

达下降。NF- κ B 的活性由 PI3K/Akt 正面调节^[6], 而磷酸化是 Akt 活性的表现。通过 Western blot, 观察到在 TPL 处理后, 细胞 Akt 的磷酸化水平下降, 与 NF- κ B 的活性下降一致。根据最新的研究结果, TPL 可通过降解截短的类视色素 X 受体 α (tRXR α) 发挥抑制 Akt 的作用^[7]。

总之, 本研究显示 TPL 可逆转 A549/DDP 细胞多药耐药性, 其机制可能通过抑制 Akt/NF- κ B 的活性, 从而下调 MDR1 和 LRP 等多药耐药蛋白的表达, 增加药物在肿瘤细胞内的浓度。这项研究支持 TPL 在临床上与化疗药物联合使用治疗肺癌。

REFERENCES

- [1] DELA CRUZ C S, TANOUE L T, MATTHAY R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention [J]. Clin Chest Med, 2011, 32(4): 605-644.
- [2] CHEN Y W, LIN G J, CHUANG Y P, et al. Triptolide

- circumvents drug-resistant effect and enhances 5-fluorouracil antitumor effect on KB cells [J]. Anti Cancer Drugs, 2010, 21(5): 502-513.
- [3] SHI X, JIN Y, CHENG C, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in STI571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(5): 1686-1697.
- [4] MUNIĆ V, KELNERIĆ Z, MIKAC L, et al. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1(ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays [J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 41(1): 86-95.
- [5] IOSEF C, ALASTALO T P, HOU Y, et al. Inhibiting NF- κ B in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(10): L1023-1036
- [6] SAFAYA S, STEINBERG M H, KLINGS E S. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Immunol, 2012, 50(1-2): 117-123.
- [7] LU N, LIU J, LIU J, et al. Antagonist effect of triptolide on AKT activation by truncated retinoid X receptor-alpha [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35722.

收稿日期: 2013-02-11

新型脂肪酰胺水解酶抑制剂的设计、合成和活性评价

王中奎, 李燕婷, 赵东升, 韩大雄* (厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 目的 设计合成新型的脂肪酰胺水解酶(FAAH)抑制剂, 并对其活性进行评价。方法 通过已有 FAAH 酶抑制剂的结构和活性构建药效团模型, 对部分 ZINC 数据库粗筛; 通过与 FAAH 酶分子对接, 对粗筛所获得的小分子化合物的活性进行打分评价, 确定拟合成目标化合物的母核结构(2-氧代苯并吡喃-7-酯); 采用酰化、缩合反应, 合成系列目标化合物; 通过体外酶抑制活性实验检测其活性。结果 化合物(±)-2-(2-苯氧基乙酰基氨基)-丙酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2b**)的 IC₅₀ 值为 95.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (±)-1-(2-苯氧基-乙酰基)-吡咯烷-2-羧酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2g**)的 IC₅₀ 值为 17.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有较好的抑制 FAAH 酶活性的作用。结论 活性化合物的结构与目前报道的脂肪酰胺水解酶抑制剂结构差异较大, 有望成为新类型先导化合物。

关键词: 脂肪酰胺水解酶抑制剂; 计算机辅助药物设计; 合成; 活性测定

中图分类号: TQ464.8

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0031-06

Design, Synthesis and Enzyme Assay of Novel Fatty Acid Amide Hydrolase(FAAH) Inhibitors

WANG Zhongkui, LI Yanting, ZHAO Dongsheng, HAN Daxiong* (School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discover novel fatty acid amide hydrolase inhibitors and evaluate their enzymatic activity. **METHODS** The pharmacophore model was based on the compounds carefully selected from the published literatures. This model was used to screen part of ZINC Nature Products database to get a series of compounds which were used to do a superimposition analysis of the FAAH X-ray crystal structure. Through the virtual screening and the structure-activity analysis of the compounds published in the literatures, the hitting compound structure(2-oxygen-benzo pyran-7-ester) was selected to do the transformation. The acylation and condensation reactions were used to get a series of novel compounds. The enzymatic activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373407); 福建省自然科学基金项目(2013J01386)

