

· 综 述 ·

氮氧自由基衍生物及其生物活性的研究进展

张启立^{1,2,3}, 田 雪¹, 王 洁¹, 赵 磊^{1,4,5,6*}, 夏鹏飞^{1,4,5}, 续艳丽^{1,6}, 徐富梅¹, 贾寅强¹

(¹ 甘肃中医药大学, 兰州 730000; ² 陇药产业创新研究院, 兰州 730000; ³ 西北中藏药省部共建协同创新中心, 兰州 730000;

⁴ 甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室, 兰州 730000; ⁵ 甘肃省高校中藏药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; ⁶ 兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730000)

摘 要 氮氧自由基是一类稳定的有机自由基, 因其结构中具有 N-O· 及未成对电子等而表现出诸多特性, 可作为自旋标记物用于探索生物反应机制, 具有磁性性质可用于多功能磁性分子材料的开发, 具有阻聚和催化作用可用于有机反应中的阻聚剂和催化剂等。更重要的是其具有抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性, 在新药的研发方面备受人们关注, 如将氮氧自由基自旋标记于抗癌药物鬼臼毒素可起到增效减毒, 易于机体吸收等作用, 得到了新的抗癌药物 4-[4"-(2", 2", 6", 6"-四甲基哌啶氮氧自由基) 氨基]-4'-去甲基表鬼臼毒素 (GP-7)。通过引入药效团对氮氧自由基进行结构修饰, 或将其自旋标记于中药活性成分等, 从而得到高效低毒的新化合物, 是寻求新药物的有效途径。对新型氮氧自由基衍生物及其生物活性等方面的研究进行归纳总结, 旨在为开发利用氮氧自由基, 寻找治疗疾病新药物提供理论依据。

关键词 氮氧自由基; 结构修饰; 衍生物; 生物活性; 研究进展

中图分类号 R914;R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)05-0673-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023041902

引用本文 张启立, 田雪, 王洁, 等. 氮氧自由基衍生物及其生物活性的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(5): 673–684.

Cite this article as: ZHANG Qili, TIAN Xue, WANG Jie, *et al.* Research progress of nitroxide radical derivatives and their biological activities[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(5): 673–684.

Research progress of nitroxide radical derivatives and their biological activities

ZHANG Qili^{1,2,3}, TIAN Xue¹, WANG Jie¹, ZHAO Lei^{1,4,5,6*}, XIA Pengfei^{1,4,5}, XU Yanli^{1,6}, XU Fumei¹, JIA Yinqiang¹

¹Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; ²Gansu Pharmaceutical Industry Innovation Research Institute, Lanzhou 730000; ³Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000; ⁴Gansu Provincial Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000; ⁵Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicine(TCM)of Colleges of Gansu Province, Lanzhou 730000; ⁶Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730000, China

Abstract Nitroxide radicals are a kind of stable organic free radicals. Due to the presence of N-O· and unpaired electrons in its structure, it has many characteristics, and thus can be used as a spin marker to explore the mechanism of biological reactions; with its magnetic properties, it can be used for the development of multifunctional magnetic molecular materials and used as a polymerization inhibitor and catalyst in organic reactions. More importantly, it has a variety of biological activities such as anti-oxidation and anti-tumor, and so has attracted much attention in the research and development of new drugs. For example, the spin labeling of

收稿日期 2023-04-19 * 通信作者 Tel: 0931-8762539 E-mail: zzyhx@gszy.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 82160457, No. 81660577); 甘肃省科技计划项目 (21JR7RA564); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目 (GSSYLXM-05); 甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室开放基金项目 (ddyc-2022-03); 甘肃省高校教师创新基金项目 (2023B-115)

nitroxide radicals on anticancer drug podophyllotoxin can enhance the efficacy and reduce the toxicity, and can be easily to be absorbed by the body, thus obtaining a new anti-cancer drug 4-[4''-(2'',2'',6'',6''-tetramethyl-1''-piperidinyloxy nitroxide radical) amino]-4'-demethyl epipodophyllotoxin(GP-7). It is an effective way to seek new drugs by introducing pharmacophore to modify nitroxide radicals or it can be spin-labeled on active natural products to obtain new compounds with high efficiency and low toxicity. The research progress of derivatives and its biological activities of nitroxide radicals are summarized, aiming to provide theoretical basis for the developing and utilizing of nitroxide radicals and searching for new drugs.

Key words nitroxide radicals; structural modification; derivative; bioactivity; research progress

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82160457, No. 81660577); the Natural Science Foundation of Gansu Province (No. 21JR7RA564); the Double First-class Key Scientific Research Project of Gansu Provincial Department of Education (GSSYLXM-05); the Open Fund of Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization (ddyc-2022-03); and the College Teachers Innovation Fund of Gansu Province(2023B-115)

氮氧自由基 (nitroxide radicals, NRs) 是一种稳定的有机自由基, 其结构中含有硝基及未成对电子 $N\cdot O\cdot$ 。NRs 具有相对分子质量低、无毒、结构稳定且易于修饰、水溶性较好、不会对细胞产生免疫反应、容易通过细胞膜进行扩散等特点, 其特殊的化学结构使其表现出显著的特性, 因此, 在生物医学领域尤其是新药研发方面应用广泛^[1-4]。采用 NRs 对抗癌药物鬼臼毒素、喜树碱、白藜芦醇等进行自旋标记, 增强了它们的抗癌活性, 降低了其毒性, 同时自旋标后因引入自由基而改善了其溶解性, 使药物更易穿过细胞膜到达疾病靶点, 而氮氧自由基降低药物毒性一定程度上与其清除体内药物代谢残留的自由基产物有关^[5]。同时, NRs 展现出多种生物活性, 具有捕获 NO 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 和 $\cdot O_2$ 的能力, 保护自由基对内皮细胞的攻击, 具有类似超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性, 能抑制 Fenton、Haber-Weiss 和脂质过氧化反应, 进而表现出抗氧化活性。此外 NRs 还具有抗肿瘤、抗缺血再灌注损伤、抗炎镇痛、抗辐射、抗次声损伤、抗高原缺氧损伤, 以及神经保护等作用^[2-3]。NRs 可作为自旋标记物用于探索生物反应机制及生物体系结构, 具有一定的磁学性质, 在多功能磁性分子材料开发领域潜力巨大, 具有阻聚和催化作用, 在有机反应中可作为阻聚剂和催化剂使用, 可见在化学、物理等领域也应用较多^[6-8]。近年来通过对 NRs 衍生化得到新化合物, 以寻找治疗疾病新药物的研究较多, 也取得了丰硕的成果, 发现了如 4-[4''-(2'',2'',6'',6''-四甲基哌啶氮氧自由基) 氨基]-4'-去甲基表鬼臼毒 (GP-7) 等一些具有显著生物活性的新型 NRs 衍生物, 可见 NRs 在新药研发方面潜力巨大。本文对新型 NRs 的衍生物及其生物活性进行

