

· 基础研究 ·

## 兼具抗氧化和 $\gamma$ -氨基丁酸增强活性的多功能抗脑卒中化合物

郑礼平, 王玉婷, 倪罗番, 陈盼盼, 秦亚娟, 厉廷有\*

南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:合成具有抗氧化和 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)增强活性的神经保护试剂并测试其抗脑卒中的神经保护作用。方法:从不同取代的酚出发合成依达拉奉的类似物,用1,1-二苯基-2-苦肟基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)法测试化合物的抗氧化活性,用膜片钳技术测试化合物的GABA活性,并用大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型测试化合物的神经保护作用。结果:合成了3',5'-二异丙基-4'-羟基依达拉奉(**6a**)和3'-甲基-5'-叔丁基-4'-羟基依达拉奉(**6b**),两个化合物都显示了良好的体外抗氧化活性,在MCAO模型上两个化合物都显示了比依达拉奉更强的神经保护作用;电生理实验表明,化合物**6b**在低浓度下显示GABA增强活性,在高浓度下显示直接的GABAR激动活性。结论:基于依达拉奉的分子骨架,成功构建了同时具有抗氧化活性和GABA增强活性的新型神经保护试剂。

**[关键词]** 依达拉奉;丙泊酚;神经保护剂**[中图分类号]** R966**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)05-644-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20220507

## Multifunctional anti-stroke compounds with both antioxidant and $\gamma$ -aminobutyric acid enhancing activity

ZHENG Liping, WANG Yuting, NI Luofan, CHEN Panpan, QING Yajuan, LI Tingyou\*

School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to synthesize multifunctional neuroprotective agent with antioxidant and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) activity and test their neuroprotective activity against stroke. **Methods:** The edaravone analogues were synthesized from phenols with distinct substitutes; the antioxidant activity was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity; the GABA activity was evaluated by patch clamp, and the neuroprotective effect of the compounds was tested by MCAO model in rats. **Results:** The 3',5'-Diisopropyl-4'-hydroxyedaravone (**6a**) and 3'-methyl-5'-tert-butyl-4'-hydroxy-edaravone (**6b**) were successfully synthesized, both compounds showed good *in vitro* antioxidant activity and stronger neuroprotection than edaravone on the MCAO model; electrophysiological experiments showed that compound **6b** had GABA enhancement activity at low concentration and direct GABAR agonistic activity at high concentration. **Conclusion:** Based on the molecular framework of edaravone, two new neuroprotecting agents with both antioxidant activity and GABA activity were successfully constructed.

**[Key words]** edaravone; propofol; neuroprotecting reagents

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(05):644-649]

脑卒中是世界上导致人类残疾和死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。依达拉奉是一个低分子量的抗氧化药物,可以清除多种自由基,临床上主要用于脑卒中和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的治疗<sup>[2-3]</sup>。脑卒中发生时,随着氧气和能量

物质的耗竭,发生一系列生理生化过程,如钙离子的流入、激酶的激活、细胞膜的去极化、自由基的产生、凋亡信号通路的激活等,最终导致神经细胞死亡<sup>[4]</sup>。因此,只针对其中一个环节的药物其治疗作用有限,或者在动物模型中有效而难以临床转化<sup>[5]</sup>。

研究表明,发生脑卒中和随后的再灌注时,谷氨酸大量释放,通过N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体介导的神经兴奋性毒性

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81803349)

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

是神经细胞损伤的重要因素<sup>[5]</sup>。但NMDA受体拮抗剂由于其不良反应众多不易成药。γ-氨基丁酸(GABA)受体系统是抑制性神经系统,对NMDA受体系统的兴奋性具有抑制作用。因此,GABA受体激动剂具有神经保护作用。曾有GABA受体激动剂氯美噻唑进入三期临床,但由于仅作用于信号系统中的一个环节,治疗效果不显著,最终没有成为治疗药物<sup>[7]</sup>。丙泊酚是临床上使用的麻醉药物<sup>[8]</sup>,是GABA受体的增强剂和激动剂。研究表明,丙泊酚具有神经保护作用,其药理学机制基于其GABA受体激动活性和其自身的抗氧化作用<sup>[9]</sup>。

根据分子骨架融合原理<sup>[10]</sup>,结合丙泊酚和依达拉奉的结构特点,本文概念验证性地设计并合成了2个依达拉奉类似物,希望其同时具有抗氧化活性和GABA活性。活性研究结果表明,化合物**6b**兼具抗氧化活性和GABA活性,并显示出比依达拉奉更优的神经保护活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

