L-精氨酸/活性醛亚胺衍生物的设计、合成和生物活性研究

步霄晗[1], 黄梦霜[2], 陈惠琴[1], 耿宇杰[1], 柳 红[1,3], 俞永平[1,4], 黄张建[1,2,5*], 帕如克•艾毕布拉[1*]

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国药科大学, 多靶标天然药物全国重点实验室, 江苏 南京 211198; 3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 4. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058; 5. 新疆医科大学, 新疆生物药械重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 缺血性脑卒中是世界范围内死亡率致残率较高的疾病, 临床治疗药物较少。中药天然活性成分肉桂醛、茴香醛等具有抗氧化、抗炎作用, 从而可以减轻缺血性脑卒中引起的氧化应激损伤。此外, 有研究发现*L*-精氨酸是一氧化氮合酶的底物, 在体内可转化为NO从而扩张血管增加脑缺血区血流量。本文设计、合成了10个新的*L*-精氨酸/活性醛亚胺衍生物, 并对缺血性脑卒中的神经保护作用进行了生物学评价。氧糖剥夺/再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 细胞模型结果显示, *L*-精氨酸与2-甲氧基肉桂醛形成的精氨酸亚胺衍生物**AI-2**组细胞存活率高于阳性药丁苯酞 (butylphthalide, NBP) 组, 并能够有效释放*L*-精氨酸, 显著降低活性氧、丙二醛水平, 提高超氧化物歧化酶水平, 具有高度抗氧化作用。体内实验结果显示, **AI-2** (5 mg·kg^{-1}) 能显著改善大鼠短暂性大脑中动脉闭塞的神经功能评分, 有效地减少脑梗死, 优于丁苯酞。本研究发现了一类具有神经保护活性的*L*-精氨酸/活性醛亚胺衍生物, 为缺血性脑卒中的治疗提供了先导化合物。实验中所有操作均获得中国药科大学动物伦理委员会批准, 批准号: YSL-202503102。

关键词: 缺血性脑卒中; *L*-精氨酸; 活性醛; OGD/R模型; 短暂性大脑中动脉闭塞模型

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1791-08

Design, synthesis and biological activity of *L*-arginine/active aldimine derivatives

BU Xiao-han[1], HUANG Meng-shuang[2], CHEN Hui-qin[1], GENG Yu-jie[1], LIU Hong[1,3], YU Yong-ping[1,4], HUANG Zhang-jian[1,2,5*], AIBIBULA Paruke[1*]

(*1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 4. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 5. Xinjiang Key Laboratory of Biomedical Equipment, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China*)

Abstract: Ischemic stroke (IS) is a disease with high mortality and disability rate worldwide, and there are few clinical treatment drugs. The natural active ingredients of traditional Chinese medicine, such as cinnamaldehyde and anisaldehyde, have antioxidant and anti-inflammatory effects, which can reduce the oxidative stress injury caused by ischemic stroke. In addition, studies have found that *L*-arginine is a substrate of nitric oxide synthase

收稿日期: 2025-03-02; 修回日期: 2025-04-08.

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (2023B03012-1); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01D38, 2023D01D16); 中亚高发病机理与防治国家重点实验室开放课题 (SKL-HIDCA-2024-4); 新疆医科大学人才专项经费 (0103010211); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2632023TD04).

*通讯作者 Tel: 18052017178, E-mail: cpudahuang@163.com;
Tel: 13609903134, E-mail: paruke@xjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0226

(NOS), which can be converted into NO in the body to dilate blood vessels and increase blood flow in the cerebral ischemic area. In this paper, 10 new *L*-arginine/active aldimine derivatives were designed and synthesized, and the neuroprotective effects of ischemic stroke were evaluated biologically. The results of oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) cell model showed that the cell survival rate of the arginine imine derivative **AI-2** group formed by *L*-arginine and 2-methoxycinnamaldehyde was higher than that of the positive drug butylphthalide (NBP) group, and it could effectively release *L*-arginine, significantly reduce the levels of reactive oxygen species and malondialdehyde, increase the level of superoxide dismutase, and had a high antioxidant effect. The results of *in vivo* experiments showed that **AI-2** (5 mg·kg^{-1}) could significantly improve the neurological function score of transient middle cerebral artery occlusion model in rats and effectively reduce cerebral infarction, which was superior to butylphthalide. In this study, a class of *L*-arginine/active aldimine derivatives with neuroprotective activity were found, which provided lead compounds for the treatment of ischemic stroke. All operations in the experiment were approved by the Animal Ethics Committee of China Pharmaceutical University, approval No. YSL-202503102.

