

新型京尼平衍生物的设计、合成及抗抑郁活性研究

程红艳¹, 王丹慧¹, 赵文杰¹, 王天城¹, 许文雪¹, 张彩云^{1,2}, 赵亚男³, 张艳春^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230012;
3. 中国科学院合肥肿瘤医院药学中心, 安徽 合肥 230012)

摘要: 抑郁症发病机制复杂, 现有部分单胺类抗抑郁药物存在耐药或失效脱靶等问题。中药经方具有多成分、多靶点等特点, 在临床中用于治疗抑郁症效果显著。越鞠丸在抑郁症治疗中成效显著, 其中“栀子-川芎”药对发挥了关键的抗抑郁作用, 京尼平苷和川芎嗪分别作为栀子和川芎的有效成分具有良好抗抑郁活性。本研究基于京尼平的神经保护活性及川芎嗪的快速抗抑郁活性, 通过药效团拼合原理将二者进行拼合, 设计合成一系列新型京尼平衍生物, 并进行神经保护活性和抗抑郁作用研究。结果表明, 新型京尼平衍生物在谷氨酸诱导的HT-22细胞模型上具有良好的神经保护活性, 其中化合物W-1和W-3的保护活性较好。在行为绝望抑郁 (behavioral despair depression, BDD) 模型小鼠的悬尾实验与强迫游泳实验的研究中发现, 化合物W-3相较于W-1抗抑郁活性更优。进一步对慢性不可预知性温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型小鼠的行为学进行研究, 结果显示, W-3可显著改善模型小鼠抑郁样行为, 所有动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: AHUCM-mouse-2022027)。通过蛋白质印迹法分析了优选化合物W-3对蛋白激酶A (protein kinase A, PKA)、cAMP反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding, CREB)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、5-羟色胺1A (5-hydroxytryptamine 1A, 5-HT_{1A}) 受体以及N-甲基-D-天冬氨酸离子型谷氨酸受体2A (N-methyl-D-aspartate ionic glutamate receptor 2A, GluN2A) 和N-甲基-D-天冬氨酸离子型谷氨酸受体2B (N-methyl-D-aspartate ionic glutamate receptor 2B, GluN2B) 蛋白表达的影响, 检测结果显示, W-3可显著上调PKA、CREB、BDNF和5-HT_{1A}蛋白表达水平, 并下调GluN2A和GluN2B蛋白表达水平; qRT-PCR结果与蛋白质印迹法检测结果一致。根据以上结果推测, 化合物W-3具有潜在的抗抑郁作用, 作用机制可能与调节GluN2A、GluN2B及5-HT_{1A}受体蛋白的表达, 从而激活PKA-CREB-BDNF信号通路有关。

关键词: 新型京尼平衍生物; 药物设计; 抗抑郁活性; 作用机制

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2564-10

Design, synthesis and antidepressant activity of novel genipin derivatives

CHENG Hong-yan¹, WANG Dan-hui¹, ZHAO Wen-jie¹, WANG Tian-cheng¹, XU Wen-xue¹,
ZHANG Cai-yun^{1,2}, ZHAO Ya-nan³, ZHANG Yan-chun^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. Pharmacy Center, Hefei Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230012, China)

Abstract: The pathogenesis of depression is complex, and some existing monoamine antidepressants have problems such as drug resistance or off-target failure. Traditional Chinese medicine has the characteristics of "multi-component and multi-target", and has been used in the treatment of depression in clinical practice. Yueju pill is effective in the treatment of depression. Geniposide and ligustrazine, the active ingredients of Gardeniae fructus

收稿日期: 2024-01-15; 修回日期: 2024-05-31.

基金项目: 中药研究与开发安徽省重点实验室开放基金项目 (AKLPDCM202306); 安徽省高等学校自然科学类研究项目 (2023AH040107).

*通讯作者 E-mail: yczhang2017@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0040

and *Ligusticum sinense* 'Chuanxiong', play a key role in the treatment of depression. In this study, based on the neuroprotective activity of genipin and the rapid antidepressant activity of tetramethylpyrazine, a series of novel genipin derivatives were designed and synthesized through pharmacophore assembly principle, and their neuroprotective activity and antidepressant effect were investigated. The results showed that the novel genipin derivatives had well neuroprotective activity on the glutamate-induced HT-22 cell model, with compounds W-1 and W-3 showing better protective activity. In behavioral despair depression (BDD) model mice, compound W-3 was found to have better antidepressant activity than W-1 in tail suspension test and forced swimming test. Further study on the behavior of chronic unpredictable mild stress (CUMS) model mice showed that W-3 could significantly improve the depression-like behavior of model mice. All animal experiments were approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Anhui University of Chinese Medicine (approval number: AHUCM-mouse-2022027). The effects of the preferred compound W-3 on protein kinase A (PKA), cAMP response element binding protein (CREB), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 5-hydroxytryptamine 1A (5-HT_{1A}) receptor, *N*-methyl-*D*-aspartate ionic glutamate receptor 2A (GluN2A) and *N*-methyl-*D*-aspartate ionic glutamate receptor 2B (GluN2B) were analyzed by Western blot. W-3 treatment significantly up-regulated the protein expression of PKA, CREB, BDNF and 5-HT_{1A}, and down-regulated the protein expression of GluN2A and GluN2B. The results of qRT-PCR were consistent with those of Western blot. According to the above results, compound W-3 has a potential antidepressant effect, and its mechanism may be related to the activation of PKA-CREB-BDNF signaling pathway by regulating the expression of GluN2A, GluN2B and 5-HT_{1A} receptor proteins.

Key words: novel genipin derivative; drug design; antidepressant activity; mechanism of action

抑郁症是一种常见的情绪障碍, 复发率高, 主要表现为持续性抑郁、记忆力减退和睡眠障碍^[1]。抑郁症的发病机制复杂, 现有研究主要集中在单胺递质假说, 认为中枢神经系统 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE/NA) 和多巴胺 (dopamine, DA) 水平的降低是抑郁症发生发展的主要原因^[2]。目前临床一线抗抑郁药物主要是基于经典单胺策略开发的, 但这些药物普遍存在起效时间迟缓 (2~6周), 对部分难治性抑郁症疗效不佳甚至无效, 临床应用效果不理想等缺陷^[3]。

