

# 5-氨基咔唑衍生物的设计、合成及抗阿尔茨海默病活性

陈萌菲<sup>1</sup>, 房雷<sup>2\*</sup>, 陈莉<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学天然药物化学教研室,南京 210009; <sup>2</sup>东南大学化学化工学院药物研究中心,南京 210009)

**摘要** 以5-氨基咔唑为先导物,在其母环及5-位氨基的氮原子上引入不同的取代基,设计、合成了一系列咔唑衍生物,测试了其乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BChE)抑制活性,以及体外神经元细胞保护活性,并总结了构效关系。其中,化合物**8a**具有AChE/BChE双重抑制活性,同时还能够有效保护PC12细胞免受Aβ造成的损伤,展现出良好的开发前景。

**关键词** 咪唑衍生物;阿尔茨海默病;胆碱酯酶抑制剂;神经元保护;多功能

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0647-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150602

## Design, synthesis and anti-Alzheimer's disease activity of 5-akylaminomethyl substituted carbazole derivatives

CHEN Mengfei<sup>1</sup>, FANG Lei<sup>2\*</sup>, CHEN Li<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup>Pharmaceutical Research Center, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 210009, China

**Abstract** A series of carbazole derivatives were designed and synthesized via the introduction of various substituents on the carbazole template and the nitrogen atom using 5-aminomethyl substituted carbazole as the lead compound. The inhibitory activity towards AChE/BChE and the neuroprotective effect against Aβ-induced toxicity were evaluated by Ellman and MTT assay, respectively. Furthermore, the SAR of the target compounds was discussed. Among all the target compounds, compound **8a** showed dual inhibitory activity toward both AChE and BChE, and could effectively protect PC12 cells from Aβ-induced toxicity, indicating compound **8a** could be considered as a promising candidate against Alzheimer's disease.

**Key words** carbazole derivatives; Alzheimer's disease; ChE inhibitors; neuroprotective effect; multifunction

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种典型的神经退行性疾病,是最常见的老年痴呆病,在临床病例中占50%~56%,其病死率仅次于心血管病、肿瘤和脑血管病。胆碱酯酶抑制剂可以有效提升中枢神经系统的胆碱神经递质水平,缓解AD患者记忆力下降、生活自理能力不足等症状,是目前临幊上广泛使用的AD治疗药物。然而,AD病因复杂,涉及神经递质水平、淀粉样蛋白(Aβ)、炎症、氧化自由基损伤等多个方面<sup>[1]</sup>,因此单纯的胆碱酯酶抑制剂仅能起到缓解症状的效果,

而无法终止并逆转疾病的发展;同时,胆碱酯酶抑制剂通常仅在开始治疗的前两年有效,之后疗效显著减退<sup>[2]</sup>,因而难以满足临幊需要,研发新型抗AD药物迫在眉睫。

Aβ作为老年斑的主要组成成分在AD发病过程中扮演的角色已经引起人们的广泛关注。虽然目前关于Aβ是否是AD的治疗靶点尚存争议<sup>[3]</sup>,但大量实验已证实Aβ单体聚集形成的寡聚体具有显著的神经毒性<sup>[4]</sup>,因此抑制Aβ聚集或阻断Aβ寡聚体的神经毒性对于AD的防治无疑具有重

要意义。

研究发现, 呋唑类化合物能有效地抑制 A<sub>β</sub> 单体聚集<sup>[5]</sup>; 本课题组前期研究也揭示 5-位带有氨基取代基的呋唑衍生物(如化合物 **6b**)兼具胆碱酯酶抑制活性及神经元细胞保护活性, 提示该类化合物具有良好的抗 AD 应用前景<sup>[6]</sup>。为了进一步总结该类化合物的构效关系, 寻找具有更强活性的化合物, 本文以 5-氨基呋唑为先导物, 在其母环及 5-位氨基的氮原子上引入不同的取代基, 又设计、合成了一系列呋唑衍生物(图 1), 并对所有目标产物进行了胆碱酯酶抑制活性及神经元保护活性筛选。

## 1 合成路线

目标化合物 **7a~7h** 和 **8a~8b** 的合成过程见路线 1。参照本课题组之前报道的合成方法<sup>[6]</sup>, 以 4-溴-3-硝基苯甲醚为起始原料, 与邻甲基苯硼酸经 Suzuki 偶联得到联苯中间体 **1**, 经 Cadogan 反应环

