

硕 士 学 位 论 文

**N-苄基-2 羟基水杨酰胺的合成及其**

**题** 目 **抗炎活性的研究**

**英文题目**

Synthesis of N-benzyl-hydroxybenzamide and Its anti-inflammatory effects study

姓 名 卢武林 学 号 11020158

所在学院 医 学 院 导师姓名 罗文鸿 教授

专 业 药 物 化 学

入学日期 2010 年 9 月 答辩日期 2013 年 5 月

学位论文原创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的工作研究及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

作者签名： 日期： 年 月 日

学位论文使用授权声明

本人授权汕头大学保存本学位论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅；学校可将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存和汇编论文；学校可以向国家有关部门或机构送交论文并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密的论文，按照保密的有关规定和程序处理。

作者签名： 导师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

摘 **要**

炎症是机体组织对内外环境有害刺激所产生的一种复杂的病理生理反应，也是引起人体多种重要疾病的共同通路。当前研究表明，许多疾病如心脑血管病、肿瘤、老年痴呆和神经退行性疾病、变态反应疾病等的发病过程均与炎症有关。因此，寻找开发高效、副作用小的抗炎药物已经成为药物化学领域重要的课题。

水杨酸作为较原始的抗炎药物，因为毒副作用较大而被开发成各种衍生物，苯甲胺作为氨基脲敏感型胺氧化酶底物，其本身及衍生物具有抗炎作用。苯甲酰胺类化合物具有抗炎、抗氧化、抗变态反应等广泛的生理活性。本课题将阿司匹林经氯化亚砜酰氯化，再与苯甲胺酰胺化合成 N-苄基-2-羟基水杨酰胺，合成产物经核磁共振 (NMR)、质谱 (MS) 和红外 (IR) 进行结构确认。所合成化合物通过脂多糖( Lipopolysaccharide, LPS)建立小鼠系统性炎症模型验证其抗炎活性及抗氧化能力。结果显示：N-苄基-2-羟基水杨酰胺能有效抑制 脂多糖( Lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠系统性炎症介质一氧化氮（Nitric oxide，

NO）的产生和降低丙二醛（Malondialdehyde, MDA）的含量，具有抗炎作用及抗脂质过氧化的能力，且抗炎作用优于阿司匹林。

关键词： 炎症；抗炎；抗氧化；N-苄基-2-羟基水杨酰胺

**Abstract**

Inflammation is a complex patho-physiological response to harmful stimulation of organism or environment, which protects body from invasion, and is involved in many important diseases. Studies have showed that the pathogenesis of many diseases such as cardiovascular disease, cancer, Alzheimer's disease and neurodegenerative diseases, allergic diseases were associated with inflammation. Therefore, exploration of novel anti-inflammatory agents with more efficient and less side effect has become an important research issue in the field of medicinal chemistry.

Salicylic acid, as the primitive anti-inflammatory agent, has been used to develop a variety of salicylic acid derivatives in order to alleviate its side effect. It has been reported that Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) substrate benzylamine could play an anti-inflammatory role. Compounds of benzamide derivates also possess anti-inflammatory, antioxidant, and anti-allergic effects. Therefore, we synthesized a new compound—N-benzyl-2-hydroxybenzamide, which was the amidation product of salicylic acid and benzylamine, and evaluated its biological activities.

N-benzyl-2-hydroxybenzamide was synthesized by reaction of aspirin with thionyl chloride to form 2-(chlorocarbonyl) phenyl acetate, which was then condensed with benzylamine. The synthesized compound was characterized by MS, IR and 1H NMR. Its anti-inflammatory and antioxidant effects were evaluated with systemic inflammatory model induced by lipopolysaccharide (LPS). The results showed that N-benzyl-2-hydroxybenzamide treatment significantly reduced LPS-induced pro-inflammatory mediator (Nitric oxide) production and decreased the content of MDA, suggesting that N-benzyl-2-hydroxybenzamide could inhibit inflammatory response and the correlated oxidative injuries. The anti-inflammatory effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide was superior to aspirin.

