·实验研究·

川芎嗪灯盏乙素苷元抗缺血性脑卒中孪药的合成及活性研究

刘明吉,吴淑霞,雷丹丹,张青艳,董　莉,董永喜
(贵州医科大学药学院,贵阳 550025)

[摘要] **目的**:设计合成川芎嗪灯盏乙素苷元孪药,研究其对于缺血性脑卒中的治疗作用。**方法**:以川芎嗪和灯盏乙素苷元为原药,通过共价键将其拼合,并对所合成目标化合物进行体外抗氧化损伤、抗凝血活性研究,筛选得到目标化合物**4**进行体内缺血再灌注损伤保护作用研究。**结果**:设计合成得到6个川芎嗪灯盏乙素苷元孪药,受试化合物均表现出良好的抗氧化损伤及抗凝血活性,化合物**4**高剂量组脑梗死体积比减小为23.7%(与模型组相比)。**结论**:孪药策略对于治疗缺血性脑卒中具有一定的参考价值。

[关键词] 川芎嗪;灯盏乙素苷元;孪药;缺血性脑卒中
[中图分类号] R914　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)03-0267-07

Synthesis and biological evaluation of twin drug of tetramethylpyrazine and scutellarein for ischemic stroke

LIU Ming-ji, WU Shu-xia, LEI Dan-dan, ZHANG Qing-yan, DONG Li, DONG Yong-xi
(*School of Pharmacy*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550025, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To design and synthesize twin drug of tetramethylpyrazine and scutellarein for ischemic stroke. **Methods**: Based upon the theory of twin drug, six targeted compounds were synthesized and their structures were confirmed by ^{1}H-NMR and HRMS. The antioxidant and anticoagulant activities of the target compounds were studied *in vitro*, and the selected compound was further evaluated for cerebral ischemia/reperfusion protection using middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. **Results**: All the tested compounds showed good effect against oxidative damage and anticoagulant activity, and the volume ratio of cerebral infarction in the high dose group of compound **4** was reduced to 23.7% compared with the MCAO group. **Conclusion**: The twin drug strategy has certain reference value for the treatment of ischemic stroke.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; scutellarein; twin drug; ischemic stroke

脑卒中可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中最常见,占脑卒中的80%~85%[1]。当脑血管出现血栓,正常的循环受阻,导致缺血性卒中产生。因此,缺血性卒中的治疗首要任务就是溶栓。缺血性脑卒中导致细胞生化的级联反应,包括腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)快速消耗、钙离子超载、酸中毒以及水肿等[2]。这些改变导致活性自由基大量产生,其中主要的就是活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS)。正常的机体组织对于过量的活性氧自由基有一定的防御机制,缺血性卒中打破了这一体系,并且加速了ROS的大量释放,最终导致神经细胞的不可逆凋亡。因此,单纯的溶栓并非缺血性卒中的最佳治疗,减少由ROS导致的神经细胞损伤被认为是治疗缺血性脑卒中的重要策略[3]。

川芎嗪(tertramethylpyrazine,TMP)为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong*)干燥根茎中提取的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81960630);贵州省科学技术基金计划(黔科合基础[2016]1127);贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018年]5779)
[作者简介] 刘明吉,女,硕士研究生,主要从事天然药物结构修饰研究。联系电话:(0851)88416153,E-mail:1506207004@qq.com。
[通讯作者] 董永喜,男,博士,副教授,主要从事天然活性产物结构修饰研究。联系电话:(0851)88416153,E-mail:dongyx01@163.com。

生物碱单体,结构式见图 1。药理学研究表明 TMP 具有防治脑缺血、改善微循环、抗血栓、保护冠状动脉、保护心肌细胞及防治心肌细胞缺血再损伤等作用[4]。TMP 容易穿透血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),在脑中富集,尤其是在脑干组织,在临床应用过程中发现 TMP 具有代谢快、半衰期短、生物利用度低等缺点[5]。其中一个主要原因是其分子中的甲基易被氧化代谢,生成极性和水溶性都较大的代谢产物,从而迅速排出体外,这使其应用受到了限制[6]。

