

肉桂酰三氮唑化合物的设计、合成及抗阿尔茨海默症活性评价

雷文聚[#], 蔡中颀[#], 谭林杰, 刘蜜敏, 曾利, 孙婷, 易红,
刘睿^{*}, 李卓荣^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 本研究设计、合成 19 个肉桂酰胺/酯三氮唑类化合物, 并对其抗阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 活性进行评价。在 APPswc 细胞模型实验中, 化合物 **4f** 具有良好的抗 A β 介导的神经细胞毒性 ($EC_{50} = 2.03 \pm 2.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和由此引起的 AChE 活性的异常升高 ($IC_{50} = 4.88 \pm 4.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 进一步研究发现, 化合物 **4f** (1、5 和 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可有效改善 β -淀粉样蛋白 1-42 (β -amyloid protein 1-42, A β_{1-42}) 损伤小鼠的空间认知和学习记忆障碍, 通过促进非淀粉样蛋白、抑制淀粉样蛋白途径和 Tau 蛋白磷酸化改善 A β_{1-42} 诱导的神经退行性病变 (实验中所有操作均获得中国医学科学院医药生物技术研究所伦理委员会批准, 批准号: IMB-20220908D701)。化合物 **4f** 作为治疗 AD 的一个有前途的先导物, 本研究为其后续研发提供了理论依据。

关键词: 肉桂酰胺/酯-三氮唑; 设计合成; 乙酰胆碱酯酶; β -淀粉样蛋白; 阿尔茨海默症
中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0150-14

Design, synthesis and anti-Alzheimer's disease activity evaluation of cinnamyl triazole compounds

LEI Wen-ju[#], CAI Zhong-di[#], TAN Lin-jie, LIU Mi-min, ZENG Li, SUN Ting, YI Hong,
LIU Rui^{*}, LI Zhuo-rong^{*}

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Beijing 100050, China)

Abstract: 19 cinnamamide/ester-triazole compounds were designed, synthesized and evaluated for their anti-Alzheimer's disease (AD) activity. Among them, compound **4f** displayed excellent anti- β -amyloid protein (A β)-mediated cytotoxicity ($EC_{50} = 2.03 \pm 2.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in APPswc cells and acetylcholinesterase inhibitor ($IC_{50} = 4.88 \pm 4.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Further study indicated that, at dosages of (1, 5 and 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), compound **4f** was effective in improving spatial learning and memory deficits in A β_{1-42} -impaired mice, which was achieved by promoting the nonamyloidogenic signaling and inhibiting the amyloidogenic pathway, along with the suppression of A β -induced Tau phosphorylation. All animal experiments in this study were approved by the Experimental Animal Care and Use Committee of the Institute of Medicinal Biotechnology (IMB-20220908D701). In conclusion, compound **4f** holds promise as a lead candidate for AD treatment, and the present study lays the foundation for its subsequent development.

Key words: cinnamamide/ester triazole; design and synthesis; acetylcholinesterase; β amyloid protein; Alzheimer's disease

收稿日期: 2024-07-29; 修回日期: 2024-11-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073709).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-67087731, E-mail: liurui@imb.pumc.edu.cn;

Tel: 86-10-63027185, E-mail: lizhuorong@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0724

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以渐进性认知功能减退为特征的神经退行性疾病, 预计到本世纪中叶, AD 患者将达到 1.5 亿^[1]。虽然 AD 的发病机制仍不清楚^[2], 但大量的研究数据显示, 胆碱能缺陷^[3]、Tau 蛋白过度磷酸化^[4]、 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 聚集^[5]、氧化损伤^[6]、谷氨酸相关兴奋毒性^[7]等因素, 在 AD 的发病过程中发挥重要作用, 为药物研发提供一定的理论依据和指导。目前, 临床上使用的抗 AD 药物 (图 1) 包括胆碱酯酶抑制剂、*N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂, 以及近几年批准上市的甘露寡糖类和抗体类新药。他克林 (tacrine) 于 1993 被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于 AD 治疗, 是最早上市的胆碱酯酶抑制剂, 但由于严重的肝脏毒性已经退市^[8]。随后的多奈哌齐 (donepezil)、利斯的明 (rivastigmine) 和加兰他敏 (galantamine) 分别在 1996 年、1998 年和 2001 年上市。因多奈哌齐对乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 具有较高的选择性抑制作用, 且活性优于他克林, 几乎无肝毒性, 对轻度、中度和重度 AD 均有一定效果, 成为临床治疗 AD 的首选药物^[9]。胆碱酯酶抑制剂利斯的明和加兰他敏目前被用于轻度和中度 AD 的治疗^[10,11]。

石杉碱甲 (huperzine A) 是一种从蛇足石杉中提取的茚萜类生物碱, 对 AChE 具有较好的选择抑制活性且半衰期长, 同时对 NMDA 受体有一定的拮抗作用, 因此在 1996 年被我国批准用于治疗 AD^[12]。美金刚胺 (memantine) 于 2002 年在英国上市, 是一种 NMDA 受体拮抗剂, 可以调节谷氨酸递质的传递, 阻止钙离子浓度升高, 拮抗神经细胞的过度兴奋, 对认知障碍和记忆缺失有一定改善作用, 用于中度、重度 AD 患者的治疗^[13]。2019 年 11 月, 国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 正式批准甘露特钠胶囊 (GV-971) 在国内上市, 这是我国原创的治

疗 AD 新药, 其靶点是脑-肠轴。GV-971 取自一种海洋褐藻, 其结构是低分子质量的甘露寡糖二酸^[14]。体内活性研究结果表明, GV-971 能够恢复肠道微生物的正常特征, 降低了苯丙氨酸和异亮氨酸的浓度, 减少脑内 Th1 细胞浸润, 降低小胶质细胞的活化, 从而缓解神经炎症。GV-971 还能够减少 A β 沉积, 降低 Tau 蛋白过度磷酸化, 起到改善认知的功能, 同时在 III 期临床试验患者中也观察到了这种效果^[15]。

尽管新冠肺炎大流行期间临床试验活动暂时放缓, 但 AD 药物的开发仍取得重要进展。2021 年 6 月, 首个靶向 A β 的疾病修饰治疗 (disease-modifying therapies, DMT) 药物 aducanumab 获 FDA 批准。Aducanumab 是首个被批准用于治疗 AD 的高亲和力抗淀粉样蛋白单克隆抗体, 用于治疗轻度认知功能障碍和轻度 AD 患者, 这也是自 2003 年以来再次有抗 AD 药物被美国 FDA 批准上市^[16,17]。随后, 卫材/渤健的另一个 A β 单抗 lecanemab 于 2023 年 1 月通过 FDA 加速批准途径上市。Lecanemab 是一种人源化免疫球蛋白 γ 1 (IgG1) 单克隆抗体, 可选择性结合并消除可溶性的 (原纤维) 聚集蛋白和 A β 。但 lecanemab 目前仅适用于治疗轻度认知障碍或轻度阶段 AD 且已确认存在 A β 病理的患者^[18]。此外, 又一个被寄予希望的 A β 单抗——donanemab 于 2024 年获 FDA 批准, 用于治疗早期症状性 AD^[19]。另有大量的小分子与抗体药物处于不同阶段的临床研究中, 将为 AD 的治疗带来新的希望和机遇^[20]。

AD 不仅损害患者的记忆力^[21], 到了晚期阶段, 甚至会剥夺患者的基本生理功能, 如日常行动能力和自主呼吸能力, 给患者的家庭和社会带来沉重的经济和心理负担^[22,23]。然而, 从 AD 发现至今 100 多年, 尽管有着广泛的研究和大量的相关试验, 现有治疗 AD 的药物大多只能做到缓解症状, 并不能逆转 AD 的发展进程。因此, 面对迫切的临床需求, 开发结构和作用机制新颖的抗 AD 活性药物具有重要意义。

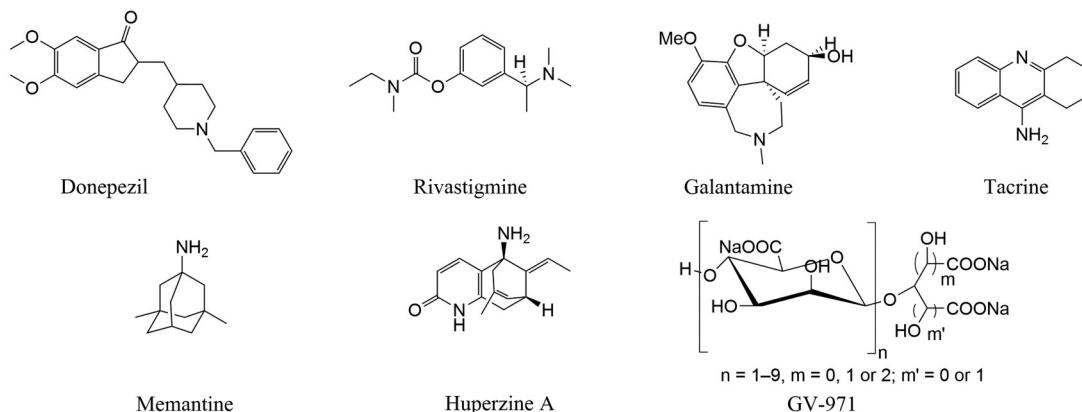


Figure 1 Chemical structures of clinical treatment drugs for Alzheimer's disease (AD)

