# 新型京尼平衍生物的设计、合成和多功能治疗阿尔茨海默活性评价

许文雪[1], 赵文杰[1], 张艳春[1,2*], 胡舒妹[1], 沈玉婷[1], 程红艳[1]

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省活性天然产物重点实验室, 安徽 合肥 230012)

**摘要**: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性神经退行性疾病。现有药物只能缓解症状, 尚未达到治愈的效果。鉴于其多因素致病特性, 开发同时作用于多个靶点的小分子化合物显得尤为重要。中药小分子具有同时调节多个生物靶点和信号通路的特点, 在AD的治疗中具有独特优势。本文以具有潜在神经保护作用的中药小分子京尼平 (genipin) 为先导化合物, 设计并合成了一系列多靶点抗AD小分子化合物。其中, 化合物**JD-5**和**JD-7**具有较好的GSK-3$\beta$抑制活性 (**JD-5**, $IC_{50}$ = 3.54 μmol·L$^{-1}$; **JD-7**, $IC_{50}$ = 2.47 μmol·L$^{-1}$), 显著优于先导化合物京尼平 ($IC_{50}$ = 28.16 μmol·L$^{-1}$)。并且, 化合物**JD-5**和**JD-7**在*t*BHP诱导和A$\beta_{25\text{-}35}$诱导的SH-SY5Y细胞损伤实验中, 都表现出显著的神经保护作用。进一步研究发现, 化合物**JD-5**和**JD-7**均可显著降低原代神经元细胞中Tau磷酸化 (S396)水平, 且呈剂量依赖性 (所有动物实验均获得南京拉姆达医药有限公司实验动物伦理委员会的批准, 批准号: IACUC-20220202)。根据以上结果推测, 化合物**JD-5**可能通过抑制GSK-3$\beta$活性及降低Tau蛋白磷酸化水平, 发挥神经保护活性、抗氧化应激作用, 为进一步开发多功能抗AD药物提供了参考。

**关键词**: 京尼平; 丹皮酚; 多靶向配体; GSK-3$\beta$; Tau; 神经保护; 阿尔茨海默病

**中图分类号**: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)05-1731-13

# Design, synthesis and evaluation of novel genipin derivatives for multi-functional treatment of Alzheimer's disease

XU Wen-xue[1], ZHAO Wen-jie[1], ZHANG Yan-chun[1,2*], HU Shu-mei[1], SHEN Yu-ting[1], CHENG Hong-yan[1]

(*1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Bioactive Natural Products, Hefei 230012, China*)

**Abstract**: Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder. Current medications can only alleviate symptoms but have not yet achieved a cure. Given its multifactorial pathogenesis, the development of small-molecule compounds that act simultaneously on multiple targets is particularly important. Traditional Chinese medicine (TCM) small molecules, which can regulate multiple biological targets and signaling pathways, offer unique advantages in AD treatment. This study utilized genipin, a TCM small molecule with potential neuroprotective effects, as the lead compound to design and synthesize a series of multi-target anti-AD small molecule compounds. Among these, compounds **JD-5** and **JD-7** exhibited significantly enhanced GSK-3$\beta$ inhibitory activity (**JD-5**, $IC_{50}$ = 3.54 μmol·L$^{-1}$; **JD-7**, $IC_{50}$ = 2.47 μmol·L$^{-1}$), substantially outperforming the lead compound genipin ($IC_{50}$ = 28.16 μmol·L$^{-1}$). Furthermore, both **JD-5** and **JD-7** demonstrated significant neuroprotective effects in SH-SY5Y cell damage experiments induced by *t*BHP and A$\beta_{25\text{-}35}$. Further investigation revealed that compounds **JD-5** and **JD-7** could significantly reduce Tau phosphorylation (S396) levels in primary neuronal cells, with dose-dependent effects. All animal experiments were approved by the Experimental Animal Ethics Committee of

收稿日期: 2025-07-14; 修回日期: 2025-11-05.

基金项目: 安徽省高等学校自然科学类研究项目 (重大) (2023AH040107).

*通讯作者 Tel: 18756590637, E-mail: yczhang2017@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0816

Nanjing Ramda Pharmaceutical Co., Ltd (approval number: IACUC-20220202). Based on these results, it is hypothesized that compound **JD-5** likely exerts neuroprotective and antioxidant stress effects by inhibiting GSK-3$\beta$ activity and reducing Tau protein phosphorylation levels, providing a reference for the development of multifunctional anti-AD drugs.

**Key words**: genipin; paeonol; multi-target ligand; GSK-3$\beta$; Tau; neuroprotection; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性神经退行性疾病, 临床表现为记忆力减退、认知障碍和行为障碍等。目前抗AD药物主要包括乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 抑制剂、*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体拮抗剂等 (图1)[1,2]。由于AD的复杂病理机制涉及多系统失调, 这类单靶点药物仅能提供对症治疗, 无法完全治愈疾病。近年研究发现, 能同时针对AD的多个致病环节 (如A$\beta$沉积、Tau蛋白异常、胆碱能缺陷等) 的多靶点药物, 不仅能改善症状, 还能延缓病情发展, 减少耐药性, 发挥联合用药的效果[3,4], 可能缓解单靶点策略的小分子药物的局限性。例如由美金刚和AChE抑制剂联用已在临床上用于缓解中度至重度AD的症状[5]。目前, 多靶点导向配体 (multitarget-directed ligands, MTDLs) 被认为是治疗AD的有效策略。

近年来, 靶向A$\beta$的单克隆抗体取得了重大突破, 仑卡奈单抗 (lecanemab) 和多奈单抗 (donanemab) 的获批是标志性事件。仑卡奈单抗和多奈单抗通过清除大脑中的A$\beta$斑块发挥神经保护作用, 已在临床试验中表现出一定程度延缓认知下降的效果, 但伴随着淀粉样蛋白相关影像学异常 (amyloid-related imaging abnormalities, ARIA) 等风险[6,7]。为了改善安全性, 研究人员正探索

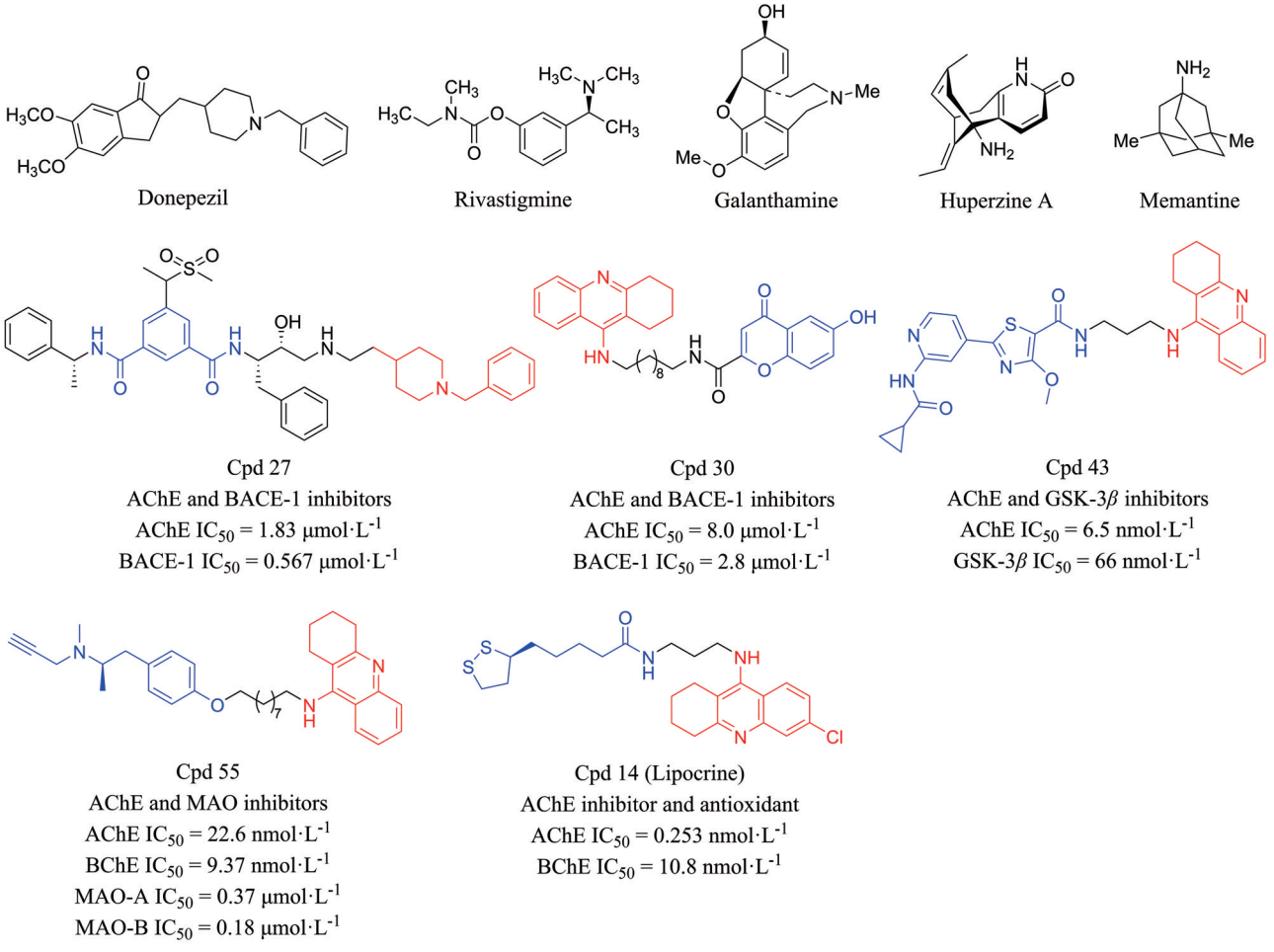



**Figure 1** Single-target drugs for the treatment of AD and polypharmacological ligands with anti-AD activity derived from medicinal chemistry approaches. AD: Alzheimer's disease; AChE: Acetylcholinesterase; BACE-1: $\beta$-Secretase 1; BChE: Butyrylcholinesterase; MAO: Monoamine oxidase; GSK-3$\beta$: Glycogen synthase kinase-3$\beta$