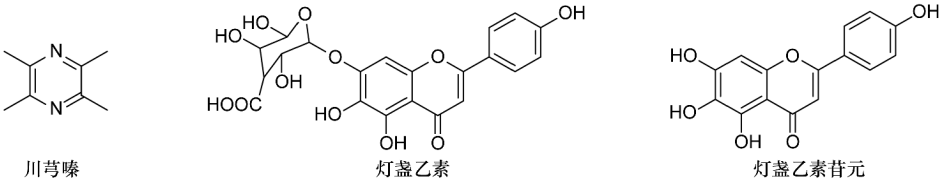


图 1 川芎嗪、灯盏乙素、灯盏乙素苷元的结构

灯盏细辛是菊科飞蓬属植物短葶飞蓬(*Erigerm breviscapus*)的全草,主要分布在我国西南部的云南、贵州等地,具有活血化瘀、通经活络等功效。在灯盏细辛中灯盏乙素(scutellarin)是最主要的黄酮类活性成分[7-8]。研究证明,灯盏乙素主要以苷元形式被小肠吸收。与灯盏乙素相比,灯盏乙素苷元(scutellarein,Sc-Ag)口服易于吸收,体内代谢稳定,其相对生物利用度为 301.8%(相对灯盏乙素)[9],而在对脑缺血大鼠梗死面积的研究中,灯盏乙素苷元的疗效高于灯盏乙素近 1.5 倍,证实灯盏乙素苷元有与灯盏乙素类似的药效,且药效显著强于灯盏乙素。

孪药设计是指将 2 个或多个药理活性相似或相近的药物通过拼合原理进行连接,可以发挥药物的协同作用或者改善原有药物的缺陷,其在神经退行性疾病[10-11]、精神疾病[12-13]、传染性疾病[14]及恶性肿瘤[15]的治疗中多见报道。*L*-氨基酸能一定程度提高药物口服生物利用度并降低药物不良反应[16-17]。基于以上理论,本文设计利用 *L*-氨基酸将灯盏乙素苷元与川芎嗪巧妙结合,发挥协同作用,期望突破现今临床单一的溶栓或自由基清除治疗。本研究共合成川芎嗪和灯盏乙素苷元杂交分子 6 个,并对其进行抗氧化损伤保护作用研究、抗凝血活性研究以及体内缺血再灌注损保护作用研究。

材　　料

1　仪器

JNM ECS400 400 MHz 核磁共振仪(日本 JEOL 公司);Xevo G2-XS QTof 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司);1290Infinity 高效液相色谱仪(配备 DAD 二极管阵列检测器,二元泵,柱温箱,美国 Agilent 公司);Modle680 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);LG-PABER-I 血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝公司);SGWX－4 熔点测定仪(上海光学仪器公司,温度未校正)。

2　试药

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTS, Sigma 公司)、PT 试剂盒(批号:STG20201-44)、TT 试剂盒(批号:STG20301-30)、APTT 试剂盒(批号:STG20201-22)、FIB 试剂盒(批号:STG20401-29)及其相关缓冲液均为购自北京世帝科学仪器公司;PC12 细胞株(中国医学科学院医药生物技术研究所);灯盏乙素(昆明风山渐医药研究有限公司,含量:90% ~95%);其余所用试剂均为市售化学纯或分析纯产品;溶剂用前都经脱水处理;柱层析硅胶 200 ~300 目、GF254 硅胶板均购自青岛海洋化工。

3　实验动物

健康雄性 SD 大鼠,随机分组,每组 6 只,共 42 只,体重(230 ±20) g,鼠龄 2 ~3 个月,购自重庆腾鑫生物技术有限公司,许可证编号:SYXK(黔)2018-0001。动物饲养于动物房中,保持室温 22 ~24 ℃,相对湿度保持 50% ~60%,适应性饲养 1 周后开始正式实验。按假手术组、模型组、阳性药物组、化合物组高剂量组、化合物组中剂量组和化合物组低剂量组分组,各组动物灌胃(*ig*)给药,*qd*,连续 14 d。