中药因其多途径、多成分、多靶点及不良反应小等特点在抑郁症的治疗中取得显著的疗效, 并且相对于西医治疗而言, 中医以其整体观念和辨证论治特点在抑郁症治疗方面具有很大的优势^[4]。逍遥散、栀子厚朴汤、开心散、越鞠丸等抗抑郁经方, 在临床中用于治疗产后抑郁、脑卒中后抑郁等疗效显著^[5-7]。其中越鞠丸具有确切的快速抗抑郁作用, 方中“栀子-川芎”组合是越鞠丸发挥抗抑郁作用的关键药对^[8-10]。其中, 环烯醚萜类化合物京尼平苷 (又称栀子苷, geniposide) 作为栀子中发挥抗抑郁活性的主要成分^[11], 可能通过激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)-cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic-AMP response binding protein, CREB)-脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 信号通路和激活 5-HT_{1A} 受体发挥快速抗抑郁作用^[12]。京尼平作为栀子主要药效成分京尼平苷的苷元, 可通过减少谷氨酸的含量, 降低 *N*-甲

基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor, NMDAR) 过度激活引起的神经兴奋毒性作用, 增强海马组织中神经元的活性, 从而修复和改善神经元的功能以及改善抑郁症组织中糖和能量的代谢异常, 进而发挥抗抑郁作用^[13,14]。川芎嗪作为川芎的主要活性成分之一, 可能通过调节 BDNF 发挥神经保护作用, 提高抗抑郁活性^[15,16]。同时, 川芎嗪与京尼平的联用可发挥协同增效的作用^[17,18]。因此, 本课题组为获得作用于非单胺类物质发挥抗抑郁作用的化合物, 结合栀子-川芎的结构优势与药理活性, 设计合成了一类新型抗抑郁化合物。

前期, 课题组基于京尼平在神经系统中的重要作用, 设计合成了一系列新型化合物, 具有一定的神经保护活性^[19]。本研究基于栀子苷与川芎嗪潜在的抗抑郁活性, 利用药效团拼合原理, 以哌嗪作为连接基团, 将京尼平与川芎嗪进行拼合 (图 1), 以期获得一类具有抗抑郁活性的新型化合物 (图 2)。

结果与讨论

1 目标化合物的合成

目标化合物 W-3 采取合成路线 1 中所示的合成方法, 以京尼平为起始原料, 将京尼平的半缩醛结构修饰为缩醛结构, 再与甲磺酰氯反应得到中间体化合物。在碳酸钾为缚酸剂、二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 为溶剂的条件下, 用不同取代基的苯哌嗪取代中间体化合物, 通过浓盐酸调节 pH 得到化合物