作者简介: 王中奎, 男, 硕士 Tel: 18030179806 E-mail: wzk19870512@sina.com *通信作者: 韩大雄, 男, 博士, 副教授 Tel: (0592)2188681 E-mail: daxiong@xmu.edu.cn

was tested by LC-MS *in vitro*. **RESULTS** Compounds ($\pm$)-2-(2-phenoxy-acetyl-amino)-propionic acid 2-oxo-2H-chromen-7-yl ester (**2b**) (IC_{50} 95.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and ($\pm$)-1-(2-phenoxy-acetyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid 2-oxo-2H-chromen-7-yl ester (**2g**) (IC_{50} 17.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) showed good inhibition to FAAH in enzyme assay. **CONCLUSION** The compounds which have been discovered are different from other FAAH inhibitors and worthy of further study as a lead compound.

KEY WORDS: fatty acid amide inhibitors; computer-acid drug design; synthesis; enzyme assay

脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)是一种内膜酰胺信号家族蛋白酶, 是生物体内许多具有生物活性的脂肪酰胺信使脂质分子(fatty acid amides, FAAs)的主要催化水解代谢酶^[1]。研究表明 FAAH 参与了多种信号通路的调控, 与疼痛、焦虑、睡眠紊乱等多种疾病的发生发展具有密切的关系。当前基于 FAAH 信号通路治疗疼痛^[2]、抑郁^[3]已成为一个研究热点。

迄今为止, 各种结构的 FAAH 抑制剂被依次发现, 包括 α -酮杂环类抑制剂^[4]、氨基甲酸酯类抑制剂^[5]、脲衍生物类抑制剂^[6-7]等。由于 FAAH 结构与人体内的其他酶蛋白结构具有相似性, 导致这些抑制剂选择性较差, 不良反应较多, 极大的限制了其最终成药的可能性, 因此, 新型结构的 FAAH 抑制剂有待发现。哺乳动物的 FAAH 主要分为 3 个区: 一个 N-端跨膜转运区, 一个丝氨酸-甘氨酸富集区和一个富含脯氨酸的活性位点区^[8]。Mileni 等^[9]于 2009 年报道了 OL-135 小分子化合物与 FAAH 复合晶体结构, 在晶体结构中, OL-135 的苯环和疏水尾部与 FAAH 结构中的芳香性残基 Phe381、Phe432 和疏水性残基 Met436、Met495 互相作用, 形成一个疏水空腔, 同时, 具有催化活性的 Ser241 进攻 OL-135 的羰基碳形成共价键, 从而抑制 FAAH 对脂肪酰胺脂质分子的水解作用。本实验基于 FAAH 晶体结构解析数据, 开展了计算机辅助药物设计, 并针对设计化合物的结构特点, 经过逆合成分析, 利用苯氧乙酸、氨基酸、7-羟基香豆素合成出系列化合物。

1 材料和方法

1.1 仪器

WRR 熔点仪(上海申光); ADVANCE III 400 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker); 6300 系列 LC/MS 离子阱质谱仪(Agilent 公司); THZ-312 型台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司)。分子模拟的硬件: 联想深腾 1800 服务器(联想); 软件: Discovery Studio 2.0(Accelrys 公司)、Sybyl7.3 (Tripos 公司)。

1.2 药品与试剂

合成化合物所用药品、试剂和溶剂均为市售分

析纯, 如无特殊说明均未经进一步处理; 花生四烯酸乙醇胺(AEA, Avanti 公司, 批号: D00870430); 胎牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA, 索莱宝公司, 批号: D00096763); 17:0 脂肪酸内标(美国加州大学欧文分校惠赠); 色谱甲醇(美国 Tedia 公司, 批号: WXBB1331V)。

1.3 化合物虚拟筛选

选取 21 个典型的 FAAH 抑制剂, 采用 Discovery Studio 2.0 软件构建 3D-QSAR 药效团模型, 模型参数见表 1, 模型见图 1。

