·实验研究·

1-苯甲酰基-4-(4-氯苄基)哌嗪衍生物的设计、合成以及抗炎活性研究

王宏伟[1,2],刘万冬[1,2],李家明[1,2],金　凡[1,2],钱诗虎[1,2]
(1 安徽中医药大学药学院,合肥 230012;2 安徽省中医药科学院药物化学研究所,合肥 230012)

[摘要] **目的**:以1-苯甲酰基-4-(4-氯苄基)哌嗪为先导化合物,经进一步的结构优化,期望获得一类抗炎活性更好的多靶点抑制剂。**方法**:以取代苯甲酸为起始原料,经取代、酰化反应合成18个目标化合物。测定所有化合物对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导RAW264.7细胞分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α和白细胞介素(interleukin, IL)-6的抑制作用,并对活性较好的化合物进行分子对接。**结果**:所有化合物均经^{1}H NMR,^{13}C NMR,HRMS确定其结构,化合物**3d**,**8k**对TNF-α的分泌具有较好的抑制活性,化合物**3b**,**3d**对IL-6的分泌具有较好的抑制活性。**结论**:化合物**3d**对LPS诱导RAW264.7细胞分泌TNF-α和IL-6具有较好的抑制活性,有进一步研究的价值。

[关键词] 多靶点抑制剂;抗炎;TNF-α;IL-6
[中图分类号] R914　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)06-0554-08

Design, synthesis and anti-inflammatory activity research of 1-benzoyl-4-(phenoxyacetyl) piperazine derivatives

WANG Hong-wei[1,2], LIU Wan-dong[1,2], LI Jia-ming[1,2], JIN Fan[1,2], QIAN Shi-hu[1,2]
(1 *College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei* 230012, *China*;2 *Department of Medicinal Chemistry, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei* 230012, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To obtain a series of multi-target inhibitors with better anti-inflammatory activity by using 1-benzoyl-4-(phenoxyacetyl) piperazine as the lead compound followed by further structure optimization. **Methods**: Substituted benzoic acid was used as a starting material, and 18 target compounds were synthesized through substitution and acylation reactions. The inhibitory effects of all compounds on lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-6 secretion in RAW264.7 cells were measured, and molecular docking was performed on the compounds with better anti-inflammatory activity. **Results**: The structures of all the compounds were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. Compounds **3d** and **8k** demonstrated better inhibitory activity on TNF-α secretion, and compounds **3b** and **3d** showed better inhibitory activity on IL-6 secretion. **Conclusion**: Compound **3d** has good inhibitory activity on TNF-α and IL-6 secretion in RAW264.7 cells induced by LPS, and is worthy of further study.

[**Key words**] multi-target inhibitors; anti-inflammation; TNF-α; IL-6

炎症是机体应对感染、组织损伤等外界刺激而引发的保护反应,通过清除损伤因子、修复受损组织来维持内环境的稳态[1]。然而,长期、不可控制的炎症反应却是导致诸多慢性炎性疾病发病以及进一步恶化的主要因素[2]。目前,各类慢性炎性疾病已经超过3 000多种,涉及到免疫炎性疾病[3]、心血管

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(1508085MB3)
[作者简介] 王宏伟,男,研究生,主要从事药物化学设计与合成研究。E-mail: 18119629721@163.com。
[通讯作者] 李家明,男,博士,教授,博士生导师,主要从事药物化学设计与合成研究。联系电话:(0551)68129147,E-mail: lijiaming2017@sina.com。

疾病[4]、癌症[5]等慢性疾病。临床上针对慢性炎性疾病的治疗药物主要有非甾体抗炎药、糖皮质激素、磷酸二酯酶 4 抑制剂等，由于存在心血管及消化道出血、引起肾上腺皮质功能衰退等诸多不可避免的不良反应[6]，使得现有药物无法满足慢性炎性疾病患者长期服药的需求。

目前，临床使用以及在开发的抗炎药物多数都是基于单一靶点的抑制达到抗炎目的，而炎症的引发与消退均涉及诸多靶点以及信号通路[7]。此外，单一靶点的过度抑制也是引发不良反应的主要因素[8]。因此，是否能够根据单一靶点设计出耐受性好且有效的抗炎药物是存在质疑的。药物联合使用是临床上针对慢性炎性疾病的主要治疗方式，通过药物联合使用可以实现对多条与疾病相关的信号通路或靶点进行调控，以达到获得治疗目的的同时避免单一靶点过度抑制导致的不良反应[9]。考虑到药物联合使用可能存在的药物相互作用引发的不良反应，开发出一类具有多靶点抑制活性的抗炎药物，对慢性炎性疾病的治疗具有重要意义[10]。