Key words: ischemic stroke; *L*-arginine; active aldehyde; OGD/R model; transient middle cerebral artery occlusion model

脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是一种发病率高、致残率高和死亡率高的疾病, 严重威胁着人类的身体健康[1]。卒中可分为两大类: 出血性和缺血性卒中, 其中缺血性卒中占卒中病例的85%[2,3]。缺血性卒中会导致脑部供血不足, 引起缺血缺氧, 从而导致脑组织坏死。使IS患者留下瘫痪、语言障碍等后遗症[4]。目前, 临床上治疗缺血性卒中的重点是通过溶栓或血栓切除术实现再通[5]。临床使用溶栓药物有抗血小板聚集药物、降纤药物、抗凝药物和神经保护药物等。其中组织纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 是唯一一种抗缺血性脑卒中特异性药物。但由于其有限的时间窗, 且给药后可能出现出血的风险, 故仅有3%～5%的缺血性脑卒中患者可接受治疗。由于治疗缺血性脑卒中的临床有效药物仍缺乏[6-8], 因此迫切需要开发新型、高效的抗缺血性脑卒中药物。

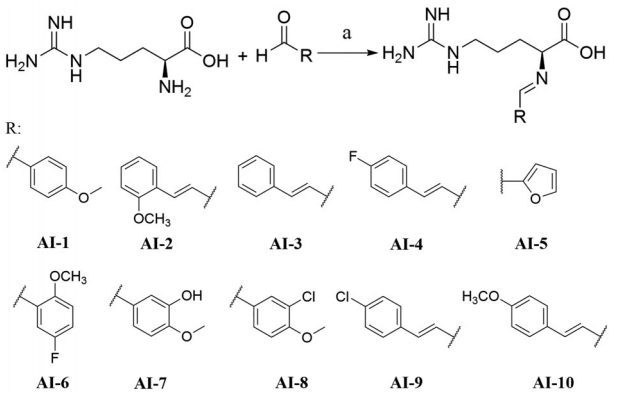
近年来, 中药天然活性成分在缺血性脑卒中的潜在治疗中受到了广泛的关注[2]。茴香醛主要存在于植物茴芹和茴香中, 是合成其他化合物的重要中间体。其具有抗氧化、抗血栓形成、抗炎、抗菌和抗真菌的特性[9,10]。肉桂醛 (cinnamaldehyde, CA) 是从中药肉桂中提取分离的生物活性成分, 具有抗氧化应激、抗炎、抗肿瘤、降血脂等特性[11,12], 对缺血性脑卒中具有神经保护作用[13]。

L-精氨酸 (*L*-arginine, *L*-Arg) 是一种半必需氨基酸, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节等功能; 可被内源性一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 代谢为NO和瓜氨酸。NO作为内皮细胞松弛因子, 可以通过扩张缺血半暗带中的小动脉, 增加侧支血流减少缺血性脑损伤[14]。还可以抑制血小板聚集和白细胞黏附[15,16]。在脑缺血再灌注损伤过程中起着重要的作用[17,18]。基于上述背景, 本研究设计、合成了*L*-精氨酸/活性醛亚胺衍生物, 研究了化合物中*L*-精氨酸的释放, 并评估了它们在体外和体内的抗脑缺血作用, 希望能在脑缺血的酸性微环境中释放*L*-精氨酸, 并可能促进NO的释放, 使NO和活性醛各自发挥扩张血管和抗炎、抗氧化作用。

结果与讨论

1 化学合成

目标化合物的制备如合成路线1所示。通过*L*-精氨酸与不同种类的醛 (肉桂醛、2-甲氧基肉桂醛、4-氟肉桂醛、4-甲氧基肉桂醛、4-氯肉桂醛、对茴香醛、5-氟-茴香醛、3-氯对茴香醛、糠醛、异香草醛) 经席夫碱反应制备了目标化合物 **AI-1**～**AI-10**, 总收率在60%～80%, 其中*L*-精氨酸与糠醛反应生成的 **AI-5** 化合物产率低, 即使尝试不同种类溶剂或升高温度进行反应, 也没有显著地提高反应产率, 推测可能与糠醛底物的低反应活性有关。



Scheme 1 Synthesis routes of target compounds **AI-1**－**AI-10**. a: EtOH, H_2O, rt, 4 h

2 生物活性研究

2.1 AI-1～AI-10对氧糖剥夺/再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导的PC 12细胞损伤的保护作用 结果如图1所示, 与对照组相比, OGD/R处理后显著降低了高分化大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (PC 12) 细胞的存活率, 提示成功建立了神经损伤模型。在相同浓度 (2 μmol·L^{-1}) 下, 与模型组相比, 各处理组的细胞活力均有不同程度的提高。其中, **AI-2** 组的细胞活力较好, 细胞存活率在66.5%。

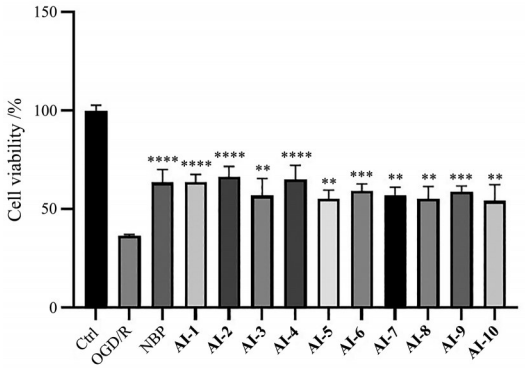


Figure 1 Effect of the compounds on the cell viability of PC 12 cells after OGD/R injury. OGD/R: Oxygen glucose deprivation/reperfusion. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* OGD/R group