含有肉桂酰胺/酯三氮唑结构的衍生物具有抗虫^[24,25]、抗炎镇痛^[26]、抗癌^[27-29]和抗AD^[30-34]等诸多药理作用,其中,文献^[35]报道化合物**1**(图2)对 β -淀粉样前体蛋白裂解酶1(β -secretase 1, BACE1)和 $A\beta$ 聚集具有一定的抑制活性,对 H_2O_2 损伤PC12细胞表现出神经保护活性,即化合物**1**可能通过多种机制或功效发挥抗AD作用。基于此,本文在前期研究的基础上^[35],以化合物**1**为先导物,进一步对其进行结构修饰和改造,设计合成一系列新型肉桂酰胺/酯三氮唑化合物(图2),并进行了抗 $A\beta$ 毒性、AChE抑制、小鼠行为学及作用机制等生物活性评价,以期拓展肉桂酰胺三氮唑衍生物的结构类型、筛选具有良好抗AD活性的新化合物。

结果与讨论

1 目标化合物的设计与合成

1.1 目标化合物的设计

文献^[35]报道肉桂酰胺/酯三氮唑化合物**1**在

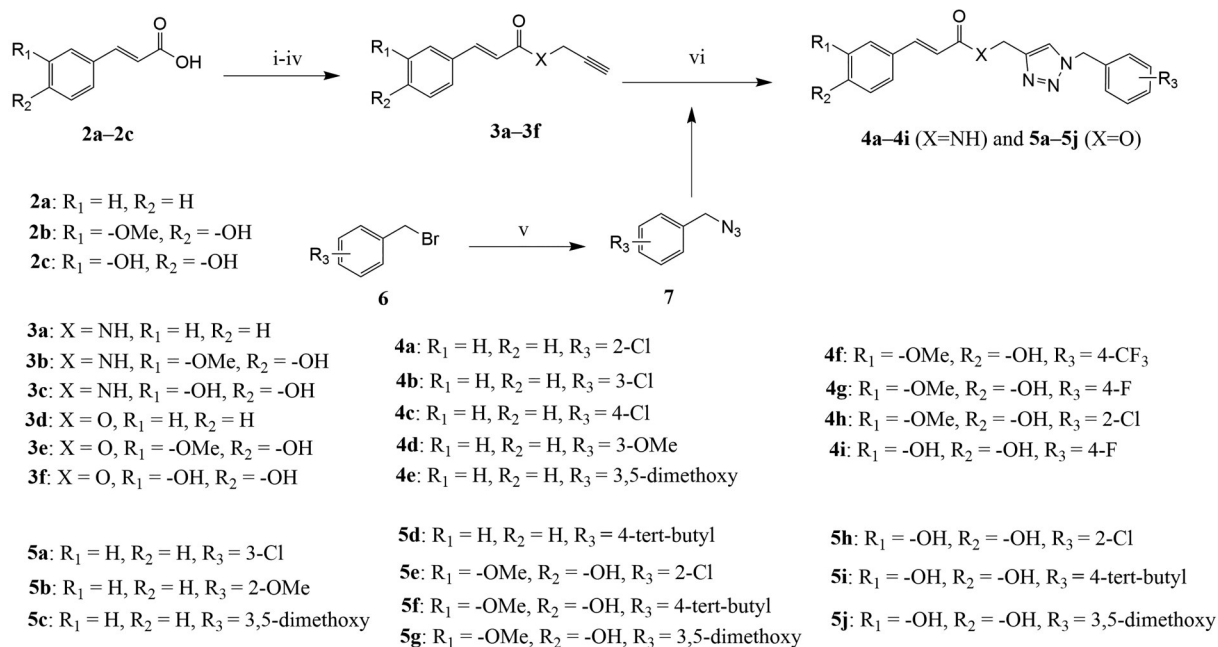
$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 $A\beta$ 自身诱导聚集的抑制率($11.70 \pm 1.95\%$),同时具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性($IC_{50} = 5.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),为了进一步提高该类化合物的生物活性,本研究采用生物电子等排体策略,用酯基替换酰胺基,并在A环的3,4位引入甲氧基、羟基等基团,设计合成了一系列肉桂酰胺/酯三氮唑类化合物(图2),在此基础上,探索了B环上不同取代基对抑制活性的影响。

1.2 目标化合物的合成

以肉桂酸(**2a**)、阿魏酸(**2b**)或咖啡酸(**2c**)为起始原料,分别与炔丙胺、3-溴丙炔反应得到中间体**3a**~**3f**^[36-38]。将苄溴及其衍生物(**6**)与叠氮化钠在无水二甲基亚砜(DMSO)中搅拌反应1 h,反应生成叠氮化苄及其衍生物(**7**);不经纯化,将肉桂酸酯/酰胺(**3a**~**3f**)加入到反应液中反应12 h,生成目标化合物**4a**~**4i**,**5a**~**5j**(合成路线1)。所有目标产物的结构均通过¹H NMR、¹³C NMR和HRMS确证。19个目标化合物的收率、理化常数及波谱数据见表1。



Figure 2 Design of novel cinnamamide/ester triazole derivatives



Reagent and conditions: (i) cinnamic acid, propargylamine, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , r.t., 12 h, for **3a**; (ii) ferulic acid/caffeic acid, propargylamine, TEA, BOP, DMF, DCM, r.t., 5 h, for **3b-3c**; (iii) cinnamic acid/ferulic acid, 3-bromopropyne, K_2CO_3 , DMF, r.t., 12 h, for **3d-3e**; (iv) caffeic acid, 3-bromopropyne, Na_2CO_3 , KI, HMPA, $0\text{ }^\circ\text{C}$ -r.t., overnight, for **3f**. (v) NaN_3 , DMSO, r.t.; (vi) sodium ascorbate (40 mol%), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, (20 mol%), $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), r.t., 12 h.

Scheme 1 Synthetic routes to target compounds **4a-4i**, **5a-5j**

Table 1 Physical and spectral data of target compounds

Compd	Yield /%	mp/°C	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	HRMS (<i>m/z</i>) Formula (calcd.) found
4a	61.2	135–137	8.62 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.55 (dd, <i>J</i> = 17.2, 7.5 Hz, 3H), 7.42 (td, <i>J</i> = 16.3, 15.4, 8.0 Hz, 6H), 7.25 (dd, <i>J</i> = 7.4, 1.9 Hz, 1H), 6.68 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H), 4.47 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H)	165.4, 145.3, 139.5, 135.3, 133.8, 133.1, 131.0, 130.7, 130.1, 130.0, 129.4, 128.2, 128.0, 123.9, 122.3, 51.0, 34.8	[M+Na] ⁺ C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O (375.098 31) 375.099 55
4b	55.4	126–128	8.63 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.61–7.55 (m, 2H), 7.53–7.37 (m, 7H), 7.31 (s, 1H), 6.68 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.46 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H)	165.3, 145.6, 139.5, 139.0, 135.3, 133.7, 131.2, 130.0, 129.4, 128.6, 128.4, 128.0, 127.2, 123.7, 122.3, 52.4, 34.8	[M+Na] ⁺ C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O (375.098 31) 375.099 33
4c	48.9	186–188	8.63 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.61–7.55 (m, 2H), 7.53–7.37 (m, 7H), 7.31 (s, 1H), 6.68 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.46 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H)	165.3, 145.6, 139.5, 139.0, 135.3, 133.7, 131.2, 130.0, 129.4, 128.6, 128.4, 128.0, 127.2, 123.7, 122.3, 52.4, 34.8	[M+Na] ⁺ C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O (375.098 31) 375.099 64
4d	61.2	109–111	8.61 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.51–7.36 (m, 5H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 6.97–6.84 (m, 3H), 6.67 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 4.45 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H)	165.3, 159.9, 145.4, 139.5, 138.0, 135.3, 130.4, 130.0, 129.4, 128.0, 123.5, 122.3, 120.6, 114.3, 113.9, 55.6, 53.1, 34.8	[M+Na] ⁺ C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₂ (371.147 85) 371.148 65
4e	45.4	110–112	8.61 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.50–7.37 (m, 4H), 6.67 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 6.48 (dd, <i>J</i> = 11.2, 2.3 Hz, 3H), 5.50 (s, 2H), 4.45 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H)	165.3, 161.1, 145.4, 139.5, 138.7, 135.3, 130.0, 129.4, 128.0, 123.6, 122.3, 106.6, 100.0, 55.7, 53.2, 34.8	[M+Na] ⁺ C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃ (401.158 41) 401.159 55
4f	42.5	164–166	9.44 (s, 1H), 8.45 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.76 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.36 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 7.12 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.99 (dd, <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.48 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H), 4.43 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H)	165.8, 148.8, 148.3, 145.8, 141.3, 139.9, 129.2, 129.1, 128.6, 126.8, 126.2, 124.6, 123.8, 122.0, 119.1, 116.1, 56.0, 52.5, 34.8	[M+H] ⁺ C ₂₁ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₃ (433.148 20) 433.147 46
4g	40.6	97–99	9.43 (s, 1H), 8.42 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.44–7.34 (m, 3H), 7.22 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 7.15–7.11 (m, 1H), 7.00 (dd, <i>J</i> = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.48 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 4.43 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H)	165.5, 162.6, 148.4, 147.7, 145.8, 140.0, 132.4 (d, <i>J</i> = 3.3 Hz), 130.3 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 127.3, 122.4, 121.8, 118.7, 115.6, 115.3 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz), 110.4, 55.3, 52.5, 34.7	[M+Na] ⁺ C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃ (405.133 34) 405.134 52
4h	64.3	125–127	9.44 (s, 1H), 8.44 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.53 (dd, <i>J</i> = 7.5, 1.8 Hz, 1H), 7.45–7.30 (m, 3H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 7.1, 2.2 Hz, 1H), 7.12 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.00 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.48 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.43 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H)	165.8, 148.8, 148.3, 145.5, 139.9, 133.9, 133.1, 131.0, 130.7, 130.1, 128.2, 126.8, 123.9, 122.0, 119.1, 116.1, 111.3, 56.0, 50.9, 34.8	[M+H] ⁺ C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃ (399.121 84) 399.121 58
4i	36.8	147–149	8.46 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.45–7.38 (m, 2H), 7.32–7.18 (m, 3H), 6.96 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 6.85 (dd, <i>J</i> = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.76 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.36 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 4.42 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H)	165.8, 162.3, 147.6, 146.0, 145.7, 140.0, 132.9 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz), 130.8 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 126.8, 123.4, 121.0, 118.6, 116.2 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz), 115.9, 114.2, 52.4, 34.7	[M+Na] ⁺ C ₁₉ H ₁₇ FN ₄ O ₃ (391.117 69) 391.118 87
5a	64.5	97–99	8.34 (s, 1H), 7.79–7.66 (m, 3H), 7.45 (t, <i>J</i> = 4.7 Hz, 6H), 7.33 (m, 1H), 6.69 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 5.30 (s, 2H)	166.4, 145.6, 142.8, 138.9, 134.4, 133.8, 131.2, 131.1, 129.4, 128.9, 128.7, 128.4, 127.3, 125.6, 118.1, 57.7, 52.5	[M+Na] ⁺ C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ (376.082 33) 376.083 34
5b	62.1	93–88	8.30 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H), 7.73 (dt, <i>J</i> = 23.1, 6.6 Hz, 3H), 7.46 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.02–6.88 (m, 3H), 6.70 (dd, <i>J</i> = 15.9, 6.4 Hz, 1H), 5.61 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 5.30 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 3.77 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 3H)	166.4, 159.9, 145.5, 142.7, 137.8, 134.4, 131.1, 130.4, 129.4, 128.9, 125.5, 120.6, 118.1, 114.3, 114.0, 57.7, 55.6, 53.2	[M+Na] ⁺ C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃ (372.131 86) 372.132 97
5c	48.1	130–132	8.29 (s, 1H), 7.77–7.66 (m, 3H), 7.44 (dt, <i>J</i> = 5.9, 2.8 Hz, 3H), 6.69 (dd, <i>J</i> = 16.1, 1.9 Hz, 1H), 6.51 (dd, <i>J</i> = 13.6, 2.2 Hz, 3H), 5.55 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 3.75 (s, 6H)	166.4, 161.2, 145.5, 142.6, 138.5, 134.4, 131.1, 129.4, 128.9, 125.5, 118.1, 106.6, 100.1, 57.7, 55.7, 53.3	[M+Na] ⁺ C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₄ (402.142 43) 402.143 83
5d	56.5	147–149	8.25 (s, 1H), 7.74–7.65 (m, 3H), 7.45–7.36 (m, 5H), 7.30–7.26 (m, 2H), 6.66 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 1.26 (s, 9H)	166.4, 151.2, 145.5, 142.6, 134.4, 133.5, 131.1, 129.4, 128.9, 128.3, 126.0, 125.3, 118.1, 57.7, 53.0, 34.8, 31.5	[M+Na] ⁺ C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₂ (398.183 99) 398.185 61