本课题组前期研究发现，1-苯甲酰基-4-(4-氯苄基)哌嗪(化合物 **1**，见图 1)能够同时抑制核因子 κB(nuclear factor kappa-B，NF-κB)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase，MAPK)信号通路的上游靶点、p38αMAPK 以及环氧合酶-2(cyclooxygenase-2，COX-2)，是一个具有抗炎活性的多靶点抑制剂[11]。另外，依据 Babu 等[12]的研究在化合物 **2** 的哌嗪环上添加 2 个甲基形成化合物 **3**，可以将化合物对 p38α MAPK 的抑制活性提高 10 倍(见图 1)。初步的分子模拟试验结果表明，与化合物 **2** 相比，化合物 **3** 除了酰胺键与铰链区的氨基酸残基 Met-109，Gly-110 形成关键的氢键作用之外，哌嗪基上的 2 个甲基分别与氨基酸残基 Ile-84，Ala-157，Leu-167 形成烷基-烷基相互作用，有助于小分子与蛋白的结合(见图 2)。基于化合物 **1** 与化合物 **2** 的结构极为相似，在化合物 **1** 的哌嗪基团上引入甲基后是否能够提高对 p38α MAPK 的抑制活性？我们对此十分感兴趣。同时，我们还考察了在苯酰胺片段上引入不同电负性取代基后对化合物活性的影响。因此，本研究以化合物 **1** 为先导化合物，依据上述思路(见图 3)设计合成了 18 新型化合物，通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用，对所有化合物的抗炎活性进行初筛，并采用分子对接试验说明抗炎活性最好的化合物在 p38α MAPK 活性位点的对接方式。

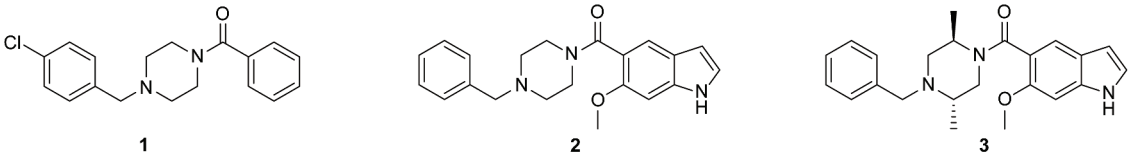
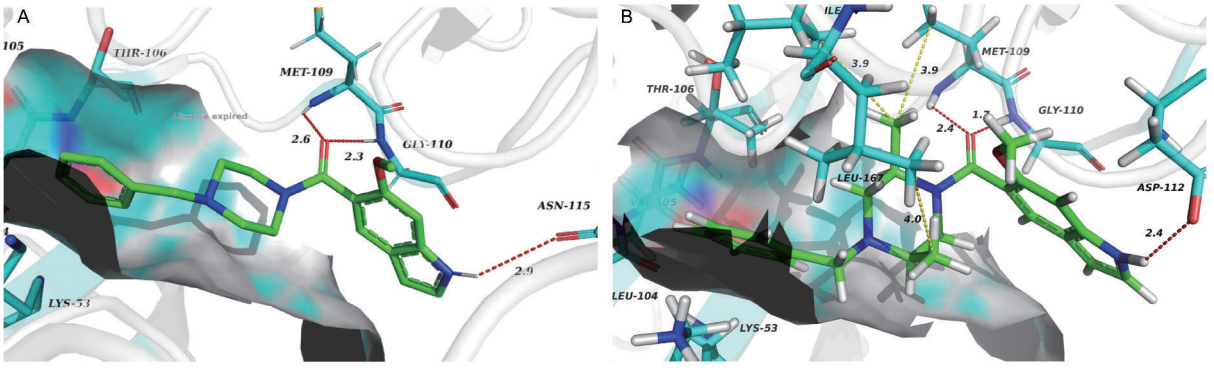