表 1 药效团模型参数

Tab 1 Parameters of pharmacophore model

模型	相关系数	均方根	总耗值	相对耗值	排斥体积
Hypo-1	0.926	1.47	106.63	112.09	2

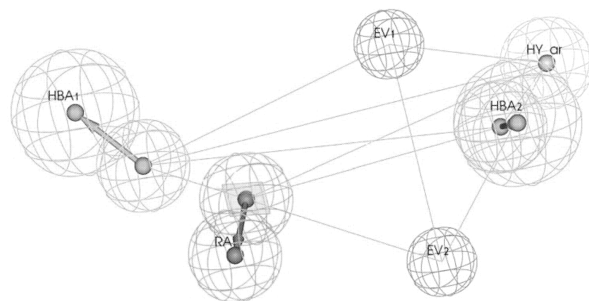


图 1 Hypo-1 药效团模型

Fig 1 The Hypo-1 pharmacophore model

下载 Zinc Natural Products 数据库(2008.05)^[10]中的 93 527 个小分子组成配体库。为了考虑分子的柔性, 配体化合物均采用“Diverse Conformation Generation”模块生成多构象。随后采用“Ligand Pharmacophore Mapping”模块粗筛, 得到 1 264 个化合物^[11]。

从 PDB 数据库中下载 FAAH 复合物晶体结构 PDB ID: 2WJ2。晶体 2WJ2 为 FAAH 的二聚体, 选取 A 链, 经过删除冗余的残基构象、为残基加氢、加电荷等操作获得 FAAH 晶体模型。采用软件 Sybyl 7.3 中的 Surflex-dock 模块, 将 1 264 个化合物与 FAAH 晶体对接, 有 73 个小分子的预测活性高于 FAAH 原配体 OL-135 的活性。经过逆合成分析, 选取具有苯并吡喃结构的 ZINC12896025

(ZINC12896025 与 FAAH 晶体对接打分为 9.55, 远高于 OL-135 与 FAAH 晶体对接的打分为 8.09) 作为母核进行改造, 晶体对接图见图 2。

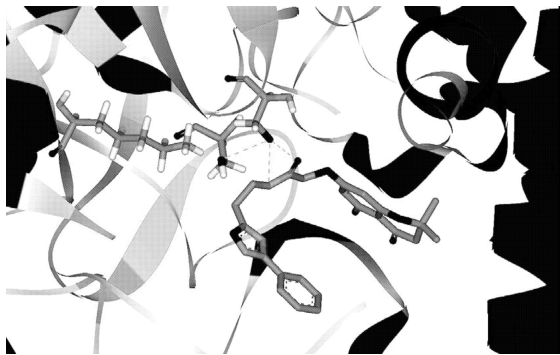


图 2 ZINC12896025 与 FAAH 晶体对接图
Fig 2 Docking result between ZINC12896025 and FAAH

对 ZINC12896025 与 FAAH 晶体的对接结构进行分析, 发现 ZINC12896025 具有以下结构特征: 含 2 个氢键受体特征(HBA1 和 HBA2)、一个芳香环特征(RA)、一个芳香性疏水特征(HY_ar)和 2 个排斥体积。参考以上特点, 本实验设计出 8 个 2-氧代苯并吡喃-7-酯类化合物进行合成, 目标化合物的结构及合成分别见表 2 和图 3。

表 2 目标化合物的结构
Tab 2 The structures of target compounds

编号	aa	化合物结构
2a	Gly	
2b	L-Ala	
2c	L-Val	
2d	L-Leu	
2e	L-Ile	
2f	L-Phe	
2g	L-Pro	
2h	L-Met	

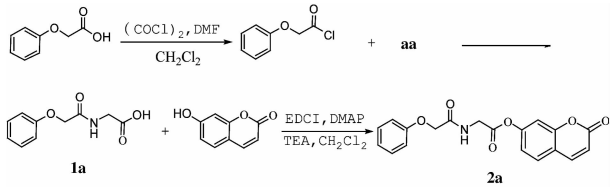


图 3 目标化合物的合成
Fig 3 Synthesis of target compounds

1.4 合成

目标化合物的合成用苯氧乙酸与草酰氯为原料, 生成苯氧乙酰氯后与 L-氨基酸反应, 得到苯氧乙酰化的氨基酸衍生物, 将产物与 7-羟基香豆素缩合生成 2-氧代苯并吡喃-7-酯类衍生物。