新策略, 我国正在研发的AA001单抗, 通过去除抗体的Fc效应功能, 旨在减少神经突触的过度丢失等不良反应[8]。对于以Tau病理为主的患者, E2814单抗和MAPTRx基因疗法的联合, 通过双通路抑制Tau磷酸化。目前对于AD源性轻度认知障碍和轻度痴呆患者, 免疫治疗可带来潜在的临床获益, 但对于中重度AD患者的免疫治疗获益暂无明确的临床数据支持, 需要在进一步的临床试验中进行探索。

糖原合成酶激酶-3$\beta$ (glycogen synthase kinase-3$\beta$, GSK-3$\beta$) 是Tau蛋白磷酸化关键激酶, 通过促进Tau磷酸化破坏微管稳定性, 同时加剧A$\beta$聚集, 导致神经元死亡, 引起AD[9-13]。单靶点GSK-3$\beta$抑制剂包括ATP竞争性 (如staurosporine、indirubin, 图2) 和非ATP竞争性 (如tideglusib、manzamine A、palinurin、TDZD-8, 图2) 抑制剂, 虽然拥有较高的GSK-3$\beta$抑酶活性, 但由于其竞争性结合ATP位点, 缺乏特异性, 并且具有脱靶效应及高毒性等不良反应, 导致GSK-3$\beta$抑制剂无法进入临床[14-19]。多靶点GSK-3$\beta$抑制剂 (如$\beta$-咔啉-三唑harmine衍生物, 图2) 可同时作用于GSK-3$\beta$/AChE等多个靶点, 协同调控多个AD病理环节[20,21]。

GSK-3$\beta$过度激活会导致Tau蛋白高度磷酸化、A$\beta$沉积、乙酰胆碱合成减少及炎症反应[22]。A$\beta$的累积通常被认为是AD进展的第一步。$\beta$-分泌酶 ($\beta$-secretase, BACE1) 和$\gamma$-分泌酶 ($\gamma$-secretase, 早老素复合物) 通过调控APP的裂解生成A$\beta$, 沉积形成老年斑[23]。研究证实, A$\beta$的累积会导致Tau蛋白病[24]。GSK-3$\beta$作为一种脯氨酸导向的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可以磷酸化Tau蛋白[25]。在AD病程中, Tau蛋白因过度磷酸化从微管中解离成为可溶性Tau蛋白, 在一些聚集诱导剂的调控下形成Tau二聚体, 进而聚集成Tau寡聚体, 最终导致NFTs的产生, 进而致使神经元死亡[26]。GSK-3$\beta$与AChE、BACE-1、HDAC等多个参与AD发病机制的因素相互关联, 使得GSK-3$\beta$成为了多靶点药物设计策略的一个关键靶标 (图3)。

中药因其多途径、多靶点、多成分的特点, 对发病机制复杂的AD显示出独特的治疗优势和潜力。以人参皂苷Rg1 (ginsenoside)、白藜芦醇 (resveratrol)、姜黄素 (curcumin) 等为代表的中药小分子 (图4), 通过激活PI3K/AKT信号通路, 协同调控下游GSK-3$\beta$、NF-$\kappa$B和Nrf2等关键靶点, 抑制A$\beta$生成/聚集和Tau过度磷酸化, 减轻神经炎症和氧化应激, 抑制神经元凋亡, 发挥多机制缓解AD作用[27-29]。丹皮酚 (paeonol, 图4) 具有抗神经炎症、抗氧化和神经保护等药理作用。Chu等[30]发现丹皮酚通过p38MAPK-Nrf2-HO-1通路抑制氧化应激, 减轻神经元损伤, 改善AD模型大鼠神经元损伤和认知功能障碍。京尼平 (genipin, 图4) 有抗炎、

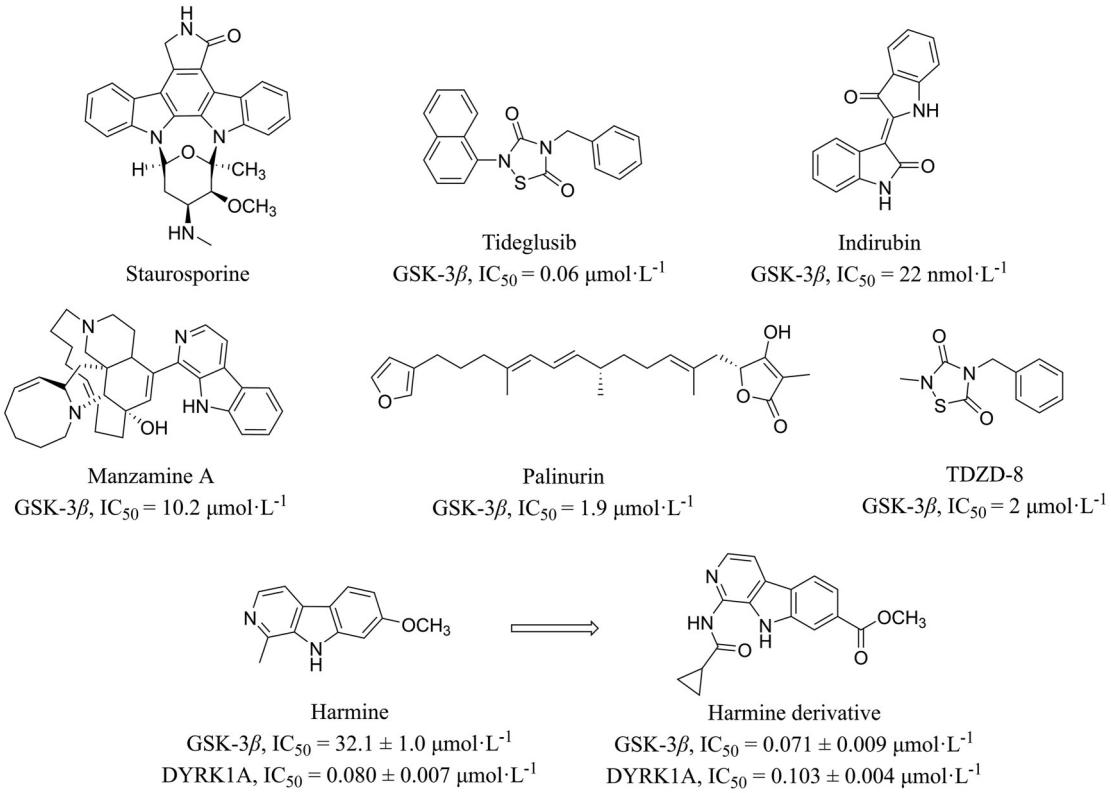



**Figure 2** Structures of glycogen synthase kinase-3$\beta$ (GSK-3$\beta$) inhibitors. DYRK1A: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A

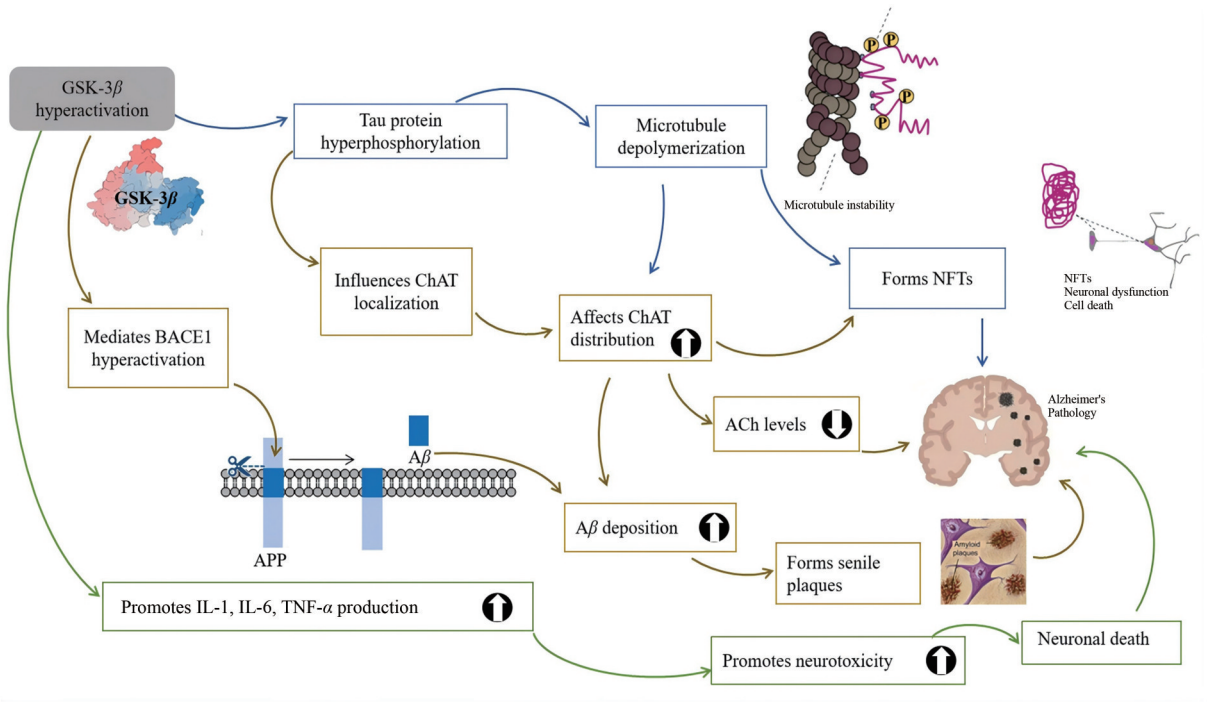



**Figure 3** The mechanism of GSK-3$\beta$ involved in AD. ChAT: Choline acetyltransferase; NFTs: Neurofibrillary tangles; IL-6: Interleukin-6; IL-1: Interleukin-1; TNF-$\alpha$: Tumor necrosis factor-α; ACh: Acetylcholine

