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取。合并提取液, 用 10% 柠檬酸 25 ml × 2 次洗涤, 饱和氯化钠洗涤, 之后 5% 碳酸氢钠 25 ml × 2 次洗涤, 再用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液蒸干, 浓缩液呈黄色。用流动相(乙酸乙酯: 石油醚 = 1:2, 体积比)进行硅胶柱层析, 得到黄色液体 0.87 g, 产率 37.7%。R<sub>f</sub> = 0.5 (乙酸乙酯: 石油醚 = 1:2, 体积比, 碘显色)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.94 (d, 3H, J = 6.90 Hz), 0.97 (d, 3H, J = 6.90 Hz), 2.21 (hept, 1H, J = 4.95 Hz), 3.38 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.55~4.57 (q,

1H), 7.53 (d, 1H, J = 6.85 Hz), MS ESI m/z 232 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.8 *N*-(2-羧基乙酰基)-L-缬氨酸甲酯 (8)

35℃ 下将 *N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-L-缬氨酸甲酯 (7) 2.32 g (10 mmol) 溶于 11 ml 甲醇中, 然后用恒压滴液漏斗滴加 NaOH (1 mol/L) 11 ml, 35℃ 继续搅拌 6 h。停止反应, 旋蒸除去甲醇, 剩余液体用浓盐酸调 pH 值至 2~3, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取。合并提取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。用流动相(乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 20:20:1, 体积比)进行硅胶柱层析, 得 1.22 g 黄色液体, 产率 56.2%。R<sub>f</sub> = 0.10 (乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 20:20:1, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.94 (d, 3H, J = 6.95 Hz), 0.97 (d, 3H, J = 6.85 Hz), 2.21 (hept, 1H, J = 5.30 Hz), 3.44 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.57~4.59 (q, 1H), 7.48 (d, 1H, J = 8.20 Hz), 9.09 (s, 1H), MS ESI m/z 218 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.9 *N*-(2-羧基乙酰基)-L-缬氨酸 (9)

35℃ 下将 *N*-(2-甲氧羰基乙酰基)-L-缬氨酸甲酯 (7) 1.16 g (5 mmol) 溶于 11 ml 甲醇中, 然后用恒压滴液漏斗滴加 NaOH (1 mol/L) 11 ml, 35℃ 搅拌 6 h。停止反应, 旋蒸除去甲醇, 剩余液体用浓盐酸调 pH 值至 2~3, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取。合并提取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。用流动相(乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 10:10:1, 体积比)进行柱层析, 得到 0.66 g 黄色液体, 产率 65.0%。R<sub>f</sub> = 0.35 (乙酸乙酯: 石油醚: 冰醋酸 = 10:10:1, 体积比, 碘显色)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 0.87 (d, 3H, J = 1.86 Hz), 0.89 (d, 3H, J = 1.83 Hz), 2.06 (hept, 1H, J = 6.81 Hz), 3.16~3.32 (m, 2H), 4.15~4.20 (q, 1H), 8.19 (d, 1H, J = 8.58 Hz), 12.50 (s, 2H), MS ESI m/z 204 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.10 *N*-(3-甲氧羰基丙酰基)-L-缬氨酸甲酯 (10)

-15℃ 下将 4.04 g (30.8 mmol) L-缬氨酸甲酯溶于 40 ml 二氯甲烷中, 搅拌 10 min 后, 滴加 3.73 ml (33.88 mmol) *N*-甲基吗啉, 然后滴加 4.17 ml (30.8 mmol) 丁二酸单甲酯酰氯, -15℃ 下继续搅拌 30 min, 然后升温至 30℃ 继续反应 15 h。停止反应, 将溶剂蒸干, 加水 20 ml, 乙酸乙酯 60 ml × 4 次萃取。合并提取液, 10% 柠檬酸 20 ml × 2 次洗涤, 5% 碳酸氢钠 20 ml × 2 次洗涤, 饱和氯化钠洗涤。无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干, 用流动相(乙酸乙酯: 石油醚 = 2:3, 体积比)进行硅胶柱层析, 得到黄色液体 5.89 g, 产

率 78.0%。R<sub>f</sub> = 0.75(乙酸乙酯:石油醚 = 2:3, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ (ppm): 0.91 (d, 3H, J = 6.93 Hz), 0.94 (d, 6H, J = 6.93 Hz), 2.15 (hept, 1H, J = 4.95 Hz), 2.48~2.61 (m, 2H), 2.63~2.73 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.53~4.58 (q, 1H), 6.17 (d, 1H, J = 7.92 Hz), MS ESI m/z 232 (M+H<sup>+</sup>), MS ESI m/z 246 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.11 N-(3-羧基丙酰基)-L-缬氨酸甲酯(11)