<sup>1</sup>H NMR用日本JEOL的400 MHz核磁共振仪测定,四甲基硅烷(TMS)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,用荧光、碘或硫酸显色;全自动多功能酶标仪(FLUOstar Omega,BMG LABTECH公司,德国);气浴恒温摇床(CHA-S THZ-82 ZD-85,江苏正基仪器有限公司);数码相机(W800,索尼株式会社,日本)。化学试剂除特殊说明外均为市售试剂。本研究所有动物实验操作经由南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会许可(IACUC-1812012)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 化合物的合成

化合物的合成方法如图1所示。烷基取代的酚经硝化得对位取代的化合物**1**,酚羟基乙酰化得化合物**2**,**2**经H<sub>2</sub>/Pt还原得化合物**3**,**3**经重氮化反应并还原得中间体**4**,**4**直接用于和乙酰乙酸乙酯缩合得化合物**5**,**5**在碱性条件下脱乙酰基得终产物**6**。

##### 1.2.1.1 2,6-二异丙基-4-硝基苯酚(**1a**)的合成

烧瓶中加入四氢呋喃100 mL,丙泊酚3.56 g(20 mmol),搅拌10 min。取亚硝酸叔丁酯4.8 mL(40 mmol),在冰浴条件下,缓慢滴加至上述溶液中,滴毕,40 °C反应过夜。反应停止后,旋干溶液,得到棕褐色固体,加入150 mL石油醚,研磨至细小固体,超声5 min,过滤,得到橘色粗品。粗品进一步经过

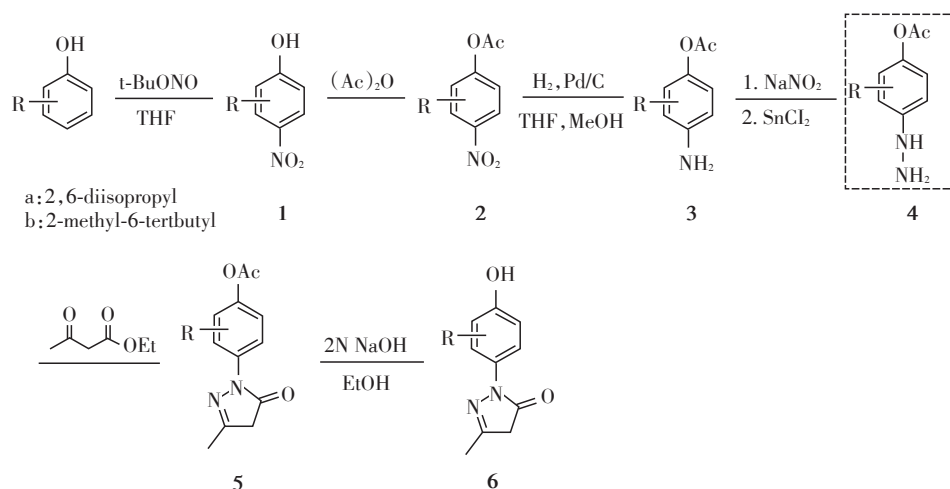


图1 化合物的合成方法

Figure 1 Synthetic scheme for the compounds

硅胶柱层析(PE:EA=20:1, R<sub>f</sub>=0.3)纯化可得淡黄白色固体1.2 g,产率27%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.98(s, 2H, arom), 5.51(s, 1H, OH), 3.16(m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.30(d, J=6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>). MS(ESI, m/z): 222.1[M-H]<sup>-</sup>。

##### 1.2.1.2 2-甲基-6-叔丁基-4-硝基苯酚(**1b**)的合成

合成方法同化合物**1a**。2-甲基-6-叔丁基苯酚

3.28 g(20 mmol),亚硝酸叔丁酯4.8 mL(40 mmol),四氢呋喃100 mL,反应处理后,得到淡黄白色固体**1b** 1.5 g, R<sub>f</sub>=0.2(PE:EA=20:1),产率36%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.09(d, J=2.8 Hz, 1H, arom), 7.95(d, J=2.8 Hz, 1H, arom), 5.45(s, 1H, OH), 2.32(s, 3H, arom CH<sub>3</sub>), 1.43(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). MS(ESI, m/z): 210.1[M+H]<sup>+</sup>。

1.2.1.3 2,6-二异丙基-4-硝基乙酰苯酚(**2a**)的合成

在125 mL耐压瓶中依次加入**1a** 2 g(9 mmol), 10 mL醋酸酐, 氩气置换后160 °C反应过夜。反应停止后, 加入乙酸乙酯100 mL, 分别用300 mL水洗涤有机层5次, 饱和食盐水洗涤2次, 无水硫酸钠充分干燥。过滤, 旋干得产物2.3 g, 产率96%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.98(s, 2H, arom), 2.95(m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.39(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24(d, *J*=6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>).