抗氧化、抗抑郁及神经保护等广泛的生物活性[31-34]。研究发现, 京尼平能保护大鼠海马原代神经元不受A$\beta$沉积、氧化应激等诱导的细胞毒性的影响, 推测其治疗AD的作用可能通过下调周期蛋白依赖性激酶5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 和GSK-3$\beta$的表达, 抑制Tau磷酸化, 从而减少NFTs, 最终缓解AD症状[35,36]。通过改造京尼平的半缩醛结构、C6=C7双键、环烯内酰胺等方法获得更加稳定的IPRG001、CHR20/CHR21、gardenamide A (图4), 显示出与京尼平相当甚至更好的神经保护活性, gardenamide A抗AD作用可能与激活PI3K/Akt和ERK1/2通路有关[37-40]。

本课题组基于京尼平的神经保护活性和药效团为环烯醚萜骨架, 设计合成了一系列新型化合物。本研究通过对C-1位羟基烷基化或内酰胺化以破坏京尼平的半缩醛结构, 提高分子结构稳定性, 同时通过引入靶向基团与京尼平的C-10共价连接, 旨在获得活性更强、毒性更低的优势候选分子。本课题利用药效团拼合策略, 以极性链作为连接基团, 将京尼平与丹皮酚进行拼合, 设计合成了8个目标化合物 (图5), 以期获得一类多靶点抗AD化合物。

## 结果和讨论

### 1 目标化合物的合成

通过合成路线1制备目标化合物**JD-1**～**JD-8**。京

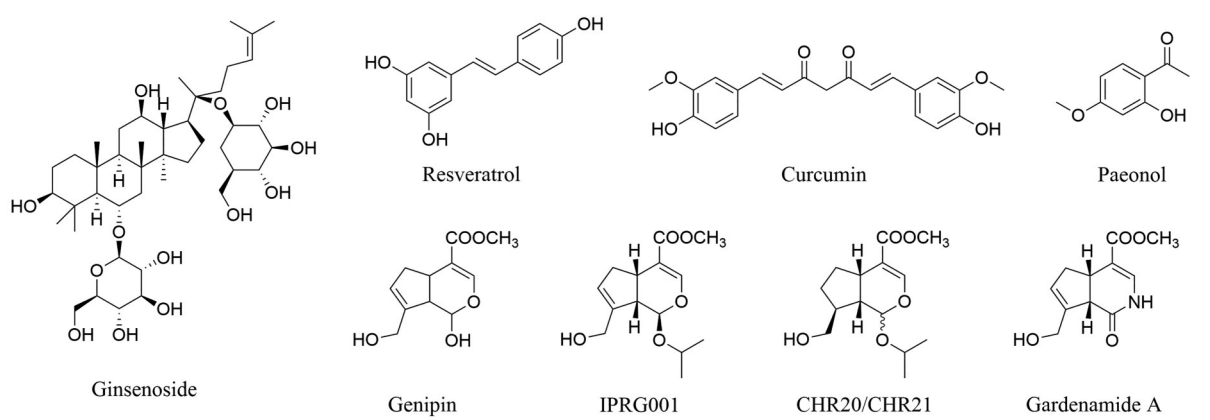



**Figure 4** Small-molecules anti-AD agents from traditional Chinese medicine

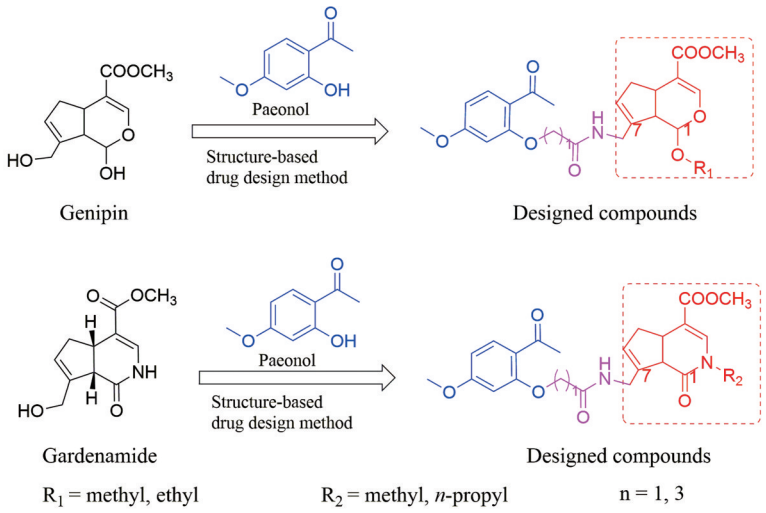



**Figure 5** Design ideas for target compounds

尼平 (**1**) 作为起始原料, 首先与相应的醇反应, 使各种烷基取代 C-1 羟基, 从而合成得到 **2a**、**2b**。同时, 以京尼平为原料通过 TBSCl 选择性保护 C-10 位羟基; 随后, 经戴斯–马丁氧化剂氧化 C-1 位羟基, 经内酰胺化和脱保护基得到关键中间体 **7a**、**7b**。**2a**、**2b**、**7a** 和 **7b** 与邻苯二甲酰亚胺发生 Mitsunobu 反应, 得到中间体 **3a**、**3b**、**8a** 和 **8b**。再经肼解得到 C-10 位的伯胺, 伯胺与化合物 **12** 缩合, 最终形成目标化合物 **JD-1**～**JD-8**。

## 2 生物学评价

**2.1 体外抑酶活性** 现有研究[41]确证了 GSK-3$\beta$ 在 AD 病程中的重要作用。本研究首先以 staurosporine 为阳性对照, 采用 Kinase-Glo 法测试目标化合物的 GSK-3$\beta$ 抑酶活性, 目标化合物对 GSK-3$\beta$ 抑制活性优于先导化合物京尼平 (表 1)。其中, 化合物 **JD-5** 和 **JD-7** 具有较优的 GSK-3$\beta$ 抑制活性 ($IC_{50}$ 分别为 3.54 和 2.47 μmol·L$^{-1}$), 明显优于先导化合物京尼平 ($IC_{50}$ = 28.16 μmol·L$^{-1}$)。此外, 延长酰胺链会导致抑制活性下降 (**JD-1** *vs* **JD-2**、**JD-3** *vs* **JD-4**、**JD-5** *vs* **JD-6**、**JD-7** *vs* **JD-8**)。