35℃下将 N-(3-甲氧羰基丙酰基)-L-缬氨酸甲酯(10) 2.45 g (10 mmol) 溶于 11 ml 甲醇中, 然后用恒压滴液漏斗滴加 NaOH (1 mol/L) 11 ml, 35℃搅拌 8 h。停止反应, 旋蒸除去甲醇, 剩余的液体用浓盐酸调 pH 值至 2~3, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取。合并提取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液蒸干。用流动相 (乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1, 体积比) 进行硅胶柱层析, 得 1.67 g 黄色液体, 产率 72.2%。R<sub>f</sub> = 0.10(乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ (ppm): 0.91 (d, 3H, J = 6.90 Hz), 0.93 (d, 3H, J = 6.85 Hz), 2.16 (hept, 1H, J = 1.45 Hz), 2.54~2.61 (m, 2H), 2.66~2.78 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 4.55~4.58 (q, 1H), 6.42 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), MS ESI m/z 232 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.12 N-(3-羧基丙酰基)-L-缬氨酸(12)

称取 2.34 g (20 mmol) 丁二酸酐和 2.02 g (20 mmol) L-缬氨酸于 50 ml 茄形瓶中, 然后加入 20 ml 冰醋酸并加热至 55℃搅拌 6 h。停止反应, 将溶剂蒸干, 加 20 ml 水, 乙酸乙酯 50 ml × 4 次萃取。合并提取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。再加入乙酸乙酯 50 ml, 加热至回流, 趁热过滤, 滤液自然冷却, 析出固体。重复此操作 2 次, 最后得到微黄色固体 2.53 g, 产率 58.9%。R<sub>f</sub> = 0.75 (三氯甲烷:甲醇:冰醋酸 = 90:8:2, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ (ppm): 0.90~0.94 (m, 6H), 2.01 (hex, 1H, J = 6.80 Hz), 2.36~2.49 (m, 4H), 4.13~4.16 (q, 1H), 7.95 (d, 1H, J = 8.60 Hz), 12.24 (s, 2H), MS ESI m/z 218 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.13 2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯

35℃下将钠 5.52 g (0.24 mol) 加入到 150 ml 乙醇中, 搅拌溶解后, 滴加丙二酸二乙酯 32.0 g (0.2 mol), 滴完后 35℃继续搅拌 20 min, 然后再滴加 4-溴丁酸乙酯 46.8 g (0.24 mol), 滴完后再加入碘化钾 0.83 g (5 mmol), 加热至 80℃回流 24 h。停止反应, 将溶剂蒸干。加水 40 ml, 用乙酸乙酯 80 ml × 4 次

萃取, 饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液蒸干, 得黄色液体。减压蒸馏, 收集 700 Pa 大气压下 144~146℃馏分, 得到无色液体 40.3 g, 产率 73.5%。R<sub>f</sub> = 0.70(乙酸乙酯:石油醚 = 1:5, 体积比, 碘显色)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ (ppm): 1.24~1.28 (m, 9H), 1.66~1.70 (m, 2H), 1.91~1.95 (q, 2H), 2.33 (t, 2H, J = 7.40 Hz), 3.32~3.36 (m, 1H), 4.11~4.15 (m, 2H), 4.17~4.22 (m, 4H)。

#### 1.2.1.14 2-异丙基-2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯

35℃下将 1.51 g (63 mmol) 氯化钠加入到 80 ml 四氢呋喃中, 搅拌下滴加 16.4 g (60 mmol) 2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯, 滴完后搅拌 20 min, 然后再滴加 2-溴异丙烷 6.80 ml (72 mmol), 再加入碘化钾 1.50 g (9 mmol), 然后加热到 70℃回流 60 h。停止反应, 将溶剂蒸干。加水 40 ml, 乙酸乙酯 100 ml × 4 次萃取, 合并提取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 1:5, 体积比), 得到微红色液体 4.86 g, 产率 25.6%。R<sub>f</sub> = 0.75(乙酸乙酯:石油醚 = 1:5, 体积比, 碘显色)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ (ppm): 0.93~0.97 (m, 6H), 1.22~1.27 (m, 9H), 1.53~1.59 (m, 2H), 1.87~1.90 (m, 2H), 2.26~2.29 (m, 4H), 2.31~2.34 (m, 2H), 4.08~4.20 (m, 6H)。