**Key words:** Inflammation; Anti-inflammation; Antioxidant; N-benzyl-2-hydroxybenzamide

# 英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩略语 | 英文全称 | 中文译名 |
| min | minute | 分钟 |
| h | hour | 小时 |
| 1H-NMR | 1H-nuclear magnetic resonance | 核磁共振氢谱 |
| IR | Infrared ray | 红外光谱 |
| MS | Mass spectrometry | 质谱 |
| LPS | lipopolysaccharide | 脂多糖 |
| DMF | dimethylformamide | 二甲基甲酰胺 |
| TEA | triethylamine | 三乙胺 |
| TLC | Thin layer chromatography | 薄层层析法 |
| NO | Nitric oxide | 一氧化氮 |
| MDA | malondialdehyde | 丙二醛 |
| T-AOC | Total antioxidant capacity | 总抗氧化能力 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DMF | dimethylformamide | 二甲基甲酰胺 |
| CMC-Na | Sodium carboxymethylcellulose | 羧甲基纤维素钠 |
| ANOVA | One-way analisis of variance | 单因素方差分析 |

目 录

[摘](#_Toc686563982)[要](#_Toc686563982) 2

**[Abstract](#_Toc686563983)** 2

[英文缩略词表](#_Toc686563984) 3

[前](#_Toc686563985)[言](#_Toc686563985) 5

[第一章](#_Toc686563986) **[N-](#_Toc686563986)**[苄基](#_Toc686563986)**[-2-](#_Toc686563986)**[羟基水杨酰胺的合成](#_Toc686563986) 6

**[1](#_Toc686563987)** [试剂与仪器](#_Toc686563987) 6

[1.1 试剂](#_Toc686563988) 6

[1.2 仪器与设备](#_Toc686563989) 7

**[2](#_Toc686563990)** [化学合成步骤](#_Toc686563990) 7

[2.1 2-氯甲酰基乙酸苯酯的合成](#_Toc686563991) 8

[2.2 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的合成](#_Toc686563992) 8

**[3](#_Toc686563993)** [结果与讨论](#_Toc686563993) 8

[3.1 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的图谱解析](#_Toc686563994) 8