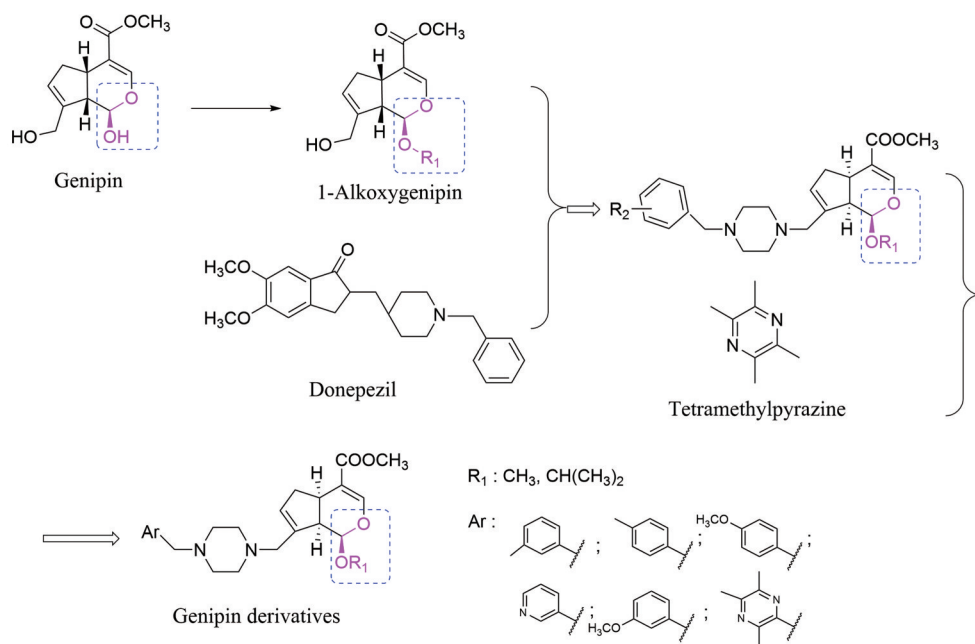


Figure 1 The design of genipin derivatives

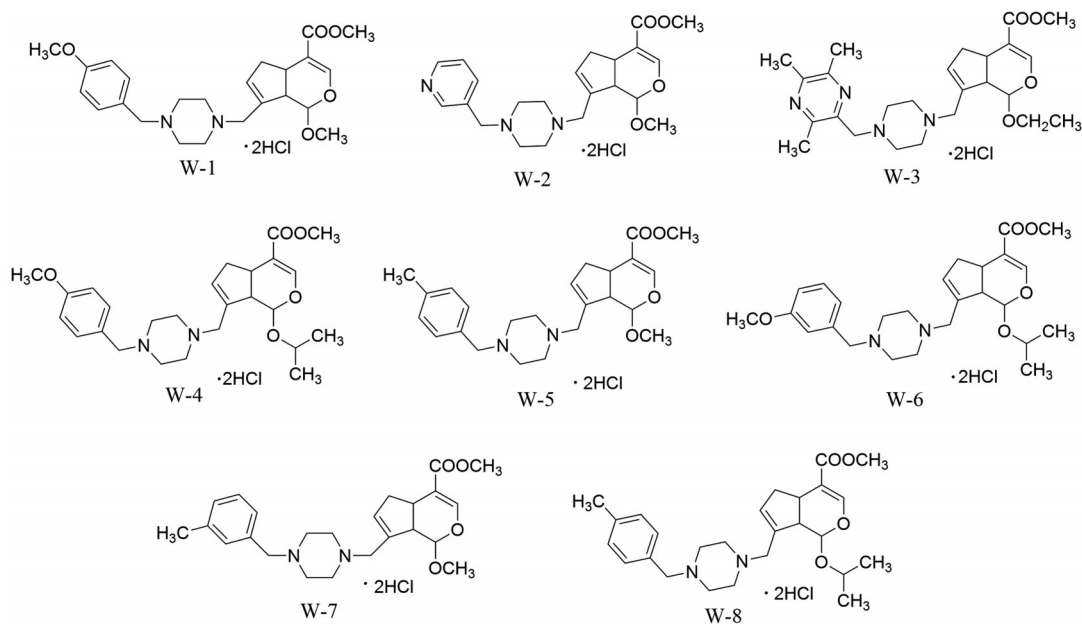


Figure 2 Structures of compounds W-1-W-8

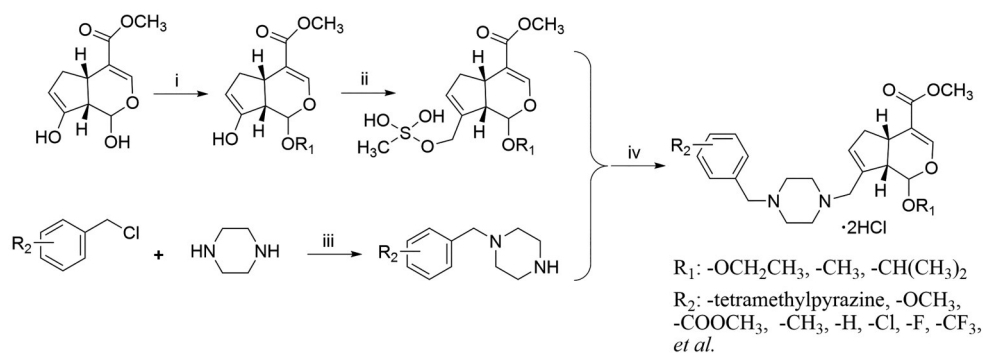
W-3。

2 初步构效关系考察

选用小鼠海马神经元 HT-22 细胞对目标化合物 W-1~W-8 进行体外神经保护活性考察, 通过 CCK-8 法筛选出谷氨酸最佳造模浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、作用时间为 24 h, 活性保护结果如图 3 所示。

在化合物神经保护活性实验中, 与正常组比较, 模型组 HT-22 细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 化合物 W-1~W-8 各浓度给药组 HT-22 细胞存

活率显著提高 ($P < 0.05$)。从图 3 中可以看出 W-1 和 W-5 细胞存活率高于 W-4 和 W-8, 其中 W-1 和 W-5 的 C-1 位羟基被甲基取代, 推测化合物 C-1 位羟基以甲基取代活性优于异丙基取代。化合物 W-1 和 W-3 在各给药浓度对细胞的保护作用均明显优于京尼平 ($P < 0.05$), 且 W-3 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对谷氨酸诱导的小鼠海马神经元 HT-22 细胞损伤模型中细胞的存活率 ($75.06\% \pm 1.12\%$) 与阳性对照氟西汀 (fluoxetine, Flu) 的细胞存活率 ($74.84\% \pm 0.92\%$) 相当, 明显高于对照



Scheme 1 Synthetic route of compound W-3. Reagents and conditions: (i) *p*-TsOH·H₂O, MeOH/*i*-PrOH, 80 °C, 1 h; (ii) CH₃SO₂Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h; (iii) CH₂Cl₂, 0 °C, 6 h; (iv) K₂CO₃, DMF, r.t., 4 h; CH₃OH/HCl (Conc.)

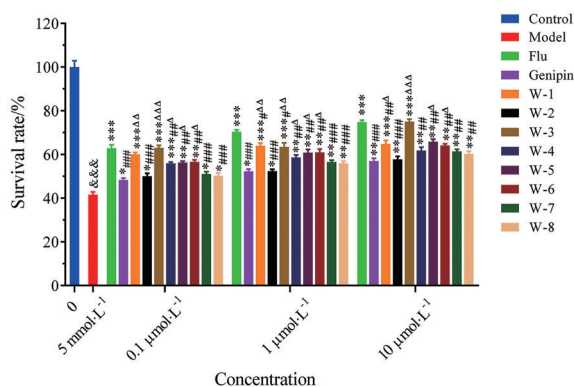


Figure 3 The effects of novel genipin derivatives on the survival rate of HT-22 cells induced by glutamate. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. &&& $P < 0.001$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Flu; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs genipin. Flu: Fluoxetine

药京尼平的细胞存活率 ($57.03\% \pm 1.26\%$) (图3)。对比W-3与其他化合物结构特征发现,其左侧为川芎嗪结构,推测左侧芳环以川芎嗪结构更换苯环结构能够提高化合物对HT-22的神经保护作用。通过初步的神经细胞保护实验筛选,最终选择活性较好的化合物W-1和W-3进行抑郁模型小鼠的行为学研究。

3 W-3对抑郁模型小鼠行为的影响

在行为绝望抑郁症 (behavioral despair depression, BDD) 模型小鼠强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 和悬尾实验 (tail suspension test, TST) 中,与正常组相比,各给药组小鼠静止不动时间显著减少 ($P < 0.05$)。且化合物W-3高剂量组在两种实验中小鼠静止时间与阳性药Flu组相近 (图4A、B)。在实验过程中,化合物W-1高剂量组小鼠出现死亡,于是将化合物W-1给药组剂量调整为1和0.1 mg·kg⁻¹。BDD模型是一种抗抑郁药物快速筛选的模型,初步筛选结果显示化合物W-3比化合物W-1具有更好的抗抑郁活性,因此选择化合物W-3在慢性不可预知性温和应激

(chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型小鼠中进行抗抑郁作用机制研究。

在CUMS模型小鼠的TST和FST中,化合物W-3给药组的小鼠静止不动时间呈剂量依赖性减少,且高剂量组 (10 mg·kg⁻¹) 的治疗效果与阳性药Flu组 (20 mg·kg⁻¹) 相当,与BDD模型小鼠结果一致 (图4C、D)。28天CUMS建模后,与正常组相比,CUMS模型组小鼠的糖水偏爱率明显降低 ($P < 0.001$),提示CUMS模型建立成功;与模型组相比,W-3中、高剂量给药组小鼠糖水偏爱率显著提高 ($P < 0.001$) (图5)。在旷场实验 (open field test, OFT) 中,与正常组相比,CUMS模型组小鼠的移动总距离和移动平均速度明显减少 ($P < 0.001$),阳性药Flu组与化合物W-3高剂量组小鼠的活动范围相似,社交区域周围均有较多活动轨迹 (图6)。

4 新型京尼平衍生物对PKA-CREB-BDNF信号通路及受体蛋白的影响

在糖水偏好实验与OFT中,W-3低剂量组 (0.1 mg·kg⁻¹) 对模型小鼠抑郁样行为的改善作用与模型组相比无显著性差异,推测低剂量组可能未对模型小鼠发挥抗抑郁作用,故选择W-3中剂量组 (1 mg·kg⁻¹) 和高剂量组 (10 mg·kg⁻¹) 进行蛋白水平及基因水平分析。