#### 1.2.1.15 2-异丙基己二酸(13)

将 1.90 g (6 mmol) 2-异丙基-2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯溶于 20 ml 甲醇中, 然后加入氢氧化钠 (4 mol/L) 30 ml, 加热至 85℃回流 10 h, 然后减压蒸去甲醇, 加入浓盐酸 30 ml, 加热到 120℃回流 12 h。乙酸乙酯 60 ml × 4 次萃取, 合并萃取液, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1, 体积比), 得 0.57 g 微黄色固体, 产率 50.5%。R<sub>f</sub> = 0.75 (乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1, 体积比)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)δ (ppm): 0.86~0.94 (m, 6H), 1.38~1.48 (m, 4H), 1.69~1.80 (m, 1H), 1.94~1.99 (m, 1H), 2.14~2.20 (m, 2H), 12.01 (s, 2H), MS ESI m/z 189 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 1.2.1.16 2-异丙基己二酸二甲酯(14)

-5℃下将 3.40 g (18.1 mmol) 2-异丙基己二酸溶于 40 ml 甲醇中, 滴加 2.76 ml (38.01 mmol) 二氯亚砷, 滴完后-5℃下继续反应 2 h, 升温到 25℃继续反应 1 h, 然后加热到 70℃回流 6 h。停止反应, 将溶剂蒸干, 加入乙酸乙酯 80 ml 溶解, 饱和氯化钠洗涤,

无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比),得微黄色液体 2.42 g,产率 61.8%。 $R_f = 0.70$ (流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  (ppm): 0.90 (d, 3H,  $J = 6.70$  Hz), 0.93 (d, 3H,  $J = 6.75$  Hz), 1.51~1.65(m, 4H), 1.85 (hept, 1H,  $J = 6.85$  Hz), 2.12~2.16(m, 1H), 2.31(t, 2H,  $J = 7.05$  Hz), 3.66(s, 3H), 3.67(s, 3H), MS ESI  $m/z$  217( $\text{M} + \text{H}^+$ )。

#### 1.2.1.17 5-异丙基己二酸单甲酯(15)

35℃下将 2-异丙基己二酸二甲酯 1.42 g(6.57 mmol)溶于 7 ml 甲醇中,然后用恒压滴液漏斗滴加 NaOH(1 mol/L)6.57 ml,35℃搅拌 8 h。停止反应,旋蒸除去甲醇,剩余的液体用浓盐酸调 pH 值至 2~3,乙酸乙酯 50 ml  $\times$  4 次萃取。合并萃取液,用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 3:1,体积比),得淡黄色液体 1.01 g,产率 76.0%。 $R_f = 0.75$ (乙酸乙酯:石油醚 = 3:1,体积比)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ (ppm): 0.84 (d, 3H,  $J = 6.75$  Hz), 0.88 (d, 3H,  $J = 6.80$  Hz), 1.37~1.44(m, 2H), 1.45~1.51(m, 2H), 1.76(hept, 1H,  $J = 6.90$  Hz), 2.09~2.13(m, 1H), 2.17~2.23(m, 2H), 3.60(s, 3H), 11.98(s, 1H), MS ESI  $m/z$  203( $\text{M} + \text{H}^+$ )。

#### 1.2.1.18 2-异丙基-2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯

35℃下将 1.51 g(63 mmol)氢化钠加入到 80 ml 四氢呋喃中,搅拌下滴加 16.44 g(60 mmol)2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯,滴完后搅拌 20 min,然后再滴加 2-溴异丁烷 6.88 ml(63 mmol),再加入碘化钾 1.0 g(6 mmol),然后加热到 70℃回流 60 h。停止反应,将溶剂蒸干。加水 40 ml,乙酸乙酯 100 ml  $\times$  4 次萃取。合并萃取液,用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比),得到微粉红色液体 9.22 g,产率 46.5%。 $R_f = 0.75$ (乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比,碘显色)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  (ppm): 0.88 (d, 6H,  $J = 6.60$  Hz), 1.23~1.26(m, 9H), 1.46~1.53(m, 2H), 1.61~1.66(m, 1H), 1.90(d, 2H,  $J = 6.35$  Hz), 1.92~1.95(m, 2H), 2.30(t, 2H,  $J = 7.30$  Hz), 4.10~4.19(m, 6H)。