2.2 构效关系分析 当目标化合物为无取代的茴香醛 (**AI-1**) 的衍生物时, 整体活性优于无取代的肉桂醛 (**AI-3**) 和糠醛 (**AI-5**) 衍生物; 以多种取代的茴香醛与*L*-精氨酸进行修饰后, 发现无取代的茴香醛 (**AI-1**) 衍生物活性最好, 同时5-位氟取代 (**AI-6**) 衍生物的活性优于3-位羟基取代 (**AI-7**) 和3-位氯取代 (**AI-8**) 的茴香醛衍生物; 以多种取代的肉桂醛与*L*-精氨酸进行修饰后, 发现2-位甲氧基取代 (**AI-2**) 的肉桂醛的衍生物活性最好, 同时4-位氟取代 (**AI-4**) 和4-位氯取代 (**AI-9**) 活性优于无取代的肉桂醛的衍生物, 4-位甲氧基取代 (**AI-10**) 的肉桂醛的衍生物活性最差; 当目标化合物为2-位甲氧基取代的肉桂醛的衍生物时, 活性优于多种取代的茴香醛和无取代的糠醛。基于以上分析, 2-位甲氧基取代的肉桂醛的衍生物 (**AI-2**) 表现出最好的活性, 为进一步优化结构提供了依据。

2.3 *L*-精氨酸的释放 将**AI-2**化合物溶于pH = 5的酸性溶液中, 随后在10、30、60 min量取含有**AI-2**化合物的溶液 (636 μg·mL^{-1}) 进行检测。用回归方程计算相应时间*L*-精氨酸的释放量。结果显示, **AI-2**化合物中*L*-精氨酸在10、30、60 min的释放量分别为22.04%、39.47%、66.81%, 说明**AI-2**化合物在酸性溶液中能够释放出*L*-精氨酸。

2.4 流式细胞术检测细胞内活性氧含量 缺血性脑卒中会导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生增加。缺血再灌注也可诱发ROS连锁反应, 通过脂质、蛋白质和DNA过氧化进一步加重脑组织氧化应激损伤。本文采用流式细胞术检测**AI-2** (2 μmol·L^{-1}) 对PC 12细胞内ROS含量的影响。结果显示, 与OGD/R组相比, **AI-2**组显著降低了细胞内ROS的含量, 优于等摩尔浓度的NBP组 ($P < 0.05$) (图2A、B)。

2.5 细胞内SOD和MDA的含量测定 为了进一步验证**AI-2**的抗氧化能力, 作者检测了**AI-2**对氧化应激指数的影响。**AI-2**处理增加了超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的释放 (图2C), 同时降低了PC 12细胞中的丙二醛 (malondiadehyde, MDA) 水平 (图2D)。这些数据表明**AI-2**可以通过抑制氧化应激损伤来提高细胞活力。

2.6 AI-2减轻MCAO大鼠脑缺血损伤 大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型是

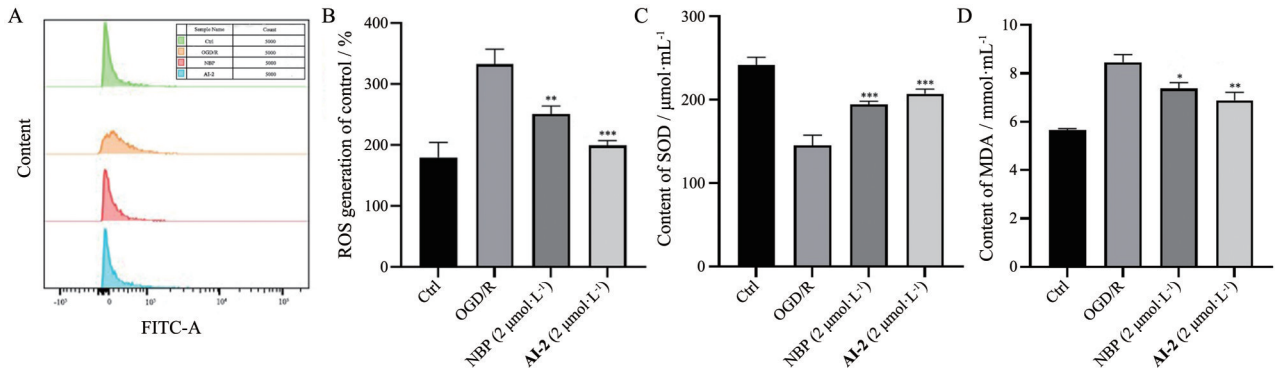


Figure 2 Effects of **AI-2** and NBP on superoxide dismutase (SOD), malondiadehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in PC 12 cells. A: The content of ROS in OGD/R induced PC 12 cells treated with compound **AI-2**; B−D: The content of ROS (B), SOD (C), and MDA (D) in OGD/R induced PC 12 cells treated with compound **AI-2**. NBP: Butylphthalide. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* OGD/R group