图 1 化合物结构式以及生物活性



红色虚线：氢键相互作用；黄色虚线：烷基-烷基相互作用

图 2 化合物 **2** 和 **3** 与 p38α MAPK 活性位点的结合方式

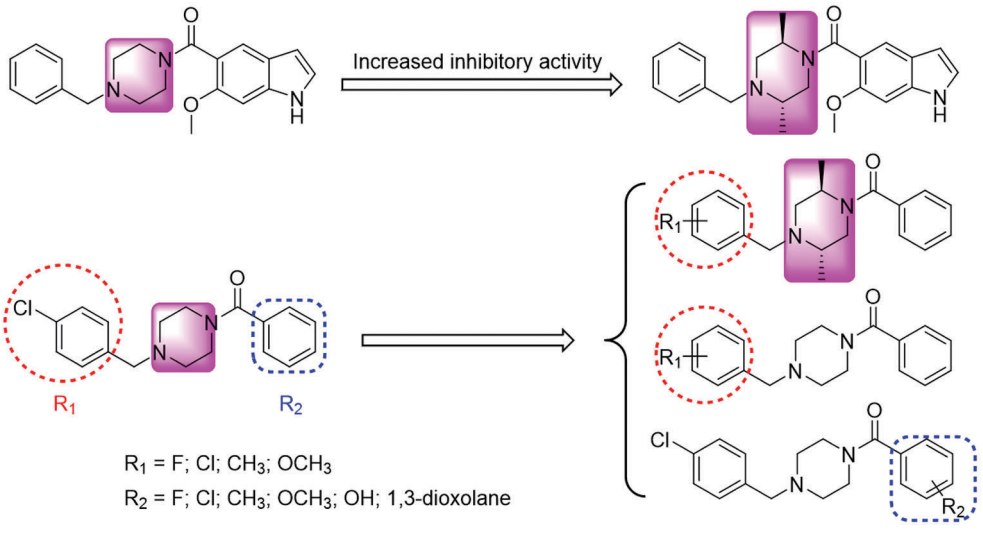


图 3 目标化合物的设计思路

材料与方法

1 细胞和试剂

RAW264.7 cell line(小鼠单核巨噬细胞株,RAW264.7,ATCC,Rockville 公司);IL-6 ELISA 试剂盒、TNF-α ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 酶联免疫吸附测定试剂盒、小鼠 TNF-α 酶联免疫吸附测定试剂盒、IL-6 ELISA kit、TNF-α ELISA kit(BOSTER Biological Technology 公司);胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、RPMI1640 培养基(GIBCO,Invitrogen Corporation 公司);青霉素、链霉素(Sigma 公司);胰蛋白酶(Gibco 公司)。所有化学试剂均购自麦克林公司,分析纯。

2 仪器

Bruker-Avance 400 Ⅱ光谱仪(溶剂 DMSO-d_6,0.3% TMS 为内标,德国布鲁克公司);WRS－1B 显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);LB941 微孔板式多功能酶标仪(Berthold 公司);FORMA 700 超低温冰箱(Thermo 公司);Direct-Q with pump 超纯水仪(Millopore 公司);SW-CJ-2FD 超净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

3 目标化合物的合成

目标化合物的合成如图 4 所示。在 100 mL 圆底烧瓶中,将苯甲酸(0.61 g,5.00 mmol)溶于 30 mL 的二氯甲烷中,并加入 3 滴的 *N*,*N*-二甲基甲酰胺溶液,氮气保护下,在 0 ℃搅拌;将 0.95 g 草酰氯用 10 mL 二氯甲烷稀释后,缓慢滴加进反应液中,继续搅拌 2 h,薄层色谱(thin layer chromatography,TLC)检测[*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯) = 1∶1 为展开剂],反应完全后,浓缩反应液,用二氯甲烷反复清洗,除尽溶液中的盐酸,得中间体。

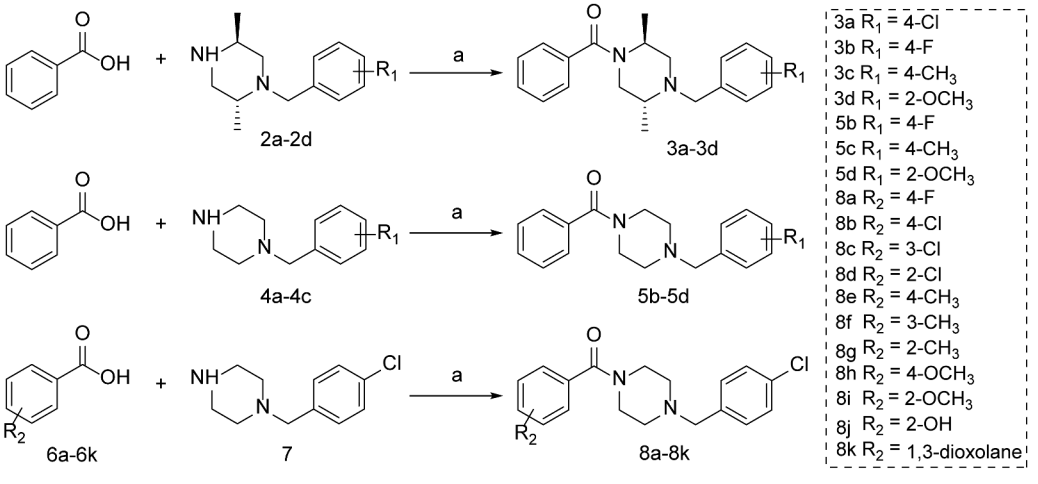


图 4 化合物的合成路线:合成路线 1(Scheme 1)

将前一步得到的中间体溶于 30 mL 的二氯甲烷中,在氮气保护下,冰浴环境中,缓慢加入化合物 **2a**(1.12 g,5.00 mmol)与三乙胺(0.76 g,7.50 mmol)混合溶液中,滴加完毕,移至室温下反应 3 h 后,TLC 检测[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=3∶1为展开剂]反应完全后,用水淬灭,分别用 30 mL 二氯甲烷洗涤 3 次,合并有机相,用饱和食盐水洗涤 3 次,有机相干燥,浓缩,柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=2∶1为洗脱剂]纯化,得白色粉末 **3a**。

目标化合物 **3b**~**3d**,**5b**~**5d**,**8a**~**8k** 的合成参考化合物 **3a** 的合成方法。

(4-(4-氯苄基)-2,5-二甲基哌嗪-1-基)(苯基)甲酮(**3a**):白色粉末;产率:64%;m. p. 131.2~131.9 ℃。^{1}H NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.47~7.42(m, 3H,Ar-H), 7.38(s, 4H, Ar-H), 7.36~7.31(m, 2H, Ar-H), 3.62 (s, 2H, CH_2), 3.46~3.34(m, 4H, piperazine-H), 2.67 (dd, J=11.8, 4.0 Hz, 1H, piperazine-H), 2.18(d, J=11.7 Hz, 1H, piperazine-H), 1.26 (d, J=6.7 Hz, 3H, CH_3), 0.94 (d, J=6.4 Hz, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 170.31,138.64,137.17,131.77,130.48, 129.59, 128.95, 128.67, 126.78, 57.52, 52.15, 48.76,16.78,7.63。HRMS Calcd for $C_{20}H_{23}ClN_2O$ $[M+H]^+$: 343.1572, found 343.1575。