方法与结果

1　目标化合物的合成路线

见图 2。

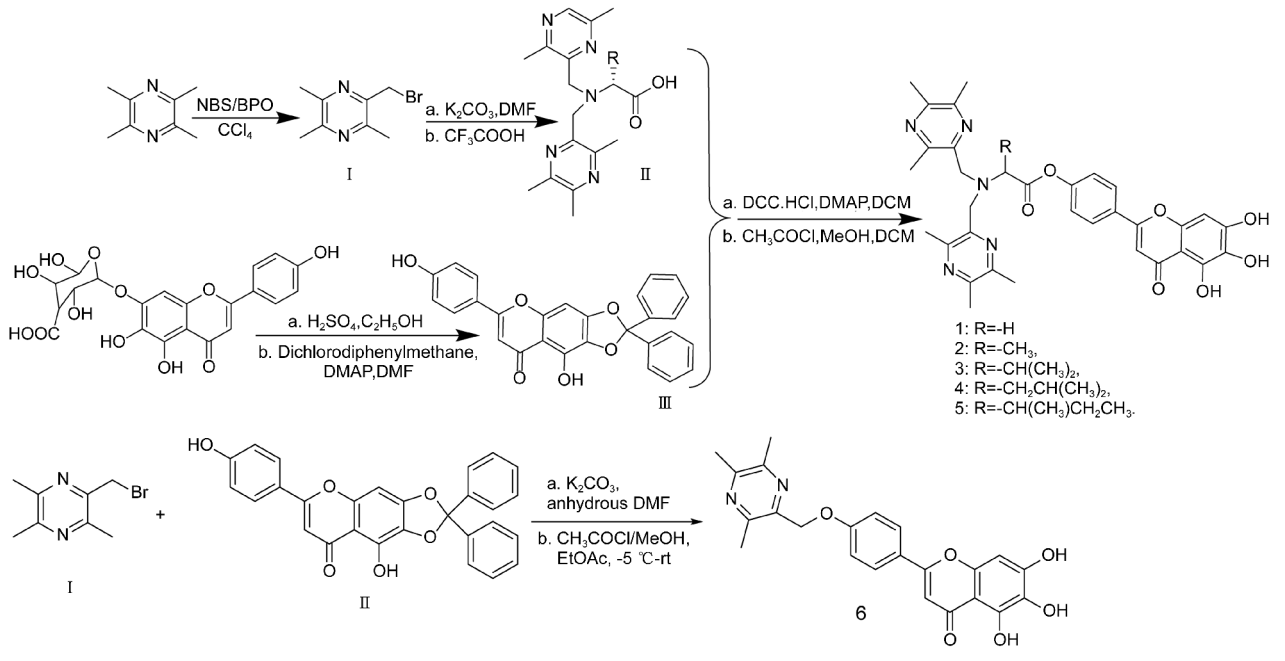


图 2　目标化合物的合成路线

2　2-溴甲基-3,5,6-三甲基吡嗪(I)的制备[18]

2,3,5,6-四甲基吡嗪(2.495 g, 0.018 5 mol),*N*-溴代丁二酰亚胺(*N*-bromosuccinimide,NBS,3.256 g, 0.018 5 mol),过氧化二苯甲酰(benzoyl peroxide, BPO,0.453 g,0.018 5 mol)溶于适量四氯化碳溶液中,65 ℃反应,薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)监测至反应结束,蒸干溶剂,柱层析纯化(EA∶PE = 1∶4)得黄色油状液体 2-溴甲基-3,5,6-三甲基吡嗪 1.323 g。^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ:4.53 (s,2H,-CH_2-),2.56(s,3H,3-CH_3),2.50(s,3H,6-CH_3),2.48(s,3H,5-CH_3)。

3　中间体(II)的制备

2-溴甲基-3,5,6-三甲基吡嗪(515 mg,2.406 mmol),氨基酸叔丁酯盐酸盐(0.961 mmol)和碳酸钾(182.3 mg,1.921 mmol)在 10 mL *N*,*N*'-二甲基甲酰胺(*N*,*N*'-dimethylformamide,DMF)中,室温搅拌,TLC 监测至反应结束,减压浓缩,柱层析纯化(EA∶PE = 1∶2),得无色油状液体。所得油状物中加入 2 mL 三氟乙酸,-5 ℃搅拌反应,TLC 监测至反应结束,减压浓缩,得中间体 **II**。