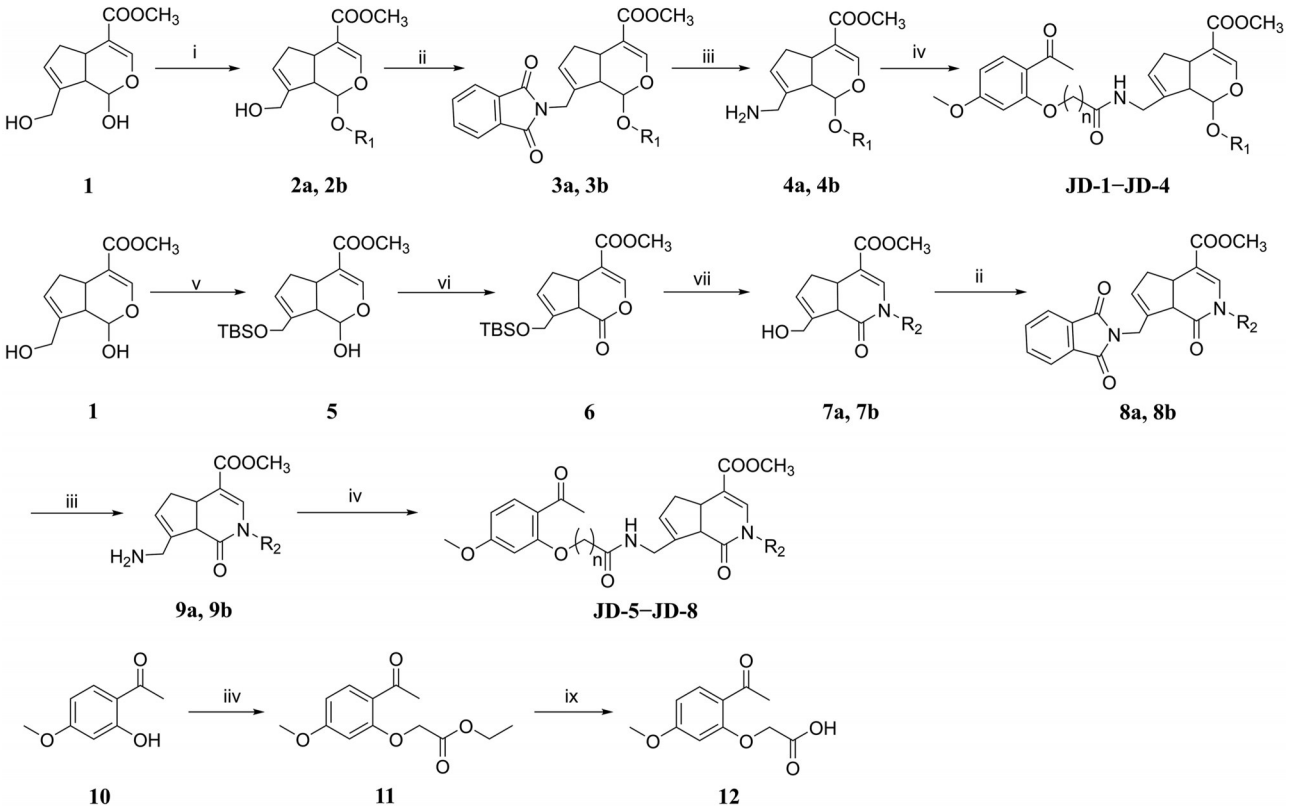
对化合物的活性进行初步构效关系分析, 结果如下: ① 当延长 linker 长度时, 化合物对 GSK-3$\beta$ 的抑酶活性降低 (**JD-1** *vs* **JD-2**、**JD-3** *vs* **JD-4**、**JD-5** *vs* **JD-6**、**JD-7** *vs* **JD-8**); ② 取代基 $R_1$ 的改变对 1-烷氧基京尼平衍生物的 GSK-3$\beta$ 抑制活性影响不大, 当增长栀子酰胺 A 衍生物吡喃环 N 原子上的烷基链 $R_2$ 时, 化合物对 GSK-3$\beta$ 的抑酶活性升高 (**JD-5** *vs* **JD-7**、**JD-6** *vs* **JD-8**); ③ 栀子酰胺 A 衍生物对 GSK-3$\beta$ 的抑酶活性普遍优于 1-烷氧基京尼平衍生物 (**JD-3** *vs* **JD-5**、**JD-4** *vs* **JD-6**)。因此, 本课题化合物下一步的结构改造应在具有内酰胺结构的栀子酰胺 A 类衍生物的基础上, 保留作为 linker 的酰胺键, 筛选具有氢键供体 (或氢键受体) 的不同芳杂环替换丹皮酚片段以提高化合物的抑酶活性。

**2.2 细胞毒性实验** 采用 CCK-8 法测定目标化合物对人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 的细胞毒性, 以多奈哌齐 (donepezil) 作为阳性对照。如表 1 所示, 50 μmol·L$^{-1}$ 浓度下, 大部分目标化合物对 SH-SY5Y 细胞株未表现出显著的神经毒性或毒性较小。CCK-8 的实验结果表明, 目标化合物可以在细胞层面做进一步研究。

**2.3 *t*BHP 及 A$\beta_{25\text{-}35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用实验** 选用 SH-SY5Y 细胞对目标化合物进行体外神经保护活性考察, 以 *t*BHP 作为体外氧化应激的诱导剂建立体外神经炎症模型, 结果如图 6A 所示, *t*BHP 浓度为 50 μmol·L$^{-1}$ 时, 细胞存活率为 78.49%, 随着 *t*BHP 浓度的提高, 细胞存活率呈剂量依赖性下降。当 *t*BHP 浓度为 100 μmol·L$^{-1}$ 时, 细胞存活率下降至 33.89%, 与空白对照组相比具有统计学差异 ($^{**}P < 0.01$)。

此外, 还评估了目标化合物对 A$\beta_{25\text{-}35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞建立的体外神经元损伤模型细胞活力的影响。结果如图 6B 所示, 不同浓度的 A$\beta_{25\text{-}35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 细胞存活率亦呈剂量依赖性下降, A$\beta_{25\text{-}35}$ 浓度为 20 μmol·L$^{-1}$ 时, 对细胞的杀伤作用较小; 当浓度为 40 μmol·L$^{-1}$ 时, 细胞存活率为 84.58%; 当浓度增大到 80 μmol·L$^{-1}$ 时, 细胞存活率下降至 64.40%, 与空白对照组相比, 40 和 80 μmol·L$^{-1}$ 的 A$\beta_{25\text{-}35}$ 组均具有统计学差异 ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)。因此, 选择 100 μmol·L$^{-1}$ *t*BHP 及 80 μmol·L$^{-1}$ 的 A$\beta_{25\text{-}35}$ 作为诱导剂建立细胞损伤模型。

结果如图 6C 所示, 孵育 24 h 后, 暴露于 100 μmol·L$^{-1}$ *t*BHP 的 SH-SY5Y 细胞存活率下降至 33.89%。而化合物组在浓度为 20 μmol·L$^{-1}$ 时能够显著提高 SH-SY5Y 细胞




**Scheme 1** Synthesis routes of target compounds **JD-1**−**JD-8**. Reagents and conditions: (i) *p*-TsOH·$H_2O$, alcohol, 80 ℃, 1 h; (ii) Phthalimide, $pH_3P$, DIAD, $N_2$, THF, r.t., 1 h; (iii) 50% Hydrazine hydrate, EtOH, r.t., overnight; (iv) EDCI, HOBt, **12**, DCM, r.t., overnight; (v) TBS-Cl, imidazole, DMF, 0 ℃, 2 h; (vi) DMP, DCM, r.t., 1 h; (vii) 1) $CH_3NH_2$·HCl or Propylamine, $Et_3N$, $CHCl_3$, 65 ℃, 1 h; 2) TFA, THF, 65 ℃, 2 h; (iiv) Ethyl 2-chloroacetate, $K_2CO_3$, DMF, r.t., overnight; (ix) NaOH, MeOH, r.t., overnight

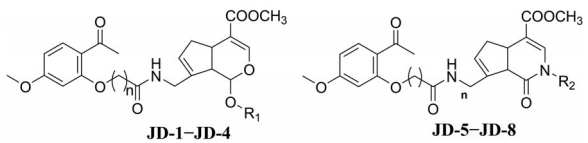
的细胞活力。因此, 选择细胞存活率分别为57.25%和60.77%的化合物**JD-5** (GSK-3$\beta$, $IC_{50}$ = 3.54 μmol·$L^{-1}$)和**JD-7** (GSK-3$\beta$, $IC_{50}$ = 2.47 μmol·$L^{-1}$)进行下一步的研究。

结果如图6D、E所示, 细胞加入80 μmol·$L^{-1}$ A$\beta_{25\text{-}35}$诱导24 h后, 细胞存活率下降至47.52%, 与正常对照组相比具有显著性差异 ($P$ < 0.001); 加入不同浓度的目标化合物**JD-5**和**JD-7**保护4 h后, 与模型组比较, 细胞存活率明显提高。在10 μmol·$L^{-1}$浓度时, 化合物**JD-5**表现出较好的细胞保护作用; 当浓度增至20 μmol·$L^{-1}$时, 细胞保护作用增强, 细胞存活率约为95.73%, 且与A$\beta_{25\text{-}35}$诱导组相比, 具有统计学差异 ($P$ < 0.05, $P$ < 0.001)。同样, 化合物**JD-7**在浓度为20 μmol·$L^{-1}$时亦具有较强的细胞保护作用, 细胞存活率约为94.47%, 与A$\beta_{25\text{-}35}$诱导组相比, 具有统计学差异 ($P$ < 0.001)。表明化合物**JD-5**和**JD-7**对*t*BHP及A$\beta_{25\text{-}35}$诱导的SH-SY5Y细胞模型具有显著的神经保护活性。

**2.4 Western blot法检测Tau蛋白磷酸化表达情况** 通过蛋白质印迹 (Western blot, WB) 法评估化合物**JD-5**和**JD-7**对Tau蛋白高表达的Sprague-Dawley (SD) 大鼠胎鼠原代神经元细胞中Tau过度磷酸化 (Ser396) 的抑制作用, SB-216763 ($IC_{50}$ = 34.3 nmol·$L^{-1}$) 作为阳性对照药。结果如图7所示, 与阴性对照组相比, 不同浓度的化合物孵育原代神经元细胞6 h后, $Tau^{S396}$磷酸化水平呈浓度依赖性下降。其中, 化合物**JD-5**和**JD-7**在0.12 μmol·$L^{-1}$浓度下表现出与阳性对照SB-216763相似的磷酸化抑制效果; 特别是在3.33和10 μmol·$L^{-1}$浓度下, 化合物**JD-5**显著抑制$Tau^{S396}$磷酸化。该实验结果与目标化合物在抑酶活性实验中的GSK-3$\beta$抑制活性相对应, 表明化合物**JD-5**和**JD-7**可能是通过抑制GSK-3$\beta$的活性从而影响Tau蛋白磷酸化的水平。