合得呋唑化合物 **2**, 然后苯磺酰基保护呋唑上的氮原子、NBS 溴代、乙胺或异丙胺取代最后脱苯磺酰基保护基得关键中间体 **6a~6b**。然后, 化合物 **6a~6b** 分别与 NBS 或 NCS 反应, 得到目标化合物 **7a~7h**, **7a** 和 **7b** 经 40% HBr 脱甲基得目标化合物 **8a~8b**。

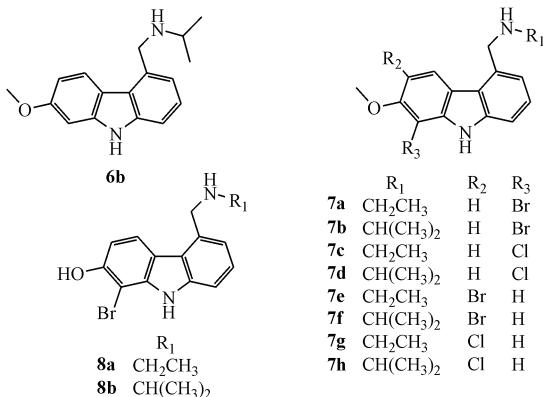
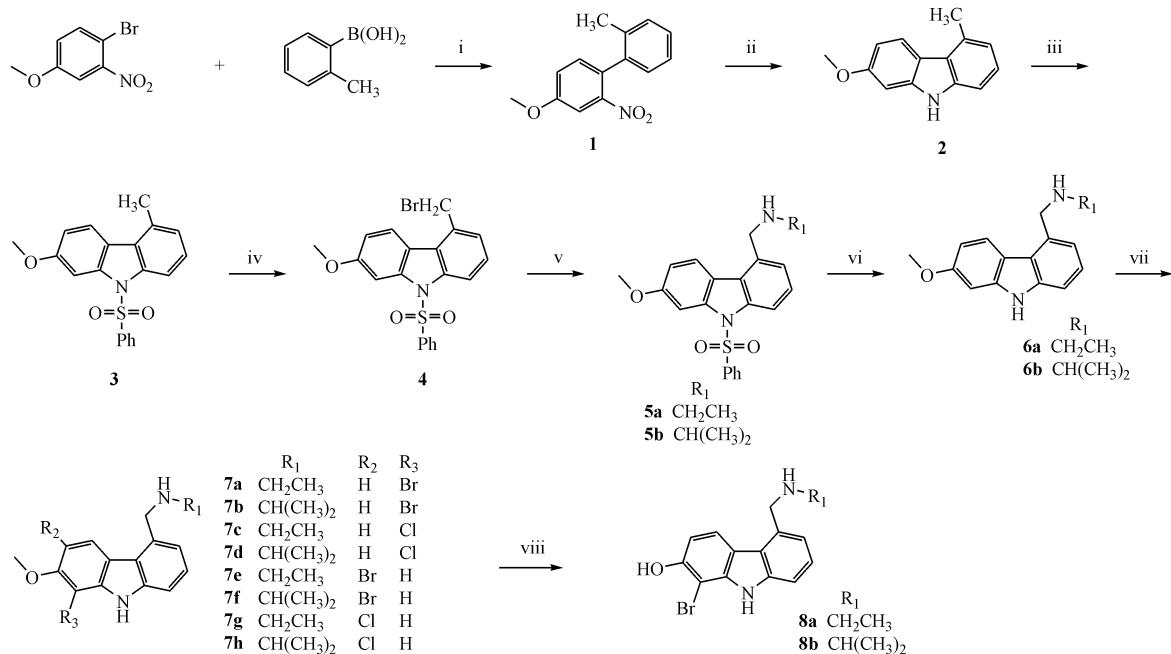


Figure 1 Structure of the targeted compounds **7a~7h** and **8a~8b**



Scheme 1 Synthetic route of the target compounds **7a~7h** and **8a~8b**

Reagents and conditions: (i) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME, reflux, 20 h; (ii) PPh<sub>3</sub>, DCB, reflux, 3 h; (iii) PhSO<sub>2</sub>Cl, NaH, THF, 0 °C then r. t., overnight; (iv) NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, reflux, 3 h; (v) alkylamine, KI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, anhydrous acetone, r. t., overnight; (vi) 2 mol/L NaOH, ethanol, reflux, overnight; (vii) NBS or NCS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, reflux, 3 h; (viii) 40% HBr aqueous solution, reflux