Continued

Compd	Yield /%	mp/°C	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	HRMS (<i>m/z</i>)
					Formula (calcd.) found
5e	63.4	Oil	9.63 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.64–7.47 (m, 2H), 7.40 (m, <i>J</i> = 10.0, 8.6, 5.1, 1.7 Hz, 2H), 7.33 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.27 (dd, <i>J</i> = 7.1, 2.2 Hz, 1H), 7.13 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.51 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.81 (s, 3H)	166.8, 149.9, 148.4, 146.1, 142.7, 133.7, 133.1, 131.1, 130.8, 130.1, 128.3, 126.0, 125.7, 123.8, 115.9, 114.4, 111.7, 57.4, 56.2, 51.1	[M+H] ⁺ C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₄ (400.105 86) 400.105 13
5f	74.0	175–176	9.63 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H), 8.24 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 7.44–7.36 (m, 2H), 7.35–7.25 (m, 3H), 7.12 (dt, <i>J</i> = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.79 (dd, <i>J</i> = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 6.50 (dd, <i>J</i> = 15.9, 1.3 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.80 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 3H), 1.26 (s, 9H)	166.8, 151.2, 149.9, 148.4, 146.1, 142.8, 133.5, 128.3, 126.0, 126.0, 125.2, 123.8, 115.9, 114.5, 111.7, 57.5, 56.1, 53.0, 34.8, 31.5	[M+H] ⁺ C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄ (422.207 43) 422.206 73
5g	76.1	Oil	9.63 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 7.33 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.61–6.41 (m, 4H), 5.53 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 6H)	166.8, 161.2, 149.9, 148.4, 146.1, 142.8, 138.5, 126.0, 125.4, 123.8, 115.9, 114.4, 111.7, 106.6, 100.1, 57.5, 56.1, 55.7, 53.3	[M+H] ⁺ C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₆ (426.165 96) 426.165 28
5h	68.2	176–177	8.23 (s, 1H), 7.59–7.46 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.26 (dd, <i>J</i> = 7.0, 2.3 Hz, 1H), 7.12–6.97 (m, 2H), 6.77 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 6.29 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H), 5.25 (s, 2H)	166.7, 149.0, 146.2, 146.0, 142.7, 133.7, 133.1, 131.1, 130.8, 130.1, 128.2, 125.9, 125.8, 122.0, 116.2, 115.4, 113.9, 57.4, 51.1	[M+H] ⁺ C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ (386.090 21) 386.089 69
5i	68.6	170–171	8.23 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 7.44–7.37 (m, 2H), 7.30–7.22 (m, 2H), 7.08–6.96 (m, 2H), 6.76 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 6.28 (dd, <i>J</i> = 16.0, 1.5 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 1.26 (s, 9H)	166.8, 151.2, 149.0, 146.2, 146.0, 142.8, 133.5, 128.3, 126.0, 125.9, 125.2, 122.0, 116.2, 115.4, 113.9, 57.5, 53.0, 34.8, 31.5	[M+H] ⁺ C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₄ (408.191 78) 408.191 01
5j	68.9	166–168	9.62 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.49 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 7.12–6.94 (m, 2H), 6.75 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.47 (dd, <i>J</i> = 9.5, 2.3 Hz, 3H), 6.27 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.71 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 6H)	166.7, 161.2, 149.0, 146.2, 146.0, 142.9, 138.5, 125.9, 125.4, 122.0, 116.2, 115.4, 113.9, 106.6, 100.1, 57.5, 55.7, 53.3	[M+H] ⁺ C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₆ (412.150 31) 412.149 87

2 对 APPswe 细胞中 Aβ 抑制活性的测定

在 SH-SY5Y 细胞中过表达瑞典突变的人淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP), 以建立 AD 细胞模型 APPswe 细胞^[39]。在该细胞模型中, Cu²⁺ 作为刺激剂添加到培养基中时, 可激动 Aβ 介导的神经毒性, 使 APPswe 细胞活力显著降低^[40]。因此, 通过评估细胞活力来检测化合物对 Aβ 毒性的抑制作用。首先将化合物终浓度设置为 20 μmol·L⁻¹, 进行了活性初筛, 以多奈哌齐和美金刚胺作为阳性对照药^[41]; 对初步筛选出无毒副作用的化合物分别测定在 0.001、0.01、0.1、1、10、100 μmol·L⁻¹ 浓度下对铜离子损伤的 APPswe 细胞活力。对于存在保护率大于 50% 的化合物, 进一步计算其 EC₅₀ 值。目标化合物的活性结果见表 2 和表 3。

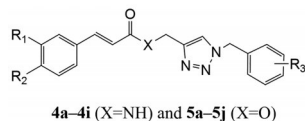
结果如表 2 和表 3 所示, 目标化合物 **4f**、**4g**、**4i** 在 20 μmol·L⁻¹ 浓度下呈现出较好的神经保护活性。其中, 化合物 **4f** 的 EC₅₀ 在 10 μmol·L⁻¹ 以下 (EC₅₀ = 2.03 ± 2.45 μmol·L⁻¹), 神经保护活性强于阳性对照药美金刚胺和多奈哌齐。此外, 化合物 **5d** 表现出一定的神经保护作用, 但未呈现浓度依赖性。化合物 **4g**~**4i** 和 **5j** 在 0.001~10 μmol·L⁻¹ 内表现出浓度依赖性的神经保护

作用, 但在高剂量 100 μmol·L⁻¹ 时, 出现神经毒性。在 1 μmol·L⁻¹ 浓度时, 化合物 **4e** 表现出较强的神经保护作用。化合物 **4b** 和 **5b** 仅在最高剂量 100 μmol·L⁻¹ 时表现出一定的神经保护作用。化合物 **4a**、**4d**、**5f** 和 **5h** 在各剂量下均未表现出神经保护作用。

对于肉桂酰胺化合物, 首先在苯基苯环 (B 环) 上引入氯、单取代或双取代甲氧基得到 5 个肉桂酰胺衍生物 **4a**~**4e**。活性结果显示, 其神经保护活性较弱。苯基苯环上引入邻、间、对氯取代化合物的神经保护活性没有明显差异, 均比较弱 (**4a**~**4c**)。而在 A 苯环上引入甲氧基和羟基后, 与 A 环未引入取代的化合物相比, 其神经保护活性提高 (**4h** > **4a**)。将化合物 **4h** 中苯基苯环上氯取代, 替换成对位三氟甲基、对位氟取代, 所得化合物 **4f**、**4g** 的神经保护活性大幅度提高, 其中化合物 **4f** 的神经保护活性强于阳性对照药美金刚胺和多奈哌齐。对于肉桂酸酯化合物 **5a**~**5j** 来说, 该类化合物整体神经保护活性较弱。

3 对 APPswe 细胞中 AChE 活性抑制作用的测定

AD 中 Aβ 的聚集可直接损伤胆碱能系统稳态, Cu²⁺ 诱导的 Aβ 聚集增加了 APPswe 细胞中 AChE 活

Table 2 A β inhibitory activities of compounds **4a–4i** and **5a–5j** in APPswe cells at 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. A β : β -Amyloid protein