与正常组相比,CUMS模型组小鼠脑中PKA、pCREB、CREB、BDNF和5-HT_{1A}受体蛋白表达水平显著下调,*N*-甲基-*D*-天冬氨酸离子型谷氨酸受体2A (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2A, GluN2A) 和*N*-甲基-*D*-天冬氨酸离子型谷氨酸受体2B (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B, GluN2B) 受体蛋白表达水平显著升高。与模型组比较,化合物W-3给药组逆转了上述蛋白的表达情况,且呈剂量依赖性,W-3高剂量给药组对蛋白表达的影响与阳性药Flu相当,无显著性差异 (图7、8)。与正常组比较,CUMS模型组大鼠PKA、CREB、BDNF、5-HT_{1A} mRNA表达水平显著降低 ($P < 0.01$),GluN2A和

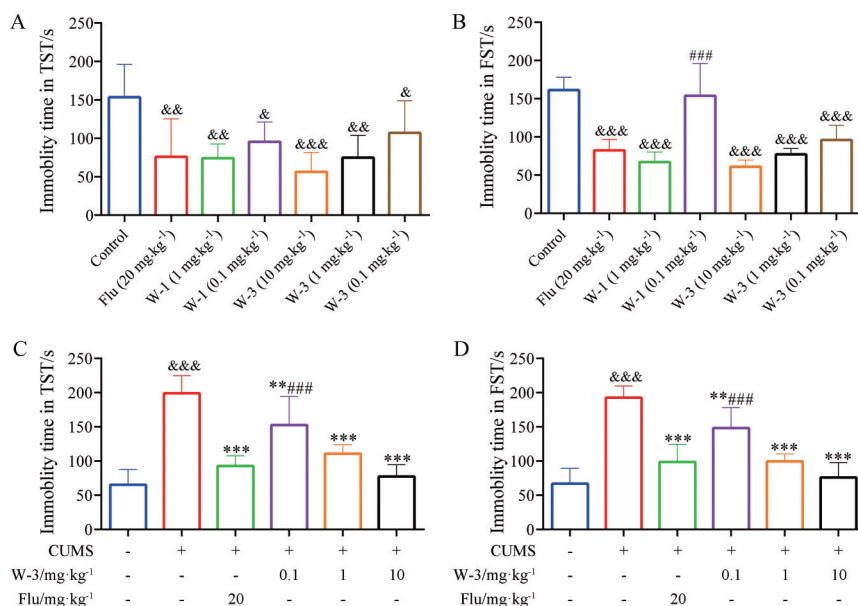


Figure 4 Effect of W-3 on the duration of TST and FST immobility in BDD model ($n = 6, \bar{x} \pm s$) and CUMS model ($n = 10, \bar{x} \pm s$). A: TST in BDD model; B: FST in BDD model; C: TST in CUMS model; D: FST in CUMS model. &&& $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CUMS model; ### $P < 0.001$ vs Flu. FST: Forced swim test; TST: Tail suspension test; CUMS: Chronic unpredictable mild stress; BDD: Behavioral despair depression

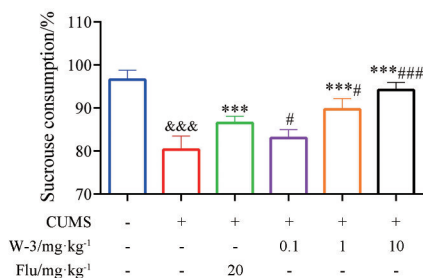


Figure 5 Effect of compound W-3 on the rate of sugar-water preference in CUMS model. $n = 10, \bar{x} \pm s$. &&& $P < 0.001$ vs control; *** $P < 0.001$ vs CUMS model; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs Flu

GluN2B mRNA 表达水平显著升高。与模型组比较, 化合物 W-3 给药组呈剂量依赖性方式显著逆转上述蛋白 mRNA 表达水平。qRT-PCR 结果与 Western blot 结果一致 (图 9)。

5 讨论

传统抗抑郁药物主要以增强中枢单胺神经递质系统功能为主, 随着人们对快速抗抑郁药物神经机制的研究, 谷氨酸日益成为抗抑郁药物研究新的关注点。谷氨酸的过度释放或者其 NMDA 受体的过度激活都会引起神经元毒性, 并导致神经退行性变化, 是抑郁症发生的重要原因^[20]。现有研究表明, 抑郁症患者血清中谷氨酸水平与抑郁症严重程度呈正相关^[21]。患者中枢谷氨酸受体及转运蛋白的异常, 可能介导了谷氨酸快速兴奋性突触传递和代谢异常, 进而诱发抑郁疾病

的发作^[22]。本研究对谷氨酸诱导 HT-22 细胞建立的神经损伤模型进行研究, 结果表明, 目标化合物均有一定的神经保护活性, 其中 W-1 和 W-3 保护活性相对最优, 有进一步研究的价值。

研究表明, 海马中谷氨酸含量适度增加, 可能通过激活 NMDA 受体的 *GluN2A* 和 *GluN2B* 两种亚型, 介导海马神经元的损伤及神经细胞凋亡, 诱导抑郁的发生和发展^[23,24]。通过抑制 NMDA 受体的表达可逆转该受体过度激活引起的 CREB-BDNF 信号通路抑制作用, 恢复神经可塑性调节^[25]。BDNF 作为脑中一种重要的神经营养因子, 具有广泛的神经保护和再生作用, 是抑郁症发病与治疗的重要标志蛋白^[26]。现有抗抑郁药物大都通过调控 PKA-CREB 信号通路进而调控 BDNF 表达水平来发挥抗抑郁活性^[27,28]。研究表明, 激活 PKA-CREB-BDNF 信号通路可发挥神经保护作用, 从而产生抗抑郁活性^[29,30]。因此, 本研究对 NMDA 受体的两种亚型 *GluN2A* 和 *GluN2B* 以及 PKA、BDNF 和 CREB 蛋白表达情况进行了分析, 结果发现化合物 W-3 可通过抑制 *GluN2A* 和 *GluN2B* 蛋白的表达水平, 从而激活 PKA-CREB-BDNF 信号通路, 发挥抗抑郁作用。

研究发现, 调节情绪和记忆的脑区中的 5-HT_{1A} 受体活性或表达发生变化可导致 5-HT 系统的功能下降, 提高该受体的表达或增强其活性可发挥抗抑郁作用^[31]。本研究发现, W-3 给药组小鼠脑中 5-HT_{1A} 受体表达水平有所升高, 表明该化合物也可通过激活