评估缺血性卒中的常用模型。在线栓法tMCAO (缺血1 h, 再灌24 h) 所致大鼠急性脑缺血再灌注损伤模型中研究了化合物**AI-2**的体内活性。氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色观察脑梗死面积的大小, 并进行神经功能评分。如图3所示, 阳性对照药丁苯酞 (5 mg·kg^{-1}) 静脉给药后, 能明显减少脑梗死体积 ($P < 0.05$), 但神经行为学无明显差异 ($P > 0.05$); **AI-2**静脉给药 (5 mg·kg^{-1}) 后能显著减少MCAO后大鼠的脑梗死面积 ($P < 0.001$), 改善神经功能评分 ($P < 0.01$)。

3 小结

本研究设计合成了10个*L*-精氨酸/活性醛亚胺衍生物, 其在酸性环境中能释放*L*-精氨酸, 并可能释放NO。通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) 法筛选出目标化合物**AI-2**, 并评价了其抗氧化活性, 结果显示, **AI-2**降低了MDA、ROS水平, 并且提高了SOD的水平, 效果优于阳性药NBP。**AI-2** (5 mg·kg^{-1}) 可明显改善tMCAO大鼠术后24 h行为学评分, 减少脑梗死体积。这些结果说明, **AI-2**通过释放*L*-精氨酸并可能释放NO、扩张血管、增加脑血流量, 活性醛发挥抗氧化活性, 从而发挥了脑保护作用, 提示**AI-2**可以作为抗IS的先导化合物。

实验部分

核磁共振波谱仪 (Unity-Inova 600 MHz型、Unity-Inova 400 MHz型, 美国Varian公司); 显微熔点仪 (X-4型, 上海精密科学仪器有限公司); 高分辨质谱仪 (Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL)、三气细胞培养箱 (Galaxy 170R)、恒温细胞培养箱 (Galaxy 170R)、全波长酶标仪 (Multiskan GO型) (美国Thermo公司); 恒温水浴锅 (HH-S4, 金坛市医疗仪器厂); 倒置显微镜 (SOPTOP型, 宁波舜宇仪器公司); 高速台式离心机 (3-18K, 美国Sigma公司); 流式细胞仪 (BD, 美国BD Biosciences公司); 高效液相色谱仪 (2695-2487, 美国沃特世公司); HPLCONE-5HILIC-A色谱柱 (547001-001, 大连依利特分析仪器有限公司); 漩涡混匀仪 (MX-S, 美国SCILOGEX公司)。

PC 12细胞购于赛百糠 (上海) 生物技术股份有限公司; 胎牛血清 (2148389)、DMEM细胞培养液 (06-1055-57-1ACS) 购于以色列BI公司; 无糖DMEM细胞培养液 (11966025) 购于赛默飞世尔科技公司; SOD ELISA试剂盒 (TW30284)、MDA ELISA试剂盒 (S0131S) 购于上海通蔚实业有限公司; H_2DCF-DA荧光探针 (20310422) 购于苏州优逸兰迪生物科技有限公司。本实验所有试剂未经说明的均为分析纯。主要试剂*L*-精氨酸 (K2218038)、肉桂醛 (F2202263) 等原料药均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 4-氯肉桂醛 (E832605)、异香草醛 (I811950) 购于上海麦克林生化科技有限公司; 乙腈 (WXBF3504V) 购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 磷酸二氢钠 (20230301801) 购于天津市致远化学试剂有限公司。

1 化学合成

1.1 (*S*,*E*)-5-胍基-2-((4-甲氧基亚苄基)氨基)戊酸 (AI-1) 向装有5 mL蒸馏水的100 mL三口烧瓶中加入0.87 g (5 mmol) *L*-精氨酸, 25 ℃室温, 磁力搅拌30 min使其溶解。称取0.68 g (5 mmol) 对茴香醛用10 mL乙醇溶解, 将溶有对茴香醛的10 mL乙醇溶液用滴液漏斗缓慢滴加至混合液中, 25 ℃室温下, TLC监测 (甲醇∶二氯甲烷 = 2∶1) 4 h反应完全, 停止反应, 混合液进行抽滤并用冰乙醇洗涤, 真空干燥所得产品为白色固体, 产率76.7%, m. p. 218.1～218.3 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.43 (s, 1H), 8.17 (s,