Compound	Activity against A β toxicity	
	Cell viability protection rate/%	
Cinnamic acid (2a)	9.92 \pm 0.87	
Ferulic acid (2b)	8.13 \pm 0.74	
Caffeic acid (2c)	< 5%	
4a	< 5%	
4b	5.24 \pm 4.79	
4c	Toxicity	
4d	< 5%	
4e	12.77 \pm 9.48	
4f	66.79 \pm 6.31	
4g	40.54 \pm 8.13	
4h	26.94 \pm 4.36	
4i	43.44 \pm 8.05	
5a	27.98 \pm 13.94	
5b	21.16 \pm 5.52	
5c	Toxicity	
5d	18.54 \pm 7.61	
5e	18.17 \pm 4.34	
5f	11.57 \pm 2.92	
5g	Toxicity	
5h	18.35 \pm 6.88	
5i	Toxicity	
5j	22.35 \pm 1.37	
Donepezil	25.22 \pm 4.17	
Memantine	56.61 \pm 4.51	

性。本实验测试了目标化合物在 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 对铜离子刺激的 APPswe 细胞

中乙酰胆碱酯酶活性的抑制活性, 以多奈哌齐和美金刚作为阳性对照药物。对存在 AChE 活性抑制率超过 50% 的化合物进行了半数抑制浓度 (IC₅₀) 曲线的绘制。

结果如表 4 所示, 化合物 **4f** 展示出了显著的 AChE 抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 4.88 \pm 4.70 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 阻止了由 A β 聚集引发的细胞 AChE 活性升高。阳性对照药多奈哌齐实验结果与其本身具有很强的 AChE 抑制活性有关, 而美金刚作为 NDMA 抑制剂, 对改善因 A β 聚集引起的细胞 AChE 活性没有显著作用。以上结果初步表明, 本文设计的肉桂酸衍生物 **4f** 可有效抑制 A β 介导的神经毒性及由此引起的 AChE 活性异常升高。

4 Morris 水迷宫实验

本研究采用 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM) 实验评估了化合物 **4f** 对侧脑室注射 A β ₁₋₄₂ 寡聚体的 AD 小鼠空间学习和记忆能力的影响。结果如图 3 所示, 具体实验设计见图 3A; 在定位航行试验中, 不同组小鼠的逃逸潜伏期均随着训练天数的增加而缩短, 但不同处理组小鼠的潜伏期出现了显著性差异 (图 3B, $P < 0.05$)。与 A β ₁₋₄₂+vehicle 组相比, 1 和 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的化合物 **4f** 给药组和 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 多奈哌齐给药组均显著降低了小鼠的逃逸潜伏期 (图 3B, $P < 0.05$)。各组间小鼠的游泳速度无显著差异 (图 3C), 说明小鼠的运动功能未受影响。在空间探索试验中, 与 A β ₁₋₄₂+ vehicle 组相比, A β ₁₋₄₂ 小鼠在给予不同剂量药物 **4f** 治疗后, 逃逸潜伏期显著缩短 (图 3D, $P < 0.001$), 穿越平台的次

Table 3 Evaluation of the dose-effect relationship on the A β inhibitory activities of cinnamamide/ester triazole derivatives. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Compound	Cell viability protection rate at different concentrations of compound treatments/%						EC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
	0.001 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
Cinnamic acid (2a)	5.84 \pm 2.44	9.73 \pm 7.90	6.63 \pm 3.60	9.73 \pm 1.25	12.28 \pm 1.27	28.33 \pm 2.39	/
Ferulic acid (2b)	-5.29 \pm 0.56	-2.75 \pm 2.40	-6.67 \pm 11.78	8.94 \pm 0.23	12.49 \pm 3.70	30.66 \pm 6.44	/
Caffeic acid (2c)	13.01 \pm 8.42	7.16 \pm 0.52	4.54 \pm 3.22	-0.88 \pm 3.03	-33.53 \pm 4.21	-78.86 \pm 1.12	/
4a	12.56 \pm 10.89	9.41 \pm 4.56	6.66 \pm 2.78	12.34 \pm 4.10	11.27 \pm 7.73	-27.94 \pm 2.48	/
4b	4.17 \pm 4.74	8.18 \pm 12.55	-6.08 \pm 4.90	7.81 \pm 3.72	3.71 \pm 4.94	36.77 \pm 15.21	/
4d	-1.83 \pm 4.98	2.33 \pm 7.47	2.22 \pm 5.97	4.79 \pm 4.02	10.15 \pm 5.40	5.99 \pm 3.61	/
4e	15.56 \pm 12.52	22.89 \pm 13.34	35.85 \pm 19.10	42.13 \pm 27.20	24.84 \pm 3.68	-10.57 \pm 20.17	/
4f	27.86 \pm 17.00	27.33 \pm 1.98	35.40 \pm 5.17	67.06 \pm 34.03	98.40 \pm 5.05	110.77 \pm 15.29	2.03 \pm 2.45
4g	10.94 \pm 5.68	6.83 \pm 7.52	13.51 \pm 2.45	24.39 \pm 3.39	34.01 \pm 0.72	-14.33 \pm 8.07	/
4h	7.72 \pm 4.83	1.52 \pm 12.34	1.59 \pm 3.96	22.17 \pm 15.95	22.94 \pm 7.29	-46.87 \pm 14.72	/
4i	10.42 \pm 4.76	1.79 \pm 8.13	6.12 \pm 4.33	26.77 \pm 15.86	30.30 \pm 1.23	-18.74 \pm 3.32	/
5a	-1.79 \pm 4.50	9.02 \pm 4.72	2.71 \pm 7.70	7.66 \pm 5.96	12.37 \pm 9.30	25.62 \pm 6.11	/
5b	-14.12 \pm 6.26	-15.84 \pm 4.69	-16.11 \pm 12.77	2.64 \pm 10.03	9.06 \pm 5.81	36.78 \pm 6.05	/
5d	43.05 \pm 4.11	32.25 \pm 5.72	31.76 \pm 10.22	25.76 \pm 2.50	24.83 \pm 9.76	29.40 \pm 7.82	/
5e	10.42 \pm 9.38	7.22 \pm 3.60	6.38 \pm 9.61	25.87 \pm 16.80	10.80 \pm 6.75	7.34 \pm 4.46	/
5f	4.39 \pm 16.73	-7.15 \pm 10.17	5.03 \pm 10.47	4.02 \pm 2.50	6.21 \pm 3.35	12.53 \pm 4.27	/
5h	3.06 \pm 5.11	-0.03 \pm 1.53	-0.78 \pm 1.40	1.43 \pm 3.56	3.05 \pm 2.52	-30.01 \pm 0.80	/
5j	16.75 \pm 6.43	22.67 \pm 6.39	23.21 \pm 8.22	29.51 \pm 8.71	33.04 \pm 8.70	-18.02 \pm 0.24	/
Donepezil	25.59 \pm 3.78	27.93 \pm 5.19	22.46 \pm 2.23	33.35 \pm 2.05	65.03 \pm 3.95	-51.29 \pm 0.96	8.93 \pm 3.14
Memantine	-3.34 \pm 6.26	5.59 \pm 15.16	15.54 \pm 9.71	17.46 \pm 1.39	44.24 \pm 2.731	74.16 \pm 4.36	8.31 \pm 3.85

Table 4 Evaluation of the dose-effect relationship on the AChE inhibitory activities of cinnamide/ester triazole derivatives. $n = 3, \bar{x} \pm s$. AChE: Acetylcholinesterase