1.2.1.4 2-甲基-6-叔丁基-4-硝基乙酰苯酚(**2b**)的合成

合成方法同化合物**2a**。从**2a** 1.5 g(7.2 mmol)出发, 反应、处理后得到淡黄色固体**2b** 1.75 g, *R<sub>f</sub>*=0.8(PE:EA=20:1), 产率97%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 8.16(d, *J*=2.8 Hz 1H, arom), 8.01(d, *J*=2.8 Hz, 1H, arom), 2.4(s, 3H, arom CH<sub>3</sub>), 2.22(s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.39(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

1.2.1.5 2,6-二异丙基-4-氨基乙酰苯酚(**3a**)的合成

**2a** 2.3 g溶解于25 mL四氢呋喃和25 mL甲醇中, 加入10%钯碳0.25 g, 氢气反应过夜。反应停止后, 过滤除去钯碳, 滤液旋干, 硅胶柱层析(PE:EA=5:1, *R<sub>f</sub>*=0.4)得淡黄白色固体**3a** 2 g, 产率98%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 6.3(s, 2H, arom), 4.85(s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.68(m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.22(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.03(d, *J*=6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>). MS(ESI, *m/z*): 258.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

1.2.1.6 2-甲基-6-叔丁基-4-氨基乙酰苯酚(**3b**)的合成

合成方法同化合物**3a**。**2b** 1.75 g(7 mmol), 10%钯碳0.2 g, 四氢呋喃25 mL, 甲醇25 mL。经还原处理后, 得到淡黄色固体**3b** 1.5 g, *R<sub>f</sub>*=0.5(PE:EA=5:1), 产率97%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 6.43(d, *J*=2.8 Hz, 2H, arom), 6.28(d, *J*=2.8 Hz, 2H, arom), 4.86(s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.26(s, 3H, arom CH<sub>3</sub>), 1.99(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.87(s, 3H, CH<sub>3</sub>CO). MS(ESI, *m/z*): 221.1 [M+H]<sup>+</sup>.

1.2.1.7 3,5-二异丙基-4-乙酰氧基苯肼(**4a**)的合成

**3a** 2.0 g(8.5 mmol)溶于6 mL醋酸(102 mmol)和17 mL浓盐酸(204 mmol)中, 在冰浴条件下缓慢滴加亚硝酸钠(0.88 g, 12.7 mmol)的水溶液(3.7 mL, 204 mmol), 维持温度0~5 °C。反应1 h后, 在氩气氛围中, 在上述重氮盐中缓慢滴加二氯亚锡二水合物(5.75 g, 25.5 mmol)的浓盐酸溶液(4.25 mL, 51 mmol), 维持温度0~5 °C。反应6 h后, 2 mol/L氢氧化钠调节pH=9, 析出大量氢氧化亚锡沉淀, 通过

硅藻土过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取3次, 硅藻土用乙酸乙酯洗涤3次, 合并所得有机层, 饱和食盐水洗涤2次, 无水硫酸钠充分干燥, 过滤旋干得橘色油状液**4a**。苯肼类化合物易氧化变质, 因此, 不经分离纯化直接用于下一步合成。

1.2.1.8 3',5'-二异丙基-4'-乙酰氧基依达拉奉(**5a**)的合成

上述得到的**4a**用15 mL冰醋酸溶解, 冷水浴条件下搅拌10 min, 缓慢滴加乙酰乙酸乙酯1.2 mL(9.35 mmol), 维持温度0~5 °C。反应15 min后, 不经处理直接将混合液加入硅胶柱中(PE:EA=2:1, *R<sub>f</sub>*=0.3), 得黄色**5a**固体1g, 两步总产率39%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.66(s, 2H, arom), 3.39(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.9(m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.34(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.18(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21(d, *J*=6.8 Hz, 12H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). MS(ESI, *m/z*): 317.2 [M+H]<sup>+</sup>.