(4-(4-氟苄基)-2,5-二甲基哌嗪-1-基)(苯基)甲酮(**3b**):白色粉末;产率:59%;m. p. 117.8~119.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.44 (dd, J=4.7, 1.6 Hz, 3H, Ar-H), 7.38 (dd, J=8.2, 5.9 Hz, 2H, Ar-H),7.36~7.32(m,2H,Ar-H),7.14 (t, J=8.7 Hz, 2H, Ar-H), 3.61 (s, 2H, CH_2), 3.43 (m, 4H, piperazine-H), 2.66 (dd, J=11.8, 4.0 Hz, 1H, piperazine-H), 2.19 (d, J=11.7 Hz, 1H, piperazine-H), 1.25 (d, J=6.8 Hz, 3H, CH_3),0.93(d,J=6.4 Hz,3H,CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 170.31, 162.87, 160.46, 137.19,135.63,135.60,130.50,130.42,129.59, 128.95,126.78, 115.51, 115.30, 57.47, 52.06, 48.72, 16.79, 7.58。HRMS Calcd for $C_{20}H_{23}FN_2O$ $[M+H]^+$: 327.1867, found 327.1865。

(2,5-二甲基-4-(4-甲基苄基)哌嗪-1-基)(苯基)甲酮(**3c**):白色粉末;产率:42%;m. p. 104.1~105.9 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d_6) δ 7.44(dd, J=4.2,2.2 Hz,3H,Ar-H),7.33(dd,J=5.3,2.0 Hz, 2H,Ar-H),7.23(d, J=7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.13 (d, J=7.5 Hz, 2H, Ar-H), 3.57 (s, 2H, CH_2), 3.43 (m, 4H, piperazine-H), 2.66 (dd, J=11.8, 4.0 Hz,1H,piperazine-H),2.65(dd,J=11.7,3.8 Hz, 1H,piperazine-H),2.28(s,3H,CH_3),2.20(d,J=11.7 Hz,1H, piperazine-H), 1.25 (d, J=6.6 Hz, 3H,CH_3),0.92(d,J=6.2 Hz,3H,CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz,DMSO-d_6) δ 170.28, 137.22, 136.35, 136.32,129.57,129.29,128.95,128.67,126.78, 58.10,51.99,48.76,16.85,7.48。HRMS Calcd for $C_{21}H_{26}N_2O$ $[M+H]^+$: 323.2118, found 323.2116。

(4-(2-甲氧基苄基)-2,5-二甲基哌嗪-1-基)(苯基)甲酮(**3d**):白色粉末;产率:45%;m. p. 74.1~76.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.44 (dd, J=6.8, 4.9 Hz, 4H, Ar-H), 7.38~7.27 (m, 2H, Ar-H), 7.21 (dd, J=11.2, 4.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.94 (dd, J=14.2, 7.6 Hz, 2H,Ar-H), 3.77(s,3H,CH_3),3.51(s,2H,CH_2),3.43(m,4H, piperazine-H), 2.69 (dd, J=11.8, 4.0 Hz, 1H, piperazine-H), 2.25(d,J=11.6 Hz,1H,piperazine-H),1.29(d,J=6.7 Hz,3H,CH_3), 0.95 (d, J=6.3 Hz, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 170.29,157.70,137.23,129.56,129.08,128.94, 128.15, 127.11, 126.78, 120.69, 111.21, 55.79, 52.37,51.77,49.09,16.88,7.88。HRMS Calcd for $C_{21}H_{26}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 339.2067, found 339.2066。

(4-(4-氟苄基)哌嗪-1-基)(苯基)甲酮(**5b**):白色粉末;产率:48%;m. p. 71.2~73.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.46~7.43 (m, 3H, Ar-H),7.36(m,J=12.7,6.9,3.9 Hz,4H,Ar-H),7.15 (t,J=8.8 Hz,2H,Ar-H),3.62(s,2H,CH_2),3.49 (s,4H,piperazine-H),2.38(s,4H,piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.37, 163.00, 160.59,136.40,134.44,134.41,131.24,131.16, 129.94,128.87,127.35,115.50,115.29,61.36, 53.10,47.63,42.02。HRMS Calcd for $C_{18}H_{19}FN_2O$ $[M+H]^+$: 299.1554, found 299.1556。

(4-(4-甲基苄基)哌嗪-1-基(苯基)甲酮(**5c**):白色粉末;产率:50%;m.p.67.2~69.8 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.43 (dd, J=5.0, 1.6 Hz, 3H, Ar-H),7.36(dd,J=6.5,3.1 Hz,2H,Ar-H), 7.18(d,J=7.9 Hz,2H,Ar-H),7.12(d,J=7.9 Hz, 2H,Ar-H),3.61(s,2H,CH_2), 3.45 (s, 4H, pipera-

zine-H), 2.36 (s, 4H, piperazine-H), 2.28 (s, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.36, 136.54, 136.42, 135.14, 129.93, 129.36, 129.25, 128.87, 127.35, 62.07, 53.19, 52.73, 47.63, 42.02。HRMS Calcd for $C_{19}H_{22}N_2O$ [M + H]$^+$: 295.180 5, found 295.180 1。