**2.5 ADME预测** 为进一步分析遴选化合物**JD-5**的药代动力学性质, 作者通过SwissADME在线服务 (https://www. swissadme. ch/) 及DEEP-B3 (http://cbcb.

**Table 1** The GSK-3$\beta$ inhibitory activity and cytotoxicity of target compounds. [a]Genipin, the leading compound; [b]Staurosporine, a typical ATP competitive GSK-3$\beta$ kinase inhibitor, was used as a reference compound in this study




| Cpd. | $R_1$ | $R_2$ | n | $IC_{50}$ /μmol·L$^{-1}$ | Cell survival rate/% |
|---|---|---|---|---|---|
| **JD-1** | Et | − | 1 | 3.85 | 71.76 |
| **JD-2** | Et | − | 3 | 15.26 | 71.49 |
| **JD-3** | Me | − | 1 | 7.40 | 61.57 |
| **JD-4** | Me | − | 3 | 26.99 | 68.84 |
| **JD-5** | − | Me | 1 | 3.54 | 78.14 |
| **JD-6** | − | Me | 3 | 9.71 | 91.31 |
| **JD-7** | − | n-Pr | 1 | 2.47 | 94.61 |
| **JD-8** | − | n-Pr | 3 | 8.92 | 82.27 |
| Genipin[a] | − | − | − | 28.16 | 92.14 |
| Staurosporine[b] | − | − | − | 0.015 | − |
| Control | − | − | − | − | 98.84 |
| Donepezil | − | − | − | − | 91.55 |

cdutcm.edu.cn/ deepb3/) 以预测化合物 **JD-5** 的类药能力及血脑屏障通透性。数据表明, 化合物 **JD-5** 的分子质量 (molecular weight, MW = 442.46)、脂水分配系数 (calculated lipophilicity, cLog*P* = 1.41)、氢键供体数目 (hydrogen bond donor, HBD = 1) 及氢键受体数目 (hydrogen bond acceptor, HBA = 7) 符合“Lipinski五规则”; 同时, 其极性表面积 (total polar surface area, TPSA = 111.24 Å$^2$)、可旋转键数目 (rotatable bonds, RB = 10) 符合“Veber法则”, 具有较好的成药性及血脑屏障通透性。

## 3 分子对接研究

为进一步探究化合物与目标蛋白GSK-3$\beta$的结合模式, 作者运用 SYBYL-X2.1.1 中的 Docking suite 程序, 对已经报道的 GSK-3$\beta$ X 射线晶体结构 (PDB: 1Q3D) 对优选化合物 **JD-5** 进行了分子对接研究。结果如图8所示, linker的NH与关键氨基酸残基Asp133形成一个传统氢键相互作用; 丹皮酚片段的2位O原子与关键氨基酸残基Val135形成一个传统氢键相互作用。这些氢键在GSK-3$\beta$中起到稳定抑制剂的作用, 可能对提高化合物的抑制活性起较大作用。丹皮酚片段的苯环与Leu188产生了疏水作用。丹皮酚片段的苯环结构与Leu188产生了1个疏水 ($\pi$-烷基) 相互作用。在京尼平结构片段的五元环及吡啶环N原子取代烷基链上共产生了4个疏水相互作用 (Ala83、Val70、Leu132和Met101)。现有研究[42]发现, 在蛋白口袋中与Arg141、Thr138、Cys199和Lys85等氨基酸残基的相互作用在选择性抑制GSK-3$\beta$中起决定性作用。晶体

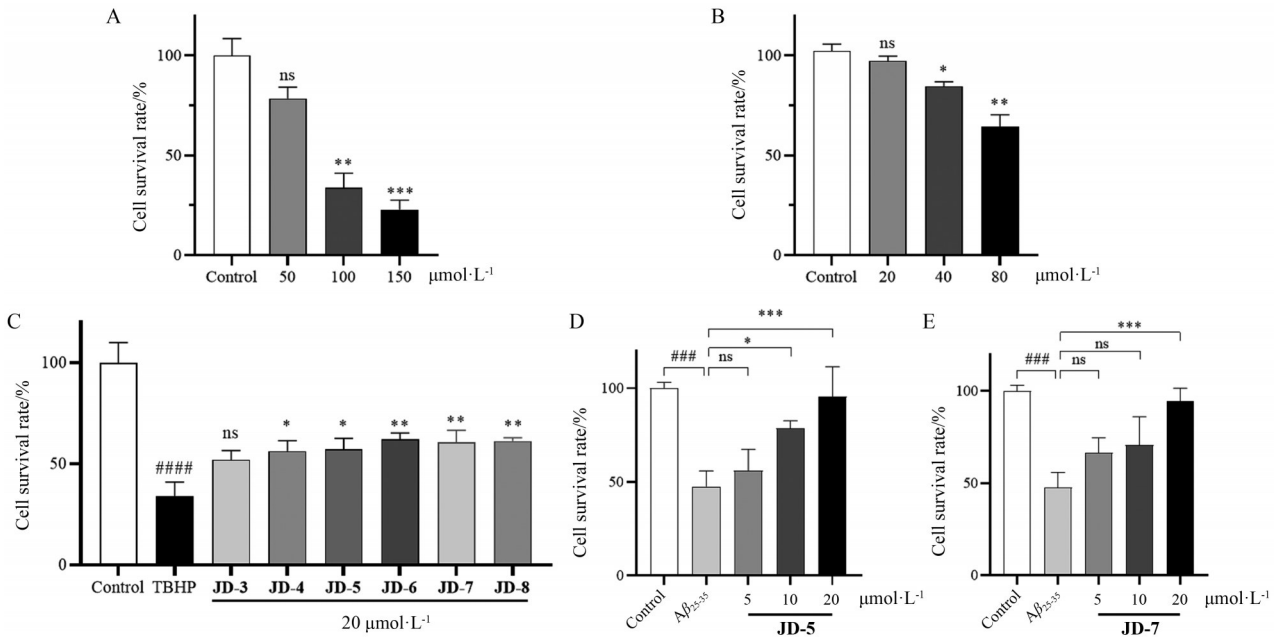



**Figure 6** The effect of different inducers on the survival rate of SH-SY5Y cells. A: *t*BHP induced SH-SY5Y cell death in a dose-dependent manner. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control; B: A$\beta_{25\text{-}35}$ induced SH-SY5Y cell death in a dose-dependent manner. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* control; C: Effects of different compounds on the viability of SH-SY5Y cells induced by *t*BHP (100 μmol·L$^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* *t*BHP; $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* control; D: The effects of compound **JD-5** on the viability of SH-SY5Y cells induced by A$\beta_{25\text{-}35}$ (80 μmol·L$^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$; $^{\#\#\#}P < 0.001$; E: The effects of compound **JD-7** on the viability of SH-SY5Y cells induced by A$\beta_{25\text{-}35}$ (80 μmol·L$^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$; $^{\#\#\#}P < 0.001$

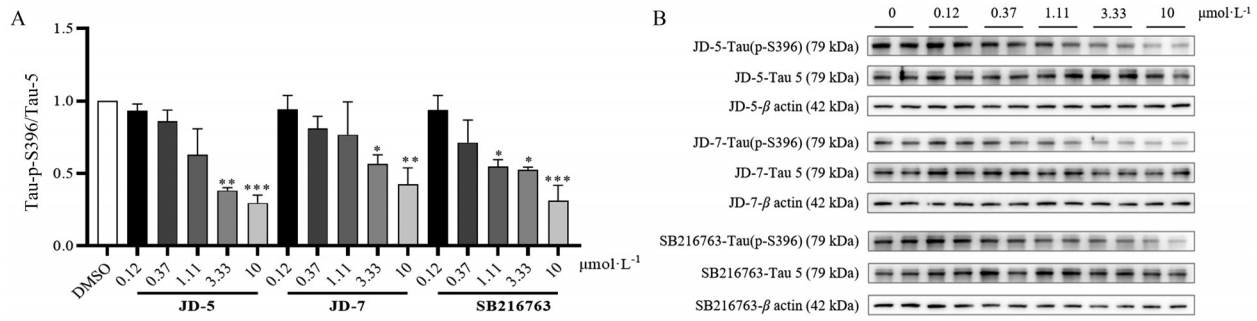



**Figure 7** The effects of compounds **JD-5** and **JD-7** on Tau hyperphosphorylation (Ser$^{396}$) in primary neuronal cells. A: Statistical analysis of Tau hyperphosphorylation (Ser$^{396}$) in primary neuronal cells by compounds **JD-5** and **JD-7**. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* DMSO; B: Representative Western blot bands of Tau hyperphosphorylated (Ser$^{396}$) in primary neuronal cells treated with compounds **JD-5** and **JD-7**

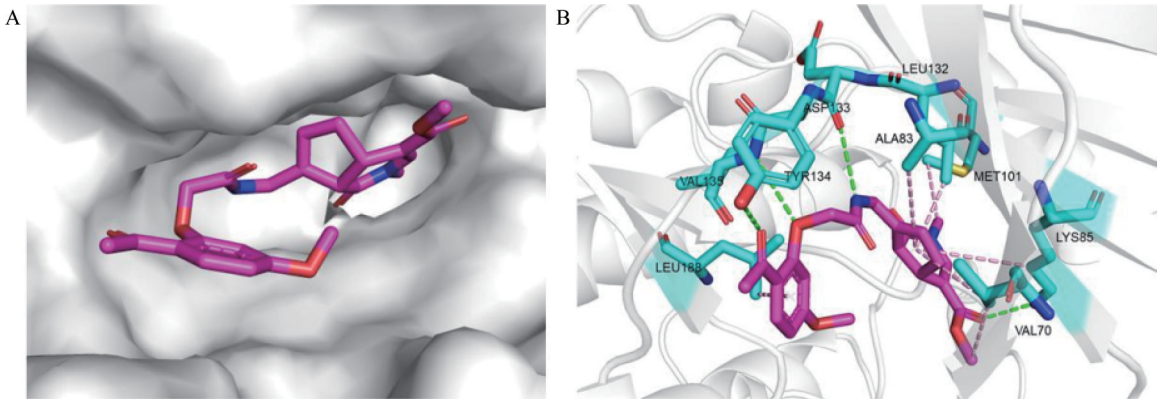



**Figure 8** The molecular docking pose of **JD-5** (pink) in GSK-3$\beta$. A: The location of compound **JD-5** in the pocket; B: The interacts of compound **JD-5** with amino acid residues of the GSK-3$\beta$ protein (PDB: 1Q3D). Green: H-bond; Pink: Hydrophobic bond