中间体 **II** 表征:二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)-甲基]-甘氨酸,收率:85%。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 3.95(s,4H),3.26(s,2H),2.45(s,6H),2.44(s,6H),2.42(s,6H)。二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)-甲基]-丙氨酸,收率:74%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 3.94(s,4H),2.86(q,1H),2.45(s,6H),2.44(s,6H),2.41(s,6H),1.48(d,J = 6.2 Hz,3H)。二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)-甲基]-缬氨酸,收率:71%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ:3.95(s, 4H), 2.73(d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.46(s, 6H), 2.45(s, 6H), 2.43(s, 6H), 0.87(d, J = 6.5 Hz, 6H)。二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)-甲基]-亮氨酸,收率:61%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ:3.92(s, 4H),3.30(t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.40(s,12H),2.33(s,6H),1.73 ~ 1.60(m,3H), 0.73(d,J = 6.2 Hz,6H)。2-[二(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲基]氨基)-3-甲基戊酸,收率:48%。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d6) δ: 3.91 (d, J = 13.6 Hz, 4H), 2.80(d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.37 (s, 12H), 2.35(s, 6H), 2.23 ~ 2.07(m, 3H), 1.12(d, J = 6.5 Hz, 3H)。

4　6,7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元(III)的制备[17]

精密称取灯盏乙素 10 g 于圆底烧瓶中,加入一定量乙醇和 20% 的浓硫酸,在氮气的保护下搅拌反应,TLC 监测至反应结束,反应液倾入烧杯,加入蒸馏水稀释,静置 1 h,冷却析出浅黄色沉淀。抽滤,干燥得灯盏乙素苷元。将灯盏乙素苷元(5.432 g, 19.0 mmol)溶于适量 DMF 中,加入 4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine,DMAP,2.76 g,22.6 mmol),溶解,加入二氯二苯甲烷(dichlorodiphenylmethane, 4 mL,20.8 mmol),180 ℃回流反应,TLC 监测直至反应结束,柱层析纯化(EA∶PE = 1∶7),得到目标产

物 2.675 g(即化合物 **III**)。浅黄色粉末状固体。产率:68.4%。^{1}H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ:12.59 (brs, 1H), 7.92(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.56 ~ 7.53 (m, 4H),7.46 ~ 7.44(m,6H),7.04(s,1H),6.91 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.83(s, 1H)。

5 川芎嗪灯盏乙素苷元杂交分子(1 ~ 5)的制备

缩酮保护的灯盏乙素苷元(344 mg,0.741 mmol),中间体(**II**,0.961 mmol),DMAP(181 mg,1.482 mmol),*N*,*N*'-二环己基碳二亚胺(*N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide,DCC,213 mg,1.037 mmol)在干燥二氯甲烷中搅拌反应,TLC 监测至反应结束,所得样品经柱层析纯化(二氯甲烷∶甲醇=100∶1),得到产物化合物 187 mg。-5 ℃条件下,依次将甲醇(50 μL,400 μmol)和乙酰氯(20 μL,333 μmol)加入 2 mL 的二氯甲烷中,-5 ℃搅拌反应 3 h 后,将之前得到的中间体 **III** 溶于 1.5 mL 二氯甲烷后,加到上述反应体系中,保持温度反应 2 h 后,逐步升至室温,搅拌 12 h,有固体产生,反应体系经超声、离心后所得沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次,得黄色粉末状目标产物。

6 川芎嗪灯盏乙素苷元杂交分子(6)的制备

2-溴甲基-3,5,6-三甲基吡嗪(I,178 mg,0.832 mmol)与二苯缩酮保护的灯盏乙素苷元(II,310 mg,0.666 mmol)和碳酸钾(61 mg,0.643 mmol)在 2 ~ 3 mL DMF 中室温搅拌,TLC 监测至反应结束,柱层析纯化(二氯甲烷∶甲醇=200∶1),得淡黄色粉末状固体 172 mg。

-5 ℃条件下,依次将甲醇 50 μL(400 μmol)和乙酰氯 20 μL(333 μmol)加入 2 mL 的二氯甲烷中,-5 ℃搅拌反应 3 h 后,将之前得到的固体溶于 1.5 mL 二氯甲烷后,加到上述反应体系中,继续保持温度反应 2 h 后,逐步升至室温,搅拌 12 h,有固体产生,反应体系经超声、离心后所得沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次,得目标产物 **6**。