(4-(2-甲氧基苄基)哌嗪-1-基(苯基)甲酮(**5d**):白色粉末;产率:64%;m. p. 84.2 ~ 86.2 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.45 (dd, J = 4.1, 2.1 Hz, 3H, Ar-H), 7.39 ~ 7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.32 (d, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.99 ~ 6.90 (m, 2H, Ar-H), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.63 (s, 2H, CH_2), 3.51 (s, 4H, piperazine-H), 2.43 (s, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.35, 157.87, 136.45, 131.98, 130.43, 129.91, 128.86, 128.64, 127.36, 125.79, 120.57, 111.30, 55.79, 55.74, 53.30, 47.74, 42.09。HRMS Calcd for $C_{19}H_{22}N_2O_2$ [M + H]$^+$: 311.175 4, found 311.174 9。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(4-氟苯基)甲酮(**8a**):白色粉末;产率:46%;m. p. 114.3 ~ 116.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.46 (dd, J = 10.0, 3.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.41 ~ 7.37 (m, 2H, Ar-H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.31 ~ 7.24 (m, 2H, Ar-H), 3.59 (s, 2H, CH_2), 3.50 (s, 4H, piperazine-H), 2.38 (s, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 168.49, 164.21, 161.76, 137.37, 132.76, 132.72, 132.05, 131.11, 130.04, 129.95, 128.66, 115.94, 115.72, 61.33, 52.87, 52.77, 47.74, 42.20。HRMS Calcd for $C_{18}H_{18}ClFN_2O$ [M + H]$^+$: 333.116 4, found 333.116 7。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(4-氯苯基)甲酮(**8b**):白色粉末;产率:53%;m. p. 71.2 ~ 73.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.43 ~ 7.37 (m, 4H, Ar-H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 3.61 (s, 2, CH_2), 3.50 (s, 4H, piperazine-H), 2.38 (s, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 168.32, 137.37, 135.13, 134.64, 132.04, 131.12, 129.42, 128.98, 128.66, 61.32, 53.05, 47.57, 42.08。HRMS Calcd for $C_{18}H_{18}Cl_2N_2O$ [M + H]$^+$: 349.086 9, found 349.086 4。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(3-氯苯基)甲酮(**8c**):白色粉末;产率:47%;m. p. 218.9 ~ 220.2 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.60 ~ 7.54 (m, 4H, Ar-H), 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (dd, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 4.50 (s, 2H, piperazine-H), 4.33 (s, 2H, piperazine-H), 3.60 (s, 2H, CH_2), 3.11 (s, 2H, piperazine-H), 2.68 (s, 2H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 168.08, 137.37, 134.87, 133.92, 133.75, 131.04, 130.36, 129.23, 128.88, 127.37, 126.14, 61.42, 58.26, 50.51, 44.22, 42.18。HRMS Calcd for $C_{18}H_{18}Cl_2N_2O$ [M + H]$^+$: 349.086 9, found 349.086 5。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(2-氯苯基)甲酮(**8d**):白色粉末;产率:43%;m. p. 184.5 ~ 185.9 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 ~ 7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.45 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.42 (dd, J = 8.9, 4.9 Hz, 2H, Ar-H), 7.38 ~ 7.35 (m, 2H, Ar-H), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 3.65 (s, 2H, CH_2), 3.52 ~ 3.50 (m, 2H, piperazine-H), 3.17 ~ 3.09 (m, 2H, piperazine-H), 2.43 ~ 2.40 (m, piperazine-H), 2.37 ~ 2.27 (m, 2H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 165.91, 137.36, 136.23, 132.05, 131.11, 130.94, 129.87, 129.58, 128.66, 128.37, 128.06, 61.30, 53.05, 52.45, 46.71, 41.55。HRMS Calcd for $C_{18}H_{18}Cl_2N_2O$ [M + H]$^+$: 349.086 9, found 349.086 5。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(4-甲基苯基)甲酮(**8e**):白色粉末;产率:49%;m. p. 87.8 ~ 90.2 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.40 ~ 7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.25 (q, J = 8.2 Hz, 4H, Ar-H), 3.60 (s, 2H, CH_2), 3.49 ~ 3.40 (m, 4H, piperazine-H), 2.37 ~ 2.34 (m, 4H, piperazine-H), 2.33 (s, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.50, 139.62, 137.40, 133.44, 132.03, 131.11, 129.33, 128.66, 127.51, 61.36, 52.90, 47.70, 42.25, 21.36。HRMS Calcd for $C_{19}H_{21}ClN_2O$ [M + H]$^+$: 329.141 5, found 329.141 7。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(3-甲基苯基)甲酮(**8f**):白色粉末;产率:51%;m. p. 71.4 ~ 73.0 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.39 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.37 ~ 7.31 (m, 3H, Ar-H), 7.26 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.19 ~ 7.13 (m, 2H, Ar-H), 3.61 (s, 2H, CH_2), 3.55 ~ 3.41 (m, 4H, piperazine-H), 2.34 (s, 4H, piperazine-H), 2.33 (s, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.48, 138.26,