1.2.1.9 3'-甲基-5'-叔丁基-4'-乙酰氧基依达拉奉(**5b**)的合成

合成方法同**4a**和**5a**。**3b** 0.5 g(2.25 mmol), 浓盐酸6 mL, 醋酸5 mL, 亚硝酸钠0.24 g(3.5 mmol), 水0.6 mL, 氯化亚锡二水合物1.5 g(6.75 mmol), 乙酰乙酸乙酯0.35 mL(2.5 mmol)。经反应并处理后得到淡黄白色固体**5b** 0.24 g, *R<sub>f</sub>*=0.3(PE:EA=3:2), 两步产率45%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.76(d, *J*=2.8 Hz, 2H, arom), 7.62(d, *J*=2.8 Hz, 2H, arom), 3.41(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.34(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.19(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.14(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). MS(ESI, *m/z*): 325.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

1.2.1.10 2',6'-二异丙基-4'-羟基依达拉奉(**6a**)的合成

在耐压瓶中依次加入**5a** 0.4 g(1.26 mmol), 2 mol/L氢氧化钠2.5 mL, 乙醇7.5 mL, 氩气置换后70 °C反应过夜。反应停止后, 3 mol/L盐酸调节pH=3, 乙酸乙酯萃取3次, 饱和食盐水洗涤2次, 无水硫酸钠充分干燥, 旋干得黄色固体产物0.3 g, 产率86.7%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.46(s, 2H, arom), 4.81(s, 1H, OH), 3.4(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.16(m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.19(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29(d, *J*=6.8 Hz, 12H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). MS(ESI, *m/z*): 297.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

1.2.1.11 3'-甲基-5'-叔丁基-4'-羟基依达拉奉(**6b**)的合成

合成方法同**6a**。**5b** 0.24 g(0.8 mmol), 2 mol/L氢氧化钠1.6 mL, 乙醇4.8 mL。反应处理后得到淡黄白色固体**6b** 0.1 g, *R<sub>f</sub>*=0.25(PE:EA=3:2), 产率



50%。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ : 7.52(d,  $J=2.8$  Hz, 2H, arom), 7.41(d,  $J=2.8$  Hz, 2H, arom), 4.74(s, 1H, OH), 3.4(s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.27(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.19(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.42(s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). MS(ESI,  $m/z$ ): 261.2[M-H] $^-$ 。

### 1.2.2 生物活性测试

#### 1.2.2.1 DPPH 自由基清除实验

DPPH 浓度为 1.2 mmol/L, 样品液配制成各个浓度梯度: 0、0.10、0.15、0.20、0.30、0.60、1.20 mmol/L。在一块 96 孔板中加入 DPPH 溶液 500  $\mu\text{L}$ , 各个浓度的样品液 500  $\mu\text{L}$ , 每个浓度的样品溶液设 3 个平行孔。室温避光孵育 30 min, 使用酶标仪测定各孔在 517 nm 的吸光度。0 mmol/L 样品液的吸光度为  $A_0$ , 其余浓度的吸光度为  $A$ , 按公式: 清除率 =  $(A_0 - A) / A_0 \times 100\%$  计算样品各个浓度的清除率。使用 Origin 8.5.1 制作样品的清除率曲线, 拟合方程 Logistic 方程, 并得到样品的  $\text{EC}_{50}$  值。

#### 1.2.2.2 短暂性脑缺血模型

实验方案参照 Zhou 等<sup>[11]</sup>的短暂性脑缺血模型。实验分假手术组、手术组、依达拉奉对照组、化合物 **6a**、**6b** 治疗组, 每组动物数 15。简而言之, 水合氯醛(350 mg/kg, ip)麻醉 SD 大鼠, 通过颈外动脉残端将 4/0 外科尼龙单丝带圆形尖端引入左颈内动脉, 在颈动脉分叉处前进 20~21 mm, 直到感觉到轻微的阻力。此时, 腔内细丝阻塞了大脑中动脉、颈内动脉、大脑前动脉和大脑后动脉的所有血源。在整个过程中, 体温保持在  $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。将栓线留在原位 120 min, 然后取出再灌注。取出栓线后, 立即通过尾静脉给药(药物处方: 5% DMSO、18% 丙二醇、0.1% 亚硫酸氢钠、10% HS-15、62% 生理盐水)。在假手术动物中, 闭塞细丝仅插入颈动脉分叉处上方 7 mm 处。在 MCAO 后 2 h 进行梗死体积测量。快速取出大脑并在  $-20^\circ\text{C}$  下冷冻 5 min。制成 1~2 mm 冠状切片, 切片浸入 2% TTC,  $37^\circ\text{C}$  4 h。梗死体积表示为梗死半球中冠状切面的百分比面积。