了综述, 旨在为 NRs 的开发利用提供理论依据。

1 氮氧自由基概述

氮氧自由基也称为硝酰基氧自由基, 是一类含有 C、N、O、H 等元素以及自旋单电子的有机化合物, 其结构式中一般含有脂肪族、芳香族、双环或杂环结构, 最常见的杂环 NRs 大多由哌啶、吡咯啉、吡咯烷、噁唑烷、咪唑啉和咪唑烷等衍生而来^[9]。NRs 具有稳定性, 主要是由于其结构中 α 碳原子 (即邻近于 $N\cdot O\cdot$ 基的碳原子) 上缺乏氢原子所致。目前发现的 NRs 大约有 100 多种, 从化学结构角度分析, 稳定的 NRs 可以分为两类: 一类是以 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基 (TEMPO) 为代表的二烷基氮氧自由基, 该类自由基是最早被制备并广泛研究的自由基; 另一类是以 4,4,5,5-四甲基-2-咪唑啉-1-炔氧基-3-氧化物 (NITR) 为代表的咪唑类氮氧自由基, 该类自由基具有更广泛的电子分布, 是一类同时包括氮氧偶极 ($^+N\cdot O$) 和氮氧自由基 ($N\cdot O\cdot$) 的双官能团分子结构, 活性较高, 结构也更为多样^[10-12], 两类化合物结构式及其结构特点见图 1, 最常见的氮氧自由基及其结构见表 1。

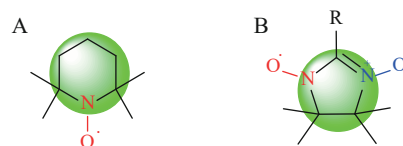


图 1 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基 (TEMPO, A) 和 4,4,5,5-四甲基-2-咪唑啉-1-炔氧基-3-氧化物 (NITR, B) 的结构式

2 氮氧自由基的生物活性

氮氧自由基及其衍生物具有多种生物活性, 主要体现在抗氧化、抗缺氧损伤、防辐射、抗肿瘤、心

表 1 最常见的氮氧自由基及其结构^[2]

名称	结构式	名称	结构式	名称	结构式
TEMPO		CAT-1		Pirolin (PL)	
Tempamine		Tempocholine		Carboxy-Pirolin	
Tempone		Pirolid		Tempol	
Carboxy-Pirolid					

肌保护、神经保护、抗炎镇痛等方面,尤其在抗氧化、抗肿瘤方面作用显著,近年来人们围绕这几方面的活性开展了大量的研究。

2.1 抗氧化

抗氧化作用是 NRs 最突出的生物活性之一, NRs 的多种生物活性与其抗氧化作用密切相关。在人体正常的活动过程中,细胞的新陈代谢可以产生多种自由基,自由基的产生和清除一般处于动态平衡状态。然而,当肌体损伤引发炎症、发生病变或受到外界刺激、辐射等导致人体自由基的动态平衡被破坏时,过剩的高活性自由基会随机与体内的蛋白质、酶、脂质和核酸等分子结合,夺取后者的电子,破坏染色体,使酶残疾,破坏细胞膜的结构和功能,同时体内 ROS 异常持续性增高可氧化 DNA 等细胞内生物分子,进而造成氧化损伤,从而诱发基因突变、细胞凋亡等,进一步增加癌症、帕金森病、阿尔茨海默病、心血管疾病、关节炎、哮喘、糖尿病和退行性眼病等多种疾病发生的风险^[13]。NRs 具有清除体内自由基,使其在体内保持动态平衡状态,进而有效避免了多种疾病的发生和发展,同时还能保护细胞大分子免受氧化损伤^[13-15]。因此, NRs 是一种有效的抗氧化剂,在抗氧化药物开发方面潜力巨大。

2.2 抗肿瘤活性

研究发现 NRs 及其衍生物均具有显著的抗肿

瘤活性,可对肺癌、肝癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、舌鳞状细胞癌、白血病、骨髓瘤、黑色素瘤等多种癌细胞的增殖具有明显的抑制作用^[12-13,16]。NRs 抗肿瘤主要体现在对肿瘤的防护、治疗、协同增效及作为活性中间体开发抗肿瘤药物等方面,尤其是将稳定 NRs 引入抗肿瘤先导化合物可以降低药物毒性,提高活性。NRs 及其衍生物抗肿瘤作用机制主要与 ROS 的调控关系密切,一方面肿瘤细胞通过提高 ROS 水平来激活近端信号通路,促进细胞增殖、生存和代谢;另一方面,肿瘤细胞通过维持一个高水平的抗氧化活性来控制 ROS 水平,从而避免细胞由于过度氧化应激而死亡^[17]。此外, NRs 可抑制内皮细胞的增殖、迁移及管样结构形成,进而表现出抗血管生成作用^[18]。耐药性是抗生素治疗癌症的主要障碍,研究发现具有抗肿瘤活性的 NRs 可调节阿霉素耐药性^[19],同时还具有协同效应,可以提高其对耐药性肿瘤细胞的疗效。

2.3 心肌保护作用

临床上在治疗如冠心病等一些心血管疾病,改善患者心功能的过程中,常常会引起心肌缺血/再灌注损伤 (MIRI),加重心肌功能障碍和结构损伤。许多 MIRI 形成机制与氧自由基损伤密切相关。当发生 MIRI 后,机体 ROS 会大量增多,引起许多重要的生物大分子结构和功能受损,进而损伤心肌。Jia 等^[20]通过 SD 大鼠心肌缺血/再灌注 (MI/R) 模

型,考察了其合成的两个手性氮氧自由基 L-1 和 L-2 的抗 MIRI 活性,结果发现 L-1 和 L-2 两个自由基均可改善 MI/R 损伤大鼠的心功能,抑制心肌细胞中肌酸激酶 (CK) 的合成与释放,同时减少丙二醛 (MDA) 的含量,同时还可以增加血清 SOD 活性,减轻氧化应激反应程度,动物血清中 NO 明显升高,说明 NRs 在体内清除自由基的同时释放 NO,二者皆起到保护缺血心肌的作用。NRs 清除自由基并释放 NO 与其结构中氮氧偶极(N^+-O^-)基团有关。