137.39,136.39,132.04,131.11,130.51,128.70,128.65,127.84,124.35,61.36,52.74,47.65,41.99,21.35。HRMS Calcd for $C_{19}H_{21}ClN_2O$ [M+H]$^+$: 329.1415, found 329.1413。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(2-甲基苯基)甲酮(**8g**):白色粉末;产率:48%;m.p. 87.5~89.2 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.40~7.37 (m, 2H, Ar-H),7.33 (dd, J=8.3,1.4 Hz,2H,Ar-H),7.30~7.20(m,3H,Ar-H), 7.13 (d, J=7.4 Hz, 1H,Ar-H),3.66(s,2H,CH_2),3.49~3.45(m,2H, piperazine-H), 3.15~3.11 (m, 2H, piperazine-H), 2.44~2.40(m,2H,piperazine-H),2.31~2.98(m, 2H, piperazine-H), 2.21 (s, 3H, CH_3)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 168.90, 137.39, 136.83, 134.08,132.04,131.10,130.62,129.05,128.65, 126.25,126.09,61.34,53.30,52.69,46.73,41.34, 19.07。HRMS Calcd for $C_{19}H_{21}ClN_2O$ [M+H]$^+$: 329.1415, found 329.1412。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(4-甲氧基苯基)甲酮(**8h**):白色粉末;产率:52%;m.p. 146.4~147.7 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d_6) δ 7.38(d,J=8.4 Hz, 2H,Ar-H),7.34(dd,J=8.1,4.9 Hz,4H,Ar-H), 6.97(d,J=8.5 Hz,2H,Ar-H),3.78(s,3H,CH_3), 3.57(s,2H,CH_2),3.49(s,4H,piperazine-H),2.39~2.35 (m, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 169.33, 160.64, 137.41, 132.03, 131.13, 129.48, 128.66, 128.28, 114.10, 61.37, 55.71, 52.95, 46.73, 41.34。HRMS Calcd for $C_{19}H_{21}ClN_2O_2$[M+H]$^+$: 345.1364, found 345.1367。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(2-甲氧基苯基)甲酮(**8i**):白色粉末;产率:46%;m.p. 209.5~211.4 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d_6) δ 7.60(d,J=42.2 Hz, 4H,Ar-H),7.43(t,J=7.7 Hz,1H,Ar-H),7.24(s, 1H,Ar-H),7.10(d,J=8.4 Hz,1H,Ar-H),7.02(t, J=6.6 Hz,1H,Ar-H),4.47(s,3H,CH_3),3.80(s, 2H,CH_2),3.49~3.47(m,2H,piperazine-H),3.31~2.84(m,4H,piperazine-H),2.53~2.48(m,2H, piperazine-H)。^{13}C NMR(100 MHz,DMSO-d_6) δ 166.92, 155.40,134.86,133.94,131.38,129.22,128.93, 128.43,124.78,121.23,111.90,58.17,55.96, 51.22,50.68,43.56,43.11。HRMS Calcd for $C_{19}H_{21}ClN_2O_2$[M+H]$^+$: 345.1364, found 345.1361。

(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)(2-羟基苯基)甲酮(**8j**):白色粉末;产率:47%;m.p. 180.6~182.1 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,DMSO-d_6) δ 9.74(s,1H,OH), 7.39~7.31(m, 4H, Ar-H), 7.20 (t, J=7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.08 (d, J=7.5 Hz, 1H, Ar-H), 6.83 (dd, J=14.9, 7.7 Hz, 2H, Ar-H), 3.64 (s, 2H, CH_3), 3.45~3.43 (m, 4H, piperazine-H), 2.35~2.31 (m, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 167.43,153.71,137.41,132.01,131.12, 130.54,128.64,128.53,124.38,119.52,116.10, 61.41,52.94,50.68,43.76,43.41。HRMS Calcd for $C_{18}H_{19}ClN_2O_2$[M+H]$^+$: 331.1208, found 331.1211。

苯并[*d*][1,3]二氧杂-5-基(4-(4-氯苄基)哌嗪-1-基)甲酮(**8k**):白色粉末;产率:43%;m.p. 106.3~107.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.36 (dd, J=20.5, 8.4 Hz, 4H, Ar-H), 6.92 (q, J=7.9 Hz,3H,Ar-H),6.06(s,2H,CH_2),3.49(s, 4H,CH_2),2.49~2.47(m, 2H, piperazine-H),2.39~2.35 (m, 4H, piperazine-H)。^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 168.87,148.66,147.58,137.41,132.02, 131.12,129.95,128.65,121.83,108.56,108.17, 101.88,61.35,52.89,50.68,43.36,43.11。HRMS Calcd for $C_{19}H_{19}ClN_2O_3$[M+H]$^+$: 359.1157, found 359.1161。