目标化合物表征:4-(5,6,7-三羟基-4-氧-4*H*-吡喃酮-2-基)苯基-二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)-甲基]甘氨酸酯(**1**),收率:21%。m. p.:175 ~ 177 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d6) δ:8.17 (d,J=8.8 Hz, 2H),7.51 (d,J=8.8 Hz,2H),6.92 (s,1H),6.65 (s,1H),3.72(s,4H),3.21(s,2H),2.47(s,12H), 2.33(s, 6H)。HRESIMS m/z (pos):612.246 3 $C_{33}H_{34}N_5O_7$ (calcd. 612.245 8)。4-(5,6,7-三羟基-4-氧代-4*H*-吡喃酮-2-基)苯基-二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲基]丙氨酸酯(**2**),收率:18%。m. p.:181 ~ 184 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d6) δ:8.19 (d,J=8.8 Hz, 2H), 7.54 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 3.71(s, 4H), 2.83 (s, 1H), 2.47 (s, 12H), 2.33(s, 6H), 1.62(d, J=6.2 Hz, 3H)。HRESIMS m/z (pos):626.262 1 $C_{34}H_{36}N_5O_7$(calcd. 626.261 5)。4-(5,6,7-三羟基-4-氧代-4*H*-吡喃酮-2-基)苯基-二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲基]缬氨酸酯(**3**),收率:26%。m. p.:196 ~ 198 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d6) δ:8.14 (d,J=8.8 Hz, 2H),7.51(d,J=8.8 Hz,2H), 6.91 (s,1H),6.62(s,1H),3.81(d,J=13.6 Hz,4H), 2.80(d, J=10.7 Hz, 1H), 2.37(s, 6H), 2.35(s, 12H),2.20 ~ 2.07(m,1H),0.90(d,J=6.5 Hz, 6H)。HRESIMS m/z (pos):654.2938 $C_{36}H_{40}N_5O_7$ (calcd. 654.292 8)。4-(5,6,7-三羟基-4-氧代-4*H*-吡喃酮-2-基)苯基-二-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲基]亮氨酸盐(**4**),收率:13%。m. p.:191 ~ 195 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d6) δ:8.17(d,J=8.8 Hz, 2H),7.53(d,J=8.8 Hz,2H),6.94(s,1H),6.65 (s, 1H), 3.91 (d, J=2.4 Hz, 4H), 3.30(t, J=7.2 Hz,1H),2.40(s,12H),2.33(s,6H),1.73 ~ 1.60(m,3H), 0.73(d, J=6.2 Hz,6H)。HRESIMS m/z (pos):668.309 1 $C_{37}H_{42}N_5O_7$(calcd. 668.308 4)。4-(5,6,7-三羟基-4-氧代-4*H*-吡喃酮-2-基)苯基-2-[二(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲基]氨基-3-甲基戊酸盐(**5**),收率:29%。m. p.:192 ~ 194 ℃。^{1}H NMR (400 MHz,DMSO-d6) δ:8.15(d,J=8.8 Hz,2H), 7.53(d,J=8.8 Hz,2H),6.92(s,1H),6.63(s, 1H),3.81(d,J=13.6 Hz,4H),2.80(d,J=10.7 Hz, 1H),2.37(s,12H),2.35(s,6H),2.23 ~ 2.07(m, 3H),1.12(d,J=6.5 Hz,3H)。HRESIMS m/z (pos):668.308 6 $C_{37}H_{42}N_5O_7$(calcd. 668.308 4)。5,6,7-三羟基-2-{4-[(3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基]苯基}-4*H*-吡喃酮-4 酮(**6**),收率:15%。m. p.:195 ~ 198 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ:8.17 (d, J=8.8 Hz, 2H),7.50(d,J=8.8 Hz,2H),6.96(s, 1H),6.68(s,1H),4.57(s,2H),2.47(s,6H),2.55 (s,3H)。HRESIMS m/z (pos):421.140 8 $C_{23}H_{21}N_2O_6$ (calcd. 421.140 0)。

7 目标化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用研究[19]

目标化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用测定结果见表 1。

表 1 目标化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用测定结果 $\bar{x} \pm s$