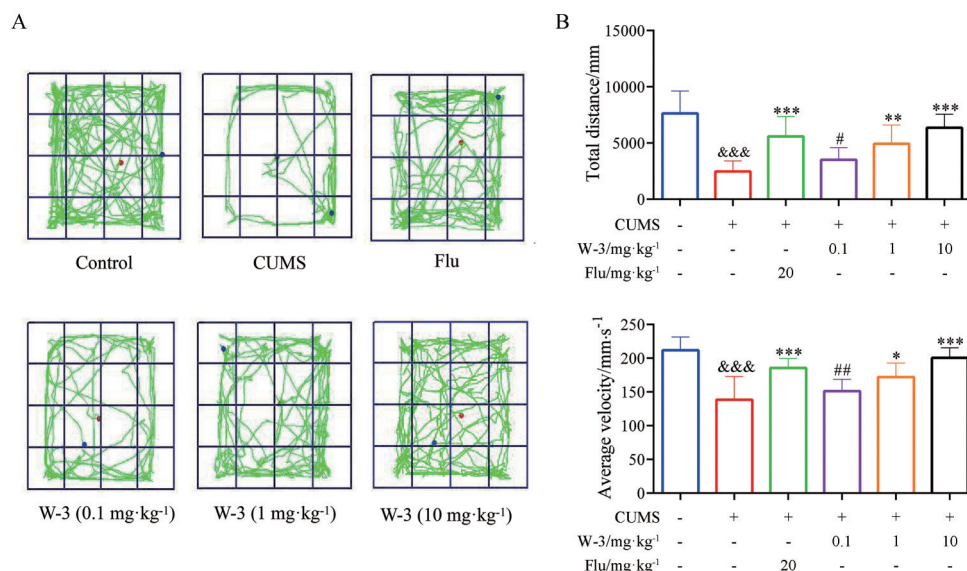


Figure 6 Effects of W-3 on spontaneous activity in CUMS model. A: Representative map of open field route; B: Total distance and average speed of mice movement. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. &&& $P < 0.001$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CUMS model; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs Flu

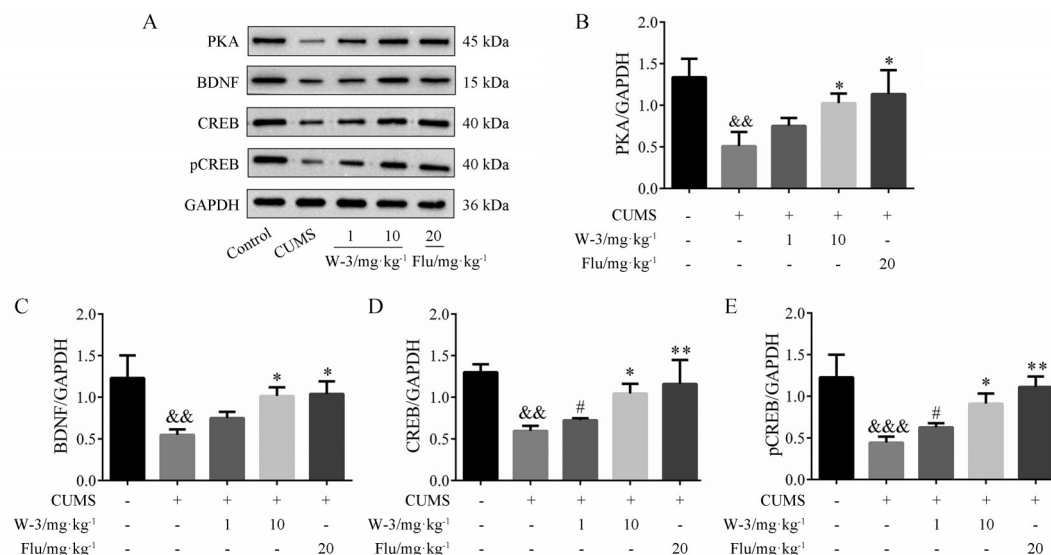


Figure 7 Effect of W-3 on PKA-CREB-BDNF signaling pathway (A-E). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. &&& $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CUMS model; # $P < 0.05$ vs Flu. PKA: Protein kinase A; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; CREB: Cyclic-AMP response binding protein; p-CREB: Phospho cyclic-AMP response binding protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

5-HT_{1A}受体发挥抗抑郁作用。

W-3能够显著缓解CUMS模型小鼠抑郁样行为,其机制可能与激活PKA-CREB-BDNF信号通路有关,通过调控5-HT_{1A}、GluN2A和GluN2B受体靶蛋白表达水平发挥潜在的抗抑郁作用。因此,化合物W-3可能是一种抑郁症治疗和神经系统保护化合物。本课题从中药活性成分中寻找有效的抗抑郁活性小分子,并对其结构进行修饰与改造,这一设计思路为后期治疗抑郁症化合物的研究提供参考。

实验部分

1 材料

1.1 细胞及动物 小鼠海马神经元HT-22细胞系购自中国科学院上海细胞生物研究所。8~9周龄雄性ICR小鼠(SPF, 20~25 g)购自安徽医科大学,动物许可证号: SCXK(安徽)-2017-001。5~6周龄雄性C57BL/6J小鼠(SPF, 20~25 g),由江苏集萃药康科技股份有限公司提供,动物使用许可证号: SCXK(SU)2018-0008。实验前,将小鼠置于温度25℃、湿度

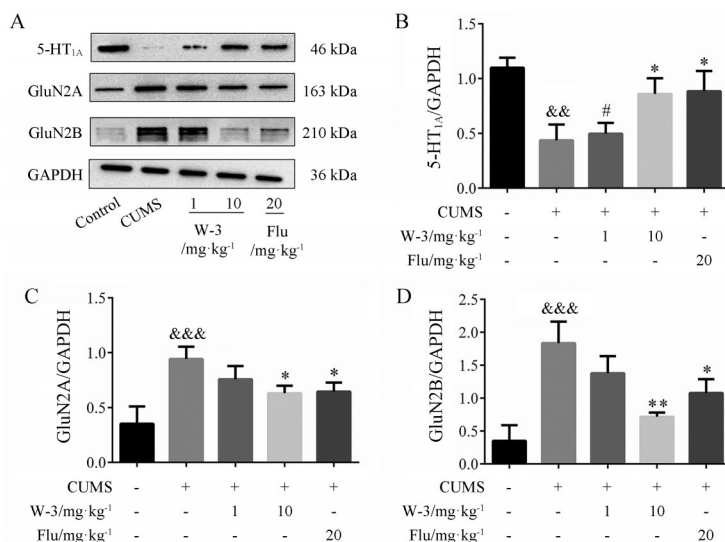


Figure 8 Effect of W-3 on receptor proteins in brain (A–D). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\&\&P < 0.01$, $\&\&\&P < 0.001$ vs control; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs CUMS model; $\#P < 0.05$ vs Flu. 5-HT_{1A}: 5-Hydroxytryptamine 1A; GluN2A: N-Methyl-D-aspartate receptor 2A; GluN2B: N-Methyl-D-aspartate receptor 2B