4 生物活性

使用含相同浓度待测化合物(10 μmol·L^{-1})的培养基孵育 RAW264.7 细胞 2 h 后,更换为含 LPS (200 ng·mL^{-1})培养基孵育 RAW264.7 细胞 8 h。将对数生长期 RAW264.7 细胞以 1×10^5 cells·孔$^{-1}$接种于96孔板,置于37 ℃,5% CO_2 条件下培养,直至细胞90%融合后,用无血清的 RPMI-1640 培养基孵育 2 h 使细胞同步化。随后弃去上清,分别加入浓度为(10 μmol·L^{-1})的新合成化合物孵育 RAW264.7 细胞 2 h 后,将培养基更换为含 LPS(200 ng·mL^{-1})的培养基继续孵育 8 h。孵育结束后,收集细胞上清液,-80 ℃冻存备用。空白对照组:等体积正常培养基孵育 RAW264.7 细胞 10 h。LPS 对照组:使用正常培养基孵育 RAW264.7 细胞 2 h 后,更换为含 LPS(200 ng·mL^{-1})培养基孵育 RAW264.7 细胞 8 h。分别根据 ELISA 试剂盒说明书细胞上清液中 THF-α 和 IL-6 水平。每个试验重复 5 次。抑制率/% =(对照组值-实验组值)/对照组值×100%,结果见表 1 和图 5。

表 1 目标化合物对 TNF-α 和 IL-6 的抑制活性

化合物	抑制率/%		化合物	抑制率/%	
	THF-α	IL-6		THF-α	IL-6
1	40.72 ± 3.72	44.92 ± 3.22	**8c**	9.74 ± 0.92	6.33 ± 0.66
3a	8.45 ± 1.03	4.01 ± 0.31	**8d**	7.45 ± 0.4	8.57 ± 0.17
3b	24.22 ± 2.68	36.93 ± 2.72	**8e**	17.73 ± 0.51	9.94 ± 0.96
3c	16.11 ± 0.51	21.36 ± 1.9	**8f**	15.49 ± 0.54	8.81 ± 0.35
3d	39.7 ± 1.4	42.45 ± 3.68	**8g**	18.59 ± 1.07	28.05 ± 2.17
5b	25.82 ± 0.53	12.59 ± 0.65	**8h**	8.57 ± 0.3	8.53 ± 1.26
5c	13.17 ± 0.88	21.86 ± 1.35	**8i**	9.75 ± 0.37	10.54 ± 1.03
5d	6.8 ± 0.57	4.6 ± 0.33	**8j**	37.9 ± 1.41	29.85 ± 1.13
8a	12.51 ± 0.73	6.29 ± 0.23	**8k**	13.24 ± 0.54	18.07 ± 1.32
8b	21.16 ± 1.33	24.3 ± 0.97			

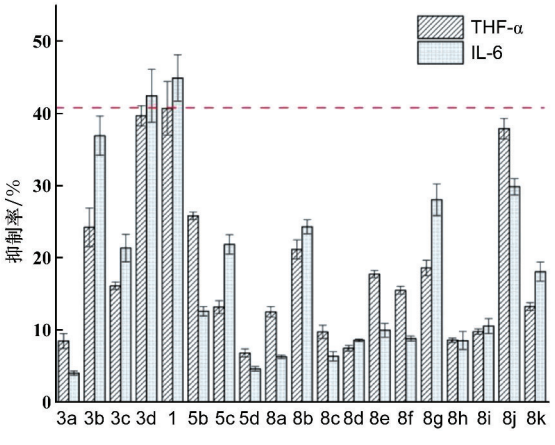
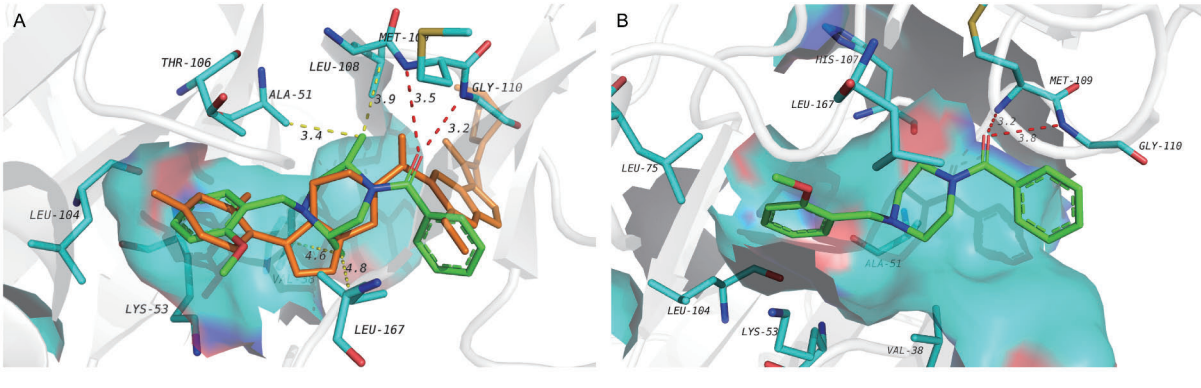


图 5 目标化合物对 THF-α 和 IL-6 抑制活性

采用化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用，评价其抗炎活性。以先导化合物 **1** 作为阳性对照，测定化合物在 10 μmol·L^{-1}浓度下对 TNF-α 和 IL-6 的抑制率。结果表明，所有化合物的抗炎活性都低于先导化合物，仅有化合物 **3d** 表现出与 **1** 相近的 TNF-α 和 IL-6 抑制活性。