Compound	AChE activity inhibition rate at different concentrations of compound treatments/%						IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
	0.001 μmol·L ⁻¹	0.01 μmol·L ⁻¹	0.1 μmol·L ⁻¹	1 μmol·L ⁻¹	10 μmol·L ⁻¹	100 μmol·L ⁻¹	
Cinnamic acid (2a)	14.04 ± 4.86	14.11 ± 2.41	13.26 ± 3.04	22.42 ± 11.53	27.67 ± 7.72	31.68 ± 4.64	/
Ferulic acid (2b)	18.28 ± 17.24	21.35 ± 7.33	12.68 ± 12.19	19.37 ± 2.35	23.12 ± 3.12	36.75 ± 10.02	/
Caffeic acid (2c)	31.28 ± 7.94	26.29 ± 5.93	21.84 ± 3.69	15.84 ± 7.57	8.08 ± 4.70	-54.37 ± 12.05	/
4a	12.48 ± 3.14	15.81 ± 2.97	14.96 ± 5.06	12.98 ± 3.71	10.14 ± 5.39	-35.69 ± 7.23	/
4b	-20.39 ± 15.52	-2.47 ± 3.79	0.90 ± 17.57	-4.50 ± 7.07	2.24 ± 6.73	31.96 ± 12.02	/
4c	8.95 ± 8.49	15.98 ± 12.21	25.15 ± 8.20	-14.47 ± 2.77	-20.58 ± 4.63	-35.33 ± 20.90	/
4d	17.94 ± 12.19	16.95 ± 8.97	16.58 ± 7.19	2.70 ± 5.10	-4.93 ± 8.55	1.87 ± 2.59	/
4e	5.65 ± 18.56	-6.35 ± 13.91	1.25 ± 12.06	18.39 ± 12.35	6.18 ± 8.11	-5.89 ± 14.55	/
4f	32.66 ± 6.00	33.59 ± 16.86	35.32 ± 13.53	43.78 ± 6.54	63.85 ± 9.04	79.99 ± 1.83	4.88 ± 4.70
4g	5.91 ± 4.23	1.79 ± 5.89	16.84 ± 11.54	21.74 ± 11.71	38.19 ± 6.77	-19.84 ± 26.07	/
4h	-2.76 ± 3.51	-1.54 ± 4.60	7.82 ± 29.16	19.79 ± 20.68	24.18 ± 10.18	-46.71 ± 8.89	/
4i	9.41 ± 15.97	18.73 ± 10.17	17.17 ± 10.89	27.18 ± 10.17	28.07 ± 14.00	-10.43 ± 13.61	/
5a	6.64 ± 17.40	6.83 ± 29.30	7.78 ± 14.44	8.64 ± 17.06	11.5 ± 17.75	25.54 ± 10.32	/
5b	5.65 ± 18.56	-6.35 ± 13.91	1.25 ± 12.06	18.39 ± 12.35	6.18 ± 8.11	-5.89 ± 14.55	/
5c	4.77 ± 17.41	6.18 ± 5.61	15.45 ± 9.40	7.86 ± 17.32	-7.31 ± 5.61	-78.21 ± 21.76	/
5d	19.78 ± 13.02	23.75 ± 10.30	33.53 ± 9.28	27.94 ± 22.17	27.75 ± 15.85	17.32 ± 13.36	/
5e	7.33 ± 19.18	1.20 ± 13.20	-3.20 ± 10.44	25.51 ± 20.35	17.23 ± 9.26	-8.60 ± 33.56	/
5f	11.81 ± 16.93	-1.07 ± 15.73	9.38 ± 11.15	13.98 ± 10.36	12.11 ± 10.64	6.40 ± 24.74	/
5g	20.97 ± 5.68	14.37 ± 0.42	-7.94 ± 1.58	-7.60 ± 10.13	-10.27 ± 21.01	-24.15 ± 5.43	/
5h	11.76 ± 5.09	16.46 ± 18.02	4.15 ± 23.80	-4.96 ± 11.76	11.32 ± 2.23	-42.08 ± 27.52	/
5i	0.00 ± 9.58	11.53 ± 14.33	29.21 ± 6.74	0.32 ± 4.90	-28.09 ± 14.62	-33.99 ± 35.88	/
5j	9.22 ± 16.42	6.68 ± 17.52	7.51 ± 9.52	11.40 ± 12.55	18.24 ± 11.82	-26.15 ± 5.32	/
Donepezil	60.05 ± 18.57	52.21 ± 23.59	22.66 ± 8.89	11.99 ± 15.14	3.88 ± 5.34	-39.43 ± 23.28	0.054 ± 0.071
Memantine	-1.30 ± 19.55	1.31 ± 10.32	7.64 ± 6.15	24.87 ± 7.03	27.38 ± 12.12	35.20 ± 5.12	/

数明显增加 (图 3E, $P < 0.01$)。值得注意的是, 药物 **4f** 在 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组的效果弱于 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组, 这可能是由于受体饱和或下调导致的效能降低, 具体原因有待进一步研究验证。化合物 **4f** 在 1 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量下增强 $A\beta_{1-42}$ 小鼠空间学习记忆能力, 优于 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 多奈哌齐的效果。上述结果表明, 1 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的化合物 **4f** 干预能够显著改善 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体侧脑室注射模型小鼠的空间学习和记忆能力。

5 作用机制探究

采用蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验评估了化合物 **4f** 在 Cu^{2+} 诱导的 APPswe 细胞和侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的模型小鼠大脑皮层和海马中 $A\beta$ 和 Tau 相关信号通路的蛋白表达变化, 以此探究化合物 **4f** 改善认知损伤的作用机制。

5.1 化合物 **4f** 在 Cu^{2+} 刺激的 APPswe 细胞中对 $A\beta$ 和 Tau 信号通路的影响

结果如图 4 所示, $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 显著提高了 APPswe 细胞中 APP、BACE1、早老蛋白-1 (presenilin 1, PS1)、 $A\beta_{1-42}$ 的表达及 Tau 蛋白在 Ser396 和 Ser404 位点的磷酸化水平, 降低解整合素金属蛋白酶 10 (ADAM metalloproteinase domain 10, ADAM10) 的表达 (图 4, $P < 0.01$)。当 $0.1, 1, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物 **4f**

作用于 Cu^{2+} 损伤的 APPswe 细胞后, 不同程度地降低了细胞中 APP、BACE1、PS1、 $A\beta_{1-42}$ 的表达及 Tau 蛋白在 Ser396 和 Ser404 位点的磷酸化水平, 并且提高了 ADAM10 的表达 (图 4, $P < 0.05$)。细胞水平的结果提示, 化合物 **4f** 通过促进非淀粉样蛋白生成途径并抑制淀粉样蛋白生成途径减少 $A\beta$ 的生成, 减轻 $A\beta$ 诱导的 Tau 蛋白磷酸化。

5.2 化合物 **4f** 对 $A\beta_{1-42}$ 侧脑室注射 AD 小鼠 $A\beta$ 和 Tau 信号通路的调节作用

体外蛋白免疫印迹实验结果初步说明化合物 **4f** 对 $A\beta$ 代谢信号通路及其诱导的 Tau 蛋白磷酸化具有改善作用, 进而在 $A\beta_{1-42}$ 侧脑室注射小鼠的大脑皮层和海马中进行验证。结果如图 5 所示, 与 Sham 组相比, $A\beta_{1-42}$ 侧脑室注射后小鼠大脑皮层和海马中 APP、BACE1、PS1、 $A\beta_{1-42}$ 的表达及 Tau 蛋白在 Ser396 和 Ser404 位点的磷酸化水平升高, ADAM10 的表达降低 (图 5, $P < 0.01$)。连续 9 天给予 $1, 5, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的化合物 **4f**, 降低了 $A\beta_{1-42}$ 侧脑室注射小鼠大脑皮层和海马中 APP、BACE1、PS1、 $A\beta_{1-42}$ 的表达及 Tau 蛋白在 Ser396 和 Ser404 位点的磷酸化程度, 提高了 ADAM10 的表达水平 (图 5, $P < 0.05$)。综合上述结果, 化合物 **4f** 可能通过促进非淀粉样蛋白生成途径并抑制淀粉样蛋白生成

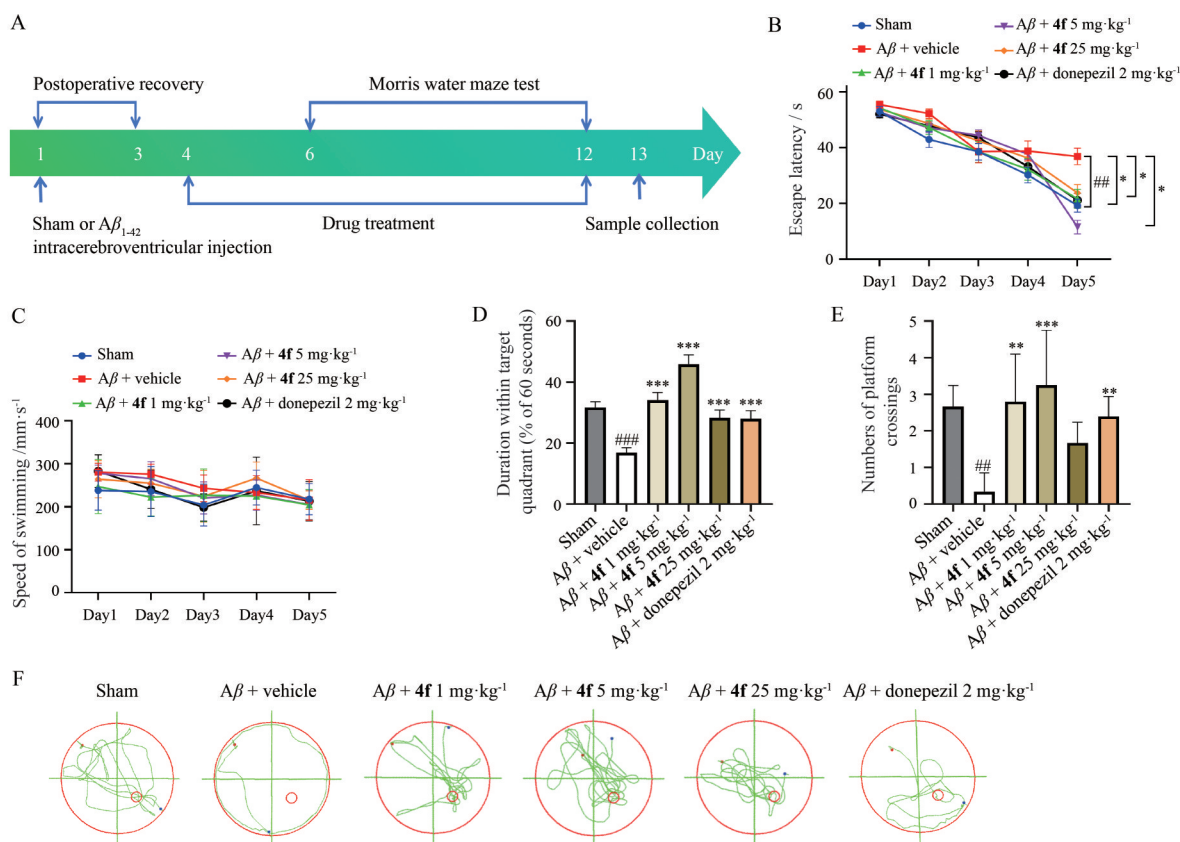


Figure 3 Treatment with compound **4f** restores cognitive dysfunction in $A\beta_{1-42}$ -impaired mice. A: Overview of the experimental design; B: Escape latency of compound **4f**-treated AD mice in the orientation navigation test; C: Swimming speed of **4f**-treated AD mice in the orientation navigation test; D: Duration within the target quadrant for compound **4f**-treated AD mice in the spatial probe trial; E: Number of platform crossings by compound **4f**-treated AD mice in the spatial probe trial; F: Representative action tracks of different groups during the spatial probe trial. The red dot represents the mouse position at the start of the 60 s timing, and the blue dot represents where the mouse stayed at the endpoint. Comparisons were calculated by repeated measures ANOVA (B, C) and one-way ANOVA (D, E). $n = 9, \bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$, $^{###}P < 0.0001$ vs Sham; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs $A\beta$ +vehicle