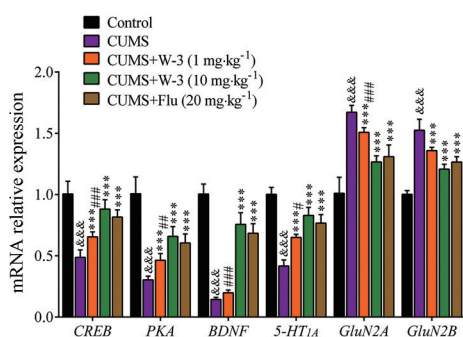


Figure 9 Effect of W-3 on the mRNA levels of *CREB*, *PKA*, *BDNF*, *5-HT_{1A}*, *GluN2A* and *GluN2B*. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\&\&\&P < 0.001$ vs control; $***P < 0.001$ vs CUMS model; $\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.01$, $\#\#\#\#P < 0.001$ vs Flu

50%~60%、12 h明暗循环的环境中适应性饲养1周。实验过程中可自由获得水和饲料，所有实验程序均通过安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号: AHUCM-mouse-2022027)。

1.2 主要仪器及试剂 熔点开放的毛细管中测定，并且没有校正。在Bruker 400 (Bruker, 瑞士) 上测量¹H NMR和¹³C NMR光谱，并且相对于四甲基硅烷，所有化学位移以ppm为单位，质谱由AB-SCIEX-X500R质谱仪测定。实验所需化学试剂购自上海阿拉丁、麦克林、润捷和江苏强盛等常规供应商，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。

胎牛血清(安徽康源生物技术有限责任公司, 20221213); DMEM培养基(赛默飞世尔科技公司, 8122638); PBS缓冲液和CCK-8试剂盒(北京兰杰柯科

技术有限公司, 22282121和01100088); 胰酶细胞消化液(上海碧云天生物科技有限公司, 122022230225); CREB抗体、BDNF抗体和pCREB抗体(英国Abcam公司, GR3102561-9、GR3105124-2和GR3012040-15); GAPDH抗体、山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司, 210040421、236000213和234750414); PKA抗体、5-HT_{1A}抗体、GluN2A抗体和GluN2B抗体(北京博奥森生物技术有限公司, AF19210562、AD08246150、AF19210516和AG08450014); ECL超敏发光试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司, 23158476); 反转录试剂盒(北京宝日医生物技术有限公司, AM62082A)。

2 目标化合物的合成

2.1 1-乙氧基-7-(羟甲基)-1,4a,5,7a-四氢环戊烷[c]吡喃-4-羧酸甲酯的合成 取100 mL干燥的单口烧瓶，依次加入京尼平(1.0 g, 4.42 mmol)、对甲苯磺酸-水合物(1.0 g, 5.30 mmol)、乙醇(7.74 mL, 132.33 mmol)，80 °C下反应1 h后，TLC检测(石油醚:乙酸乙酯 = 1:1)原料基本反应完全，加水10 mL，二氯甲烷(2 × 30 mL)萃取，合并有机相，饱和氯化钠溶液(3 × 30 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩，经硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯 = 4:1)得淡黄色油状物1.5 g，产率80%。

2.2 甲基1-乙氧基-7-[(甲基磺酰基)氧基]-1,4a,5,7a-四氢环戊基[c]吡喃-4-羧酸甲酯的合成 取100 mL干燥的单口烧瓶，依次加入1-乙氧基-7-(羟甲基)-1,4a,5,7a-四氢环戊基[c]吡喃-4-羧酸甲酯(0.9 g, 3.54 mmol)、二氯甲烷15 mL、三乙胺(5.3 g, 5.31 mmol)，冰浴条件

下缓慢滴加甲磺酰氯 (4.2 g, 3.72 mmol), 冰浴条件下继续反应 2 h, TLC 检测 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1) 原料基本反应完全。向反应液中加入 10% 稀盐酸进行洗涤 (3 × 20 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩得淡黄色油状物 1.2 g, 产率 75%。

2.3 2,3,5-三甲基-6-(哌嗪-1-基甲基)吡嗪的合成 在 250 mL 单口烧瓶中依次加入哌嗪 (8.8 g, 10.26 mmol)、二氯甲烷 28 mL, 0 °C 条件下缓慢滴加 2-(氯甲基)-3,5,6-三甲基吡嗪 (5.0 g, 2.93 mmol) 的二氯甲烷溶液, 在冰浴条件下继续反应 6 h, TLC 检测 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1) 原料基本反应完全, 水洗 (4 × 50 mL), 饱和氯化钠溶液 (2 × 30 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得淡黄色油状物 1.6 g, 产率 77%。

2.4 1-乙氧基-7-[(甲磺酰基)氧基]-1,4a,5,7a-四氢环戊[c]吡喃-4-羧酸甲酯·二盐酸盐 (W-3) 的合成 在 250 mL 单口烧瓶中依次加入甲基 1-乙氧基-7-[(甲磺酰基)氧基]-1,4a,5,7a-四氢环戊基[c]吡喃-4-羧酸甲酯 (1.5 g, 4.3 mmol)、2,3,5-三甲基-6-(哌嗪-1-基甲基)吡嗪 (1.6 g, 8.4 mmol)、碳酸钾 (1.2 g, 8.7 mmol)、DMF 20 mL, 常温反应 4 h, TLC 检测 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1) 原料基本反应完全, 加水 10 mL, 二氯甲烷 (2 × 30 mL) 萃取, 合并有机相, 饱和氯化钠溶液 (3 × 30 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 经硅胶柱分离 (石油醚: 乙酸乙酯 = 5:1) 得油状物, 加 5 mL 甲醇溶解, 浓盐酸调 pH 2, 冷冻, 析晶, 过滤, 滤饼干燥得 1.0 g 白色固体, 产率 58%, m.p. 273.8~274.9 °C。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 4.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.75 (s, 4H), 3.63 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.19 (q, *J* = 8.5, 8.1 Hz, 2H), 3.04 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 2.85 (m, *J* = 15.6, 9.1 Hz, 1H), 2.71~2.63 (m, 2H), 2.60 (s, 8H), 2.52 (s, 9H), 1.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.01, 152.31, 149.87, 149.47, 148.03, 129.52, 110.95, 101.29, 65.21, 61.76, 57.93, 53.22, 51.14, 46.60, 38.78, 35.11, 21.55, 21.45, 20.97, 15.13。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₅H₃₆N₄O₄ [M+H]⁺ 457.280 9, found 457.280 4。