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

SGW X-4 显微熔点仪(上海精密科学仪器有

限公司), 温度未经校正。Nicolet IR200 FT-IR 红外仪器(KBr 压片, 美国赛默飞世尔科技公司); AV-300MHz 核磁共振仪(TMS 为内标, 德国 Bruker 公司); LC/MSD TOF 高分辨质谱(美国安捷伦科

技有限公司)。AChE 和 BChE(美国 Sigma-Aldrich 公司);Ellman 试剂、碘代硫代乙酰胆碱(ATC)和碘代硫代丁酰胆碱(BTC)(美国 Fluka 公司); $\text{A}\beta_{42}$ (上海强耀生物科技有限公司);六氟异丙醇(美国 Sigma 公司);PC12 细胞(中科院上海细胞库)。所用化学试剂均为市售分析纯且未经处理直接使用。

## 2.2 化学合成

### 2.2.1 目标化合物 **7a~7h** 的合成方法

将中间体 **6a~6b**<sup>[6]</sup>(1 mmol)溶于  $\text{CCl}_4$  30 mL 中,加入等物质的量的 NBS 或 NCS 以及催化量的偶氮二异丁腈(AIBN),回流反应 3 h。冷却至室温,抽滤,滤液减压蒸馏除去溶剂得到粗品,以乙酸乙酯-石油醚(1:1)为洗脱剂,柱色谱纯化得到化合物 **7a~7h**。

**1-溴-2-甲氨基-5-乙胺甲基-9H-咔唑(**7a**) 收率 18%,黄色固体,mp:138~140 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 166, 2 859, 1 551, 1 520, 1 455  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.11 (1H, s, NH), 7.78 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.65 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.36 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.15~7.18 (1H, m, Ar-H), 6.74 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 4.10 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.92 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.60 (2H, q,  $J$  = 7.5 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 0.96 (3H, t,  $J$  = 7.5 Hz, C-CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrN}_2\text{O}$  [M + H]<sup>+</sup> 333.060 26, Found 333.060 55。**

**1-溴-2-甲氨基-5-异丙胺甲基-9H-咔唑(**7b**) 收率 15%,黄色固体,mp:133~134 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 130, 2 895, 1 533, 1 455  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.14 (1H, s, NH), 7.77 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.65 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.36 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.16~7.18 (1H, m, Ar-H), 6.76 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 4.12 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.92 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.88~2.90 (1H, m, N-CH), 1.15 (6H, d,  $J$  = 7.5 Hz, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{BrN}_2\text{O}$  [M + H]<sup>+</sup> 347.075 91, Found 347.076 08。**

**1-氯-2-甲氨基-5-乙胺甲基-9H-咔唑(**7c**) 收率 21%,黄色固体,mp:166~169 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 111, 2 879, 1 545, 1 525  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}$**

$d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.15 (1H, s, NH), 7.75 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.73 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.40 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.12~7.14 (1H, m, Ar-H), 6.88 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 4.10 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.93 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.60 (2H, q,  $J$  = 7.5 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 0.96 (3H, t,  $J$  = 7.5 Hz, C-CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}$  [M + H]<sup>+</sup> 289.110 77, Found 289.110 57。

**1-氯-2-甲氨基-5-异丙胺甲基-9H-咔唑(**7d**) 收率 27%,黄色固体,mp:163~164 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 125, 2 886, 1 530, 1 450  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.14 (1H, s, NH), 7.75 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.40 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.12~7.14 (1H, m, Ar-H), 6.89 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 4.10 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.93 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.87~2.89 (1H, m, N-CH), 1.15 (6H, d,  $J$  = 7.5 Hz, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}$  [M + H]<sup>+</sup> 303.126 42, Found 303.126 47。**

**2-甲氨基-3-溴-5-乙胺甲基-9H-咔唑(**7e**) 收率 34%,黄色固体,mp:121~124 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 059, 2 859, 1 538, 1 520, 1 494, 1 457  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.29 (1H, s, NH), 8.18 (1H, s, Ar-H), 7.31 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.24 (1H, t,  $J$  = 8.0, 7.3 Hz, Ar-H), 7.15 (1H, s, Ar-H), 6.94 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, Ar-H), 4.18 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.62~2.63 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>), 0.95 (3H, t,  $J$  = 7.5 Hz, C-CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrN}_2\text{O}$  [M + H]<sup>+</sup> 333.060 26, Found 333.060 86。**