#### 1.2.2.3 GABA 增强作用及直接激动作用实验

采用膜片钳电压钳全细胞记录模式, 开始记录之前, 小鼠皮层神经元至少观察 5 min, 保证细胞处于较为稳定状态。灌流液中加入  $\text{Na}^+$  通道阻断剂(TTX, 1  $\mu\text{mol/L}$ )、AMPA 受体阻断剂(CNQX, 10  $\mu\text{mol/L}$ )和 NMDA 受体阻断剂(APV, 50  $\mu\text{mol/L}$ ), 钳制细胞在  $-70$  mV 记录自发性抑制性突触后电流, 根据实验设计, 分别灌流 GABA 或药物, 观察其诱发的抑

制性反应。记录过程中持续观察串联阻抗, 以防止细胞破膜后的重封接, 与本底值差异大于 20% 者弃用。

### 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  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用  $t$  检验分析组间差异。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

从 2,6-二异丙基苯酚和 2-甲基-6-叔丁基苯酚出发, 经 6 步反应, 成功合成了 2 个依达拉奉类似物, 见图 2。DPPH 自由基清除实验表明, 依达拉奉、**6a**、**6b** 的  $\text{EC}_{50}$  分别为  $(0.326 \pm 0.120)$  mmol/L、 $(0.158 \pm 0.200)$  mmol/L 和  $(0.183 \pm 0.150)$  mmol/L(图 2)。**6a** 和 **6b** 显示了比依达拉奉更强的自由基清除活性。

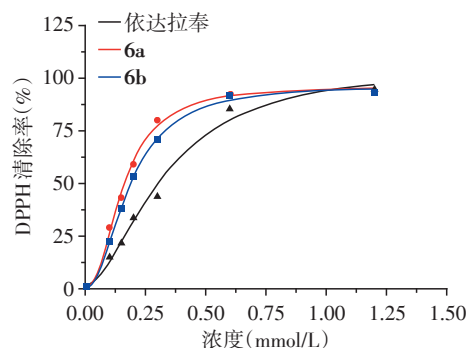


图 2 依达拉奉、**6a** 和 **6b** 的 DPPH 自由基清除活性  
Figure 2 DPPH free radical scavenging activity of edaravone, **6a** and **6b**

体内的脑卒中模型显示, 等摩尔量的化合物 **6a** 和 **6b** 显示了比对照药物依达拉奉更优的神经保护效果(图 3)。手术组的梗死面积百分比是  $(36.0 \pm 3.1)\%$  ( $n=15$ ), 依达拉奉阳性对照组(6 mg/kg)、化合物 **6a**(9.2 mg/kg)、化合物 **6b**(9.44 mg/kg) 治疗组的梗死面积百分比分别降为  $(13.5 \pm 1.2)\%$  ( $n=15$ )、 $(10 \pm 1.0)\%$  ( $n=15$ )、 $(7.3 \pm 0.34)\%$  ( $n=15$ )。经  $t$  检验, 化合物 **6a** 和 **6b** 的神经保护作用显著优于依达拉奉对照组( $P < 0.01$ )。

对神经保护作用较好的化合物 **6b** 进行了 GABA 活性的验证(图 4)。化合物 **6b** 在 5 mmol/L 时对 GABA 没有增强活性, 20~40 mmol/L 区间体现显著的 GABA 增强活性, 且显示剂量依赖性(图 4A~C)。**6b** 在高剂量下(500 mmol/L)显示对 GABA 受体的直接激动活性(图 4D)。