3 CCK-8法测定细胞活力

HT-22 细胞以 2 × 10⁴ 的密度接种于 96 孔板中, 设空白对照组、正常对照组和药物组。药物组在不同时间 (6、12、24 和 48 h) 加入不同浓度的谷氨酸, 对应时间点每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C 恒温培养箱中孵育 2 h 后, 在 450 nm 波长下测定吸光度 (optical density, OD) 值。

将细胞同前接种于 96 孔板, 分为对照组、模型组 (谷氨酸 5 mmol·L⁻¹)、谷氨酸诱导 W-3、Flu 和京尼平给

药组 (0.1、1 和 10 μmol·L⁻¹)。处理 24 h 后, 采用 CCK-8 法测定 OD 值, 按公式 (1) 计算细胞存活率。

$$\text{存活率}/\% = \frac{(\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})}{(\text{对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})} \times 100\% \quad (1)$$

4 抑郁模型构建

绝望行为抑郁症动物模型是筛选抗抑郁药的药理学检测模型^[32]。小鼠适应性喂养 7 天后, 随机分为 8 组: 正常组、Flu (20 mg·kg⁻¹) 组、W-1 (0.1、1 和 10 mg·kg⁻¹) 组、W-3 (0.1、1 和 10 mg·kg⁻¹) 组。给药组小鼠给予 0.1 mL·20 g⁻¹ 腹腔注射, 正常组给予等体积生理盐水。腹腔注射 1 h 后, 对小鼠进行悬尾实验和强迫游泳实验, 记录小鼠静止不动时间 (s)。

在 Willner 法^[33]基础上对 CUMS 建模方法进行改进。C57BL/6J 小鼠暴露于不可预测的温和应激连续 28 天。应激因素包括禁食、夹尾、冰水游泳、湿笼、拥挤、夜间光照等。适应性喂养 7 天后, 将小鼠随机分为正常组 (给予等量生理盐水)、CUMS 组、W-3 (0.1、1 和 10 mg·kg⁻¹) 组和 Flu (20 mg·kg⁻¹) 组。小鼠单次腹腔注射 5 μL·g⁻¹, 正常组和 CUMS 组给予等体积生理盐水。经过应激至 3 周末开始给药, 给药同时每天持续进行应激, 持续到 5 周末结束给药, 之后进行行为学指标检测。

5 行为学检测

5.1 强迫游泳和悬尾实验 采用 FST 和 TST 作为行为绝望试验评估化合物 W-3 的抗抑郁活性。小鼠悬尾实验操作参照 Lucien Steru 的方法加以改进^[34]。强迫游泳实验操作参照 Porsolt 的方法加以改进^[35]。采用实验室自制强迫游泳玻璃桶, 每组实验小鼠在强迫游泳前 24 h 分别进行 15 min 游泳训练, 24 h 后分别腹腔注射给予各组小鼠相应药物, 1 h 后放入桶内进行强迫游泳, 统计小鼠悬挂后和放入桶内前 6 min 内后 4 min 的累计不动时间。

5.2 糖水偏好实验 糖水偏好实验被用来检测抑郁症的核心症状快感缺失行为, 以评估实验动物的抑郁程度, 并且作为检验 CUMS 模型建立成功的评判标准^[36]。在实验正式开始前, 进行三天训练。第四天小鼠单独饲养, 给予一瓶蒸馏水、一瓶 1% 的蔗糖溶液和饲料。4 h 后, 按公式 (2) 计算糖水偏好率。

$$\text{糖水偏好率}/\% = \frac{\text{糖水消耗量}}{(\text{糖水消耗量} + \text{水消耗量})} \times 100\% \quad (2)$$

5.3 旷场实验 将小鼠放置在测试房间中适应 10 min, 之后放入旷场立体室的中央位置, 由系统录像设备记录小鼠自由移动 5 min 的轨迹, 并对其分析得出 5 min

Table 1 Sequences of primers

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>β-actin</i>	AGTGTGACGTTGACATCCGT	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA
<i>CREB</i>	GTGAAGATGGCCGAGAAGCT	CAGCTCATCAGGAAGGTCAT
<i>BDNF</i>	TTACTCTCCTGGGTTCTGTA	ACGTCCACTTCTGTTTCCTT
<i>PKA</i>	CTTCCTGTTCACCCATATC	AAATCTTCCTGGCTTTGGC
<i>5-HT_{1A}</i>	CTTTCCAATGTCTGCACCTG	ACCAGCAACTTTGGCAATTT
<i>GluN2A</i>	TGACTATTCTCCGCCTTTC	CGTCCAACCTCCAGTTTTC
<i>GluN2B</i>	CCTCCTGTGTGAGAGGAAAG	GTAGAGGAGTCTCTGTGTGG

内小鼠活动的总路程和平均速度。

6 组织样本收集

行为学实验结束后,立即按0.3%戊巴比妥钠50 mg·kg⁻¹的标准对各组实验小鼠进行腹腔注射麻醉。眼眶静脉丛采血,血液采集后立即取出小鼠的脑组织,置于EP管并储存于液氮罐中。

7 蛋白免疫印迹

将小鼠脑组织与RIPA缓冲液(RIPA裂解液:PMSF = 100:1)混合匀浆,冰上充分裂解,细胞直接加入RIPA缓冲裂解液于冰上裂解。BCA试剂盒检测蛋白浓度。将等量的样品进行SDS-PAGE并转移到PVDF膜上。室温下用5%脱脂牛奶封闭膜2 h, TBST清洗3遍后于4 °C下与一抗孵育过夜。孵育完成后TBST清洗3遍并在室温下与相应的二抗孵育1.2 h。然后用超敏化学发光液显影, Image J软件分析条带的光密度值。

8 qRT-PCR检测

采用qRT-PCR技术检测小鼠脑组织中*BDNF*、*CREB*、*PKA*、*5-HT_{1A}*、*GluN2A*和*GluN2B*的mRNA表达水平。实验中所选引物序列见表1,引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成,cDNA进行聚合酶链式反应,反应以*β-actin*为内标参照物,目的基因的相对表达量用 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

PCR反应体系:2 × SYBR Green mixture 5 μL,正、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL, cDNA模板1 μL,用灭菌水补足至总体积10 μL。