**2-甲氨基-3-溴-5-异丙胺甲基-9H-咔唑(**7f**) 收率 34%,黄色固体,mp:101~103 °C;IR (KBr,  $\nu$ ): 3 119, 2 855, 1 538, 1 520, 1 480, 1 450  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 11.29 (1H, s, NH), 8.16 (1H, s, Ar-H), 7.30 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.25 (1H, t,  $J$  = 8.0, 7.3 Hz, Ar-H), 7.15 (1H, s, Ar-H), 6.94 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, Ar-H), 4.19 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.90~2.92 (1H, m, N-CH), 1.05 (6H, d,  $J$  = 7.5**

Hz, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>2</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 347.075 91, Found 347.075 86。

**2-甲氧基-3-氯-5-乙胺甲基-9H-咔唑(7g)** 收率41%, 黃色固体, mp: 118~119 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 088, 2 888, 1 533, 1 520, 1 455 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 11.19 (1H, s, NH), 8.15 (1H, s, Ar-H), 7.29 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.20 (1H, t, *J* = 8.0, 7.3 Hz, Ar-H), 7.15 (1H, s, Ar-H), 6.98 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, Ar-H), 4.20 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.61-2.63 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>), 0.96 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, C-CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 289.110 77, Found 289.110 70。

**2-甲氧基-3-氯-5-异丙胺甲基-9H-咔唑(7h)** 收率38%, 黄色固体, mp: 107~109 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 110, 2 855, 1 563, 1 480, 1 455 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 11.29 (1H, s, NH), 8.20 (1H, s, Ar-H), 7.31 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.27 (1H, t, *J* = 8.0, 7.3 Hz, Ar-H), 7.16 (1H, s, Ar-H), 6.99 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, Ar-H), 4.19 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.88~2.90 (1H, m, N-CH), 1.10 (6H, d, *J* = 7.5 Hz, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>2</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 303.126 42, Found 303.126 57。

**2.2.2 目标化合物 8a~8b 的合成** 将化合物 7a 或 7b(1 mmol)加入至40% HBr水溶液30 mL中, 回流反应3 h。TLC 监测反应完成后, 10% NaOH 水溶液调节pH至8, 乙酸乙酯萃取(30 mL × 3), 无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 以乙酸乙酯-石油醚(1:1)为洗脱剂, 柱色谱纯化得到化合物 8a~8b。

**1-溴-2-羟基-5-乙胺甲基-9H-咔唑(8a)** 收率83%, 黄色固体, mp: 98~99 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 395, 3 273, 2 889, 1 610, 1 582, 1 445 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 11.11 (1H, s, NH), 7.89 (1H, br, OH), 7.74~7.69 (2H, m, Ar-H), 7.36 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.16~7.18 (1H, m, Ar-H), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 4.08 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 2.60 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 0.96 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, C-CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O [M - H]<sup>-</sup> 317.028 96, Found 317.028 58。

**1-溴-2-羟基-5-异丙胺甲基-9H-咔唑(8b)** 收率86%, 黄色固体, mp: 111~112 °C; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 398, 3 273, 2 959, 1 626, 1 580, 1 437 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 11.11 (1H, s, NH), 7.90 (1H, br, OH), 7.74~7.69 (2H, m, Ar-H), 7.36 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.16~7.18 (1H, m, Ar-H), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 4.10 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>-N), 2.88~2.90 (1H, m, N-CH), 1.15 (6H, d, *J* = 7.5 Hz, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>2</sub>O [M - H]<sup>-</sup> 331.044 61, Found 331.044 69。

### 3 体外胆碱酯酶抑制活性

应用Ellman法<sup>[7]</sup>进行测试。将受试物溶液100 μL、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)(0.01 mol/L)溶液100 μL、AChE或BChE溶液(5 U/mL)100 μL加至缓冲溶液(pH 8)3 mL中, 待加入ATC(0.075 mol/L)或BTC(0.075 mol/L)溶液20 μL触发反应后立即计时并同时快速混匀测试溶液, 2 min后于412 nm波长下测量紫外吸收度。等体积的水代替受试物溶液为空白对照, 加兰他敏为阳性对照。所有测试均平行操作3次。实验结果见表1。

**Table 1** Inhibitory activities of compounds 7a~7h and 8a~8b towards AChE and BChE

Compd.	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> /(μmol/L)	
	AChE <sup>b</sup>	BChE <sup>b</sup>
7a	12.1	9.1
7b	16.9	8.9
7c	29.1	7.9
7d	33.2	9.9
7e	61.6	12.8
7f	88.2	11.9
7g	>100	20.5
7h	>100	14.1
8a	11.1	8.7
8b	11.9	13.1
Galanthamine	9.6	36.9