1.4.1 (2-苯氧基-乙酰基氨基)-乙酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(2a)的制备 取苯氧乙酸 1 g(6.5 mmol)溶解于 5 mL 二氯甲烷中, 冰浴搅拌下加入草酰氯 1 mL(11.8 mmol), 再加入一滴N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 反应 2 h, 旋蒸除去未反应的草酰氯。将产物溶解于 3 mL 丙酮中, 取甘氨酸 0.49 g(6.5 mmol)溶解于 4 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液中, 冰浴下将氢氧化钠溶液加入丙酮溶液中, 于-20 °C 下反应 1 h。后用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸将反应调至 pH 1.5, 用饱和食盐水洗涤 3 次, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压蒸馏得 1a。

将 7-羟基香豆素 1.05 g(6.5 mmol), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(DMAP) 1.25 g(6.5 mmol), 4-二甲氨基吡啶 0.09 g(0.65 mmol), 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入 1a, 加入三乙胺 0.9 mL(6.5 mmol), 室温搅拌 48 h^[12]。反应液用 2 mol·L⁻¹ 盐酸调至 pH 5, 用饱和食盐水洗涤 3 次, 后用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压蒸干, 经硅胶柱层析(石油醚: 乙酸乙酯=2: 1 为洗脱剂)纯化, 得白色粉末状固体 2a(1.42 g, 收率 61%)。Mp. 101~104 °C。ESI-POS-MS(m/z): 354.3 [M+H]⁺。 ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 4.24(d, J=5.4 Hz, 2H), 4.61(s, 2H), 6.50(d, J=9.5 Hz, 1H), 6.99(m, 3H), 7.15(dd, J=8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.26(d, J=1.0 Hz, 1H), 7.30(t, J=7.9 Hz, 3H), 7.80(d, J=8.5 Hz, 1H), 8.09(d, J=9.5 Hz, 1H), 8.72(t, J=5.4 Hz, 1H)。

1.4.2 (±)-2-(2-苯氧基乙酰基氨基)-丙酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(2b)的制备 参照化合物 2a 的制备

方法, 原料采用 L-丙氨酸(6.5 mmol), 得白色固体 **2b**(1.04 g, 收率 43%)。Mp. 122~125 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 368.4[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = -0.4 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.53(d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 4.54(m, 2H), 4.66(s, 2H), 6.53(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.94(m, 3H), 7.17(dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.29(d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.36(t, *J* = 7.9 Hz, 3H), 7.80(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.19(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.72(t, *J* = 5.4 Hz, 1H)。

1.4.3 (±)-3-甲基-2-(2-苯氧基-乙酰基氨基)-丁酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2c**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料采用 L-缬氨酸(6.5 mmol), 得白色粉末状固体 **2c**(1.43 g, 收率 55%)。Mp. 97~101 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 396.4[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = -0.2 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.02(d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 2.31(dq, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 4.46(dd, *J* = 7.4, 6.4 Hz, 1H), 4.67(d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 6.50(d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.92~6.98(m, 3H), 7.11(dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.21(d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.28(dt, *J* = 8.9, 7.2 Hz, 2H), 7.80(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.09(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.60(d, *J* = 7.5 Hz, 1H)。

1.4.4 (±)-4-甲基-2-(2-苯氧基乙酰基氨基)-戊酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2d**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料 L-亮氨酸(6.5 mmol), 得白色固体 **2d**(1.24 g, 收率 46%)。Mp. 105~108 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 410.4[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = -0.2 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 0.91(d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.9(d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.63~1.78(m, 2H), 1.81~1.89(m, 1H), 4.55~4.61(m, 1H), 4.62(d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.50(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.92~7.00(m, 3H), 7.10(dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.21(d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.28(dt, *J* = 1.0, 3.4 Hz, 2H), 7.79(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.08(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.74(d, *J* = 7.2 Hz, 1H)。