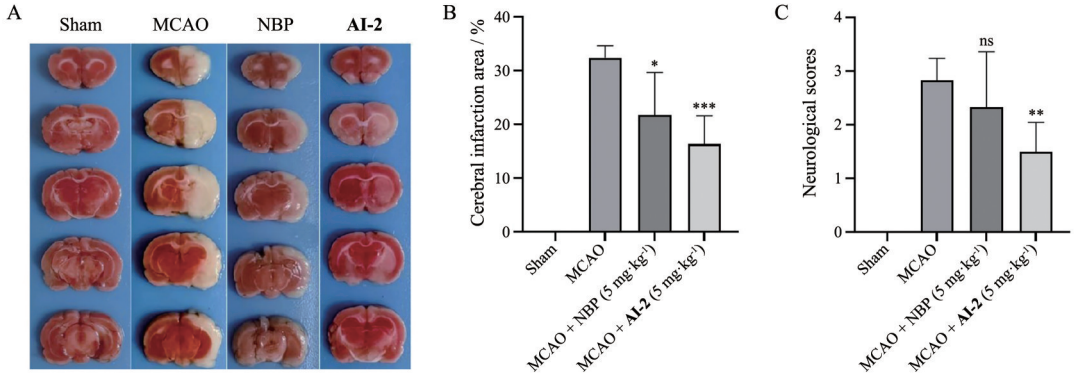


Figure 3 Effects of intravenous injection of *L*-arginine/imine derivative (**AI-2**) and NBP at 1 h after ischemia on cerebral infarction volume and neurological function score in rats with transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). A: The effect of compound **AI-2** on cerebral infarction volume; B: Cerebral infarction area; C: Neurological scores. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* MCAO group

1H), 8.25～7.30 (m, 3H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.17～2.99 (m, 2H), 1.97～1.78 (m, 1H), 1.75～1.56 (m, 1H), 1.57～1.35 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 176.34, 160.89, 159.13, 157.47, 129.44, 129.25, 113.91, 75.98, 55.20, 40.54, 31.22, 26.14; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{14}H_{21}N_4O_3^+$ $(M+H)^+$ 293.160 82, found 293.161 37。

化合物**AI-2**～**AI-10**按照化合物**AI-1**合成与纯化方法进行合成。

1.2 (*S*)-5-胍基-2-(((1*Z*,2*E*)-3-(2-甲氧基苯基)烯丙基)氨基)戊酸 (AI-2) 白色固体, 收率 71.8%, m.p. 211～211.2 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.71～9.34 (m, 1H), 8.25～7.30 (m, 3H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.75～7.64 (m, 1H), 7.58～7.48 (m, 2H), 7.07～6.89 (m, 3H), 6.74 (dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.16～3.01 (m, 2H), 1.88～1.75 (m, 1H), 1.72～1.55 (m, 1H), 1.54～1.37 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 176.04, 162.10, 157.96, 156.91, 147.84, 135.71, 128.88, 127.49, 124.07, 120.67, 111.52, 75.96, 55.48, 40.49, 31.33, 26.03; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{23}N_4O_3^+$ $[M+H]^+$ 319.176 47, found 319.177 02。

1.3 (*S*)-5-胍基-2-(((1*Z*,2*E*)-3-苯基烯丙基)氨基)戊酸 (AI-3) 白色固体, 收率 73.2%, m.p. 207.5～207.8 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.36 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.35～7.43 (m, 3H), 7.59～7.54 (m, 2H), 7.42～7.35 (m, 2H), 7.34～7.29 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, 1H), 3.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.18～3.01 (m, 2H), 1.90～1.76 (m, 1H), 1.66 (td, *J* = 13.8, 11.2, 6.7 Hz, 1H), 1.54～1.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 175.80, 161.28, 157.42, 140.62, 135.59, 128.65, 128.56, 127.99, 126.91, 75.83, 40.46, 31.16, 25.86; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{21}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ 289.165 90, found 289.166 45。

1.4 (*S*)-2-(((1*Z*,2*E*)-3-(4-氟苯基)烯丙基)氨基)-5-胍基戊酸 (AI-4) 白色固体, 收率 81.2%, m.p. 189.5～189.7 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.03 (s, 1H), 8.35～7.40 (m, 3H), 7.98～7.90 (m, 1H), 7.68～7.52 (m, 2H), 7.22～7.08 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.85～6.73 (m, 1H), 3.67～3.50 (m, 1H), 3.24～2.92 (m, 2H), 1.94～1.73 (m, 1H), 1.73～1.56 (m, 1H), 1.54～1.31 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 176.22, 162.40 (d, *J* = 233.5 Hz), 161.54, 157.43, 139.89, 132.27, 129.27, 127.74, 115.70 (d, *J* = 21.5 Hz), 76.18, 40.51, 31.36, 26.03; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{20}FN_4O_2^+$ $[M+H]^+$ 307.156 48, found 307.157 03。

1.5 (*S*,*E*)-2-((呋喃-2-基亚甲基)氨基)-5-胍基戊酸 (AI-5) 棕色固体, 收率 62.5%, m.p. 176.7～176.9 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.36 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 8.00～7.28 (m, 3H), 6.86 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.17～3.01 (m, 2H), 1.90～1.79 (m, 1H), 1.70～1.59 (m, 1H), 1.53～1.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 175.75, 157.39, 151.60, 148.92, 144.97, 113.88, 111.78, 75.78, 40.47, 31.11, 26.08; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{11}H_{17}N_4O_3^+$ $[M+H]^+$ 253.129 52, found 253.130 07。