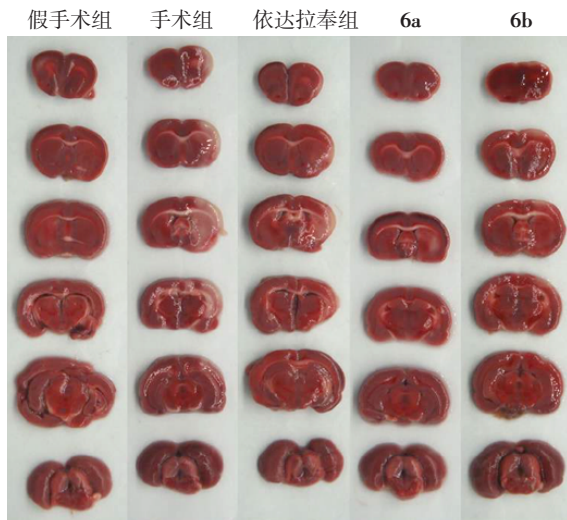
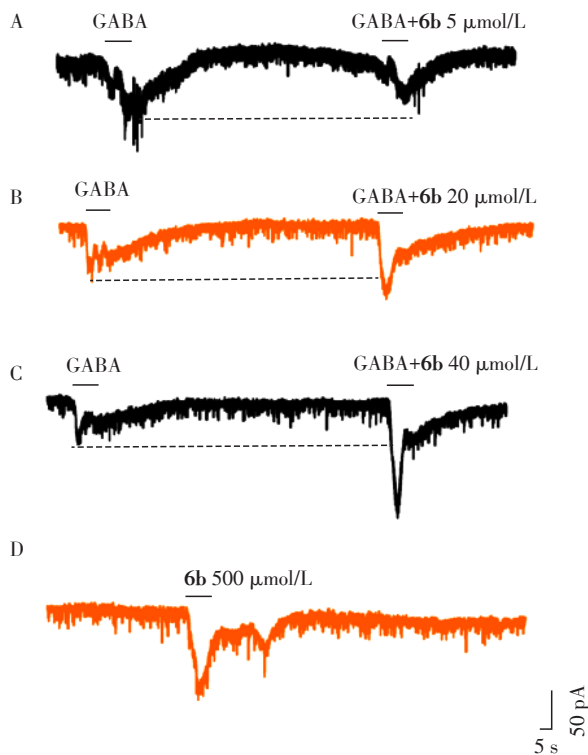


图3 脑切片TTC染色示意图

Figure 3 Representative of brain slices by triphenyltetrazolium chloride staining



A: 5  $\mu\text{mol/L}$  **6b**对12  $\mu\text{mol/L}$  GABA的增强活性; B: 20  $\mu\text{mol/L}$  **6b**对12  $\mu\text{mol/L}$  GABA的增强活性; C: 40  $\mu\text{mol/L}$  **6b**对12  $\mu\text{mol/L}$  GABA的增强活性; D: 500  $\mu\text{mol/L}$  **6b**对GABA的直接激动活性。

图4 **6b**的GABA增强活性及直接激动作用

Figure 4 GABA-enhancing and direct agonistic effect of **6b**

### 3 讨论

脑卒中导致的神经损伤是多因素、多信号通路共同作用的结果,只针对其中一个靶点或者一个信

号通路的化合物,往往治疗效果有限,这也许正是脑卒中治疗药物开发难、临床治疗药物缺乏的原因所在<sup>[7]</sup>。因此,多功能的神经保护试剂必然是今后卒中药物发展的方向<sup>[1]</sup>。

研究表明,卒中发生时,谷氨酸介导的神经兴奋性毒性在神经损伤中起重要作用<sup>[11]</sup>,而GABA系统是抑制性神经递质,可拮抗谷氨酸介导的兴奋性损伤,因此能增强GABA活性的物质,具有神经保护作用,例如氯美噻唑曾进入三期临床<sup>[7]</sup>。近年来,国内批准了先声药业依达拉奉和冰片的复方制剂“先必新®”用于脑卒中的治疗,其中冰片在其中的药理学作用正是GABA系统的增强剂<sup>[12-13]</sup>。因此,这些研究成果,为设计多功能的具有GABA受体增强活性的新型抗脑卒中药物奠定了理论和实践基础。