化合物	细胞活力/%		
	2 μmol·L^{-1}	10 μmol·L^{-1}	20 μmol·L^{-1}
Sc-Ag	65.26 ± 0.97^b	67.21 ± 0.57^b	69.26 ± 0.21^a
1	63.38 ± 0.59^a	72.37 ± 0.35^c	80.36 ± 1.32^d
2	63.69 ± 0.28^a	67.24 ± 0.33^a	83.63 ± 1.31^a
3	60.63 ± 0.48^a	74.51 ± 0.95^c	85.34 ± 1.56^d
4	69.32 ± 0.57^c	79.26 ± 0.36^d	85.39 ± 1.26^d
5	69.21 ± 1.21^c	77.85 ± 1.32^c	87.37 ± 0.34^d
6	60.52 ± 1.34^a	61.54 ± 1.08^a	72.10 ± 1.17^a
H_2O_2		47.43 ± 0.58	
Con		100.07 ± 1.24	

a：与 H_2O_2 组相比，$P<0.001$；b：与 Sc-Ag 组相比，$P<0.05$；c：与 Sc-Ag 组相比，$P<0.01$；d：与 Sc-Ag 组相比，$P<0.001$

选取对数生长期 PC12 细胞，以每孔 100 μL，5 ~ 10 × 10^4 个·mL^{-1}种植于 96 孔培养板中，将培养板置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。实验分为正常细胞组、模型组、Sc-Ag 组和药物组。正常对照组每孔加入 100 μL DMEM 培养液；模型组中将 H_2O_2 稀释至 1 000 μmol·L^{-1}，每孔加入 100 μL；阳性药组中将 Sc-Ag 稀释至浓度为 20 μmol·L^{-1}，并加入 H_2O_2 母液使每组 H_2O_2 浓度为 1 000 μmol·L^{-1}，每孔加入 100 μL；药物组中将受试化合物稀释至不同体积比浓度（2，10，20 μmol·L^{-1}），并加入 H_2O_2 母液使每组 H_2O_2 浓度为 1 000 μmol·L^{-1}，每孔加入 100 μL，作用 PC12 细胞 6 h 后用 MTS 法测定其细胞存活率。每个浓度平行 4 孔，实验重复 3 次。

8 目标化合物体外抗凝血活性研究[17]

新西兰大耳兔注射麻醉后，颈总动脉取血，收集于含 3.8% 枸橼酸钠的一次性专用真空硅化血凝管中（抗凝剂/血液 = 1∶9，*v*/*v*）。3 000 r·min^{-1}离心 10 min，分取贫血小板血浆（platelet poor plasma，PPP）待用。所有受试化合物均溶于 80% 乙醇，除 TMP 为 200 μmol·L^{-1}外，其余受试化合物浓度为 100 μmol·L^{-1}。

PT，TT，APTT，FIB 检测，均按照试剂盒及血小板聚集凝血因子分析仪相关说明进行。40 μL PPP 在 37 ℃孵育 3 min，随后加入 40 μL 凝血酶原溶液和 20 μL 供试品溶液用于 PT 的检测；40 μL PPP 在 37 ℃孵育 3 min，随后加入 40 μL 凝血酶溶液和 20 μL 供试品溶液，37 ℃孵育 3 min 用于 TT 的检测；50 μL PPP，40 μL 活化部分凝血酶原溶液和 10 μL 供试品溶液在 37 ℃孵育 3 min，随后加入 50 μL $CaCl_2$ 用于 APTT 的检测；10 μL PPP 和 90 μL 咪唑缓冲液在 37 ℃孵育 3 min，随后加入 50 μL 纤维蛋白原溶液和 10 μL 供试品溶液用于 FIB 的检测。保持室内温度在（26 ± 2）℃、4 h 之内完成实验。

表 2 部分目标化合物体外抗凝血活性研究测定结果 $\bar{x} \pm s$

化合物	凝血参数			
	TT/s	APTT/s	PT/s	FIB/g·L^{-1}
TMP	29.34 ± 0.76	41.19 ± 0.19	7.47 ± 0.67	2.98 ± 1.06
80% 乙醇	11.38 ± 0.42	18.35 ± 0.61	4.26 ± 0.43	14.18 ± 0.36
1	31.06 ± 0.36^b	46.39 ± 0.38^c	7.58 ± 0.27^b	2.09 ± 0.12^c
3	30.48 ± 0.26^a	45.37 ± 0.17^c	7.07 ± 0.16^a	2.35 ± 0.17^c
4	35.14 ± 0.37^c	44.41 ± 0.32^d	8.47 ± 0.32^c	2.01 ± 0.21^c