2.4 其他

NRs 除了具有一定的生物活性外,还有其他一些用途。NRs 是最常用的自旋标记物,它在生理 pH 水溶液系统中很稳定,即使发生微小的变化,也能被检测出来,可用于探索生物反应机制及生物体系结构等。稳定的 NRs 可作为信号传递的官能团,用以研究药物和其他生物大分子配体(如重要的酶、核酸和细胞膜)的相互作用。NRs 是一种造影剂,Zhang 等^[21]通过结构修饰将氮氧自由基连接在键合了超顺磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 的树枝高分子末端,合成了 Fe_3O_4 -NO-纳米粒子,得到了一种兼具 T1 和 T2 信号增强能力的双模磁共振成像 (MRI) 造影剂,并成功地运用于对肿瘤细胞自噬监测中,再根据肿瘤细胞的自噬情况,通过调节肿瘤自噬联合化疗药物进行抗肿瘤的治疗。

3 氮氧自由基的衍生化研究

近年来围绕 NRs 衍生化的研究较多,研究方法和思路也较为多样,主要体现在 NRs 与中药活性成分如鬼臼毒素、喜树碱、白藜芦醇等相结合,与葡萄糖苷、血红蛋白、稀土元素的结合,也有与临床常用药物如阿司匹林、吡哆美辛的结合等。氮氧自由基与这些分子主要通过酯化反应、Passerini 异腈三组分反应、A3 偶联反应等以共价键连接,即得到了自旋标记的化合物。通过采用这些方法对 NRs 进行衍生化获得了一些具有显著生物活性的新药物,且部分药物已应用于临床开展疾病的治疗。代表性的 NRs 衍生物见表 2。

3.1 氮氧自由基与中药活性成分的有效结合

从中药或天然药物中寻找治疗疾病的活性物质或前体化合物是开发新药的有效途径之一,但部分中药活性成分在表现出良好的生物活性的同时,也存在不良反应强,亲水性差致难以有效吸收,结

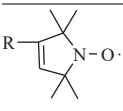
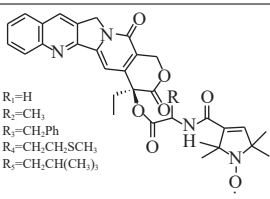
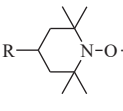
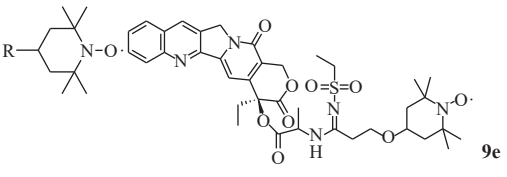
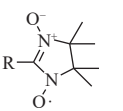
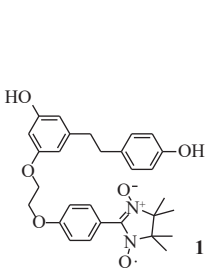
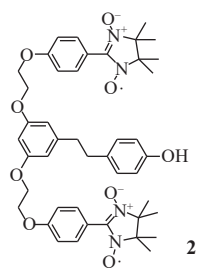
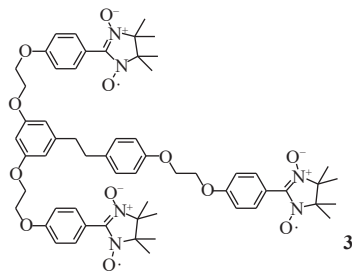
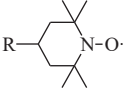
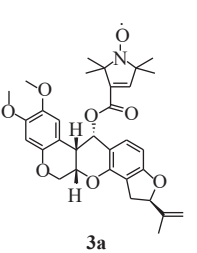
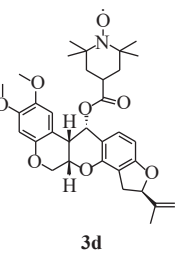
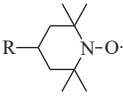
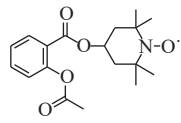
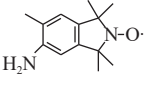
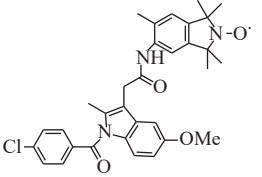
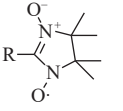
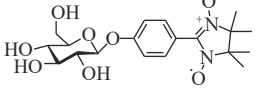
构不稳定等诸多缺点。通过引入自旋标记的 NRs 药效团对中药活性成分进行结构修饰,可达到降低毒性、改变极性、提高活性的目的。目前,对于中药活性成分与 NRs 有效结合研究较多,典型代表有鬼臼毒素、喜树碱及白藜芦醇等,也因此得到了一些活性较好的新化合物。

3.1.1 氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物的研究 天然木脂素类化合物鬼臼毒素具有良好的抗肿瘤活性,是一种研发抗癌药物的先导化合物,围绕其已开展了大量研究也取得了丰硕成果,以鬼臼毒素为母体化合物,衍生得到的 etoposide(VP-16),toniposide(VM-26)和 etopophos 等已成为一线抗肿瘤药物。为降低鬼臼毒素毒性,且能够提高或不影响其生物活性,将稳定 NRs 引入其母体结构,从而得到新型低毒高效鬼臼毒素 NRs 衍生物是开发抗癌药物的有效策略之一。研究人员在 NRs 标记的鬼臼毒素衍生物方面开展了大量研究,也得到了一些具有显著抗肿瘤活性的新化合物,代表性的有 4-[4''-(2'',2'',6'',6''-四甲基哌啶氮氧自由基)氨基]-4'-去甲基表鬼臼毒 (GP-7)、鬼臼酰肼哌啶氮氧自由基脒 (GP-1)、*N''*-podophyllin acid-*N*-[3-(2,2,5,5-tetramethyl pyrrolinenoxy)]semicarbazide(GP-11)等^[22-24]。其中化合物 GP-7 和抗癌药物 VP-16 相比抗癌活性相当,但毒性显著降低,合成产率显著增高。后续随着该研究的深入,一些新的高活性的 NRs 标记的鬼臼衍生物相继被发现,如 Jin 等^[25]合成并筛选出高活性化合物 4-β-氧-(1''-氧-4''-羰基-2'',2'',6'',6''-四甲基哌啶)-4'-去甲基表鬼臼酯 (9d),Zhang 等^[15]合成筛选出脱氧鬼臼自旋标记衍生物 *N*-(1-氧-2,2,6,6-四甲基-4-哌啶氧羰基)-L-甘氨酸-4'-去甲-4-脱氧鬼臼酯 (11a)等,Kou 等^[26]合成了多个自旋标记的 4-β-*N*表鬼臼毒素、4'-*O*-去甲-4-β-*N*表鬼臼毒素衍生物,筛选出了活性较好的新化合物 12e 和 12h。Zhang 等^[27-28]以具有抗肿瘤活性的 4β-氨基-4'-去甲表鬼臼为原料,以氨基酸作连结基,合成了 5 个氨基酸连结的吡咯啉类、7 个哌啶类稳定氮氧自由基自旋标记的鬼臼衍生物,并考察了它们的抗肿瘤、抗氧化活性。结果发现绝大部分化合物对人肺癌细胞 A-549、骨髓瘤细胞 RPMI-8226、肝癌细胞 HepG2、白血病细胞 HL-60 和 K562 有不同程度的抑制增殖作用,且有些化合物活性优于母体化合物,有些化合物活性比临床抗癌药物 etoposide