依达拉奉是一个小分子的抗氧化剂,临床上用作抗脑卒中药物。研究表明,依达拉奉的苯环可被众多的基团修饰而不影响分子的抗氧化性,有的基团取代还能增强分子的抗氧化性<sup>[14]</sup>。丙泊酚临床上用于麻醉,丙泊酚是GABA受体的增强剂和激动剂,研究表明,丙泊酚具有神经保护作用,其药理学机制基于其GABA受体激动活性和其自身的抗氧化作用。研究表明丙泊酚的GABA活性对苯环上的取代基具有较大的耐受性,例如,2-甲基-6-叔丁基的GABA增强活性比丙泊酚还强<sup>[15]</sup>,另外,GABA活性对苯环的4位取代也具有良好的耐受性。因此,这些研究结果,为设计骨架融合的、具有多功能的新型小分子抗脑卒中药物打下了良好的基础。

在本研究中,利用骨架融合的药物设计原理,概念验证性地合成了2个具有依达拉奉结构和丙泊酚结构或其类似物结构的小分子化合物**6a**和**6b**。由于依达拉奉和丙泊酚类化合物都具有抗氧化活性,因此,在DPPH自由基清除实验中,**6a**和**6b**体现了比依达拉奉更强的抗氧化活性。在MCAO模型中,**6a**和**6b**也体现了比依达拉奉更优异的神经保护作用。化合物**6b**在电生理的实验中,体现了GABA的增强作用和GABAR的直接激动活性,这些都和丙泊酚及其类似物在低浓度时具有增强作用、在高浓度时具有直接激活作用的现象类似<sup>[16]</sup>。因此,**6b**所体现出来的抗氧化活性和GABA活性基本达到了概念验证的目的,具有进一步拓展和深入研究的价值。本研究存在的不足是没有在细胞层面及动物层面对化合物进行自由基清除活性的表征。在今后,计划合成更多的化合物<sup>[17]</sup>,做更深入的药理学研究,例如,在电生理实验中,测定丙泊酚的GABA

活性,让化合物的活性比较更为直观。

#### [参考文献]

- [1] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 1135-18
- [2] WATANABE K, TANAKA M, YUKI S, et al. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 62(1): 20-38
- [3] SHEFNER J, HEIMAN-PATTERSON T, PIORO E P, et al. Long-term edaravone efficacy in amyotrophic lateral sclerosis: post-hoc analyses of Study 19 (MCI186-19) [J]. *Muscle Nerve*, 2020, 61(2): 218-221
- [4] 曹媛媛,丁可,胡静,等. 快充式经鼻湿化高流量通气在静脉麻醉下宫腔镜手术中的应用效果[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(10): 1517-1520
- [5] GOENKA L, UPPUGUNDURI SATYANARAYANA C R. Neuroprotective agents in acute ischemic stroke-A reality check [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2539-2547
- [6] WU Q J, TYMIANSKI M. Targeting nmda receptors in stroke: new hope in neuroprotection [J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 15
- [7] AMANTEA D, BAGETTA G. Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in stroke: from neurotoxicity to ischemic tolerance [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 35: 111-119
- [8] 陈伟,赵麟,刘宁,等. 星形胶质细胞来源的GJA1-20k在氧化应激后参与神经元保护作用的机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(8): 1098-1104
- [9] YANG C Y, LIU S Y, WANG H Y, et al. Neuroprotection by propofol post-conditioning: focus on PKM $\zeta$ /KCC2 pathway activity [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(3): 691-701
- [10] STUMPF D, HOCH A, BAJORATH J. Introducing the metacore concept for multi-target ligand design [J]. *RSC Med Chem*, 2021, 12(4): 628-635
- [11] 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
- [12] XU J, WANG Y, WANG A, et al. Safety and efficacy of Edaravone Dexborneol versus edaravone for patients with acute ischaemic stroke: a phase II, multicentre, randomised, double-blind, multiple-dose, active-controlled clinical trial [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, 4(3): 109-114
- [13] 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
- [14] POLKAM N, RAMASWAMY V R, RAYAM P, et al. Synthesis, molecular properties prediction and anticancer, antioxidant evaluation of new edaravone derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(10): 2562-2568
- [15] KRASOWSKI M D, 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 (A) receptor but not with lipid solubility [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297(1): 338-351
- [16] TRAPANI G, LATROFA A, FRANCO M, et al. Propofol analogues. synthesis, relationships between structure and affinity at GABAA receptor in rat brain, and differential electrophysiological profile at recombinant human GABAA receptors [J]. *J Med Chem*, 1998, 41(11): 1846-1854
- [17] QIN L, REN L, WAN S, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel 2, 6-disubstituted phenol derivatives as general anesthetics [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(9): 3606-3617

[收稿日期] 2022-02-27

(本文编辑:唐震)