途径减少 $A\beta$ 的生成, 抑制 $A\beta$ 诱导的 Tau 蛋白磷酸化, 进而缓解 AD 神经退行性病变。

结论

本文设计合成了 19 个肉桂酰胺/酯三氮唑化合物, 采用 APP_{sw} 细胞模型, 评价其神经保护作用 and 抗乙酰胆碱酯酶作用, 发现化合物 **4f** 可提高 AD 小鼠学习记忆能力, 可能通过促进非淀粉样蛋白途径和抑制淀粉样蛋白途径来减少 $A\beta$ 的产生和抑制 Tau 的磷酸化, 从而减轻 AD 病理症状。综上所述, 化合物 **4f** 通过干预多种 AD 病理环节发挥神经保护作用, 作为一种新结构类型的抗 AD 活性分子, 其作为抗 AD 药物的潜在应用价值值得进一步研究。

实验部分

所有试剂购自百灵威和北京伊诺凯科技有限公

司, 未经说明的均为分析纯, 无需进一步纯化。所有提交生物检测的化合物均经高效液相色谱检测, 纯度 > 95% (归一化法)。采用硅胶 60 F₂₅₄D 铝片薄层色谱或日本岛津 LC-MS 对反应进行监测。在配备硅胶柱的 Combi Flash Rf 150 + 仪器 (Teledyne) 上进行纯化, 或用硅胶 (200~300 目) 进行柱层析。用 Bruker Avance III 400 MHz, 500 MHz 光谱仪在所指示的溶剂 ($CDCl_3$, CD_3OD 或 $DMSO-d_6$) 中记录合成化合物的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱, 并参照内标四甲基硅烷。化合物熔点用瑞士 Mettler Toledo MP90 熔点仪测定。所有最终化合物的高分辨质谱 (HRMS) 是在 Thermo Science LTQ Orbitrap XL 上用 ESI 质量选择检测器记录。

1 化学合成

1.1 中间体的合成

1.1.1 中间体 3a 的合成 取肉桂酸 (**2a**) (500 mg, 3.38 mmol) 和二环己基碳二亚胺 (695 mg, 3.38 mmol)

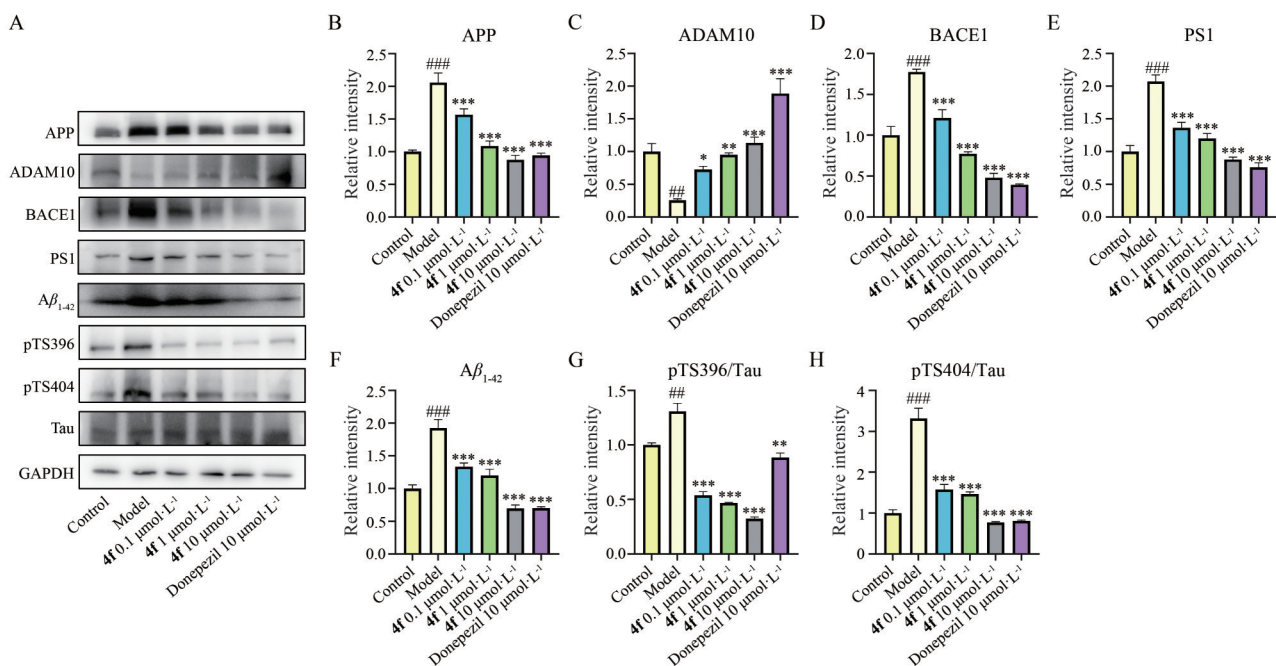


Figure 4 Effects of compound **4f** on $A\beta$ and Tau signaling pathways in copper-injured APPsw cells. A: Representative Western blot bands for APP, ADAM10, BACE1, PS1, $A\beta_{1-42}$, pTS396, pTS404 and Tau in different groups; B–H: Quantitative analysis of APP (B), ADAM10 (C), BACE1 (D), PS1 (E), $A\beta_{1-42}$ (F), pTS396/Tau (G) and pTS404/Tau (H) observed in panel A. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$, #### $P < 0.001$ vs Control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Model. APP: Amyloid precursor protein; ADAM10: ADAM metalloproteinase domain 10; BACE1: β -secretase 1; PS1: Presenilin 1

溶于 40 mL 超干的 CH_2Cl_2 中, 在室温下搅拌 0.5 h。然后加入丙炔胺 (450 mg, 8.10 mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (0.82 mg, 6.75 mmol), 并在室温下搅拌反应 12 h。TLC 检测 (展开剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 3:1) 原料基本反应完全。过滤反应液, 并用水将滤液稀释, 用 CH_2Cl_2 (3×30 mL) 萃取。合并有机相, 饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 剩余物经硅胶色谱柱 (洗脱剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 15:1) 分离纯化, 得到白色粉末 (**3a**) 500 mg, 收率 80%。mp: 104~106 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H : 8.56 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.60~7.54 (m, 2H), 7.51~7.35 (m, 4H), 6.64 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 4.00 (dd, $J = 5.6, 2.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ_C : 165.14, 139.83, 135.20, 130.07, 129.42, 128.06, 121.92, 81.51, 73.65, 28.49; MS (ESI) m/z : 186.10 $[M+H]^+$ 。

1.1.2 中间体 3b、3c 的合成 (以 **3b** 合成为例) 取阿魏酸 (**2b**) (439 mg, 2.26 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL N,N -二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF) 溶解, 然后加入 0.4 mL 三乙胺, 将反应装置放入零度冰水浴中; 将 1H-苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐 (BOP, 1.00 g, 2.26 mmol) 溶于 4 mL CH_2Cl_2 中, 0 °C 下滴加炔丙胺 (125 mg, 2.26 mmol), 得到炔丙胺混合物; 将炔丙胺混合物滴加到阿魏酸的

DMF 混合物中, 在 0 °C 下反应 0.5 h, 然后将反应体系升至室温搅拌反应 6 h。TLC 检测 (展开剂为二氯甲烷与甲醇, 体积比为 30:1) 原料基本反应完全, 减压浓缩溶剂并加 15 mL 水稀释。用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取 3 次, 合并有机相, 并依次用 10% HCl 溶液、水、饱和食盐水洗涤。无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 剩余物经硅胶色谱柱 (洗脱剂为二氯甲烷与甲醇, 体积比为 20:1) 分离纯化, 得到黄色固体 (**3b**) 392 mg, 收率 75%。mp: 70~71 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H : 9.46~9.41 (m, 1H), 8.37 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.41~7.34 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J = 15.7, 2.1$ Hz, 1H), 4.01~3.96 (m, 2H), 3.82 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 3.13 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, acetone- d_6) δ_C : 165.31, 148.44, 147.75, 140.43, 127.18, 121.81, 118.28, 115.27, 110.51, 80.61, 71.13, 55.35, 28.16; MS (ESI) m/z : 232.15 $[M+H]^+$ 。

以咖啡酸 (**2c**) 为起始原料 (407 mg, 2.26 mmol), 同法合成中间体 **3c**, 得到棕色固体 375 mg, 收率 76%。mp: 85~87 °C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H : 9.37 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.40 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.99~6.95 (m, 1H), 6.86 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.34 (dd, $J = 15.7,$