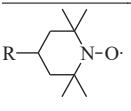
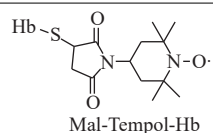
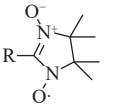
表 2 氮氧自由基衍生物结构式

氮氧自由基类型	氮氧自由基衍生物结构式	氮氧自由基衍生物结构类型	参考文献
	 GP-1 GP-7	氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物	[22-24]
	 GP-11	氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物	[22-24]
	 $R_1=H$ $R_2=Me$ $R_3=CHMe_2$ $R_4=CH_2CHMe_2$ $R_5=(CHMe)CH_2Me$ $R_6=Proline$ $R_7=CH_2Ph$ $R_8=CH_2(C_6H_4)OH$	氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物	[24]
	 9d	氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物	[25]
	 12e 12h	氮氧自由基自旋标记的鬼臼毒素衍生物	[26]
	 $R_1=H$ $R_2=CH_2$ $R_3=CH_2Ph$ $R_4=CH_2CH_2SMe$	氨基酸连结的吡咯啉类氮氧自由基鬼臼衍生物	[27]
	 $R_1=H$ $R_2=Me$ $R_3=CHMe_2$ $R_4=CH_2CHMe_2$ $R_5=CH(OH)Me$ $R_6=CH_2CH_2SMe$ $R_7=CH_2Ph$	氨基酸连结的哌啶类氮氧自由基鬼臼衍生物	[28]

(续表)

氮氧自由基类型	氮氧自由基衍生物结构式	氮氧自由基衍生物结构类型	参考文献
		氮氧自由基自旋标记的喜树碱衍生物	[29]
	 9e	氮氧自由基自旋标记的喜树碱衍生物	[30]
	 1	氮氧自由基自旋标记的白藜芦醇衍生物	[32]
	 2		
	 3		
	 3a	氮氧自由基-鱼藤酮衍生物	[33]
	 3d		
		氮氧自由基-阿司匹林类似物	[34]
		氮氧自由基-咪唑美辛类似物	[34]
		氮氧自由基葡萄糖衍生物	[35]

(续表)

氮氧自由基类型	氮氧自由基衍生物结构式	氮氧自由基衍生物结构类型	参考文献
	 Mal-Tempol-Hb	马来酰亚胺-氮氧自由-牛血红蛋白衍生物	[36]
	$[\text{Dy}(\text{hfac})_3(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot (\text{NITMePy})$	氮氧自由基-稀土配合物	[37]

(VP-16) 更好, 大部分化合物抗氧化活性也有显著提高。可见将 NRs 与鬼臼毒素相结合在开发抗肿瘤等药物方面潜力巨大。以 GP-7 为例, 氮氧自由基参与自旋标记的鬼臼毒素衍生物的合成路线见图 2。

3.1.2 氮氧自由基自旋标记的喜树碱衍生物的研究 天然生物碱类化合物喜树碱具有广泛的生物活性, 其能够通过选择性抑制拓扑异构酶 I (Topo I) 进而表现出广谱的抗肿瘤作用, 各国学者在围绕喜树碱开发新药方面开展了大量研究, 也开发出来如盐酸伊立替康、盐酸拓扑替康、贝托替康等抗癌药物并应用于临床。喜树碱水溶性差使其在体内不能被有效吸收, 结构中内酯环不稳定也引发了一些不良反应, 围绕 NRs 自旋标记的喜树碱衍生物的研究可解决这些难题, 是开发喜树碱类抗肿瘤药物的主要手段。Liu 等^[29]受前期对鬼臼毒素等化合物 NRs 衍生物研究的启发, 为解决喜树碱稳定性和水溶性等问题, 将 NRs 引入喜树碱分子结构的 20 位羟基上, 增强了其水溶性和提高了内酯环的稳定性, 合成了 5 个新型自旋标记的喜树碱衍生物, 并通过对膀胱癌细胞 T-24 体外细胞毒性考察了其生物活性。结果表明, 各化合物的细胞毒性较母体化合物比都有了显著提高。Zhao 等^[30]设计、合成得到了 20 个新型自旋标记的喜树碱衍生物, 并考察了其抗肿瘤活性, 结果发现有 18 个新化合物对

人非小细胞肺癌细胞 A-549、乳腺癌 MDA-MB-231、人口腔表皮样癌细胞 KB 和人口腔表皮样癌细胞抗药株 KBvin 均有显著的抗增殖活性, 其中化合物 **9e** 和 **9j** (IC_{50} 分别为 0.057 和 0.072 $\mu\text{mol/L}$) 对耐多药的 KBvin 细胞系显示出很强的细胞毒性, 是潜在的抗癌药物的候选化合物, 以化合物 **9e** 为例, 氮氧自由基参与自旋标记的喜树碱衍生物合成路线见图 3。

3.1.3 氮氧自由基自旋标记的白藜芦醇衍生物研究 白藜芦醇(3,5,4'-三羟基反-二苯代乙烯)是一种非黄酮多酚类化合物, 广泛存在于虎杖等中药中, 是其发挥生物活性的主要有效成分, 研究发现白藜芦醇具有很强的抗氧化能力, 同时还具有抗衰老、抗炎、抗肿瘤等多方面的生物活性。白藜芦醇生物相容性好、代谢速度快且毒性低, 是一种潜在的抗辐射损伤药物, 但研究发现它的抗辐射效果与传统的抗放药相比较弱^[31]。Luo 等^[32]针对白藜芦醇多酚类天然药物的优势以及 NRs 分子特殊的辐射防护机制, 选用 NRs 分子 NITR 对白藜芦醇进行结构修饰, 设计合成了 3 个新型 NITR 自旋标记的白藜芦醇 NRs 衍生物, 并考察了新化合物对 Jurkat T 细胞毒性, 发现白藜芦醇衍生物比白藜芦醇母体具有更低的细胞毒性, 同时衍生物 **2** 和 **3** (结构见表 2) 能显著减轻 X 射线辐射对 Jurkat T 细胞的损伤, 降低 Jurkat T 细胞胞内 ROS 水平, 作用效果与阳性对