1.6 (*S*,*E*)-2-((5-氟-2-甲氧基亚苄基)氨基)-5-胍基戊酸 (AI-6) 白色固体, 收率 75.5%, m.p. 198.2～198.5 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.48 (s, 1H), 8.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.12～7.34 (m, 3H), 7.52 (dd, *J* = 9.3, 3.3 Hz, 1H), 7.25 (td, *J* = 8.7, 3.4 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 9.2, 4.3 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.70 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.15～2.99 (m, 2H), 1.94～1.82 (m, 1H), 1.73～1.58 (m, 1H), 1.54～1.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 175.49, 157.32, 156.32 (d, *J* = 235.0 Hz), 154.62, 153.55, 117.86, 113.44, 112.20, 111.97, 75.91, 56.17, 40.52, 31.25, 26.14; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{14}H_{20}FN_4O_3^+$ $[M+H]^+$ 311.151 40, found 311.151 94。

1.7 (*S*,*E*)-5-胍基-2-((3-羟基-4-甲氧基亚苄基)氨基)戊酸 (AI-7) 淡黄色固体, 收率 70.5%, m.p. 193.2～193.4 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.10 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.01～7.42 (m, 3H), 7.25～7.22 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.68～3.60 (m, 1H), 3.14～3.02 (m, 2H), 1.91～1.79 (m, 1H), 1.69～1.58 (m, 1H), 1.53～1.38 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 176.71, 159.67, 157.39, 149.97, 147.03, 129.49, 120.95, 113.07, 111.48, 76.21, 55.47, 40.52, 31.27, 26.05; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{14}H_{21}N_4O_4^+$ $[M+H]^+$ 309.155 73, found 309.156 28。

1.8 (*S*,*E*)-2-((3-氯-4-甲氧基亚苄基)氨基)-5-胍基戊酸 (AI-8) 淡黄色固体, 收率 76.2%, m.p. 227.6～227.8 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.87 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.66 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.92～1.84 (m, 1H), 1.70～1.60 (m, 1H), 1.53～1.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 175.84, 157.64, 157.42, 155.85, 130.23, 128.44, 128.31, 121.37, 112.53,

75.55, 56.22, 40.48, 31.18, 26.06; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{14}H_{20}ClN_4O_3^+$ $[M+H]^+$ 327.121 84, found 327.122 39。

1.9 (*S*)-2-(((1*Z*,2*E*)-3-(4-氯苯基)烯丙基)氨基)-5-胍基戊酸 (AI-9) 淡黄色固体, 收率 70.6%, m.p. 230.6～230.8 ℃。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.34 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.25～7.37 (m, 3H), 7.66～7.61 (m, 2H), 7.23～7.17 (m, 2H), 7.04 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.87～6.80 (m, 1H), 3.58 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.16～3.01 (m, 2H), 1.89～1.76 (m, 1H), 1.65 (h, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.53～1.37 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 178.35, 164.46, 161.06, 151.65, 135.73, 130.46, 129.16, 128.84, 114.13, 72.75, 40.57, 30.81, 24.60; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{20}ClN_4O_2^+$ $[M+H]^+$ 323.126 93, found 323.127 48。

1.10 (*S*)-5-胍基-2-(((1*Z*,2*E*)-3-(4-甲氧基苯基)烯丙基)氨基)戊酸 (AI-10) 白色固体, 收率 65.6%, m.p. 205.3～205.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 9.34 (s, 1H), 8.13～7.39 (m, 3H), 7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.05～6.90 (m, 3H), 6.80～6.69 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.55 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.19～2.96 (m, 2H), 1.89～1.72 (m, 1H), 1.72～1.55 (m, 1H), 1.53～1.32 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 176.45, 160.38, 157.83, 153.70, 140.87, 131.19, 129.10, 115.04, 114.76, 76.46, 55.67, 40.99, 31.81, 26.57; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{23}N_4O_3^+$ $[M+H]^+$ 319.176 47, found 319.177 02。

2 生物学评价

2.1 细胞培养 PC 12细胞在含有10% FBS、1%链霉素和1%青霉素的杜氏改良Eagle培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 中生长, 并置于37 ℃、5% CO_2的培养箱中。细胞培养1～2天后, 更换细胞培养液, 待培养瓶中细胞密度达到80%左右时进行细胞传代, 选择对数生长期细胞状态良好的细胞进行后续实验。

2.2 OGD/R模型的建立及药物干预[19] 以每孔1×10^4个细胞的密度接种对数生长期的PC 12细胞于96孔板中。将孔板在37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养, 直至细胞密度达到约80%。目标化合物**AI-1**～**AI-10**与阳性药物丁苯酞用DMSO配成2×10^{-2} mol·L^{-1}的溶液作为供试品溶液, 将供试品溶液稀释成浓度为2 μmol·L^{-1}的溶液, 用含有化合物 (2 μmol·L^{-1}) 的DMEM预处理细胞3 h, 然后用无葡萄糖DMEM培养基替换, 并置于充满1% O_2、5% CO_2和94% N_2混合物的三气培养箱中。OGD 2 h后, 用含有10% FBS、1%链霉素和1%青霉素的DMEM培养基替换无葡萄糖的DMEM培养基。在37 ℃、5% CO_2下孵育12 h后, 进行后续实验。