[3.1.1 核磁共振氢谱解析](#_Toc686563995) 9

[3.1.2 红外图谱解析](#_Toc686563996) 9

[3.1.3 质谱图解析](#_Toc686563997) 9

[3.2 酰氯化反应](#_Toc686563998) 9

[3.2.1 酰氯化温度、时间对产率的影响](#_Toc686563999) 9

[3.2.2 投料比对产率的影响](#_Toc686564000) 10

[3.3 酰胺化反应](#_Toc686564001) 10

**[4](#_Toc686564002)** [本章小结](#_Toc686564002) 10

[第二章 药理部分](#_Toc686564003) 11

**[1](#_Toc686564004)** [材料与试剂](#_Toc686564004) 11

[1.1 试剂](#_Toc686564005) 11

[1.2 仪器与设备](#_Toc686564006) 11

[酶标仪：Thermo](#_Toc686564007) 11

[1.3 实验动物](#_Toc686564008) 11

**[2](#_Toc686564009)** [实验方法](#_Toc686564009) 11

[2.1 药理模型的建立](#_Toc686564010) 11

[2.2 血浆NO含量测定](#_Toc686564011) 11

[操作表：](#_Toc686564012) 12

[2.3 丙二醛（MDA）及总抗氧化能力（T-AOC）含量的测定](#_Toc686564013) 13

[2.3.1 血浆MDA及T-AOC含量的测定](#_Toc686564014) 13

[2.3.2 肝、脑组织中MDA及T-AOC含量的测定](#_Toc686564015) 15

[操作表同血浆MDA的测定。](#_Toc686564016) 15

[2.4 统计学处理](#_Toc686564017) 16

**[3](#_Toc686564018)** [结果](#_Toc686564018) 16

[3.1 药物对内毒素血症小鼠血浆中NO、MDA、T-AOC含量的影响](#_Toc686564019) 16

[3.2 药物对内毒素血症小鼠肝、脑组织中MDA及T-AOC含量的影响](#_Toc686564020) 17

[3.2.1 药物对内毒素血症肝组织中MDA、T-AOC含量的影响](#_Toc686564021) 17

[3.2.2 药物对内毒素血症小鼠脑组织中MDA、T-AOC含量的影响](#_Toc686564022) 18

**[4](#_Toc686564023)** [讨论](#_Toc686564023) 19

**[5](#_Toc686564024)** [结论](#_Toc686564024) 19

[参考文献](#_Toc686564025) 19

[参考文献](#_Toc686564026) 23

[附](#_Toc686564027)[录](#_Toc686564027) 25

前 **言**

非甾体类抗炎药（Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, NSAIDs）是一类具有解热、镇痛、抗炎[[1](#_bookmark23), [2](#_bookmark23)]作用的不含甾体结构的抗炎药，是目前应用最广泛的药物之一，最早应用于临床的非甾体抗炎药是水杨酸类抗炎药。1859年Kolbe等成功化学合成水杨酸。1875年Buss首先发现水杨酸有解热镇痛和抗风湿的作用，并以水杨酸钠的形式首次在临床应用于解热镇痛，后发现水杨酸刺激性强，毒副作用大，耐受性大，病人难以接受，于是开始寻找毒副作用小的水杨酸衍生物。1899年水杨酸的乙酰衍生物阿司匹林问世，临床应用证实了其解热镇痛抗炎作用，毒副作用也远低于水杨酸。

阿司匹林是不会产生药物依赖性的解热、镇痛和消炎药，被认为是通过抑制细胞环氧化酶（Cycloxygenase, COX）从而抑制前列腺素（Prostaglandin, PG）的合成发挥解热、 镇痛、抗炎、抗风湿的作用[[3](#_bookmark23)]。近几十年来阿司匹林新的治疗功能的发现及机理研究，新的作用机制及药理活性还在不断被发现。随着研究的深入，阿司匹林新的临床应用及药理活性在不断突破。最新研究发现，服用阿司匹林能降低肺癌的死亡率[[4](#_bookmark23)]，流行病学调查证实，每周至少服用阿司匹林一次，持续一年以上者能降低小细胞肺癌和非小细胞肺癌的发病率[[5](#_bookmark23)]，此外阿司匹林还能降低乳腺癌的发病率[6-7]。最近美国科研人员研发的超级阿司匹林（一氧化氮硫化氢，NOSH）能有效地抑制人体内结肠癌、胰腺癌等11种癌细胞的

生长，而且不会损害正常细胞，其抗癌效力比普通的阿司匹林强10万倍[8-9]。这些研究表明水杨酸类衍生物的研究开发及生物活性的研究仍有广泛的空间。

苯甲胺能抑制胰岛素、纤溶酶、凝血酶的作用，具有抗炎、抗凝血等作用[10-11]，但苯甲胺毒性较大对身体有害，对眼睛、粘膜、呼吸道及皮肤有强烈刺激作用，吸入后可引起咽喉、支气管的炎症、痉挛、水肿化学性肺炎、肺水肿而致死。单独使用毒性较大，应开发为前药或衍生物。

先导化合物（Lead compound）的发现是新药研发的重要一步，通过结构优化改造具有一定活性的新化学体并进行活性筛选，就有可能发现具有新型结构和特殊药理作用的新药

[12]. 在先导化合物的基础上，根据不同的目的，利用结构拼合原理、前药原理及局部修

饰等方法进行结构改造优化，就有可能找到优良的新药。

水杨酸酰胺类衍生物是在水杨酸分子中引入酰胺基形成苯甲酰胺类化合物，由于酰胺

化反应是在分子中引入酰胺基的反应过程，可用于许多具有重要药用价值的肽类激素、神经肽、毒素等的碳端酰胺化修饰，既保持了有机高分子的特性，又具有酰胺基的特性，所以对酰胺化材料的设计、合成、结构和性能研究成为近年来十分活跃的领域，而且它跨越了有机化学特别是高分子化学、生物学、材料学、医药学等学科领域[[13](#_bookmark24)]，所以该类水杨酸衍生物具有广泛的生物活性。苯甲酰胺类化合物可选择性地抑制PDE IV的活性[14]、治疗