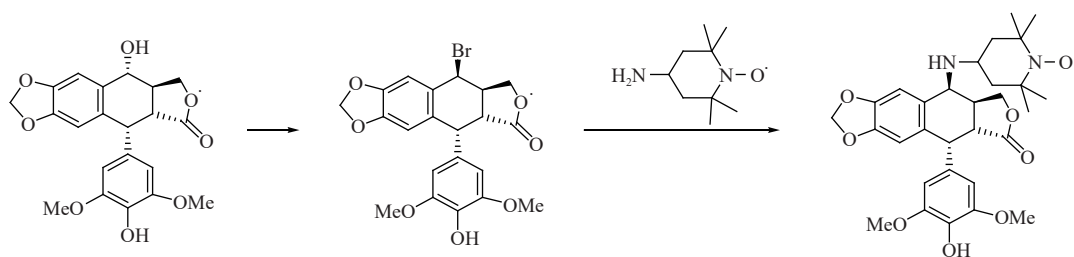


图 2 自旋标记的鬼臼毒素衍生物 (GP-7) 的合成

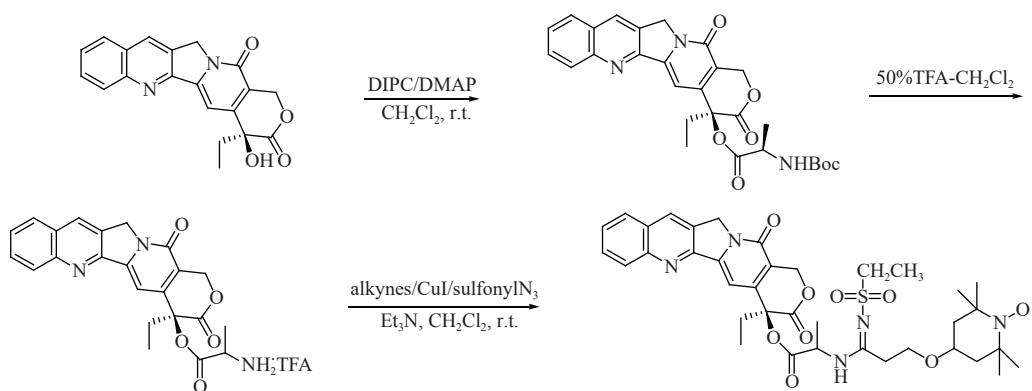


图 3 自旋标记的喜树碱衍生物 (9e) 的合成

照药氨磷汀相当,同时表现出较好的抑制辐射诱导的受试细胞凋亡的性能。作用机制研究表明,白藜芦醇衍生物的抗辐射作用与调控凋亡蛋白 cIAP-1、cIAP-2、cytochrome c、caspase-3 和 caspase-9 的表达密切相关,因此新型 NITR 自旋标记白藜芦醇衍生物是一种新的潜在的辐射防护候选化合物可用于改善电离辐射损伤。以衍生物 **2** 为例,氮氧自由基参与自旋标记的白藜芦醇衍生物合成路线见图 4。

3.1.4 氮氧自由基自旋标记的鱼藤酮衍生物的研究 鱼藤酮是一种异黄酮类化合物,研究发现其可通过诱导 B 淋巴细胞瘤、早幼粒细胞白血病和神经母细胞瘤的凋亡进而显示出抗癌活性。同时可与

微管蛋白结合抑制微管的组装,是一种有效的微管组装抑制剂,此外也是一种植物杀虫剂。Liu 等^[33]为增强鱼藤酮抗肿瘤活性且降低毒性,将稳定的 NRs 引入鱼藤酮母体,合成了 3 种新型自旋标记的鱼藤酮衍生物,并考察了其对 A-549、DU-145、KB 和 KBvin 4 种肿瘤细胞系的细胞毒性,结果发现所有衍生物对肿瘤细胞系均表现出较好的细胞毒活性,化合物 **3a**、**3d**(结构见表 2)对 KBvin 细胞的抑制作用明显,且活性优于紫杉醇。以化合物 **3a** 为例,氮氧自由基参与自旋标记的鱼藤酮衍生物合成路线见图 5。