5 分子对接试验

采用对接软件 Autodock 4.2 探究化合物 **3d** 和 **5d** 在 p38α MAPK 活性位点的对接方式。在 PDB 数据库中下载相应酶的蛋白结构：p38α MAPK（PDB code：2QD9）[13]。采用对接软件对蛋白晶体进行处理，以共晶体中的配体定义对接位点，对接方盒的边长设置 40 Å，选择 Genetic Algorithm 算法，设置运算次数为 100，其他参数保持默认。采用 PyMOL 绘制对接结果，结果见图 6。



A：化合物 **3d** 与 p38α MAPK 活性位点的结合方式；B：化合物 **5d** 与 p38α MAPK 活性位点的结合方式；
橘红色分子：共晶体中包含的配体；红色虚线：氢键相互作用；黄色虚线：烷基-烷基相互作用

图 6 化合物 **3d**，**5d** 与 p38α MAPK 活性位点的结合方式

对接结果表明，化合物 **3d** 和 **5d** 能够与共晶体中配体相似的对接方式与 p38α MAPK 活性位点结合，邻甲氧基苄基片段可以进入由 Lys-53，Leu-104，Thr-106 等氨基酸残基组成的疏水口袋；其酰胺键也

能够与铰链区的氨基酸残基 Met-109，Gly-110 形成关键的氢键作用。此外，化合物 **3d** 的哌嗪基上的甲基还会和氨基酸残基 Ala-51，Leu-108，Leu-167 形成烷基-烷基相互作用（见图 5A）。

讨　论

相比较化合物 **3b** 与 **5b**，**3c** 与 **5c**，**3d** 与 **5d** 这 3 组化合物的 THF-α 和 IL-6 抑制活性，可以说明在哌嗪上引入甲基确实能够提升化合物的抗炎活性；对接结果显示，哌嗪环上的甲基能与 Ala-51，Leu-108 等残基形成烷基-烷基相互作用，有助于化合物与活性位点的结合。但是，这一规律却不适用于苄基位上对氯类化合物。由此说明，在多数情况下哌嗪上引入甲基可以提高化合物的抗炎活性。比较化合物 **1** 与 **8a** ~ **k** 的 THF-α 和 IL-6 抑制活性，可以说明无论在苯酰胺片段上引入给电子基团还是吸电子基团，都会降低化合物的抗炎活性。综上所述，在哌嗪环上的甲基有助于化合物与 p38α MAPK 活性位点的结合，这提示哌嗪上引入甲基对提高化合物的抗炎活性具有一定的参考价值。

[参 考 文 献]

[1] SCHULTZE JL, CONSORTIUM S, ROSENSTIEL P. Systems medicine in chronic inflammatory diseases[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 608 - 613.

[2] MAZARAKIS N, SNIBSON K, LICCIARDI PV, *et al*. The potential use of l-sulforaphane for the treatment of chronic inflammatory diseases: a review of the clinical evidence[J]. *Clin Nutr Edinb Scotl*, 2020, 39(3): 664 - 675.

[3] LI X, LEONARDI I, ILIEV ID. Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1365 - 1379.

[4] NDREPEPA G. Myeloperoxidase: a bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease[J]. *Clin Chimica Acta*, 2019, 493: 36 - 51.

[5] KAY JE, THADHANI E, SAMSON LD, *et al*. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer[J]. *DNA Repair*, 2019, 83: 102673.

[6] 白东鲁，陈凯先. 高等药物化学[M]. 北京：化学工业出版社，2011：612 - 614.

[7] LÖTSCH J, GEISSLINGER G. Low-dose drug combinations along molecular pathways could maximize therapeutic effectiveness while minimizing collateral adverse effects[J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16(23 - 24): 1001 - 1006.

[8] MA XD, LV X, ZHANG JK. Exploiting polypharmacology for improving therapeutic outcome of kinase inhibitors (KIs): an update of recent medicinal chemistry efforts[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 449 - 463.

[9] BOLOGNESI ML. Harnessing polypharmacology with medicinal chemistry[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10(3): 273 - 275.

[10] SCHIERLE S, FLAUAUS C, HEITEL P, *et al*. Boosting anti-inflammatory potency of zafirlukast by designed polypharmacology [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(13): 5758 - 5764.

[11] LIU WD, HOU CY, LI JM, *et al*. Discovery of talmapimod analogues as polypharmacological anti-inflammatory agents[J]. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2020, 35(1): 187 - 198.

[12] MAVUNKEL BJ, CHAKRAVARTY S, PERUMATTAM JJ, *et al*. Indole-based heterocyclic inhibitors of p38α MAP kinase: designing a conformationally restricted analogue[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(18): 3087 - 3090.

[13] MURALI DHAR TG, WROBLESKI ST, LIN SQ, *et al*. Synthesis and SAR of p38α MAP kinase inhibitors based on heterobicyclic scaffolds[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(18): 5019 - 5024.

编辑：赵文锐/接受日期：2020 - 05 - 18