#### 1.2.1.19 2-异丁基己二酸(16)

将 1.98 g(6 mmol)2-异丙基-2-(3-乙氧羰基丙基)丙二酸二乙酯溶于 20 ml 甲醇中,然后加入氢氧

化钠(4 mol/L)30 ml,加热至 85℃回流 10 h,然后将溶剂甲醇减压蒸干,再加入浓盐酸 30 ml,加热到 120℃回流 12 h。乙酸乙酯 60 ml  $\times$  4 次萃取,提取液用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1,体积比),得到 1.13 g 微黄色固体,产率 93.1%。 $R_f = 0.45$ (乙酸乙酯:石油醚:冰醋酸 = 20:20:1,体积比)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$  (ppm): 0.85 (d, 3H,  $J = 6.10$  Hz), 0.86 (d, 3H,  $J = 6.55$  Hz), 1.17(hex, 1H,  $J = 4.85$  Hz), 1.37~1.54(m, 6H), 2.16~2.30(m, 2H), 2.25~2.29(m, 1H), 11.99(s, 2H), MS ESI  $m/z$  203( $\text{M} + \text{H}^+$ )。

#### 1.2.1.20 2-异丁基己二酸二甲酯(17)

-5℃下将 2.80 g(13.8 mmol)2-异丁基己二酸溶于 40 ml 甲醇中,然后滴加 2.11 ml(29.1 mmol)二氯亚砷,滴完后-5℃下反应 2 h,升温到 25℃继续反应 1 h,然后加热到 70℃回流 6 h。停止反应,将溶剂蒸干,加入乙酸乙酯 80 ml 溶解,饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。用硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比),得微黄色液体 2.60 g,产率 81.6%。 $R_f = 0.75$ (乙酸乙酯:石油醚 = 1:5,体积比,碘显色)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  (ppm): 0.87 (d, 3H,  $J = 6.50$  Hz), 0.89(d, 3H,  $J = 6.50$  Hz), 1.24(hept, 1H,  $J = 5.35$  Hz), 1.44~1.53(m, 2H), 1.54~1.62(m, 4H), 2.30(t, 2H,  $J = 7.3$ ), 2.42~2.48(m, 1H), 3.67(s, 6H), MS ESI  $m/z$  231( $\text{M} + \text{H}^+$ )。

#### 1.2.1.21 5-异丁基己二酸单甲酯(18)

35℃下将 2-异丁基己二酸二乙酯 4.43 g(19.2 mmol)溶于 20 ml 甲醇中,然后用恒压滴液漏斗滴加 NaOH(1 mol/L)21.2 ml,35℃继续搅拌 8 h。停止反应,旋蒸除去甲醇。剩余液体用浓盐酸调 pH 值至 2~3,乙酸乙酯 50 ml  $\times$  4 次萃取。合并提取液,用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液蒸干。硅胶柱色谱纯化(流动相:乙酸乙酯:石油醚 = 3:1,体积比),得黄色液体 3.72 g,产率 89.4%。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$  (ppm): 0.83 (d, 3H,  $J = 6.25$  Hz), 0.85 (d, 3H,  $J = 6.40$  Hz), 1.21 (hept, 1H,  $J = 5.15$  Hz), 1.40~1.52(m, 6H), 2.19(t, 2H,  $J = 5.40$ ), 2.38~2.41(m, 1H), 3.60(s, 3H), MS ESI  $m/z$  217( $\text{M} + \text{H}^+$ )。

### 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 孕小鼠,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,剥去脑膜置于另外一个放有 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 °C 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 离心 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-谷氨酰胺 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,移去 120 μl,再加 450 μl。第 4 天再次换液,移去 200 μl 后,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 3 μl 和甘氨酸 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 °C 反复冻融 3 次后收集(胞内)。 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.2.2.3 LDH 漏出率的测定

测定方法参考文献[9],表 1 显示 LDH 漏出率的测定步骤。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,然后在酶标仪上测定 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%

表 1 漏出率测定的操作步骤

Table 1 The procedure of determination of the LDH release ratio

(μl)

步骤	试剂	标准管	标准空白管	测定管	测定空白管
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

#### 1.2.2.4 结果评价依据

根据下述公式计算化合物对谷氨酸诱导的神经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%

#### 1.2.3 化合物 1 免疫共沉淀实验

按 1.2.2 的方法培养细胞,在给予  $1 \times 10^{-7}$  nmol/L 药物后孵育 30 min,去掉培养液,收集细胞置于 100 mmol/L HEPES (含 200 mmol/L NaCl、10% 甘油、2 mmol/L  $\text{NaO}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、2 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L 苯甲脒、0.1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 μmol/L 胃酶抑素、10 μg/ml 抑酶肽、10 μg/ml 亮氨酸和 10 μmol/L 苯甲磺酰氟)中,冰浴上迅速匀浆。匀浆完毕后将样品置于冰浴上裂解 15 min,4 °C 离心机 12 000 g 离心 15 min,小心吸取上清即为蛋白提取液。将上述提取的蛋白上