3.2 氮氧自由基与临床常见药物的有效结合

研究人员利用药效团拼合原理将稳定的抗氧

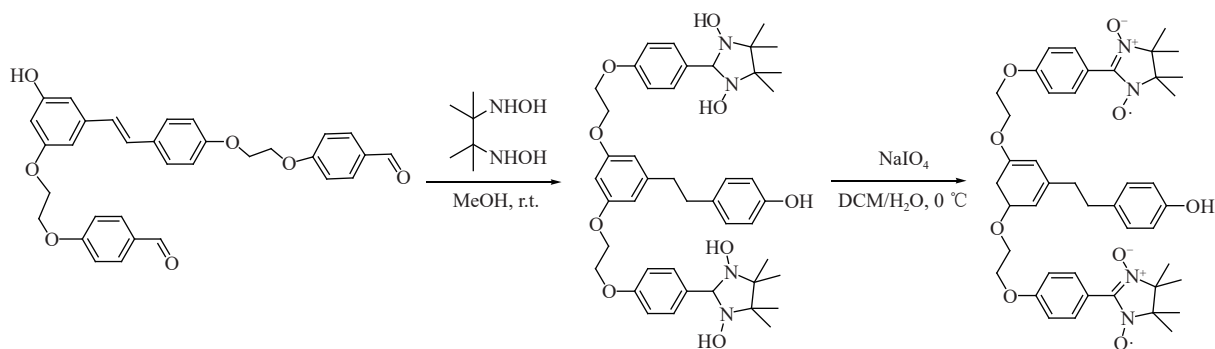


图 4 自旋标记的白藜芦醇衍生物 (2) 的合成

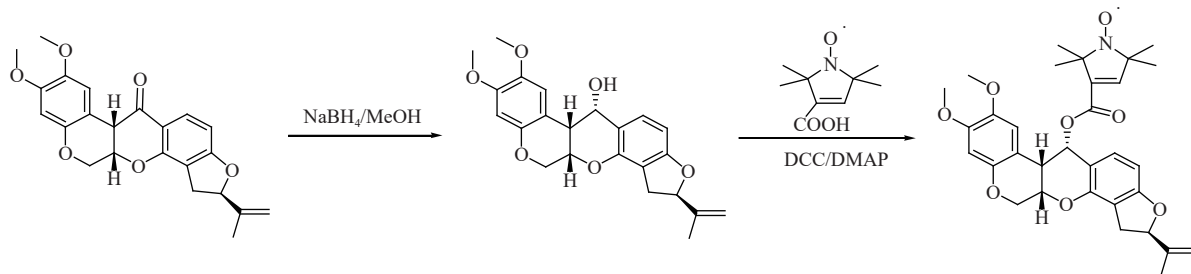


图 5 自旋标记的鱼藤酮衍生物 (3a) 的合成

化 NRs 与传统的非甾体抗炎药 (NSAIDs) 相结合, 研制出抗氧化/抗炎双重作用的混合剂, 并考察了混合剂的生物活性, 发现了一种酯连接的氮氧自由基-阿司匹林类似物(表 2), 该化合物具有比母体化合物阿司匹林更好的抗炎作用, 可能是一种环氧合酶抑制剂, 并表现出与抗氧化剂 Tempol 类似的清除活性氧的作用。另外研究人员将 NRs 与消炎药吡哆美辛相连接得到的一种化合物(表 2)能够显著改善氧化应激对 661 W 视网膜神经元的影响, 其效果与抗氧化剂叶黄素相近或更优^[34]。此外, 还发现了一些拼合偶联物对肺癌 A549 的增殖具有显著的抑制作用, 进而显示出潜在的抗癌活性。

3.3 氮氧自由基与葡萄糖苷的结合

将 NRs 与葡萄糖苷的结合, 也是提高 NRs 生物活性, 寻找高活性物质的有效手段之一, 如 Yang 等^[35]将对缺氧诱导的 PC12 细胞和心脑血管组织损伤均具有明显保护作用的 4'-羟基-2-苯基硝基氮氧自由基 (HPN) 与具有显著生物活性的乙酰溴代葡萄糖偶联, 合成得到了 HPN 葡萄糖苷衍生物, 并通过体内抗缺氧活性实验发现该衍生物能显著延长常压密闭缺氧小鼠的存活时间, 且活性明显优于母体分子 HPN。

3.4 氮氧自由基定点修饰牛血红蛋白

血液代用品血红蛋白类氧载体 (HBOCs) 存在因 ROS 引发的不良反应, 研究人员尝试用 NRs 修饰血红蛋白, 以降低 ROS 损伤以及提高 HBOCs 的安全性, 如 Qi 等^[36]利用马来酰亚胺基可与巯基发生特异性反应的特点, 以 4-(N-马来酰亚胺基)-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氮氧自由基 (Mal-Tempol) 和牛血红蛋白 (Hb) 为原料, 将 NRs 定点修饰到 Hb 的表面巯基上, 制备了马来酰亚胺氮氧自由基修饰的牛血红蛋白 (Mal-Tempol-Hb)。并考察了有无 NaN_3 介导条件下 Hb 的自氧化过程, 结果发现 NRs 的修饰有效地降低了血红蛋白的自氧化速率。TEMPO 是一种稳定的自由基, 它具有类 SOD 的功能, 可以将超氧自由基转化成 H_2O_2 , 而 TEMPO 和 Hb 单体或血红素形成的化合物具有清除 H_2O_2 的能力, 表现出 CAT 酶的活性。此外, TEMPO 低毒、在体内代谢速度快、价廉易得, 因此是一种优良的抗氧化修饰剂。

3.5 其他

整理文献发现, NRs 还可与稀土金属离子、杂

环类化合物等相结合得到不同类型的新型 NRs 衍生物。稀土金属离子具有独特的光学性质, 它们的强旋轨耦合特征导致明显的磁各向异性, 使其成为多功能材料领域的“明星”。近年来, 氮氧自由基-稀土配合物的研究受到越来越多的国内外研究者的重视, 如 Wang 等^[37]以吡啶取代的 2-(2-吡啶基-3-甲基)-4,4,5,5-四甲基氧化咪唑啉-3 氧化-1-氧基自由基 (NITMePy) 与稀土 Dy(III) 的六氟乙酰丙酮 (hfac) 盐反应, 合成了一种新的氮氧自由基-稀土配合物 $[\text{Dy}(\text{hfac})_3(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot (\text{NITMePy})$ 。环类化合物在自然界中分布广泛, 其独特的结构和性质凸显出的巨大优势, 使其在化学、生物医药等多个领域都得到了广泛应用。将 NRs 和杂环类化合物相结合也是寻求新型活性物质的主要手段之一。Hideg 等^[38]在前期对氮氧结构和杂环化合物相结合获取新的化合物的基础上, 以容易获得的顺磁性五元、六元酮及吡咯醛为原料, 采用经典的杂环合成和 Pd 催化反应合成了一系列自旋标记的杂环类化合物, 如顺磁性咪啉、苯并咪啉、吡咯、噁唑、苯并咪唑、噻二唑等, 该方法也可用于顺磁性配体的合成。

4 新型氮氧自由基的合成

NRs 本身具有广泛的生物活性, 对其进行结构修饰改善其结构缺陷, 是提高其生物活性获得新药物的主要方法。近年来学者们围绕 NRs 结构修饰开展了大量研究且成果丰硕。该方面的研究主要针对二烷基氮氧自由基和咪唑类氮氧自由基, 主要手段有在其结构中增加碳链长度, 对芳环上的取代基的进行修饰等。

二烷基氮氧自由基中最具代表性的即 TEMPO, 围绕 TEMPO 进行结构修饰得到新型 NRs 的研究相对较少, Wang 等^[39]以羟基酸和 1-氧基-4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶 (Tempol) 为原料, 设计合成得到 3 种 Tempol 类氮氧自由基。咪唑类氮氧自由基最具代表的是 4,4,5,5-四甲基-2-咪唑啉-1-氧基-3-氧化物 (NIT), 与 TEMPO 相比, 对 NIT 进行化学结构修饰显得更为容易, 也得到一些新型 NRs 衍生物。芳环上的取代基是影响 NIT 生物活性主要因素, 对 NIT 进行结构修饰过程中发现了一种新的氮氧自由基 HPN。Jing 等^[40]为了对 HPN 进行结构优化, 向 HPN 结构中引入了不同碳原子的烷基链, 以改变其油水分配系数, 合成了一系列新的硝基氮

氧化物自由基 HPN-C2, HPN-C4, HPN-C6、HPN-C8 (表 3), 并发现 HPN-C6 对急性低压低氧小鼠模型脑损伤的具有良好的保护作用。Yang 等^[41]以 NRs 和不同长链二溴代烷烃为原料, 通过取代反应在 HPN 分子中连接了 C2-C8 的长链烷烃, 得到了双取代的 NRs 衍生物。Wang 等^[42]以 4-羟基苯甲醛, *N,N'*-二羟基-2,3-二甲基-2,3-丁二胺为原料, 合成对羟基苯硝基 NRs, 并取代三聚氯氰的两个氯原子进而合成了一种稳定的新型硝基氮氧自由基 NRbt (见表 3)。