结构分析也同样证明, 在大多数共结晶复合物中, ATP竞争性抑制剂与铰链区的两个残基Asp133和Val135形成氢键相互作用[43]。分子对接结果表明, 化合物**JD-5**与GSK-3$\beta$具有较好的结合作用, 与抑酶活性检测的结果相对应, 验证了结构设计具有一定的合理性, 对下一步的结构改造具有指导意义。

## 结论

本文设计并合成了一类新型的京尼平衍生物, 生物学评价结果表明, 这些化合物均表现出GSK-3$\beta$抑酶活性, 其中, **JD-5**和**JD-7**对GSK-3$\beta$的抑制作用 ($IC_{50}$分别为3.54和2.47 μmol·L$^{-1}$) 显著优于京尼平 ($IC_{50}$ = 28.16 μmol·L$^{-1}$)。体外细胞保护活性实验表明, 化合物**JD-5**和**JD-7**能够显著降低*t*BHP或A$\beta_{25\text{-}35}$对SH-SY5Y细胞造成的损伤, 均具有神经保护作用。WB实验结果进一步证明了优选化合物**JD-5**能够降低Tau磷酸化(S369)水平, 且呈剂量依赖性。分子对接结果显示, 化合物**JD-5**能够与ATP活性口袋结合, 并与关键氨基酸残基ASP133和VAL135各形成一个传统氢键相互作用, 解释了其具有优秀的体外GSK-3$\beta$抑酶活性的原因。以上结果为进一步设计多功能抗AD药物提供参考。

## 实验部分

### 1 仪器与试剂

核磁共振仪 (Bruker 400, 瑞士Bruker公司), 四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 氘代二甲基亚砜 (DMSO-$d_6$) 为溶剂, 所有化学位移以ppm为单位, AB-SCIEX-X500R液质联用仪测定质谱; 实验所需化学试剂购自阿拉丁、麦克林和毕得等常规供应商, 所有溶剂均为市售化学纯或分析纯, 无特殊说明, 一般不经纯化处理直接使用。柱层析使用200～300目硅胶为固定相。人重组GSK-3$\beta$、GSK-3$\beta$底物 [YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS) EDEEE]、Reaction Buffer、DTT (cat: V1991) 和Kinase-Glo激酶发光检测试剂盒 (cat: V6711) 购自Promega公司。

### 2 目标化合物的合成

**2.1 7-(羟甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (2a)** 在50 mL圆底烧瓶中

依次加入京尼平 (**1**) (400.00 mg, 1.77 mmol)、对甲苯磺酸一水合物 (403.60 mg, 2.12 mmol)、乙醇 3.96 mL, 80 ℃反应 1 h后, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 1∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入 20 mL 饱和 $NaHCO_3$ 水溶液淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得黄色油状物, 经硅胶柱层析洗脱剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 4∶1, *v*/*v*) 纯化, 得淡黄色油状物416.60 mg, 产率87.8%。

化合物**2b**按照化合物**2a**的合成方法进行合成。

**2.2 7-(((叔丁基二甲基硅基)氧基)甲基)-1-羟基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (5)** 在 250 mL 圆底烧瓶中, 加入京尼平 (**1**) (10.00 g, 44.20 mmol)、咪唑 (6.02 g, 88.40 mmol), 用DMF (60 mL) 溶解。另取叔丁基二甲基氯硅烷 (TBSCl 13.32 g, 88.40 mmol) 溶于DMF (30 mL) 中, 冰浴下缓慢滴加到反应液中, 滴加完毕后继续反应2 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 4∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入20 mL蒸馏水淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析洗脱剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 6∶1, *v*/*v*) 纯化, 得白色固体12.50 g, 产率83.1%。

**2.3 7-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-1-氧代-1,4a,5,7-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (6) 的合成** 在 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 7-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-1-羟基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (**5**) (12.50 g, 36.70 mmol) 和二氯甲烷 (80 mL), 加入戴斯马丁氧化剂 (DMP, 31.10 g, 73.40 mmol), 分3次加入, 每次间隔 10 min, 室温下反应1 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 4∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (60 mL) 和饱和硫代硫酸钠水溶液 (60 mL), 搅拌 15 min, 将其转移至分液漏斗中分液, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析洗脱剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 8∶1, *v*/*v*) 纯化, 得白色固体10.00 g, 产率80.5%。

**2.4 7-(羟甲基)-2-甲基-1-氧代-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡啶-4-羧酸甲酯的合成 (7a)** 在250 mL圆底烧瓶中, 加入7-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-1-氧代-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (**6**) (5.00 g, 14.77 mmol)、甲胺盐酸盐 (3.99 g, 59.09 mmol) 和三乙胺 (16.43 mL, 118.18 mmol), 并用氯仿 (50 mL) 溶解, 65 ℃下反应3 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 3∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全。将反应冷却至室温并减压浓缩去除多余溶剂, 加入三氟乙酸 (30 mL) 和四氢呋喃 (30 mL), 65 ℃下反应2 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 2∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入20 mL饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析洗脱剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 3∶1, *v*/*v*) 纯化, 得黄色固体1.66 g, 收率47.4%。

化合物**7b**按照化合物**7a**的合成方法进行合成。

**2.5 7-((1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (3a)** 在50 mL三颈烧瓶中依次加入7-(羟甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (**2a**) (530.00 mg, 2.08 mmol)、邻苯二甲酰亚胺 (710.70 mg, 2.71 mmol)、三苯基膦 (398.70 mg, 2.71 mmol), 抽真空3或4次, 向反应瓶中置换氮气; 氮气保护下, 加入无水四氢呋喃 (6 mL) 溶解, 将反应瓶置于冰浴中, 缓慢滴加2 mL无水四氢呋喃稀释后的DIAD (820.80 mmL, 4.17 mmol), 于室温下反应1 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 5∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入20 mL蒸馏水淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析洗脱剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 8∶1, *v*/*v*) 纯化, 得淡黄色固体750.00 mg, 产率为93.8%。

化合物**3b**、**8a**、**8b**按照化合物**3a**的合成方法进行合成。

**2.6 7-(氨基甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (4a)** 在50 mL圆底烧瓶中依次加入7-((1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (**3a**) (750.00 mg, 1.96 mmol), 用无水乙醇 (10 mL) 溶解, 加入40%～50%水合肼 (752.30 mg, 23.47 mmol), 室温下反应12 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 3∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 过滤除去白色沉淀, 滤液减压浓缩得淡黄色油状粗产物, 经硅胶柱层析洗脱剂 (二氯甲烷∶甲醇 = 10∶1, *v*/*v*) 纯化, 得淡黄色油状液体350.00 mg, 产率为70.6%。

化合物**4b**、**9a**、**9b**按照化合物**4a**的合成方法进行合成。

**2.7 2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酸乙酯 (11) 的合成** 在50 mL圆底烧瓶中加入丹皮酚 (**10**) (500.00 mg, 3.01 mmol)、碳酸钾 (1.66 g, 3.61 mmol) 和DMF (5 mL), 将反应瓶置于冰浴中, 加入氯乙酸乙酯 (386.4 mmL, 3.61 mmol), 室温反应12 h, TLC展开剂 (石油醚∶乙酸

乙酯 = 5∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入 20 mL 蒸馏水淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得褐色固体 690.00 mg, 产率 90.9%。

**2.8 2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酸 (12) 的合成** 在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酸乙酯 (**11**) (690.00 mg, 2.74 mmol) 和无水甲醇 (5 mL), 将反应置于冰浴中, 加入氢氧化钠水溶液 (437.60 mmL, 10.94 mmol), 室温反应 12 h, TLC 展开剂 (石油醚∶乙酸乙酯 = 3∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入 1 mol·L$^{-1}$ 盐酸溶液调节 pH 至 3～4, 沉淀析出, 过滤, 干燥滤饼得 483.90 mg 淡黄色固体, 产率为 78.9%。

**2.9 7-((2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酰胺基)甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (JD-1)** 在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酸 (**12**) (100.00 mg, 446.00 μmol)、7-(氨基甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (**4a**) (113.00 mg, 446.00 μmol)、EDCI·HCl (128.30 mg, 669.00 μmol)、HOBt (90.40 mg, 669.00 μmol)、三乙胺 (217.00 mmL, 1.56 mmol) 和二氯甲烷 (5 mL), 室温反应 12 h, TLC 展开剂 (二氯甲烷∶甲醇 = 10∶1, *v*/*v*), 显示反应基本完全, 加入 20 mL 蒸馏水淬灭反应, 并用二氯甲烷 (50 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (50 mL×3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经硅胶柱层析纯化洗脱剂 (二氯甲烷∶甲醇 = 200∶1, *v*/*v*) 纯化, 得白色固体 55.80 mg, 产率 27.2%。$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.36 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.66～5.61 (m, 1H), 4.72 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.07～4.01 (m, 2H), 3.86 (dq, *J* = 10.0, 7.1 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.02 (qd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 2.70～2.63 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.05～2.00 (m, 1H), 1.17 (t, *J* = 1.6 Hz, 3H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 197.13, 167.50, 167.40, 164.54, 159.60, 152.49, 141.00, 132.80, 127.16, 120.94, 110.85, 106.90, 101.23, 100.11, 67.92, 65.34, 56.11, 51.49, 46.69, 38.71, 38.61, 35.59, 31.65, 15.42; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{24}H_{29}NO_8$ [M+H]$^+$ 460.196 6, found 460.196 4。