1.4.5 (±)-3-甲基-2-(2-苯氧基-乙酰基氨基)-戊酸-2-氧代-2H-苯并吡喃-7-酯(**2e**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料采用 L-异亮氨酸(6.5 mmol), 得白色固体 **2e**(1.43 g, 收率 53%)。Mp. 113~115 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 410.4[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = +2.2 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物

为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 0.92(td, *J* = 7.4, 1.76 Hz, 3H), 1.00(dd, *J* = 6.7, 3.01 Hz, 3H), 1.18~1.35(m, 1H), 1.38~1.62(m, 1H), 2.00~2.20(m, 1H), 4.50(t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.65~4.72(m, 3H), 6.50(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.92~6.98(m, 3H), 7.11(ddd, *J* = 9.6, 8.34, 2.1 Hz, 1H), 7.21(dd, *J* = 14.5, 2.2 Hz, 1H), 7.27(dd, *J* = 8.6, 7.4 Hz, 2H), 7.79(dd, *J* = 8.5, 1.00 Hz, 1H), 8.09(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.56(dd, *J* = 1.0, 1.0 Hz, 1H)。

1.4.6 (±)-2-(2-苯氧基-乙酰基氨基)-3-苯基丙酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2f**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料采用 L-苯丙氨酸(6.5 mmol), 得淡黄色粉末状固体 **2f**(0.90 g, 收率 31%)。Mp. 222~225 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 444.4[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = +0.5 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 2.21(d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.54(m, 2H), 4.61(s, 2H), 6.50(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.99(m, 3H), 7.15(dd, *J* = 8.5, 3.4 Hz, 1H), 7.21(m, 4H), 7.33(m, 6H), 7.73(d, *J* = 8.53 Hz, 1H), 8.01(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.69(t, *J* = 5.4 Hz, 1H)。

1.4.7 (±)-1-(2-苯氧基-乙酰基)-吡咯烷-2-羧酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2g**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料采用 L-脯氨酸(6.5 mmol), 得白色固体 **2g**(2.02 g, 收率 78%)。Mp. 179~183 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 394.3[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = -0.9 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.91~2.20(m, 4H), 3.63~3.76(m, 1H), 4.57(dd, *J* = 8.5, 5.0 Hz, 1H), 4.66(s, 2H), 6.49(d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.91~6.93(m, 3H), 7.20(d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.27(s, 1H), 7.28~7.32(m, 2H), 7.78(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.08(d, *J* = 9.7 Hz, 1H)。

1.4.8 (±)-4-甲基硫烷基-2-(2-苯氧基-乙酰基氨基)-丁酸-2-氧代苯并吡喃-7-酯(**2h**)的制备 参照化合物 **2a** 的制备方法, 原料采用 L-蛋氨酸(6.5 mmol), 得白色固体 **2h**(1.52 g, 收率 64%)。Mp. 107~109 °C。ESI-POS-MS(*m/z*): 428.3[M+H]⁺。旋光值 [α]_D²¹ = -0.2 (*c* = 5 mg·mL⁻¹, CHCl₃), 化合物为外消旋体。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆, δ): 2.07(s, 4H), 2.11~2.27(m, 3H), 2.54~2.65(m, 2H), 4.63(d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 4.67~4.74(m, 1H), 6.50(d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.95~7.00(m, 3H), 7.12(dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz,

1H), 7.24(d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.26~7.31(m, 2H), 7.79(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.08(d, $J=9.5$ Hz, 1H), 8.80(d, $J=7.5$ Hz, 1H)。

1.5 体外酶活性测试

采用液质联用的方法检测目标化合物在体外对 FAAH 的抑制活性。

FAAH 酶反应：配制 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷醋酸盐缓冲液(pH 7.4); 0.05% 牛血清白蛋白; $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AEA 底物; $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 目标化合物的 DMSO 溶液; $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ FAAH 酶溶液。依次加入上述试剂于缓冲液中, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床摇晃反应 30 min 后, 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含有 $1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脂肪酸(17:0)作为内标的甲醇溶液终止反应^[13]。