HIV感染[15]，有较好的抗心律失常[16-18]、抗炎[19]、抗变态[14]、抗利什曼虫、抗疟疾活性[20]

作用，还具有中和拮抗肝素[21-22]的作用，能快速、彻底的对抗肝素所致的抗凝作用。

基于水杨酸衍生物具有潜在药理活性及应用价值，本课题以阿司匹林为原料，经氯化亚砜酰氯化后，再与苯甲胺酰胺化得到水杨酸的衍生物N-苄基-2-羟基水杨酰胺，并探讨其生物活性。

# **第一章** **N-**苄基**-2-**羟基水杨酰胺的合成

## **1** 试剂与仪器

### 1.1 试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 规格 | 生产公司 |
| 乙酰水杨酸 | 分析纯 | 上海晶纯实业有限公司 |
| 氯化亚砜 | 分析纯 | 上海晶纯实业有限公司 |
| 三乙胺 | 分析纯 | 上海晶纯实业有限公司 |
| 二甲基甲酰胺 | 分析纯 | 上海晶纯实业有限公司 |
| 盐酸 | 分析纯 | 汕头西陇化工 |
| 无水乙醇  无水碳酸钠 | 分析纯  分析纯 | 广州化学试剂广州化学试剂 |
| 二氯甲烷 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 无水硫酸镁 | 分析纯 | 上海晶纯实业有限公司 |
| 乙酸乙酯 | 分析纯 | 广州化学试剂厂 |
| 石油醚 | 分析纯 | 汕头西陇化工 |
| 三氯甲烷 | 分析纯 | 汕头西陇化工 |
| GF254 薄层层析硅胶板 | 厚度 0.20-0.25mm | 青岛海洋化工厂 |

### 1.2 仪器与设备

磁力搅拌器：HJ-1型，巩义市英峪予华仪器厂显微熔点测定仪：XT4型，北京科仪电光仪器厂WRS-1B数字熔点仪：上海申光仪器表有限公司薄层层析硅胶板：青岛海洋化工厂

旋转蒸发仪：RE-52AA型，上海亚荣生化仪器厂电子天平：JJ300型，江苏省常熟市双杰测试仪器厂循环水多用真空泵：SHB-3型，郑州杜甫仪器厂

三用紫外分析仪：ZF-I型，上海顾村电光仪器厂

核磁共振仪：AVANCE 400MHz型，瑞士Brucker Biospin公司傅立叶变换红外光谱：Magna 750型，美国Nicolet公司

真空干燥箱：DHG-9420A，上海和呈仪器制造有限公司质谱仪：Q-TRAP，美国ABI

## **2** 化学合成步骤

N-苄基-2-羟基水杨酰胺的合成方法（图1）

**O**

**Cl**

**O** O **50** **-60**

**+**

**S**

**O**

**H 2N**

**O**

**O** O

**OH** O

**N**

**OH** **Cl** **DMF**

**Cl 冰浴/ TEA** **H**

***N*----bbbbeeeennnnzzzzyyyyllll----2222----hhhhyyyyddddrrrrooooxxxxyyyybbbbeeeennnnzzzzaaaammmmiiiiddddeeee**

图1-1 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的合成路线

Fig. 1-1 The synthesis scheme of N-benzyl-2-hydroxybenzamide

### 2.1 2-氯甲酰基乙酸苯酯的合成

称取乙酰水杨酸5.4 g（30 mmol, 100%）加10 mL无水二氯甲烷（Methylene dichloride, CH2Cl2）稀释，滴加3滴新蒸的二甲基甲酰胺（Dimethylformamide, DMF），搅拌下缓慢滴入氯化亚砜（Sulfoxide chloride, SOCl2）4 mL (60 mmol, 200%)，加毕，缓慢升高温度至60℃，维持60℃反应3 h，待反应液呈淡黄绿色停止反应，减压抽滤除去过量的SOCl2和CH2Cl2，得淡黄色粘稠物，黄色粘稠物用CH2Cl2重复洗涤三次，真空旋干，得略带淡黄色的透明液体，即为2-氯甲酰基乙酸苯酯（密闭低温下保存，酰氯不稳定，易水解），用无水CH2Cl2 10 mL溶解稀释后倒入干燥的滴液漏斗中密闭备用，待下一步反应用。