清加到 beads 和抗体中,4 °C 振摇过夜。第 2 天用 PBS 洗蛋白-抗体-Beads 复合物,重复洗 3 次,每次洗时 4 °C 摇动 5 min,最后一次尽量洗净上清,并将蛋白-抗体-Beads 复合物重悬至 50 μl PBS 中,进而进行 Western blot 分析。

#### 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

ZL006 是一种新型神经保护剂。ZL006 通过抑制 nNOS 与 PSD95 的偶联,降低 nNOS 在病理条件下被过度激活而起神经保护作用<sup>[10]</sup>。本研究中,以 ZL006 作为阳性对照药物。由表 2 可知,化合物 1 和

2有良好的体外神经保护作用。其中,化合物1在低浓度  $1 \times 10^{-7}$  nmol/L 和高浓度  $1 \times 10^{-5}$  nmol/L 的神经保护作用比 ZL006 作用强,在中浓度  $1 \times 10^{-6}$  nmol/L 时和 ZL006 保护作用相当。化合物2在  $1 \times 10^{-7}$  nmol/L 时的神经保护作用约是 ZL006 的2倍,但随浓度提高,化合物保护作用变弱,在  $1 \times 10^{-6}$  nmol/L 时,它的保护作用只有 ZL006 的66%。化合物4和6虽然在  $1 \times 10^{-7}$  nmol/L 时具有和 ZL006 相当的保护作用,但随浓度提高,迅速失去保护作

用,并显示神经毒性。化合物3在测试的浓度范围内主要体现为神经毒性,化合物5药理学性质不稳定。

由表3可知,化合物7和9在测试的浓度范围内都体现良好的神经保护作用,化合物8在低浓度的  $1 \times 10^{-7}$  nmol/L 时具有较强的神经保护作用,但随浓度提高,显示神经毒性。化合物10和12保护作用较弱,化合物11在低浓度时有较强的神经毒性,但随浓度增加表现为神经保护作用。

表2 系列1目标化合物 LDH 漏出率

Table 2 The inhibiting ratios of LDH release induced by the series 1 compounds

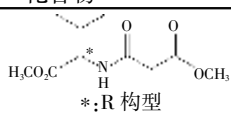
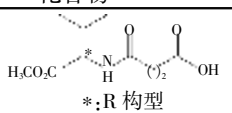
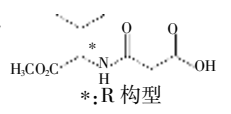
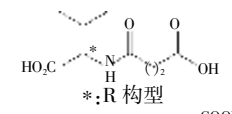
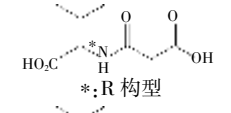
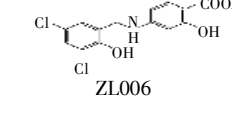
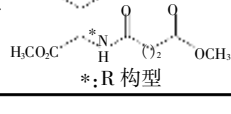
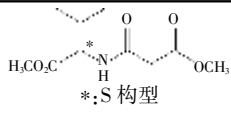
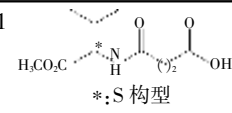
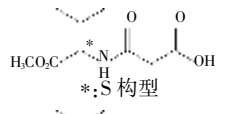
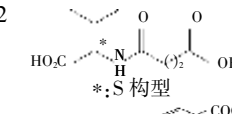
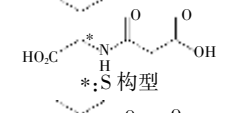
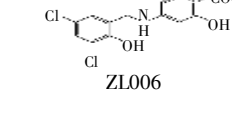
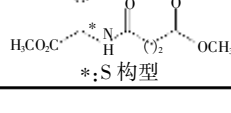
化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)	化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)
 1 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	45.12 ± 6.51	 5 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	-20.10 ± 3.34
	$1 \times 10^{-6}$	32.0 ± 5.12		$1 \times 10^{-6}$	35.28 ± 5.95
	$1 \times 10^{-5}$	40.44 ± 5.68		$1 \times 10^{-5}$	-6.92 ± 0.77
 2 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	71.22 ± 9.83	 6 HO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	33.94 ± 4.52
	$1 \times 10^{-6}$	24.62 ± 2.45		$1 \times 10^{-6}$	9.02 ± 0.58
	$1 \times 10^{-5}$	22.90 ± 3.11		$1 \times 10^{-5}$	-28.86 ± 3.44
 3 HO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	2.06 ± 0.51	 ZL006	$1 \times 10^{-7}$	37.38
	$1 \times 10^{-6}$	-6.48 ± 1.51		$1 \times 10^{-6}$	
	$1 \times 10^{-5}$	-29.30 ± 3.73		$1 \times 10^{-5}$	
 4 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> *:R 构型	$1 \times 10^{-7}$	35.0 ± 4.94		$1 \times 10^{-7}$	
	$1 \times 10^{-6}$	8.36 ± 1.87		$1 \times 10^{-6}$	
	$1 \times 10^{-5}$	-7.96 ± 1.11		$1 \times 10^{-5}$	