化合物 **JD-2**～**JD-8** 按照化合物 **JD-1** 的合成方法进行合成。

**2.10 7-((4-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)丁酰胺基)甲基)-1-乙氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (JD-2)** 淡黄色油状液体, 产率 36.4%。$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.11～8.03 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.10 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.93 (dt, *J* = 15.4, 4.7 Hz, 1H), 3.87～3.83 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.76～3.70 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.99 (qd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 2.66～2.59 (m, 1H), 2.51 (dd, *J* = 4.0, 2.2 Hz, 3H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.01～1.96 (m, 1H) 1.17 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 196.76, 171.63, 167.40, 164.74, 160.75, 152.44, 141.45, 132.25, 126.80, 120.76, 110.86, 106.46, 101.12, 99.25, 68.32, 65.30, 56.04, 51.48, 46.70, 38.76, 38.54, 35.46, 32.41, 32.22, 25.21, 15.41; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{33}NO_8$ [M+H]$^+$ 488.227 9, found 488.229 0。

**2.11 7-((2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酰胺基)甲基)-1-甲氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (JD-3)** 淡黄色油状液体, 产率 32.1%。$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.39 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.69 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.84～3.78 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.06～2.99 (m, 1H), 2.69～2.62 (m, 1H), 2.58 (dd, *J* = 8.5, 6.4 Hz, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.06～1.95 (m, 1H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 152.26, 132.79, 127.37, 106.90, 102.00, 100.08, 67.88, 56.95, 56.11, 51.51, 46.77, 39.85, 38.55, 35.14, 31.69; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{27}NO_8$ [M+H]$^+$ 446.180 9, found 446.182 0。

**2.12 7-((4-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)丁酰胺基)甲基)-1-甲氧基-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡喃-4-羧酸甲酯 (JD-4)** 乳白色油状液体, 产率 38.2%。$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.06 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.7, 3.2 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.57 (s, 1H), 4.68 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.90～3.83 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.03～2.95 (m, 1H), 2.66～2.59 (m, 1H), 2.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.01～1.96 (m, 1H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 196.76, 171.67, 167.34, 164.74, 160.75, 152.20, 141.07, 132.26, 127.00, 120.75, 111.14, 106.45, 101.92, 99.25, 68.30, 56.92, 56.04, 51.49, 46.79, 38.61, 38.48, 35.02, 32.41, 32.21, 25.21; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{31}NO_8$ [M+

H]$^+$ 474.212 2, found 474.213 2。

**2.13 7-((2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酰胺基)甲基)-2-甲基-1-氧代-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡啶-4-羧酸甲酯 (JD-5)** 淡黄色固体, 产率32.7%。$^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.38 (t, $J$ = 5.9 Hz, 1H), 7.72 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.64 (dd, $J$ = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.57 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 5.64～5.58 (m, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.21 (dt, $J$ = 16.5, 4.7 Hz, 1H), 4.00 (ddd, $J$ = 16.7, 5.6, 2.8 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.55 (d, $J$ = 10.7 Hz, 1H), 3.40～3.35 (m, 1H), 3.08 (s, 3H), 2.73～2.65 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.11～2.02 (m, 1H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 197.11, 169.29, 167.54, 166.84, 164.52, 159.56, 140.47, 139.70, 132.79, 126.10, 120.94, 109.25, 106.85, 100.07, 67.91, 56.10, 51.73, 49.08, 39.93, 39.23, 37.47, 35.15, 31.69; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{26}N_2O_7$ [M+H]$^+$ 443.181 8, found 443.181 2。

**2.14 7-((4-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)丁酰胺基)甲基)-2-甲基-1-氧代-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡啶-4-羧酸甲酯 (JD-6)** 白色固体, 产率38.9%。$^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.09 (t, $J$ = 5.7 Hz, 1H), 7.67 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.62～6.57 (m, 2H), 5.56 (dt, $J$ = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 4.15～4.07 (m, 3H), 3.91 (ddd, $J$ = 16.6, 5.7, 2.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.50 (d, $J$ = 10.8 Hz, 1H), 3.33 (dt, $J$ = 10.8, 8.6 Hz, 1H), 3.07 (s, 3H), 2.70～2.63 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.35 (t, $J$ = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (p, $J$ = 6.5 Hz, 3H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 196.77, 171.68, 169.25, 166.84, 164.72, 160.74, 140.95, 139.65, 132.24, 125.74, 120.71, 109.24, 106.42, 99.25, 99.22, 68.27, 56.03, 51.70, 49.01, 39.37, 37.49, 35.14, 32.41, 32.22, 25.20; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{30}N_2O_7$ [M+H]$^+$ 471.212 6, found 471.212 1。

**2.15 7-((2-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)乙酰氨基)甲基)-1-氧代-2-丙基-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡啶-4-羧酸甲酯 (JD-7)** 淡黄色固体, 产率45.7%。$^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.39 (t, $J$ = 5.8 Hz, 1H), 7.72 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.64 (dd, $J$ = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.57 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 5.62 (dt, $J$ = 3.4, 1.9 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.19 (dt, $J$ = 16.3, 4.4 Hz, 1H), 4.00 (ddd, $J$ = 16.9, 5.9, 2.9 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.59～3.51 (m, 2H), 3.47 (dt, $J$ = 13.6, 7.1 Hz, 1H), 3.37 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 2.73～2.66 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.09～2.01 (m, 1H), 1.49 (h, $J$ = 7.3 Hz, 2H), 0.80 (t, $J$ = 7.4 Hz, 3H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 138.78, 132.77, 106.86, 100.06, 67.92, 56.10, 51.76, 49.22, 48.63, 39.99, 39.25, 37.42, 31.70, 22.00, 11.24; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{30}N_2O_7$ [M+H]$^+$ 471.212 6, found 471.211 6。

**2.16 7-((4-(2-乙酰基-5-甲氧基苯氧基)丁酰胺基)甲基)-1-氧代-2-丙基-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊二烯并[*c*]吡啶-4-羧酸甲酯 (JD-8)** 白色固体, 产率34.6%。$^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_H$: 8.10 (t, $J$ = 5.7 Hz, 1H), 7.67 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.63～6.56 (m, 2H), 5.56 (dt, $J$ = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.09 (t, $J$ = 6.2 Hz, 1H), 3.91 (ddd, $J$ = 16.8, 5.8, 2.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.58～3.49 (m, 2H), 3.45 (dt, $J$ = 13.6, 7.1 Hz, 1H), 3.33 (dt, $J$ = 10.7, 8.6 Hz, 1H), 2.69～2.63 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.35 (t, $J$ = 7.3 Hz, 2H), 2.03 (q, $J$ = 6.4 Hz, 2H), 2.01 (m, 1H), 1.49 (p, $J$ = 7.3 Hz, 2H), 0.80 (t, $J$ = 7.4 Hz, 3H); $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$) $\delta_C$: 196.73, 171.64, 168.87, 166.83, 164.72, 160.74, 141.11, 138.77, 132.24, 125.60, 120.71, 109.42, 106.43, 99.22, 68.29, 56.04, 51.73, 49.16, 48.62, 39.74, 39.37, 37.45, 32.42, 32.22, 25.20, 22.01, 11.25; ESI-HRMS: *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{34}N_2O_7$ [M+H]$^+$ 499.243 9, found 499.243 9。

## 3 GSK-3*β*抑酶活性测定

使用Kinase-Glo试剂盒、人重组GSK-3*β*评价化合物对GSK-3*β*活性的体外抑制作用。在96孔板中依次加入10 μL待测化合物 (溶于二甲基亚砜并在测定缓冲液中稀释至所需浓度), 10 μL人重组GSK-3*β* (20 ng), 10 μL底物 (0.05 μg·μL$^{-1}$) 与10 μL ATP (2 μmol·L$^{-1}$), 37 ℃孵育30 min后, 通过加入40 μL Kinase-Glo试剂终止酶促反应, 并通过SpectraMaxi 3x测量荧光强度。

## 4 细胞毒性试验

采用CCK-8试剂盒 (SparkJade, CT 0001-B), SH-SY5Y (安徽医科大学赠送) 细胞株评价化合物的细胞毒性。将细胞以每孔1×10$^4$个细胞的密度在96孔板中孵育过夜后, 每组的给药浓度设定为50 μmol·L$^{-1}$。在37 ℃、5% $CO_2$环境下孵育48 h后, 弃去96孔板中的原液, 每孔加入100 μL含10% CCK-8工作液的培养基, 37 ℃孵育1.5 h。最后用多功能酶标在450 nm波长下测定吸光度 ($OD_{450}$) 值, 计算细胞存活率。

## 5 神经保护作用测定

用CCK-8试剂盒评价化合物对SH-SY5Y细胞系的神经保护作用。将细胞以每孔1×10$^4$个细胞的密度在96孔板中孵育。将培养基在37 ℃、5% $CO_2$的培养箱中培养24 h, 然后弃去。给药组预处理4 h后, 弃去培养基, 更换为含100 μmol·L$^{-1}$ *t*BHP (或80 μmol·L$^{-1}$

A$\beta_{25\text{-}35}$) 的含药培养基。孵育 24 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 工作液的培养基, 37 ℃孵育 1.5 h。最后用多功能酶标记物在 450 nm 波长处测定 $OD_{450}$ 值, 计算细胞存活率。每组实验重复 3 次, 数据以平均值 ± 标准差表示。