2.3 CCK8法检测细胞活力 将对数生长期的PC 12细胞以每孔1×10^4个细胞接种于96孔板中。当细胞密度达到约80%时, 用浓度为2 μmol·L^{-1}的化合物处理细胞3 h, 然后OGD 2 h并复氧12 h。将PC 12细胞与CCK8 (质量浓度为0.5 mg·mL^{-1}) 在37 ℃培养箱中孵育1 h, 然后采用全波长酶标仪在450 nm下测吸光度 (OD) 值。根据公式: 存活率 (%) = [($OD_{样品组}$ − $OD_{空白组}$) / ($OD_{模型组}$ − $OD_{空白组}$)] × 100%, 计算不同化合物下PC 12细胞的存活率。

2.4 HPLC检测*L*-Arg的释放[20] 精密称取*L*-精氨酸标准品并配成350 μg·mL^{-1}的储备液备用, 将储备液逐级稀释成0.35、0.175、0.087 5、0.043 75、0.021 875、0.010 937 5 μg·mL^{-1}的溶液, 使用HPLCONE-5HILIC-A (150 mm × 4.6 mm × 5 μm) 色谱柱; 流动相: 0.01 mol·L^{-1}磷酸二氢钠溶液−乙腈 (25∶75); 对*L*-精氨酸标准品进行检测, 以质量浓度为横坐标 (*X*), 样品峰面积为纵坐标 (*Y*), 计算回归方程。将精密称取的**AI-2**化合物用pH = 5的酸性溶液溶解并配制成质量浓度为636 μg·mL^{-1}的溶液, 随后在10、30、60 min的时间段, 量取含有**AI-2**化合物的溶液进行检测, 用回归方程计算相应时间*L*-精氨酸的释放量。

2.5 H_2DCF-DA荧光探针检测细胞内ROS测定 以每孔3×10^4个细胞接种于6孔板中, 构建OGD/R模型后, 吸去原有培养液, 按比例稀释2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯 (2′,7′-dichlorofluorescin diacetate, H_2DCF-DA) (H_2DCF-DA∶无血清培养液 = 1∶1 000), 终浓度为10 μmol·L^{-1}, 收集细胞后每个离心管加入1 mL H_2DCF-DA探针, 每组设置3个重复, 37 ℃细胞培养箱孵育25 min, 每隔3～5 min颠倒混匀, 使探针和细胞充分接触; 然后吸去H_2DCF-DA溶液, 用无血清培养液清洗3次, 以除去细胞外的H_2DCF-DA, 防止残留导致背景过高。流式细胞仪下检测荧光强度, 488 nm激发波长, 525 nm发射波长。

2.6 SOD、MDA含量的测定 PC 12细胞以每孔3×10^4个细胞接种于6孔板中, 构建OGD/R模型后, 设置标准品孔, 每孔加不同浓度标准品50 μL。样本孔加待测样品10 μL, 再加样本稀释液40 μL。标准品孔和样本孔每孔加HRP标记的检测抗体100 μL, 用封板膜封住, 培养箱孵育1 h。弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加洗涤液, 静置1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 重复5次。每孔加入底物A、B各50 μL, 避光孵育15 min。每孔加终止液, 使用酶标仪于450 nm处测定OD值。以浓度为横坐标 (*X*), 样品OD值为纵坐标 (*Y*), 计算回

归方程, 用回归方程分别计算SOD、MDA含量。

3 动物

SPF级雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠(190～210 g), 购自浙江维通利华实验技术有限公司, 许可证号: SCXK (浙) 2019-0001。大鼠饲养在通风笼中, 饲养条件包括温度(23 ± 2) ℃、相对湿度(60%)、光/暗循环(12 h)及自由进食和饮水。所有动物护理和实验程序均获得中国药科大学动物伦理委员会批准, 批准号: YSL-202503102。

3.1 短暂性大鼠脑缺血模型(tMCAO)建立[21] 为探讨目标化合物**AI-2**对缺血再灌注损伤的保护作用, 建立大鼠MCAO模型。成年雄性大鼠, 分为Sham组、MCAO组、MCAO + NBP组和MCAO + **AI-2**组, 每组6只。将大鼠麻醉后, 固定大鼠四肢, 采用颈部正中切口, 暴露右侧颈总动脉、右侧颈外动脉、右侧颈内动脉。用弯镊将线栓从缺口插入颈总动脉, 缺血1 h后撤去线栓进行再灌注。假手术组同法操作, 不使用线栓。

3.2 Longa神经行为学评分 再灌注24 h后, 用Longa评分法对大鼠进行神经功能评分。0分: 无神经功能缺损, 即正常状态; 1分: 提起尾巴时瘫痪侧前肢不能完全伸展; 2分: 行走时向瘫痪侧转圈; 3分: 行走时向瘫痪侧倾倒; 4分: 无法自主行走, 存在意识丧失现象。

3.3 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色测量梗死体积。分组同上, 每组6只大鼠, 重复3次。立即取新鲜大脑, 然后放入冰箱冷藏20 min。用刀片切取冠状脑片(2 mm), 在2% TTC溶液中37 ℃避光浸泡30 min, 15 min后翻转1次, 随后在4%多聚甲醛中固定过夜。用数码相机对切片进行拍照。采用Image J软件计算梗死面积百分比, 脑梗死体积百分比 = 梗死体积 / 脑总体积 × 100%。

4 统计学分析

数据以至少3个独立实验的平均值 ± 标准差表示, 结果采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析, 不同组间数据的比较分析采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用*t*检验, $P < 0.05$被认为具有统计学意义。

作者贡献: 步霄晗负责化合物合成、体外活性实验及文章的撰写; 黄梦霜负责动物实验; 陈惠琴、耿宇杰、柳红、俞永平负责实验技术指导; 黄张建、帕如克•艾毕布拉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] Wu GP, Li B, Wei XZ, et al. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-salicyloyl tryptamine derivatives as multifunctional neuroprotectants for the treatment of ischemic stroke [J]. Eur J Med Chem, 2024, 278: 116795.