此外, 还有其他一些新型 NRs 相继被合成, 如 Wang 等^[39]以 2-硝基丙烷和各种醛类化合物为原料, 制备得到 12 种咪唑类 NRs, 结果发现 1-(3,4-二羟基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧化-1-氧基自由基 (N5) 具有较好的抗氧化活性。Xue 等^[17,43]以 2-硝基丙烷为原料, 经烷基化、还原、缩合及氧化等

步骤, 合成 18 种咪唑类 NRs 作用, 其中 1-(3,4-二羟基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧化-1-氧基自由基 **4a** 和 1-(3,5-二溴-4-羟基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧化-1-氧基自由基 **4i** 具有较好的抗肿瘤活性。He 等^[44]以 2,4-dimethoxybenzaldehyde, 2-nitropropane 及 NITR 等为原料制备了一种新型硝基 NRs 化合物 2-(2,4-dimethoxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, 发现该新型硝基氮氧自由基是一种有效的抗氧化剂, 也是一种可应用于临床的潜在治疗药物。

5 结论及展望

氮氧自由基是一种结构中含有 N-O·基团和未配对电子的特殊的氮杂环, 具有多方面的作用和生物活性。对于氮氧自由基的研究一直备受研究者所关注, 尤其是在生物医药方面, 围绕氮氧自由基

表 3 新型氮氧自由基的结构

原氮氧自由基	新型氮氧自由基结构式	结构类型	参考文献
		Tempol类氮氧自由基	[37]
		不同碳原子的烷基链氮氧自由基	[38]
		长链烷烃双取代的氮氧自由基	[39]
		硝基氮氧自由基	[40]
		咪唑类氮氧自由基	[15]
		咪唑类氮氧自由基	[15]

开展了广泛而又深入的研究。氮氧自由基具有相对分子质量低、结构稳定且易于修饰、水溶性较好、无毒、不会对细胞产生免疫反应、容易通过细胞膜扩散等优点, 同时自身生物活性突出, 因此被认为是一种具有显著结构优势的活性中间体。近年来, 针对氮氧自由基结构修饰和衍生化的研究发现, 在其结构中引入烷基链等结构可获得具有显著生物活性的新型氮氧自由基, 同时将氮氧自由基与中药活性成分、临床药物等高效结合, 有效地提高了药物的治疗作用, 也降低了毒性、耐药性等, 尤其将氮氧自由基自旋标记于抗癌药物, 不仅可以增强其抗癌活性, 还降低了母体化合物不良反应, 被自旋标记后的化合物因引入氮氧自由基而溶解性得到了改善, 使药物更易穿过细胞膜到达疾病部位。

中药在疾病治疗过程中扮演着重要角色, 有效成分是中药发挥治疗作用的主要物质, 目前已经从中药中发现和分离出了大量的有效成分。有效成分在发挥生物活性的同时, 随着对其研究的深入, 发现部分成分因结构的差异也存在一些缺点, 如不良反应强, 极性较大使得其在体内代谢加快, 口服生物利用度低, 亲水性差致难以有效吸收, 结构不稳定等, 这将制约其在临床上得到有效利用。从陈耀祖等对传统鬼臼类中药中有效成分鬼臼毒素等进行氮氧自由基自旋标记, 进而得到低毒高效的抗肿瘤药物的研究开始, 近几年人们相继开展了对中药虎杖中白藜芦醇、喜树中喜树碱等新型自旋标记的氮氧自由基衍生物的研究, 解决了这些中药有效成分存在不良反应及耐药性等众多问题。可见, 氮氧自由基结构优势突出, 受对其进行结构修饰及衍生化等一系列研究的启发, 根据药效团拼合原理等理论, 将氮氧自由基引入中药化学成分对其进行结构修饰, 可能会起到增效减毒的作用, 这一研究思路为寻找新药物提供了可能, 也为开发利用中药有效成分提供新方法, 值得在中药的研究过程中借鉴和推广。

References

- [1] Haugland MM, Lovett JE, Anderson EA. Advances in the synthesis of nitroxide radicals for use in biomolecule spin labelling[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(3): 668-680.
- [2] Lewandowski M, Gwozdziński K. Nitroxides as antioxidants and anticancer drugs[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(11): 2490.
- [3] Griesser M, Shah R, van Kessel AT, *et al.* The catalytic reaction of nitroxides with peroxy radicals and its relevance to their cytoprotective properties[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(10): 3798-3808.
- [4] Abe M. Diradicals[J]. *Chem Rev*, 2013, **113**(9): 7011-7088.
- [5] Zhang JQ. Synthesis, anti-cancer and antioxidation activities studies of stable nitroxyl radicals spin-labeled podophyllotoxin derivatives(稳定氮氧自由基自旋标记的鬼臼类化合物的合成及抗癌、抗氧化活性研究)[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010.
- [6] Rajca A, Wang Y, Boska M, *et al.* Organic radical contrast agents for magnetic resonance imaging[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(38): 15724-15727.
- [7] Yamada K, Mito F, Matsuoka Y, *et al.* Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals[J]. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(8): 608-613.
- [8] Soikkeli M, Horkka K, Moilanen JO, *et al.* Synthesis, stability and relaxivity of TEEPO-met: an organic radical as a potential tumour targeting contrast agent for magnetic resonance imaging[J]. *Molecules*, 2018, **23**(5): 1034.
- [9] Wang SY, Li MH, Xue SS, *et al.* Progress in application of nitroxide radicals[J]. *Chemistry* (化学通报), 2017, **80**(11): 1002-1008.
- [10] Zhang XH, Yang ST, Wang SP. Rare earth complexes with nitroxide radicals[J]. *Prog Chem*, 2008, **20**(7/8): 1073-1089.
- [11] He Y, Zhang G, Tian M, *et al.* Preparation and catalytic degradability of NIT-Ph-p-BEN nitroxide radical[J]. *Fine Chem* (精细化工), 2021, **38**(12): 2552-2557.
- [12] Shao J, Yang Y, Ma HP, *et al.* Biological activities of imidazole nitroxide radical compounds: research advances[J]. *J Int Pharm Res* (国际药学研究杂志), 2019, **46**(3): 182-187.
- [13] Liang J, Li XL, Qin XY, *et al.* Research progress of biological activities of nitroxide radical compounds[J]. *Chem Reag* (化学试剂), 2020, **42**(12): 1430-1437.
- [14] Poon JF, Zilka O, Pratt DA. Potent ferroptosis inhibitors can catalyze the cross-dismutation of phospholipid-derived peroxy radicals and hydroperoxy radicals[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(33): 14331-14342.
- [15] Xu WL, Yue J, Yuan H, *et al.* Application of nitroxide radicals in radiation protection[J]. *Carcino Terato Muta*(癌变 畸变 突变), 2015, **27**(6): 490-492.
- [16] Jin Y, Liu J, Chen SW, *et al.* Synthesis and biological evaluation of spin-labeled chalcones[J]. *J Lanzhou Univ Med Sci*(兰州大学学报 医学版), 2013, **39**(1): 23-26.
- [17] Xue SS. Design, synthesis of imidazole-based nitronyl nitroxide radicals and researches on their antioxidant activities and antitumor activities(咪唑类氮氧自由基的设计合成及其抗氧化损伤与抗肿瘤活性研究)[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2016.