FAAH 的水解产物检测条件：液相色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} 柱($4.6\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, 1.8 mm); 柱温保持在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$; 流动相 A: 水(含 0.25% 醋酸和 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵), 流动相 B: 甲醇(含 0.25% 醋酸和 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵), 流速 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 95% B 洗脱 4 min; 质谱为 ESI 负离子源; 干燥气为 N_2 ; 温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 帘气 137.9 kPa ; 扫描质量范围 $50\sim 400$ 。对 FAAH 水解产物花生四烯酸 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ $m/z=303$ 进行定量分析。

抑制率检测方法：FAAH 可以催化 AEA 水解产生花生四烯酸, 加入抑制剂后, 这个反应将受到抑制。本实验首先不加入抑制剂时, 利用质谱测得水解产生的花生四烯酸峰的丰度; 在加入抑制剂后, 再次检测水解产生的花生四烯酸峰的丰度, 利用加入抑制剂前后花生四烯酸的丰度比来检测合成的抑制剂对 FAAH 催化 AEA 反应的抑制率。

2 结果与讨论

目标化合物在浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的抑制率及抑制率 $>50\%$ 的化合物 **2b** 和 **2g** 的半数抑制浓度(IC_{50})值见表 3。

表 3 化合物浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的抑制率

Tab 3 Inhibition rate of compounds in $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

化合物	抑制率/%	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
2a	43.14	—
2b	54.93	95.24
2c	15.03	—
2d	48.26	—
2e	13.94	—
2f	24.74	—
2g	85.28	17.34
2h	28.95	—

本研究通过计算机辅助药物设计和合成, 来寻找新结构类型的脂肪酰胺水解酶抑制剂。实验结果表明 2-氧代苯并吡喃-7-酯类衍生物明显抑制 FAAH 酶活性。化合物 **2b** 和 **2g** 的 IC_{50} 分别达到了 $95.24\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.34\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 虽然与经典的 FAAH 抑制剂(OL-135, $\text{IC}_{50}=0.025\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[14] 相比, 活性还有一定差距, 但是可以作为先导化合物进行进一步的改造和优化, 进而为发现具有更高活性和选择性的 FAAH 抑制剂奠定基础。

REFERENCES

- [1] PILLARISSETTI S, ALEXANDER C W, KHANNA I. Pain and beyond: fatty acid amides and fatty acid amide hydrolase inhibitors in cardiovascular and metabolic diseases [J]. Drug Discov Today, 2009, 14(23/24): 1098-1111.
- [2] WALKER J M, KREY J F, CHU C J. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation [J]. Chem Phys Lipids, 2002, 121(5): 159-172.
- [3] SUARDÍAZ M, ESTIVILL-TORRÚS G, GOICOECHEA C, et al. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain [J]. Pain, 2007, 133(1-3): 99-110.
- [4] BISOGNO T, DE P L, DI M V. Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(4): 533-547.
- [5] TARZIA G, DURANTI A, TONTINI A, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamate acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors [J]. J Med Chem, 2003, 46(3): 2352-2360.
- [6] ALEXANDER J P, CRAVATT B F. The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(5): 9699-9704.
- [7] TORII S, MITSUMORI K, INUBUSHI S. The REM sleep-inducing action of a naturally occurring organic bromine compound in the encéphale isolé cat [J]. Psychopharmacologia, 1973, 29(1): 65-75.
- [8] MCKINNEY M K, CRAVATT B F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase [J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74(4): 411-432.
- [9] MILENI M, GARFUNKLE J, DEMARTINO J K, et al. Binding and inactivation mechanism of a humanized fatty acid amide hydrolase by alpha-ketoheterocycle inhibitors revealed from cocrystal structures [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(3): 10497-10506.
- [10] Shoichet Laboratory, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco(UCSF). Zinc Natural Products [DB/OL]. USA. <http://zinc.docking.org/vendor0/npd/index.html>.
- [11] DONG S Z, HAI Y W, ZHI H L, et al. Pharmacophore modeling and virtual screening for the discovery of new fatty acid amide hydrolase inhibitors [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2011, 1(1): 27-35.
- [12] EMILIE A B, LESLEY M, MARIE A, et al. Synthesis of potential prodrug systems for reductive activation. Prodrugs for anti-angiogenic isoflavones and VEGF receptor tyrosine kinase inhibitory oxindoles [J]. Tetrahedron, 2009, 65(25): 4811-4821.