## 6 动物

SD 大鼠购自上海斯莱克, 许可证编号: SYXK (苏) 2017-0040。所有动物的实验程序均获得南京拉姆达有限公司实验动物伦理委员会的批准, 批准号: IACUC-20220202。

## 7 蛋白免疫印迹

SD 大鼠为母体的胚胎海马神经元细胞用于磷酸化 Tau 测定。将大鼠放置在控制温度和湿度的房间中, 保持 12 h 光照/黑暗循环。在实验过程中, 动物体重在 20～25 g 之间。在胚胎第 18 天 (E18) 时对妊娠雌性 SD 大鼠实施安乐死, 以获得幼鼠的海马, 并如前所述提取原代神经元[37]。将原代神经元接种于 12 孔板中, 分为阴性对照组 (DMSO)、化合物组 (**JD-5**、**JD-7**) 和阳性对照组 (SB-216763)。通过 WB 分析各组 Tau 蛋白的表达。其中, 一抗为兔抗 p-TauSer$^{396}$ 磷酸特异性抗体和 Tau 抗体 (Abcam, 分别为 1∶1 000 和 1∶500), 二抗为一抗的特异性抗体 (Abcam, 1∶500)。

## 8 分子对接

从 RSCB Protein Bank 数据库获取 GSK-3$\beta$ 与 staurosporine 的复合物。去除蛋白质的水分子, 抽取内源性配体, 并选择链 C 和 D。对蛋白质进行能量优化、加氢和侧链修复等一系列处理。运用 SYBYL-X2.1.1 Analyze Results 模块判断化合物与受体的作用模式, Sequence Viewer 模块用于确定关键氨基酸残基。将对接结果的“Mol2”文件导入软件 Pymol 2.3.1, 首先确定配体对象, 然后选择产生相互作用的氨基酸残基, 绘制相互作用力, 并对相关原子及氢键、疏水键进行颜色凸显, 最后将绘制的相互作用模式图进行像素加强, 背景颜色更改。

**作者贡献**: 许文雪负责部分合成和文章撰写; 赵文杰负责设计研究方案, 实施研究过程, 采集整理数据; 胡舒妹和沈玉婷给予合成实验工作支持; 程红艳负责部分生物活性测试工作; 张艳春对本文提供指导性支持, 设计论文总纲, 终审论文。

**利益冲突**: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

[1] Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and beyond [J]. Curr Alzheimer Res, 2009, 6: 86-96.

[2] Hellweg R, Wirth Y, Janetzky W, et al. Efficacy of memantine in delaying clinical worsening in Alzheimer's disease (AD): Responder analyses of nine clinical trials with patients with moderate to severe AD [J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2012, 27: 651-656.

[3] Cheong SL, Tiew JK, Fong YH, et al. Current pharmacotherapy and multi-target approaches for Alzheimer's disease [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15: 1560.

[4] Zhang PF, Xu ST, Zhu ZY, et al. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease [J]. Eur J Med Chem, 2019, 176: 228-247.

[5] Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments in Alzheimer disease: An update [J]. J Cent Nerv Syst Dis, 2020, 12: 1179573520907397.

[6] Van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, et al. Lecanemab in early Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2023, 388: 9-21.

[7] Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, et al. Donanemab in early symptomatic Alzheimer disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 randomized clinical trial [J]. JAMA, 2023, 330: 512.

[8] Gan X. Alzheimer's disease original drug licensed for clinical trials [N]. Chin Sci News (中国科学报), 2025.

[9] Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration [J]. Lancet Neurol, 2013, 12: 609-622.

[10] Zhang HQ, Wei W, Zhao M, et al. Interaction between A$\beta$ and Tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17: 2181-2192.

[11] Iliyasu MO, Musa SA, Oladele SB, et al. Amyloid-beta aggregation implicates multiple pathways in Alzheimer's disease: Understanding the mechanisms [J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1081938.

[12] Tzeng CY, Lee WS, Liu KF, et al. Allantoin ameliorates amyloid $\beta$-peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3$\beta$ signaling pathway in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113389.

[13] Choi SH, Kim YH, Hebisch M, et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease [J]. Nature, 2014, 515: 274-278.

[14] Liu JG, Zhao DF, Gong Q, et al. Development of bisindole-substituted aminopyrazoles as novel GSK-3$\beta$ inhibitors with suppressive effects against microglial inflammation and oxidative neurotoxicity [J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11: 3398-3408.

[15] Yang L, Li XY, Huang W, et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113112.

[16] Dong YX, Lu J, Zhang SH, et al. Design, synthesis and bioevaluation of 1, 2, 4-thiadiazolidine-3, 5-dione derivatives as potential GSK-3$\beta$ inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Bioorg Chem, 2023, 134: 106446.

[17] Koehler D, Shah ZA, Williams FE. The GSK3$\beta$ inhibitor, TDZD-8, rescues cognition in a zebrafish model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int, 2019, 122: 31-37.

[18] Hamann M, Alonso D, Martín-Aparicio E, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity

relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease [J]. J Nat Prod, 2007, 70: 1397-1405.

[19] Bidon-Chanal A, Fuertes A, Alonso D, et al. Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin [J]. Eur J Med Chem, 2013, 60: 479-489.

[20] Liu WW, Liu X, Tian LT, et al. Design, synthesis and biological evaluation of harmine derivatives as potent GSK-3*β*/DYRK1A dual inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Eur J Med Chem, 2021, 222: 113554.

[21] Liu X, Lai LY, Chen JX, et al. An inhibitor with GSK3*β* and DYRK1A dual inhibitory properties reduces Tau hyperphosphorylation and ameliorates disease in models of Alzheimer's disease [J]. Neuropharmacology, 2023, 232: 109525.

[22] Martin L, Latypova X, Wilson CM, et al. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2013, 12: 289-309.

[23] Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867: 118664.

[24] Ly PT, Wu Y, Zou H, et al. Inhibition of GSK3*β* -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes [J]. J Clin Invest, 2013, 123: 224-235.

[25] Saeki K, Machida M, Kinoshita Y, et al. Glycogen synthase kinase-3*β*2 has lower phosphorylation activity to Tau than glycogen synthase kinase-3*β*1 [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34: 146-149.

[26] Lo Monte F, Kramer T, Gu JM, et al. Structure-based optimization of oxadiazole-based GSK-3 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2013, 61: 26-40.

[27] Lei MY, Gao PP, Long JG. Research progress on the effective components of traditional Chinese medicine for improving AD-related cognitive impairment [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 1925-1936.

[28] 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 (药学学报), 2022, 57: 1954-1961.

[29] Ozpak L, Bağca BG. Neuroprotective effects of resveratrol through modulation of PI3K/Akt/GSK-3*β* pathway and metalloproteases [J]. IUBMB Life, 2024, 76: 1199-1208.

[30] Chu HS. Antioxidant Stress Property of Paeonol in the Rat Model of Alzheimer's Disease (丹皮酚对阿尔茨海默病模型大鼠抗氧化应激损伤机制的研究) [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

[31] Kim J, Kim HY, Lee SM. Protective effects of geniposide and genipin against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Biomol Ther (Seoul), 2013, 21: 132-137.

[32] Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103: 496-500.

[33] Liu CM, Yang HX, Ma JQ, et al. Role of AMPK pathway in lead-induced endoplasmic reticulum stress in kidney and in paeonol-induced protection in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 122: 87-94.

[34] Wei CC, Wong SK, Chan HT, et al. Genipin and geniposide from gardenia jasminoides: An overview of their anti-cancer and other pharmacological properties [J]. J Chin Pharm Sci, 2022, 31: 1-12.

[35] Li MT, Cai N, Gu L, et al. Genipin attenuates Tau phosphorylation and A*β* levels in cellular models of Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58: 4134-4144.

[36] Li J, Shi JP, Li PL, et al. Genipin attenuates hyperoxia-induced lung injury and pulmonary hypertension *via* targeting glycogen synthase kinase-3*β* in neonatal rats [J]. Nutrition, 2019, 57: 237-244.

[37] Suzuki H, Yamazaki M, Chiba K, et al. Neuritogenic activities of 1-alkyloxygenipins [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58: 168-171.

[38] Wang RK, Yang J, Liao SF, et al. Stereoselective reduction of 1-*O*-isopropyloxygenipin enhances its neuroprotective activity in neuronal cells from apoptosis induced by sodium nitroprusside [J]. ChemMedChem, 2014, 9: 1397-1401.

[39] Luo J, Wang RK, Huang Z, et al. Synthesis of stable genipin derivatives and studies of their neuroprotective activity in PC12 cells [J]. ChemMedChem, 2012, 7: 1661-1668.

[40] Wang R, Yang J, Peng L, et al. Gardenamide a attenuated cell apoptosis induced by serum deprivation insult *via* the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways [J]. Neuroscience, 2015, 286: 242-250.

[41] Stathas SA, Alvarez VE, Xia WM, et al. Tau phosphorylation sites serine202 and serine396 are differently altered in chronic traumatic encephalopathy and Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Dement, 2022, 18: 1511-1522.

[42] Arfeen M, Bhagat S, Patel R, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 5-benzylidene-2-iminothiazolidin-4-ones as selective GSK-3*β* inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2016, 121: 727-736.

[43] Sukanya S, Choudhary BS, Mehta P, et al. Identification of CNS compatible small molecules as glycogen synthase kinase-3*β* (GSK-3*β*) inhibitors through structure-based virtual screening [J]. Med Chem Res, 2022, 31: 1545-1557.