- [18] Liu YY. Antiangiogenic effect of 4-isothiocyanate-2, 2, 6, 6-tetramethyl piperidinoxyl and its mechanisms(4-异硫氰酸酯-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氮氧自由基抗血管生成作用及机制研究)[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011.
- [19] Chen X, Xing SJ, Li WG, *et al.* The cooperative antitumor effects of GP1 and DOX[J]. *J Lanzhou Univ Med Sci*(兰州大学学报 医学版), 2001, **1**(1): 1-2.
- [20] Jia YJ. The Design, synthesis of structures of nitronyl nitroxide radicals drugs and their preliminary pharmacodynamic research(氮氧自由基药物结构设计合成及初步药效学研究)[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2014.
- [21] Zhang TX. The study of nitroxide radical-ferroferric oxide hybrid nanoparticles in the diagnosis and treatment of tumor autophagy(氮氧自由基-四氧化三铁杂化纳米粒子在肿瘤自噬诊疗中的研究)[D]. Nanjing: Nanjing University, 2021.
- [22] Chen YZ, Wang YG, Li JX, *et al.* Anticancer drugs. II. Synthesis and biological evaluation of spin labeled derivatives of podophyllotoxin[J]. *Life Sci*, 1989, **45**(26): 2569-2575.
- [23] Wang DW, Guo FX, Dang XL. The single intravenous injection half-life of GP1 in mice[J]. *J Lanzhou Med Col* (兰州医学院学报), 1997, **23**(3): 3-7.
- [24] Zhang ZW, Zhang JQ, Hui L, *et al.* First synthesis and biological evaluation of novel spin-labeled derivatives of deoxy-podophyllotoxin[J]. *Eur J Med Chem*, 2010, **45**(4): 1673-1677.
- [25] Jin Y, Chen SW, Tian X. Synthesis and biological evaluation of new spin-labeled derivatives of podophyllotoxin[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, **14**(9): 3062-3068.
- [26] Kou L, Wang MJ, Wang LT, *et al.* Toward synthesis of third-generation spin-labeled podophyllotoxin derivatives using isocyanide multicomponent reactions[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, **75**: 282-288.
- [27] Zhang JQ, Zhang ZW, Hui L, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel spin-labeled derivatives of podophyllotoxin[J]. *Nat Prod Commun*, 2010, **5**(2): 241-244.
- [28] Zhang JQ, Zhang ZW, Hui L, *et al.* Novel semisynthetic spin-labeled derivatives of podophyllotoxin with cytotoxic and antioxidative activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(3): 983-986.
- [29] Liu YQ, Tian X, Yang L, *et al.* First synthesis of novel spin-labeled derivatives of camptothecin as potential antineoplastic agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2008, **43**(11): 2610-2614.
- [30] Zhao XB, Wu D, Wang MJ, *et al.* Design and synthesis of novel spin-labeled camptothecin derivatives as potent cytotoxic agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, **22**(22): 6453-6458.
- [31] Chu YF, Yu HY, Yang Q, *et al.* Research progress on the role and mechanism of resveratrol in osteoarthritis[J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2022, **28**(9): 1351-1355.
- [32] Luo GY, Sun LL, Li H, *et al.* The potent radioprotective agents: novel nitronyl nitroxide radical spin-labeled resveratrol derivatives[J]. *Fitoterapia*, 2021, **155**: 105053.
- [33] Liu YQ, Ohkoshi E, Li LH, *et al.* Design, synthesis and cytotoxic activity of novel spin-labeled rotenone derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(2): 920-923.
- [34] Thomas K, Moody TW, Jensen RT, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of hybrid nitroxide-based non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **147**: 34-47.
- [35] Yang LC, Shao J, Zhao T, *et al.* Design, synthesis and anti-hypoxia activity of nitronyl nitroxide HPN glucoside[J]. *Chem Res* (化学研究), 2020, **31**(5): 421-424.
- [36] Qi DL, Wang D, Li Q, *et al.* Preparation and antioxidation of hemoglobin site-specifically modified by TEMPO[J]. *Fine Chem* (精细化工), 2017, **34**(8): 854-857,874.
- [37] Wang XL, Zhang HW, Liu DF, *et al.* Synthesis, structure and optical properties of a novel lanthanide complex based on nitroxide radical[J]. *Chin J Synth Chem* (合成化学), 2022, **30**(4): 294-298.
- [38] Hideg K, Kálai T, Bognár B, *et al.* Synthesis of new, paramagnetically modified heterocycles[J]. *Synthesis*, 2006, **2006**(15): 2573-2579.
- [39] Wang SY. Design, synthesis and biological activity evaluation of new nitronyl nitroxide radicals and Schiff bases derivatives(新型氮氧自由基和席夫碱类药物的设计合成及其生物活性研究)[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2017.
- [40] Jing LL, Huang YR, Ma HP, *et al.* A novel nitronyl nitroxide radical HPN-C₆ attenuates brain damage in an acute hypobaric hypoxia mouse model through inhibition of the oxidative stress[J]. *Neurosci Lett*, 2022, **782**: 136650.
- [41] Yang Y, Shao J, Jing LL, *et al.* Synthesis and anti-hypoxia activity of new nitronyl nitroxide radical HPN derivatives[J]. *Med Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军医药杂志), 2019, **31**(5): 1-4.
- [42] Wang HB, Wang J, Yang Q, *et al.* Synthesis of a novel nitronyl nitroxide radical and determination of its protective effects against infrasound-induced injury[J]. *Neurochem Res*, 2015, **40**(7): 1526-1536.
- [43] Xue SS, Qin XY, Sun XL, *et al.* Study on synthesis and scavenging activity of DPPH free radical by imidazole nitronyl nitroxide radicals[J]. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2016, **16**(14): 2612-2617.
- [44] He SM, Lei YH, Wang JM, *et al.* The protective effect of nitronyl nitroxide radical on peroxidation of A549 cell damaged by iron overload[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, **108**: 110189.