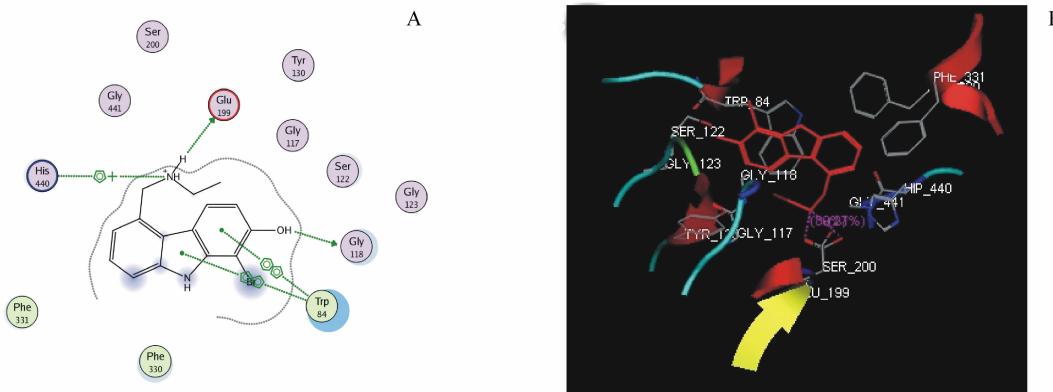
<sup>a</sup>Data were the mean values of at least three determinations; <sup>b</sup>AChE from electric eel and BChE from equine serum

实验结果显示, 大部分目标化合物对BChE有较好的抑制活性, IC<sub>50</sub>在10 μmol/L左右, 较加兰他敏活性提高了约3~5倍; 而对AChE的抑制活性总体较弱, 显示目标化合物对BChE具有一定的选择性。目标化合物 7a、7b、8a 和 8b 对 AChE 的抑

制活性较好,IC<sub>50</sub>低于20 μmol/L,提示这些化合物具有AChE/BChE双重抑制活性。有研究发现,AD患者的AChE被抑制后,其体内的BChE活性会代偿性提升,从而降低了AChE抑制剂的疗效<sup>[8]</sup>。因此,AChE/BChE双重抑制剂相较单纯的AChE抑制剂在AD治疗效果上更具优势。

分析构效关系发现,带有溴取代基的化合物活性略优于含氯取代基的化合物;此外,1-位取代的化合物(如7a)要优于3-位取代的化合物(如7e);而将甲氧基脱去甲基可使活性略有提升。

为了初步探讨该类化合物的分子作用机制,利用MOE软件,尝试将活性最好的化合物8a与AChE(PDB编号:3I6M)做了分子模拟对接,发现化合物8a可以有效进入AChE的活性口袋,并且咔唑母环与活性口袋的Trp84残基形成强烈的π-π共轭效应,而5-位的氨基及其活泼氢原子可分别与His440及Glu199产生共轭及氢键效应,2-位的酚羟基则可与Gly118产生氢键,提示5-位的氨基取代基及2-位的酚羟基对其活性至关重要,见图2。

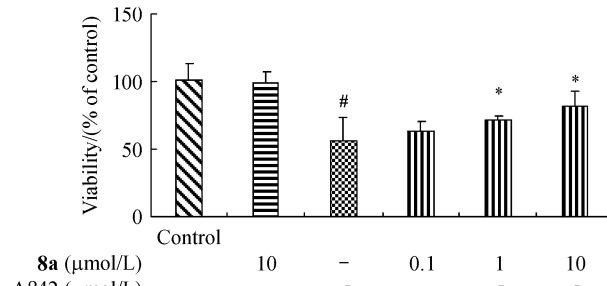


**Figure 2** Interaction of compound 8a and AChE (Protein Data Bank code 3I6M). A) Schematic diagram of compound 8a interacted with the active pocket of AChE; B) 3D diagram of compound 8a interacted with corresponding amino acid residues