表3 系列2目标化合物 LDH 漏出率

Table 3 The inhibiting ratios of LDH release induced by the series 2 compounds

化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)	化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)
 7 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	39.06 ± 7.21	 11 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	-40.21 ± 5.45
	$1 \times 10^{-6}$	18.83 ± 2.55		$1 \times 10^{-6}$	-17.47 ± 3.18
	$1 \times 10^{-5}$	47.38 ± 6.74		$1 \times 10^{-5}$	25.78 ± 4.64
 8 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	49.05 ± 7.58	 12 HO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	8.90 ± 1.57
	$1 \times 10^{-6}$	15.52 ± 1.67		$1 \times 10^{-6}$	26.28 ± 3.36
	$1 \times 10^{-5}$	-26.37 ± 3.95		$1 \times 10^{-5}$	-3.87 ± 0.56
 9 HO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	31.34 ± 4.28	 ZL006	$1 \times 10^{-7}$	40.96
	$1 \times 10^{-6}$	30.41 ± 3.59		$1 \times 10^{-6}$	
	$1 \times 10^{-5}$	36.09 ± 5.32		$1 \times 10^{-5}$	
 10 H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> *:S 构型	$1 \times 10^{-7}$	6.61 ± 1.93		$1 \times 10^{-7}$	
	$1 \times 10^{-6}$	18.67 ± 2.76		$1 \times 10^{-6}$	
	$1 \times 10^{-5}$	16.62 ± 3.31		$1 \times 10^{-5}$	

由表4可知,此系列化合物除13体现较弱的神经保护作用外,多数化合物具有神经毒性。

为测试合成的化合物是否具有抑制 nNOS 和下游蛋白相互作用的活性,本研究选取了在测试浓度范围内 ( $1 \times 10^{-7}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  nmol/L) 神经保护作用较好的化合物1进行了神经细胞的 nNOS-NOS1AP 偶联抑制实验。结果表明,化合物1具有显著地抑制

nNOS-NOS1AP 偶联的作用(图1)。

### 3 讨论

脑缺血发生时谷氨酸大量释放,释放的谷氨酸激活 NR,从 NR 内流的钙离子激活通过 PSD-95 锚定在 NR 附近的 nNOS,从而生成大量 NO,继而引发脑缺血瀑布,引起脑缺血损伤<sup>[10]</sup>。研究表明, NR 对



表 4 系列 3 目标化合物 LDH 漏出率  
Table 4 The inhibiting ratios of LDH release induced by the series 3 compounds

化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)	化合物	浓度(mol/L)	抑制率(%)		
13		1 × 10 <sup>-7</sup>	8.80 ± 0.91	17		1 × 10 <sup>-7</sup>	-42.17 ± 6.23
		1 × 10 <sup>-6</sup>	27.44 ± 3.72			1 × 10 <sup>-6</sup>	-38.63 ± 5.18
		1 × 10 <sup>-5</sup>	6.12 ± 1.52			1 × 10 <sup>-5</sup>	-19.14 ± 2.79
14		1 × 10 <sup>-7</sup>	13.90 ± 2.33	18		1 × 10 <sup>-7</sup>	-11.58 ± 2.01
		1 × 10 <sup>-6</sup>	-41.51 ± 4.51			1 × 10 <sup>-6</sup>	0.34 ± 0.08
		1 × 10 <sup>-5</sup>	-57.85 ± 7.44			1 × 10 <sup>-5</sup>	-0.82 ± 0.10
15		1 × 10 <sup>-7</sup>	19.74 ± 2.65	ZL006		1 × 10 <sup>-7</sup>	41.74
		1 × 10 <sup>-6</sup>	-0.08 ± 0.02			1 × 10 <sup>-6</sup>	
		1 × 10 <sup>-5</sup>	1.92 ± 0.23			1 × 10 <sup>-5</sup>	
16		1 × 10 <sup>-7</sup>	22.04 ± 3.70				
		1 × 10 <sup>-6</sup>	4.72 ± 1.51				
		1 × 10 <sup>-5</sup>	-5.92 ± 1.38				