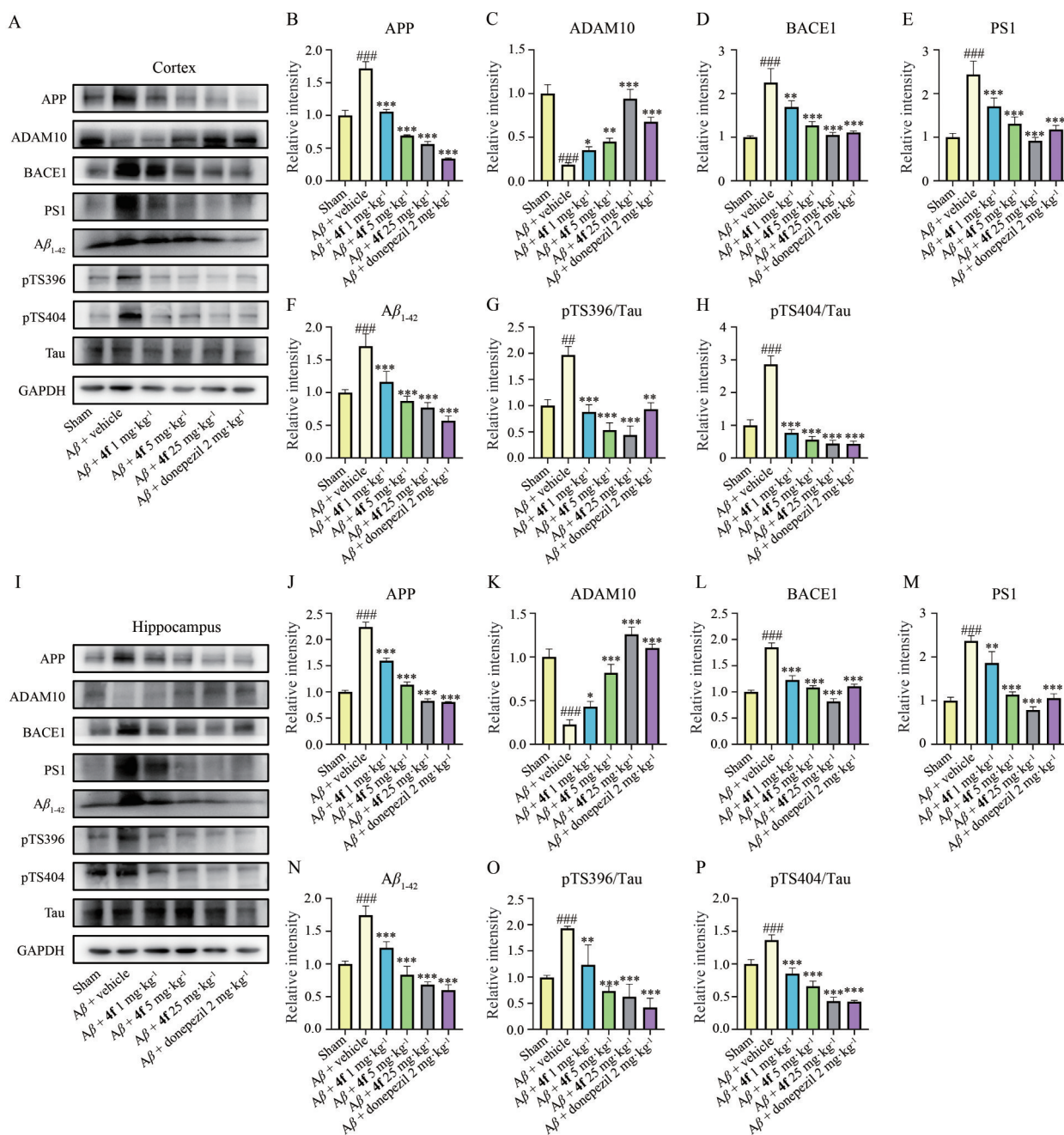


Figure 5 Effect of compound **4f** on $A\beta$ and Tau signaling pathways in the cerebral cortex and hippocampus of $A\beta_{1-42}$ -injured mice. A: Representative Western blot bands in the cerebral cortex of $A\beta_{1-42}$ -injured mice after treatment with compound **4f**; B–H: Quantification of APP (B), ADAM10 (C), BACE1 (D), PS1 (E), $A\beta_{1-42}$ (F), pTS396/Tau (G) and pTS404/Tau (H) observed in panel A; I: Representative Western blot bands in the hippocampus of $A\beta_{1-42}$ -injured mice after treatment with compound **4f**. J–P: Quantification of APP (J), ADAM10 (K), BACE1 (L), PS1 (M), $A\beta_{1-42}$ (N), pTS396/Tau (O) and pTS404/Tau (P) observed in panel I. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$, $^{####}P < 0.001$ vs Sham; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs $A\beta$ +vehicle

2.9 Hz, 1H), 4.00~3.96 (m, 2H), 3.13 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H); MS (ESI) m/z : 218.05 $[M+H]^+$.

1.1.3 中间体 3d~3f 的合成 (以 3d 的合成为例) 取肉桂酸 (**2a**) (1.00 g, 6.76 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL DMF 溶解, 然后加入 3-溴丙炔 (1 g, 6.76 mmol), K_2CO_3 (2.32 g, 16.9 mmol) 室温下搅拌反

应 8 h, TLC 检测 (展开剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 3:1) 原料基本反应完全, 过滤反应液, 除去不溶物, 并用水将滤液稀释, 用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取 3 次。合并有机相, 用 5% HCl 水溶液和饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥。过滤, 减压蒸干溶剂, 剩余物经硅胶色谱柱 (洗脱剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 8:1)

分离纯化, 得到黄色油状物 (**3d**) 848 mg, 收率 68%。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 7.75 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.56~7.50 (m, 2H), 7.43~7.37 (m, 3H), 6.47 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H); MS (ESI) m/z : 187.05 [M + H]⁺。

以阿魏酸 (**2b**) 为起始原料 (1.38 g, 6.67 mmol), 同法合成中间体 **3e**, 得到白色粉末 1.08 g, 收率 70%。mp: 70~72 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 9.65 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.56 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 166.32, 150.06, 148.41, 146.52, 125.90, 123.88, 115.97, 113.95, 111.82, 79.18, 78.02, 56.17, 51.96; MS (ESI) m/z : 232.10 [M+H]⁺。

1.1.4 中间体 3f 的合成 取咖啡酸 (**2c**) (500 mg, 2.78 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, N₂ 保护下, 加入 5 mL 六甲基磷酰三胺, 然后加入 Na₂CO₃ (350 mg, 3.33 mmol), 并在 0 °C 下搅拌反应 0.5 h。将 0.5 mL 3-溴丙炔的六甲基磷酰三胺溶液加到反应体系中。同时加入催化量的 KI, 0 °C 下搅拌反应 12 h。TLC 检测 (展开剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 2:1) 原料基本反应完全, 向反应液中加入适量冰水。用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取 3 次。合并有机相。用 5% HCl 水溶液和饱和盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥。过滤, 减压蒸干溶剂, 剩余物经硅胶色谱柱 (洗脱剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 5:1) 分离纯化, 得到黄色固体 (**3f**) 1.04 g, 收率 70%。mp: 96~98 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 9.65 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.21~6.95 (m, 2H), 6.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.31 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 4.91~4.65 (m, 2H), 3.56 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 166.24, 149.15, 146.63, 146.06, 125.82, 122.14, 116.20, 115.43, 113.40, 79.22, 78.01, 51.94; MS (ESI) m/z : 219.05 [M+H]⁺。

1.2 目标化合物 4a~4i, 5a~5j 的合成通法 (以 4a 的合成为例)

取苜蓿基溴 (1.0 mmol) 和叠氮化钠 (1.0 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 3 mL 无水 DMSO 溶液, 室温搅拌反应 1 h, TLC 检测 (展开剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 2:1) 原料基本反应完全, 向反应体系中加入 3 mL 水。将化合物 **2a** (1 mmol) 溶解在 2 mL DMSO 中并添加到反应体系中, 然后加入 CuSO₄·5H₂O (0.2 eq) 和抗坏血酸钠 (0.10 eq) 和 2 mL 水, 室温下搅拌反应 12 h, TLC 检测原料基本反应完全, 加 15 mL 水稀释反

应液, 用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取 3 次, 合并有机相。用饱和 NH₄Cl 水溶液和饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 剩余物经硅胶色谱柱 (洗脱剂为石油醚与乙酸乙酯, 体积比为 5:1) 分离纯化, 得到黄绿色固体 (**4a**) 227 mg, 收率 61.2%。mp: 135~137 °C。同法制得化合物 **4a~4i, 5a~5j**。

2 细胞活力测定

将 APPswe 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1 μg·mL⁻¹ 嘌呤霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件的细胞培养箱中培养。将处于对数生长期的细胞经胰酶消化后, 以每孔 8 000 个接种于 96 孔板中。待细胞稳定生长至 70%~80% 时, 将板内细胞随机分为对照组、Cu²⁺ 损伤 (300 μmol·L⁻¹) 组、Cu²⁺ + 样品 (20 μmol·L⁻¹) 组。培养 24 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活力, 每孔加入 90 μL DMEM 空白培养基和 10 μL MTT, 37 °C 孵育 4 h, 多功能酶标仪检测各孔 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 根据公式 (1) 计算保护率:

$$\text{保护率 (\%)} = [(A_s - A_b) - (A_m - A_b)] / [(A_m - A_b)] \times 100\% \quad (1)$$

其中, A_s 为样本组的吸光度值; A_b 为空白组的吸光度值; A_m 为模型组的吸光度值。

如果在浓度梯度范围内化合物的保护率未达到 50%, 则以细胞存活率的柱状图表示。

3 乙酰胆碱酯酶活性抑制作用

将 APPswe 细胞接种于 6 孔板 (每孔 4×10⁵ 个) 中。待细胞稳定生长至 70%~80% 时, 使用 300 μmol·L⁻¹ 的 Cu²⁺ 和终浓度为 20 μmol·L⁻¹ 的目标化合物对细胞进行处理。培养 24 h 后, 使用乙酰胆碱酯酶活性测定试剂盒收集细胞, 测定化合物 20 μmol·L⁻¹ 浓度下对 Cu²⁺ 刺激的 APPswe 细胞中乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用。使用多功能酶标仪, 测定 412 nm 处的各孔吸光度值。

4 AD 模型小鼠建立及分组给药处理

C57BL/6 小鼠 (SPF 级) 8 周龄雄性, 购自至善 (北京) 健康医学研究院有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2021-0010。实验中所有操作均获得中国医学科学院医药生物技术研究所伦理委员会批准, 批准号: IMB-20220908D701。