#### 4 体外神经元保护活性评价

采用文献[9]方法,通过MTT法测试化合物对PC12细胞的保护作用。PC12细胞使用含10%胎牛血清、100 mg/mL链霉素和100 mg/mL青霉素的F-12培养基在37 °C、全湿度含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。Aβ42溶液的制备:将Aβ42溶解在六氟异丙醇中配成1 mol/L溶液,等分置于消毒的微量离心管中,减压除去六氟异丙醇,将得到的肽样品在-20 °C干燥储存。将F-12培养基加入上述制备得到的肽样品中,在4 °C孵育24 h配成最终浓度为100 μmol/L的溶液。待测化合物溶液的制备;将待测化合物溶解在DMSO中并用F-12培养基稀释成所需要的浓度(DMSO最终浓度低于小于0.5%)。将细胞接种于96孔板上,每孔含有2×10<sup>3</sup>个细胞,在37 °C、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h。然后加入待测化合物溶液(浓度为0.1,1.0,10.0 μmol/L)24 μL,或是含Aβ42(5 μmol/L)

的待测化合物溶液(浓度为0.1,1.0,10.0 μmol/L)24 μL,然后将细胞在37 °C下继续培养24 h。每孔中加入5 mg/mL MTT溶液10 μL,继续培养4 h。吸去各孔内上清液,每孔加入DMSO 150 μL,振荡10 min,使结晶物充分溶解,在540 nm下ELISA酶联免疫检测器测定吸收度。以没有接种细胞的孔作为空白对照,作为每个测试的背景扣除,平行试验3组,实验结果见图3。



**Figure 3** Neuroprotective effect of compound 8a against Aβ42-induced cytotoxicity towards PC12 cells *in vitro* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*P<0.01 vs control group; \*P<0.05 vs control group

大量文献报道, A<sub>β</sub> 寡聚体具有显著的神经元毒性<sup>[4]</sup>, 较低剂量即会造成神经元细胞死亡。以自制的 A<sub>β</sub> 寡聚体为神经毒剂, 进一步测试了化合物 **8a** 对神经元细胞 PC12 的保护作用。结果显示, 将 PC12 细胞单独与 A<sub>β</sub> 寡聚体共培养 24 h, 即使在 10 μmol/L 的浓度下也未见明显毒性。而将 PC12 细胞单独与 A<sub>β</sub> 寡聚体共培养 24 h, 细胞存活率明显降低, 提示 A<sub>β</sub> 寡聚体具有显著的细胞毒性。有趣的是, 将 PC12 细胞与不同浓度的化合物 **8a** 及 5 μmol/L A<sub>β</sub> 寡聚体共培养 24 h, A<sub>β</sub> 寡聚体的毒性被显著缓解, 并且呈浓度依赖性, 表明化合物 **8a** 能够有效地保护神经元细胞免受 A<sub>β</sub> 寡聚体造成的神经毒性损伤。

## 5 结 论

以 5-氨基咔唑为先导物, 在其母环及 5-位氨基的氮原子上引入不同的取代基设计、合成了系列咔唑衍生物, 活性测试发现部分化合物具有良好的 AChE 和 BChE 抑制活性, 构效关系研究揭示咔唑母环及其 5-位的氨基取代基为活性必需基团, 同时 2-位引入溴等吸电子基团以及将 3-位甲氧基转换为羟基有助于提升抑制活性。所有目标化合物中, 化合物 **8a** 显示了良好的活性, 其既具有 AChE/BChE 双重抑制活性, 同时还能够有效保护 PC12 细胞免受 A<sub>β</sub> 造成的神经毒性损伤, 展现出良好的开发前景。

## 参 考 文 献

- [1] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, **362**(4): 329–344.
- [2] Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, et al. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease [J]. *J Am Med Assoc*, 1994, **271**(13): 992–998.
- [3] Mullane K, Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis—but what lies beyond [J]? *Biochem Pharmacol*, 2013, **85**(3): 289–305.
- [4] Walsh DM, Selkoe DJ. Abeta oligomers—a decade of discovery [J]. *J Neurochem*, 2007, **101**(5): 1172–1184.
- [5] Yang W, Wong Y, Ng OT, et al. Inhibition of beta-amyloid peptide aggregation by multifunctional carbazole-based fluorophores [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(8): 1804–1810.
- [6] Fang L, Fang XB, Gou SH, et al. Design, synthesis and biological evaluation of D-ring opened galantamine analogs as multifunctional anti-Alzheimer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, **76**: 376–386.
- [7] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, **7**: 88–95.
- [8] Fang L, Appenroth D, Decker M, et al. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates [J]. *J Med Chem*, 2008, **51**(4): 713–716.
- [9] Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(35): 32046–32053.