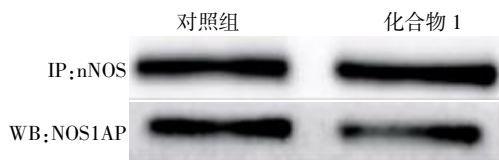


图 1 化合物 1 的免疫共沉淀分析

Figure 1 Coimmunoprecipitation assay of compounds 1

脑的正常功能、神经元的存活起重要作用,许多临床研究表明,NR 拮抗剂由于其作用不能开发成治疗药物<sup>[3,11]</sup>。NR 通过 PSD95 和 nNOS 形成 NR-PSD95-nNOS 三元复合物<sup>[4]</sup>。抑制 NR 和 PSD95 的偶联具有抗脑卒中作用<sup>[4]</sup>,但 PSD95 介导许多蛋白的功能,PSD95 也是维持神经正常功能必须的<sup>[12]</sup>。因此,为开发低毒副作用的神经保护药物,药物靶点不断深入到信号通路的下游。Zhou 等<sup>[10]</sup>报道,抑制 PSD95 和 nNOS 的偶联具有神经保护作用,针对该靶点开发的 ZL006 是兼具神经保护和修复功能的神经保护试剂。

nNOS 产生的 NO 要激活下游的效应分子产生药理学作用。研究表明,nNOS 通过其 PDZ 结构域和 NOS1AP 相结合,已知该蛋白是一个和心源性猝死、糖尿病并发症、精神分裂症有关的蛋白<sup>[6-8]</sup>。本文推测 nNOS 可能通过 NOS1AP 向下传递信号。为此,本研究针对 nNOS PDZ 结构域配体结合口袋的结构特点,设计并合成了一系列化合物用于抑制 nNOS PDZ 结构域和下游蛋白的偶联,并用 LDH 释放模型评价这些化合物对神经元细胞的保护作用。

nNOS PDZ 结构域天然配体的末端是 Val。PDZ 结合口袋有 GLGF (27~30) 的羧基结合口袋,有 Leu28、Phe30、Leu81 侧链构成的能容纳 Val 侧链异

丙基的疏水口袋,且 PDZ 结构域结合口袋附近多碱性基团(Lys22、Arg23、Lys24、Arg85)<sup>[13]</sup>,针对这些特点,本研究设计了一系列的含有异丙基、异丁基的二羧酸化合物,考虑到分子的极性,根据前药设计原理,合成了羧酸化合物的酯衍生物。

天然氨基酸为 S 构型,考虑到衍生于非天然氨基酸化合物代谢的稳定性,本研究首先利用 R 构型的缬氨酸合成了表 2 所示的化合物。表 2 所示,缬氨酸的 N 上链接了丙二酸的化合物 1 和 2 显示了良好的神经保护作用,而其双游离羧酸 3 神经保护作用很弱,可能和该化合物极性大不易通过细胞膜所致。3 在高浓度(1 × 10<sup>-5</sup> nmol/L)下有神经毒性,可能与 3 和其他靶点发生作用有关。N 端多 1 个碳原子的化合物 4,在低浓度下(1 × 10<sup>-7</sup> nmol/L)也有较好的神经保护作用,但在中高浓度下(1 × 10<sup>-6</sup>~1 × 10<sup>-5</sup> nmol/L)保护作用弱或显示毒性,说明 N 端两个羧基间以 1 个碳原子隔开为宜。

接下来本研究考察了氨基酸构型对活性的影响,用天然的 S 构型的缬氨酸合成了如表 3 所示的化合物 7~12。测试结果表明,化合物 7、8、9 在 1 × 10<sup>-7</sup>~1 × 10<sup>-6</sup> nmol/L 范围内显示较好的生物活性,说明对双酯(1 vs 7)和单酯(2 vs 8)的化合物来说,氨基酸的构型对活性影响不大。而对双羧酸化合物(3 vs 9)来说,构型对活性影响巨大,R 构型的 3 有神经毒性,而 S 构型的 9 具有良好的神经保护作用,其中原因有待深入研究。同样 N 端多 1 个碳原子的化合物 10~12 神经保护作用较弱(10,12),或具有神经毒性(11)。说明 S 构型的缬氨酸衍生物,其 N 端两个羧基的距离以 1 个碳原子为宜。