8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组和模型组。采用脑立体定位仪完成侧脑室注射, 将前囟的位置设定为零点, 调节 X 轴为 1.0 mm、Y 轴为 -0.5 mm、Z 轴为 -3.0 mm。模型构建过程中每只小鼠侧脑室注射 2.5 μL 的 400 μmol·L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 寡聚体, 假手术 (Sham) 组则注射同剂量的生理盐水。手术后使动物恢复 3 天, 按照体重对小鼠进行随机分组: Sham 组、Aβ₁₋₄₂ 模型组 + vehicle、Aβ₁₋₄₂ 模型组 + 多奈哌齐 (donepezil 2 mg·kg⁻¹)、

Table 5 Primary and secondary antibodies used in Western blot analyses. CST: Cell signaling technology; HRP: Horse radish peroxidase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IgG: Immunoglobulin G

Primary antibody	Dilution	Source	Secondary antibody
Anti-APP rabbit mAb	1:1 000	CST	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:10 000, Proteintech)
Anti-BACE1 rabbit mAb	1:1 000	Proteintech	
Anti-PS1 rabbit mAb	1:1 000	Abcam	
Anti-ADAM10 rabbit mAb	1:1 000	Abcam	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (1:10 000, Proteintech)
Anti- β amyloid (1-42) rabbit mAb	1:1 000	CST	
Anti-Tau (phospho S396) rabbit mAb	1:1 000	Abcam	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (1:10 000, Proteintech)
Anti-Tau (phospho S404) rabbit mAb	1:1 000	Abcam	
Anti-GAPDH rabbit mAb	1:5 000	Proteintech	
Anti-Tau mouse mAb	1:1 000	Abcam	

$A\beta_{1-42}$ 模型组 + **4f**低剂量组 ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 $A\beta_{1-42}$ 模型组 + **4f**中剂量组 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 $A\beta_{1-42}$ 模型组 + **4f**高剂量组 ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。将化合物溶解在10% DMSO、20% HS-15和70%生理盐水中,腹腔注射给予相应剂量,每天给药一次,持续给药9天。

5 Morris水迷宫实验

MWM实验主要分为定位航行实验和空间探索实验两个部分。定位航行实验连续进行5天,试验期间将平台置于固定位置,每天将小鼠面向池壁从4个象限放入水中,记录小鼠成功找到平台的时间及游泳速度。定位航行实验设置逃避潜伏期最长时长为60 s,如果小鼠不能在规定时间内找到平台,则将它们引导到平台并停留15 s以观察学习。空间探索实验在定位航行实验结束后24 h进行,撤除平台,小鼠入水点选择为距离平台最远的对侧象限,记录60 s内小鼠在原平台象限内的停留时间和穿越平台的次数,作为衡量小鼠空间记忆能力的指标。

6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验

提取与分析总蛋白的具体步骤如下:利用含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞和脑组织。将提取到的总蛋白样本通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳进行分离,分离后的蛋白质条带转印至PVDF膜。在室温下,用5% BSA/0.5% Tween 20/Tris-HCl缓冲盐溶液封闭膜2 h。根据目的蛋白的检测分子质量和Marker位置裁膜,与一抗 (primary antibody) 在4 °C下孵育过夜。使用TBST洗膜后,在室温下与一抗相应种属的辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 偶联的二抗孵育1 h。一抗和二抗 (secondary antibody) 的具体信息详见表5。再次洗膜后,使用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影观察目标蛋白条带,于Fusion-FX6 成像仪 (Vilber Lourmat, Marne-laVall'ee, France) 进行曝光,得到灰度条带。利用ImageJ软件分析条带的灰度值,将GAPDH的表达作为内源性对照,

计算目标蛋白相对表达水平。

7 统计学方法

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用IBM SPSS Statistics 25.0版软件通过重复测量的单因素方差分析,对Morris水迷宫实验中的平台潜伏期和游泳速度进行分析。其他数据分析采用GraphPad Prism 8.0版软件完成,两组之间比较使用非配对 *t*-test, 三组及以上组间比较使用one-way ANOVA分析。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

作者贡献:雷文聚、蔡中颀负责化合物合成及文章的撰写;谭林杰、刘蜜敏负责实验技术指导;曾利、孙婷参与了部分合成、体外活性实验;易红参与了数据分析及文献整理;刘睿、李卓荣负责研究方案设计与指导论文撰写。

利益冲突:本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Public Health*, 2022, 7: e105-e125.
- [2] Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, et al. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" [J]. *Clin Anat*, 1995, 8: 429-431.
- [3] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14: 101-115.
- [4] Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, et al. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 3245935.
- [5] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297: 353-356.
- [6] Zhou LL, Qian K, Yang P, et al. Research progress on mitochondrial oxidative stress and corresponding targeted delivery systems in Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1630-1640.

- [7] Shimizu E, Tang YP, Rampon C, et al. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation [J]. *Science*, 2000, 290: 1170-1174.
- [8] Jarrott B. Tacrine: *in vivo* veritas [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 116: 29-31.
- [9] Holmes C, Wilkinson D, Dean C, et al. The efficacy of donepezil in the treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2004, 63: 214-219.
- [10] Desai A, Grossberg G. Review of rivastigmine and its clinical applications in Alzheimer's disease and related disorders [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2001, 2: 653-666.
- [11] Scott LJ, Goa KL. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease [J]. *Drugs*, 2000, 60: 1095-1122.
- [12] Zhang P, Ji H, Hu QH. Research progress in clinical treatment of Alzheimer's disease and potential drugs from natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1954-1961.
- [13] Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0123289.
- [14] Wang SH, Li J, Xia W, et al. A marine-derived acidic oligosaccharide sugar chain specifically inhibits neuronal cell injury mediated by beta-amyloid-induced astrocyte activation *in vitro* [J]. *Neurol Res*, 2007, 29: 96-102.
- [15] Wang XY, Sun GQ, Feng T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression [J]. *Cell Res*, 2019, 29: 787-803.
- [16] Mintun MA, Wessels AM, Sims JR. Donanemab in early Alzheimer's disease. Reply [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385: 667.
- [17] Swanson CJ, Zhang Y, Dhadda S, et al. Correction to: A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-A β protofibril antibody [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2022, 14: 70.
- [18] van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, et al. Lecanemab in early Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388: 9-21.
- [19] Iwatsubo T. Development of disease-modifying therapies against Alzheimer's disease [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2024, 78: 491-494.
- [20] Cummings J, Zhou YD, Lee G, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2024, 10: e12465.
- [21] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7: 263-269.
- [22] Mattap SM, Mohan D, McGrattan AM, et al. The economic burden of dementia in low- and middle-income countries (LMICs): a systematic review [J]. *BMJ Glob Health*, 2022, 7: e007409.
- [23] Jia JP, Wei CB, Chen SQ, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14: 483-491.
- [24] Gupta O, Pradhan T, Bhatia R, et al. Recent advancements in anti-leishmanial research: synthetic strategies and structural activity relationships [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 223: 113606.
- [25] Marinović M, Poje G, Perković I, et al. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 224: 113687.
- [26] Kwon MY, Kim SM, Park J, et al. A caffeic acid-ferulic acid hybrid compound attenuates lipopolysaccharide-mediated inflammation in BV2 and RAW264.7 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515: 565-571.
- [27] Rassias G, Leonardi S, Rigopoulou D, et al. Potent antiproliferative activity of bradykinin B2 receptor selective agonist FR-190997 and analogue structures thereof: a paradox resolved? [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 210: 112948.
- [28] De Lucia D, Lucio OM, Musio B, et al. Design, synthesis and evaluation of semi-synthetic triazole-containing caffeic acid analogues as 5-lipoxygenase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 101: 573-583.
- [29] Lima GDA, Rodrigues MP, Mendes TAO, et al. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 53: 1-9.
- [30] Zang WB, Wei HL, Zhang WW, et al. Curcumin hybrid molecules for the treatment of Alzheimer's disease: structure and pharmacological activities [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 265: 116070.
- [31] Tu LH, Tseng NH, Tsai YR, et al. Rationally designed divalent caffeic amides inhibit amyloid-beta fibrillization, induce fibril dissociation, and ameliorate cytotoxicity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 158: 393-404.
- [32] Saeedi M, Safavi M, Karimpour-Razkenari E, et al. Synthesis of novel chromenones linked to 1,2,3-triazole ring system: investigation of biological activities against Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 70: 86-93.
- [33] Yang CB, Zhao J, Cheng YY, et al. *N*-Propargyl caffeate amide (PACA) potentiates nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth and attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced toxicity by activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6: 1560-1569.
- [34] Ghafary S, Nadri H, Mahdavi M, et al. Anticholinesterase activity of cinnamic acids derivatives: *in vitro*, *in vivo* biological evaluation, and docking study. [J]. *Lett Drug Des Discov*, 2020, 17: 965-982.
- [35] Tan LJ, Lei WJ, Liu MM, et al. Discovery of cinnamide/ester triazole hybrids as potential treatment for Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 150: 107584.
- [36] Chao XJ, He XX, Yang YL, et al. Design, synthesis and pharma-

- cological evaluation of novel tacrine-caffeic acid hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 6498-6502.
- [37] Rodríguez-Hernández D, Demuner AJ, Barbosa LC, et al. Novel hederagenin-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 115: 257-267.
- [38] Sang ZP, Pan WL, Wang KR, et al. Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-*O*-alkylamine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 130: 379-392.
- [39] Zhao LH, Yue ZR, Wang YN, et al. Autophagy activation by *Terminalia chebula* Retz. reduce Abeta generation by shifting APP processing toward non-amyloidogenic pathway in APPswe transgenic SH-SY5Y cells [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154245.
- [40] Liu QS, Jiang HL, Wang Y, et al. Total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. attenuates β -amyloid-induced toxicity through anti-amyloidogenic and neurotrophic pathways [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 214-225.
- [41] Singh JV, Thakur S, Kumar N, et al. Donepezil-inspired multitargeting indanone derivatives as effective anti-Alzheimer's agents [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13: 733-750.