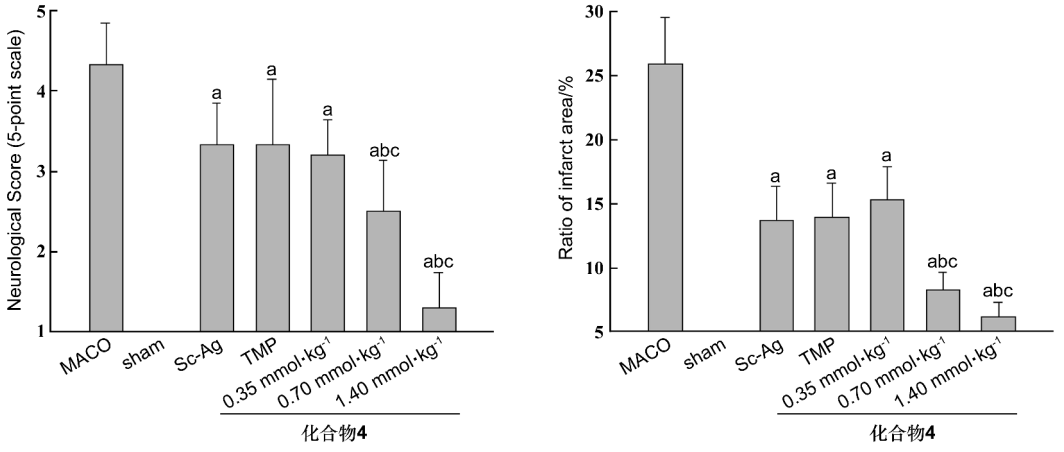
a：与 80% 乙醇组相比，$P<0.001$；b：与 TMP 组相比，$P<0.05$；c：与 TMP 组相比，$P<0.01$；d：与 TMP 组相比，$P<0.001$

9 杂交分子 4 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[19-20]

MCAO 模型的建立采用文献报道的方法[21]，各组大鼠于缺血 2 h 后进行再灌注，缓慢外拉线栓使其恢复大脑中动脉的供血 24 h，即中动脉缺血再灌注造模完成。假手术组除不插线栓外，其余操作均相同。

给药方案：阳性药物组：0.70 mmol·kg^{-1}灯盏乙素苷元，0.70 mmol·kg^{-1}川芎嗪组。药物组：0.35 mmol·kg^{-1}化合物 **4**（低浓度组）、0.70 mmol·kg^{-1}化合物 **4**（中浓度组）、1.4 mmol·kg^{-1}化合物 **4**（高浓度组）。假手术组和模型组：给予等容积的生理盐水（含 0.25% CMC-Na）。灌胃给药。各组动物均灌胃给药或生理盐水 7 d，末次给药 30 min 后造模。

缺血再灌注 24 h 后，按神经行为学评分标准评分，TTC 染色计算梗死体积比。



a：与 MCAO 组相比，$P<0.05$；b：与 Sc-Ag 组相比，$P<0.05$；c：与 TMP 组相比，$P<0.001$

图 3　目标化合物 **4** 对神经行为学评分及梗死体积比的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

讨　论

基于拼合原理，本部分研究共合成川芎嗪灯盏乙素苷元孪药化合物 6 个，并进行体外抗氧化损伤保护活性研究、抗凝血研究以及缺血再灌注损伤保护作用研究。

首先利用 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞模型对目标化合物进行抗氧化活性研究，结果表明，与原药 Sc-Ag 相比，除化合物 **6** 外，其余受试化合物各浓度组均能不同程度提高细胞存活率，提高原药抗氧化损伤活性。推测原因可能是化合物 **6** 溶解性较差所致。