为研究化合物 1 中酰胺键对生物活性的作用,



本研究合成了如表4中13~15的己二酸及其酯化合物。神经保护分析表明,二羧酸13及其单酯15显示弱的神经保护作用,双酯14有较强的神经毒性。说明化合物1中的酰胺键对生物活性很重要。有研究表明,nNOS PDZ结构域的Val结合位点也能容纳稍大的异丁基<sup>[14]</sup>,因此,本研究合成了异丁基取代的二羧酸及其酯(16~18)并考察了其生物活性。活性分析表明,16显示弱的保护作用,17、18具有神经毒性,和13~15相比,生物活性没有改善。

nNOS通过其PDZ结构域和NOS1AP、Syn-trophin、PFK等蛋白的羧基末端结合,用小分子占据nNOS PDZ结构域的结合位点,就能抑制PDZ和其他蛋白的相互作用。Western blot分析表明,化合物1( $1 \times 10^{-7}$  nmol/L)能显著地抑制nNOS和NOS1AP的相互作用(图1),说明,化合物1的神经保护作用至少部分是通过抑制nNOS PDZ结构域和其他蛋白的偶联起作用的。

最近,Li等<sup>[15]</sup>报道,利用表达的nNOS PDZ结构域和NOS1AP竞争结合从而抑制天然nNOS和NOS1AP的结合,或利用Tat-YAGQWGESV(Tat连接的nNOS PDZ配体)和nNOS PDZ结合从而抑制NOS1AP和nNOS的偶联均具有神经保护作用。该工作为本研究化合物的神经保护作用提供了良好的理论基础。

神经保护作用靶点众多,例如,NR受体拮抗剂、nNOS抑制剂、L型钙通道激动剂、ErbB4受体激动剂等具有神经保护作用,而相应的激动剂或拮抗剂则具有神经损伤作用,在本研究合成的化合物中,有一些化合物活性很差或具有神经毒性,可能和这些化合物不作用于nNOS PDZ结构域,或作用于其他靶点有关。

综上所述,针对nNOS PDZ结构域的结构特点,本研究设计并合成了三系列的18个化合物,其中R或S构型的N-(2-甲氧羰基乙酰基)缬氨酸甲酯(1,7)和N-(2-甲氧羰基乙酰基)缬氨酸甲酯(2,8)显示良好的神经保护作用。这些化合物详细的生物学表征正在进行中。

#### [参考文献]

- [1] Liao TV,Forehand CC,Hess DC,et al. Minocycline repurposing in critical illness: focus on stroke[J]. *Curr Top Med Chem*,2013,13(18):2283-2290
- [2] Wang X,Wang L,Li T,et al. Novel hybrids of optically

activering-opened 3-n-butylphthalide derivative and isosorbide as potential anti-ischemic stroke agents [J]. *J Med Chem*,2013,56(7):3078-3089

- [3] Lai TW,Shyu WC,Wang YT. Stroke intervention pathways:NMDA receptors and beyond[J]. *Trends Mol Med*,2011,17(5):266-275
- [4] Aarts M,Liu Y,Liu L,et al. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions[J]. *Science*,2002,298(5594):846-850
- [5] Luo CX,Zhu DY. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase[J]. *Neurosci Bull*,2011,27(1):23-35
- [6] Arking DE,Pfeufer A,Post W. A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization[J]. *Nat Genet*,2006,38(6):644-651
- [7] Becker ML,Aarmoudse AJ,Newton-Cheh C. Common variation in the NOS1AP gene is associated with reduced glucose-lowering effect and with increased mortality in users of sulfonylurea [J]. *Pharmacogenet Genomics*,2008,18(7):591-597
- [8] Brzustowicz LM. NOS1AP in schizophrenia[J]. *Curr Psychiatry Rep*,2008,10(2):158-163
- [9] 陈佳佳,刘金春,常磊,等. 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[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2013,33(5):630-635
- [10] Zhou L,Li F,Xu HB,et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95 [J]. *Nat Med*,2010,16(12):1439-1443
- [11] Lai TW,Wang YT. Fashioning drugs for stroke[J]. *Nat Med*,2010,16(12):1376-1378
- [12] Elias GM,Nicoll RA. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins[J]. *Trends Cell Biol*,2007,17(7):343-352
- [13] Tochio H,Zhang Q,Mandal P,et al. Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide[J]. *Nat Struct Biol*,1999,6(5):417-421
- [14] Stricker NL,Christopherson KS,Yi BA,et al. PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences [J]. *Nat Biotechnol*,1997,15(4):336-342
- [15] Li LL,Ginet V,Liu X,et al. The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death[J]. *J Neurosci*,2013,33(19):8185-8201

[收稿日期] 2013-10-22