[2] Wu JZ, Huang CY, Ren S, et al. Design, green synthesis, and anti-glutamate damage screening of chalcone derivatives with spiro-heterocyclic structures as potential anti-ischemic brain and eye damage agents [J]. Bioorg Chem, 2024, 153: 107870.

[3] Jia J, Wu JB, Ji DR, et al. Synthesis and biological evaluation of hybrids from optically active ring-opened 3-*N*-butylphthalide derivatives and 4-fluro-edaravone as potential anti-acute ischemic stroke agents [J]. Bioorg Med Chem, 2022, 69: 116891.

[4] Wu JH, Mao SQ, Wu X, et al. Jasminoidin reduces ischemic stroke injury by regulating microglia polarization *via* PASK - EEF1A1 axis [J]. Chem Biol Drug Des, 2024, 103: e14354.

[5] Wang M, Xing SY, Liu Y, et al. 2-Acetylacteoside improves recovery after ischemic stroke by promoting neurogenesis *via* the PI3K/Akt pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 225: 415-429.

[6] Wu JB, Yin W, Huang ZJ, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of organic nitrite (NO_2-) donors as potential anticerebral ischemia agents [J]. J Med Chem, 2021, 64: 10919-10933.

[7] Abe H, Jitsuki S, Takahashi T. Pharmacological enhancement of stroke rehabilitation [J]. Stroke, 2019, 50: 3323-3329.

[8] Zivin JA. Acute stroke therapy with tissue plasminogen activator (tPA) since it was approved by the U.S Food and Drug Administration (FDA) [J]. Ann Neurol, 2009, 66: 6-10.

[9] Ksouda G, Sellimi S, Merlier F, et al. Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella Saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive [J]. Food Chem, 2019, 288: 47-56.

[10] Muhammad AJ, Ahmed D, Yousuf S, et al. Synthesis, crystal structures, Hirshfeld surface analysis and spectroscopic studies of two Schiff bases of anisaldehyde and their urease and acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties [J]. Heliyon, 2019, 5: e01758.

[11] Li YG, Li JH, Wang HQ, et al. Cinnamaldehyde protects cardiomyocytes from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced lipid peroxidation and DNA damage *via* activating the Nrf2 pathway [J]. Chem Biol Drug Des, 2024, 103: e14489.

[12] Mukhopadhyay P, Mao M, Zheng W, et al. Cinnamaldehyde alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing oxidative stress and ferroptosis in cardiomyocytes [J]. PLoS One, 2023, 18: e0292124.

[13] Qi X, Zhou R, Liu Y, et al. Trans-cinnamaldehyde protected PC12 cells against oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) -induced injury *via* anti-apoptosis and anti-oxidative stress [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 421: 67-74.

[14] Zhu CL, Sun YY, Gao JF, et al. Inhaled nitric oxide protects males but not females from neonatal mouse hypoxia-ischemia brain injury [J]. Transl Stroke Res, 2013, 4: 201-207.

[15] Lüscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system [J]. Eur Heart J, 1991, 12: 2-11.

[16] Zhao Q, Zhang C, Wang XL, et al. (*S*)-ZJM-289, a nitric oxide-releasing derivative of 3-*N*-butylphthalide, protects against ischemic neuronal injury by attenuating mitochondrial dysfunction and associated cell death [J]. Neurochem Int, 2012, 60: 134-144.

[17] Yamada M, Huang Z, Dalkara T, et al. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by *L*-arginine after chronic statin treatment [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 709-717.

[18] Wei Y, Wang Z, Liu YQ, et al. Extracellular vesicles of *Candida albicans* regulate its own growth through the *L*-arginine/nitric oxide pathway [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2023, 107: 355-367.

[19] Zhou YP, Li GC. Kaempferol protects cell damage in *in vitro* ischemia reperfusion model in rat neuronal PC12 cells [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2461079.

[20] Zhou YF, Zhou C, Luo G, et al. Identification of serum metabolomics characteristics in patients with stable angina pectoris using UHPLC-QE-MS [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 3900828.

[21] Zhu T, Fang BY, Meng XB, et al. *Folium ginkgo* extract and tetramethylpyrazine sodium chloride injection (Xingxiong injection) protects against focal cerebral ischeamia/reperfusion injury *via* activating the Akt/Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Pharm Biol, 2022, 60: 195-205.