PCR反应参数:95 °C预变性1 min,1次循环;95 °C变性20 s;60 °C退火1 min,共计40次循环。

9 统计学处理

所有实验至少进行了三次重复,使用Graphpad Prism 6等软件对实验结果进行统计分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用*t*检验,多组间均数比较采用单因素方差分析;*P* < 0.05为差异具有统计学意义。

作者贡献:程红艳负责调研整理文献和文章撰写;王丹慧负责调研整理文献、设计研究方案、实施研究过程、采集整理数据;赵文杰参与研究、统计分析、提供技术支持;王天城、许

文雪、张彩云和赵亚男给予工作支持、修订论文、论文校正;张艳春对本文提供指导性支持,设计论文总纲和终审论文。

利益冲突:所有作者均声明不存在任何利益相关问题。

References

- [1] Monroe SM, Harkness KL. Major depression and its recurrences: life course matters [J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2022, 18: 329-357.
- [2] Hu NN, Sun JJ. The relationship between neurotransmitters, inflammatory factors and cognitive function in elderly patients with depression [J]. *Chin J Geriatrics (中国老年学杂志)*, 2020, 40: 3302-3307.
- [3] Furukawa TA, Cipriani A, Cowen PJ, et al. Optimal dose of selective serotonin reuptake inhibitors, venlafaxine, and mirtazapine in major depression: a systematic review and dose-response meta-analysis [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6: 601-609.
- [4] Sun AN, Cai L. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of depression [J]. *J Pract Chin Med (实用中医药杂志)*, 2023, 39: 2094-2096.
- [5] Liang Y, Zhao H, Yue LF, et al. Clinical and experimental research progress of Xiaoyao powder for depression [J]. *J New Chin Med (新中医)*, 2017, 49: 142-145.
- [6] Zhou ZL, Zhang YX, Chen G. Research progress on Yueju pill in the treatment of depression and associated traditional Chinese medicine connotation [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化)*, 2018, 20: 875-879.
- [7] Hao WZ, Wang L, Huang JQ, et al. Research progress on the pharmacodynamic mechanism of antidepressant compound prescriptions and its flavonoids active ingredients [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3035-3046.
- [8] Ren L, Zhang H, Tao W, et al. Hippocampal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mediates rapid antidepressant-like effects of Yueju pill [J]. *Neuropeptides*, 2023, 101: 102350.
- [9] Ren L, Chen G. Rapid antidepressant effects of Yueju: a new look at the function and mechanism of an old herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 226-232.
- [10] Ren L, Tao W, Zhang H, et al. Two standardized fractions of *Gardenia jasminoides* Ellis with rapid antidepressant effects are differentially associated with BDNF up-regulation in the hippocampus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187: 66-73.

- [11] Ren L, Zhang H, Tao W, et al. The rapid and long-lasting antidepressant effects of iridoid fraction in *Gardenia Jasminoides* J. Ellis are dependent on activating PKA-CREB signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 896628.
- [12] Chai C, Jin B, Yan Y, et al. Anti-depressant effect of Zhi-zi-chi decoction on CUMS mice and elucidation of its signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113283.
- [13] Shan M, Yu S, Yan H, et al. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1689.
- [14] Zhang B, Chang HS, Hu KL, et al. Combination of geniposide and eleutheroside B exerts antidepressant-like effect on lipopolysaccharide-induced depression mice model [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27: 534-541.
- [15] Zou J, Gao P, Hao X, et al. Recent progress in the structural modification and pharmacological activities of ligustrazine derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 147: 150-162.
- [16] Zhao Y, Liu Y, Chen K. Mechanisms and clinical application of tetramethylpyrazine (an interesting natural compound isolated from *Ligusticum wallichii*): current status and perspective [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2124638.
- [17] Zhao T, Fu Y, Sun H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia [J]. *IUBMB Life*, 2018, 70: 60-70.
- [18] Chen B, An J, Guo YS, et al. Tetramethylpyrazine induces the release of BDNF from BM-MSCs through activation of the PI3K/AKT/CREB pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45: 2429-2442.
- [19] Huang W, Wang Y, Li J, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel genipin derivatives for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2019, 93: 110-122.
- [20] Zhang J, Narr KL, Woods RP, et al. Glutamate normalization with ECT treatment response in major depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 18: 268-270.
- [21] Yang EJ, Kim M, Woo JE, et al. The comparison of neuroprotective effects of isoliquiritigenin and its phase I metabolites against glutamate-induced HT22 cell death [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 5639-5643.
- [22] Xue L, Gong P, Wang Z, et al. Neurobiological mechanisms of glutamate on the pathogenesis of depression and treatment [J]. *Int J Psychiatry (国际精神病学杂志)*, 2023, 50: 600-604.
- [23] Pham TH, Gardier AM. Fast- β -acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 199: 58-90.
- [24] Wang HQ, Wang ZZ, Chen NH. Research progress on the pathogenesis of depression and receptor gene abnormality [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 384-391.
- [25] Tang XH, Zhang GF, Xu N, et al. Extrasynaptic CaMKII α is involved in the antidepressant effects of ketamine by downregulating GluN2B receptors in an LPS-induced depression model [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17: 181-189.
- [26] Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7777.
- [27] Tan P, Xue T, Wang Y, et al. Hippocampal NR6A1 impairs CREB-BDNF signaling and leads to the development of depression-like behaviors in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 209: 108-115.
- [28] Nishijo T, Suzuki E, Momiyama T. Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor-mediated inhibition of glutamatergic transmission onto rat basal forebrain cholinergic neurons [J]. *J Physiol*, 2022, 600: 3149-3167.
- [29] Zhu X, Liu H, Deng Z, et al. Hesperidin exerts anxiolytic-like effects in rats with streptozotocin-induced diabetes via PKA/CREB signaling [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2023, 16: 91-100.
- [30] Cai MY, Yang Z, Huang XJ, et al. Mongolian medicine areca thirteen pill (GY-13) improved depressive syndrome via upregulating cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115310.
- [31] Limón-Morales O, Morales-Quintero K, Arteaga-Silva M, et al. Alterations of learning and memory are accompanied by alterations in the expression of 5-HT receptors, glucocorticoid receptor and brain-derived neurotrophic factor in different brain regions of an animal model of depression generated by neonatally male treatment with clomipramine in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 455: 114664.
- [32] Yu HL, Deng XQ, Li YJ, et al. N-Palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63: 834-839.
- [33] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
- [34] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85: 367-370.
- [35] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior [J]. *J Vis Exp*, 2015, (97): 52587.
- [36] Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13: 1686-1698.