依据抗氧化损伤结果，选取化合物 **1**，**3**，**4** 进行体外凝血时间检查，结果表明，与川芎嗪组相比，受试化合物均能不同程度延长 TT，APTT 和 PT，并显著性降低血浆中 FIB 含量。综合 PC12 体外抗氧化活性研究结果，侧面验证了孪药设计“1 + 1 > 2”的可能性。

综合以上结果，本实验研究了理化性质良好、具有较强抗氧化和抗凝血活性的化合物 **4** 对于大鼠缺血再灌注损伤的保护作用。结果表明：化合物 **4** 能够显著改善大鼠缺血再灌注损伤后的神经行为特征，减少脑梗死体积比。推测原因可能是抗凝血活性与抗氧化损伤活性协同作用的结果。

[参 考 文 献]

[1] YOUNG CC, AL-DALAHMAH O, LEWIS NJ, *et al*. Blocked angiogenesis in Galectin-3 null mice does not alter cellular and behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 63: 155 - 164.

[2] WOODRUFF TM, THUNDYIL J, TANG S, *et al*. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1): 11.

[3] 周思行，刘添，李基煜，等. 药师指导联合电话随访对缺血性脑卒中二级预防用药依从性及预后的影响[J]. 今日药学，2020，30(7)：495 - 497.

[4] LIU CF, LIN CH, CHEN CF, *et al*. Antioxidative effects of tetramethylpyrazine on acute ethanol-induced lipid peroxidation[J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(6): 981 - 988.

[5] ZHANG ZH, WEI TT, HOU JW, *et al*. Tetramethylpyrazine scavenges superoxide anion and decreases nitric oxide production in human polymorphonuclear leukocytes[J]. *Life Sci*, 2003, 72(22): 2465 - 2472.

[6] QIAN WD, XIONG XJ, FANG ZY, *et al*. Protective effect of tetramethylpyrazine on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 107501.

[7] 车庆明，潘丽怡，陈颖，等. 灯盏花乙素苷元的药动学研究[J]. 中国药学杂志，2007，42(18)：1418 - 1421.

[8] CHEN XY, CUI L, DUAN XT, *et al*. Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral administration[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(8): 1345 - 1352.

[9] ZHANG JL, CHE QM, LI SZ, *et al*. Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC-MS and HPLC-NMR[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(4): 249 - 256.

[10] WANG L, ESTEBAN G, OJIMA M, *et al*. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 80: 543 - 561.

[11] CHRISTEN V, RUSCONI M, CRETTAZ P, *et al*. Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells *in vitro*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 325(1): 25 - 36.

[12] BAWA P, PRADEEP P, KUMAR P, *et al*. Multi-target therapeutics for neuropsychiatric and neurodegenerative disorders[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(12): 1886 - 1914.

[13] DEKEYNE A, BROCCO M, LOISEAU F, *et al*. S32212, a novel serotonin type 2C receptor inverse agonist/α_2-adrenoceptor antagonist and potential antidepressant: II. a behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 340(3): 765 - 780.

[14] EAST SP, SILVER LL. Multitarget ligands in antibacterial research: progress and opportunities[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8(2): 143 - 156.

[15] TAO L, ZHU F, XU F, *et al*. Co-targeting cancer drug escape

pathways confers clinical advantage for multi-target anticancer drugs[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 102: 123 - 131.

[16] DRAG-ZALESINSKA M, KULBACKA J, SACZKO J, *et al*. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(16): 4814 - 4817.

[17] MCCONATHY J, YU WP, JARKAS N, *et al*. Radiohalogenated nonnatural amino acids as PET and SPECT tumor imaging agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4): 868 - 905.

[18] SUN YW, JIANG J, ZHANG ZJ, *et al*. Antioxidative and thrombolytic TMP nitrone for treatment of ischemic stroke[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(19): 8868 - 8874.

[19] DONG YX, ZHANG XH, LIU MJ, *et al*. Hybrid molecules of scutellarein and tertramethylpyrazine's active metabolites for ischemic stroke[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(19): 126608.

[20] DONG YX, DONG L, CHEN JL, *et al*. Synthesis and biological evaluation of N-alkyl-1, 4-dihydroquinoline prodrugs of scutellarin methyl ester as neuroprotective agents[J]. *Med Chem Res*, 2018, 27(4): 1111 - 1121.

[21] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 05 - 28