- [13] WU X Y, HAN L J, ZHANG X, et al. Alteration of endocanna-binoid system in human gliomas [J]. J Neurochem, 2012, 120(5): 842-849.

- [14] GUSTIN D J, MA Z, MIN X, et al. Identification of potent, noncovalent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(2): 2492-2496.

收稿日期: 2013-01-09

丹参多酚酸盐注射液对 AECOPD 患者血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 的影响

黄美健¹, 陈文霖² (1. 杭州市第三人民医院, 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究丹参多酚酸盐注射液对慢性阻塞性肺疾病急性加重(acute exacerbations chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)患者血清 8-异前列腺素(8-isoPG)、白介素-18(IL-18)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等的影响。方法 将 60 例 AECOPD 患者随机分为治疗组与对照组, 每组 30 例, 均予以抗感染、化痰、平喘等治疗, 治疗组在此基础上加用丹参多酚酸盐 200 mg 静脉滴注, 1 次·d⁻¹, 共 14 d, 分别在治疗前后行肺功能检查及 CAT 量表评分, 并用 ELISA 法检测治疗前后血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 水平, 并与 30 名健康体检者(正常对照组)血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 水平进行对照。结果 治疗前 2 组患者血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 、第 1 秒用力呼气量/用力肺活量(FEV1/FVC)、FEV1 占预计值百分比及 CAT 评分值差异均不具有统计学意义($P>0.05$); 治疗前 2 组患者血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 明显高于正常对照组($P<0.01$)。治疗后 2 组患者血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 、肺功能、CAT 评分值均有所改善($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 其中治疗组治疗后血清 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 、CAT 评分值与对照组治疗后比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 丹参多酚酸盐注射液可改善 AECOPD 患者临床症状及降低血 8-isoPG、IL-18、IL-1 β 水平, 其作用机制可能与抑制炎症反应和减少氧化应激有关。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病急性加重; 丹参多酚酸盐注射液; 8-异前列腺素; 白介素-18; 白介素-1 β ; 肺功能

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)01-0036-05

Clinical Study on the Effects of Salvianolate Injection on the Levels of Serum 8-isoPG, IL-18 and IL-1 β in Acute Exacerbated Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients

HUANG Meijian¹, CHEN Wenlin² (1. The Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Salvianolate injection on the levels of serum 8-isoPG, IL-18 and IL-1 β in acute exacerbated chronic obstructive pulmonary disease(AECOPD) patients. **METHODS** Sixty patients with AECOPD were randomly assigned to the treatment group and the control group. Routine therapies were given to patients in the control group, while 200 mg Salvianolate injection was given to those in the treatment group by intravenous dripping, once daily for total 14 days. The changes of 8-isoPG, IL-18, IL-1 β , the pulmonary functions and CAT scores were evaluated before and after treatment, which was compared with those of 30 healthy controls. **RESULTS** There were no significant differences in the value of 8-isoPG, IL-18, IL-1 β , FEV1/FVC and FEV1% before treatment between two group($P>0.05$). Compared with the control group, the levels of serum 8-isoPG, IL-18, IL-1 β and CAT scores in patient with AECOPD were increased significantly($P<0.01$). The levels of serum 8-isoPG, IL-18, IL-1 β and CAT scores after treatment was significantly lower than that before treatment($P<0.01$); the levels of 8-isoPG, IL-18, IL-1 β and CAT scores decreased more significantly in the salvianolate group after treatment($P<0.05$). The FEV1% and FEV1/FVC were significantly improved after treatment in two groups($P<0.01$). There were no significant differences between two group in the levels of FEV1% and FEV1/FVC after treatment ($P>0.05$). **CONCLUSION** Salvianolate injection can reduce the levels of 8-isoPG, IL-18 and IL-1 β and improve the clinical symptoms in AECOPD patients, probably by inhibiting inflammatory reaction and reducing the oxidative stress.

KEY WORDS: AECOPD; Salvianolate injection; 8-isoPG; IL-18; IL-1 β ; lung function