### 2.2 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的合成

量取苯甲胺4 mL (36.7 mmol, 122%)，加CH2Cl2 20 mL稀释，缚酸剂三乙胺4 mL

（29 mmol, 100%），冰盐浴下搅拌冷却，待冷却后缓慢滴入上述2-氯甲酰基乙酸苯酯稀释

液，反应生成浅黄色混浊物，20 min滴完，反应过程始终保持温度在0℃左右，加毕，继续反应。薄层板层析（Thin layer chromatography, TLC）跟踪反应，待反应原料点消失，停止反应，反应浑浊液加水搅拌振荡，分液漏斗分出有机层。水层加稀盐酸HCl溶液呈弱酸性再用有机溶剂CH2Cl2萃取3次，分出有机层，合并有机层，无水MgSO4干燥。真空旋干有机溶剂，得白色固体，白色固体用95%的乙醇重结晶两次，得雪白色固体。

N-苄基-2-羟基水杨酰胺的熔点、产率及波普数据如下：

Mp 135.2-136.9℃, yield = 68%. MS: m/z 228.5, [M+H] +. 1H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ= 12.54 (s, 1H, Ar-OH), 9.36 (s, 1H, -NH-), 7.91 (d, J = 7.6Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.2 Hz, 1H),

δ7.25-7.35 (m, 5H), δ6.89-6.93 (m, 2H), 4.53(d, J = 6Hz, 2H). IR(KBr压片，cm-1)：3358, 3020,

2939, 1644, 1511, 1300-1445.

## **3** 结果与讨论

### 3.1 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的图谱解析

#### 3.1.1 核磁共振氢谱解析

如图1-3所示，δ2.5的单峰为DMSO溶剂峰，δ3.3的单峰为水峰；δ12.53的单峰为

酚羟基上氢的峰，δ9.36的宽矮峰为酰胺基上氢的峰，δ4.53为亚甲基上两个氢的峰；δ7.91 (d, J = 7.6Hz, 1H)为6位上苯环氢的峰，δ7.27 (q, J = 4.4 Hz, 1H)为4位上苯环氢的峰，δ6.89-6.93 (m, 2H)为3、5位上苯环氢的峰；δ7.25-7.35(m, 5H)为2'、3'、4'、5'、6'上苯环氢的峰。

OH O

2'

3 N 3'

H

4 6 6' 4'

5 5'

图1-2 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的结构图

Fig. 1-2 The structure ofN-benzyl-2-hydroxybenzamide

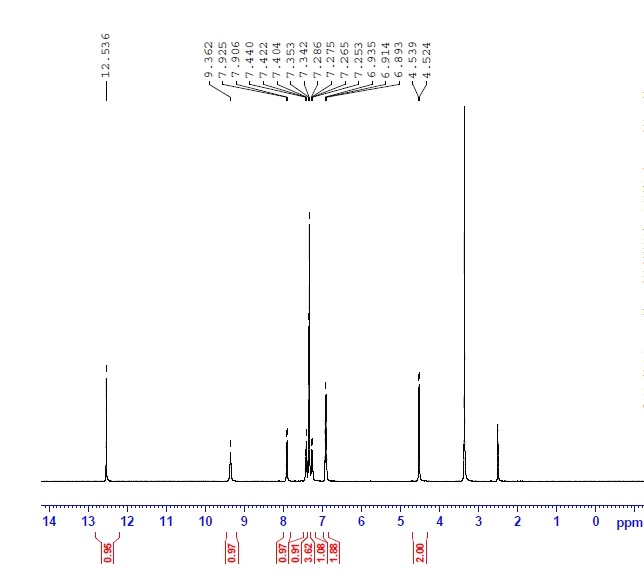


图1-3 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的核磁共振图

Fig. 1-3 The H-NMR spectrum of N-benzyl-2-hydroxybenzamide

#### 3.1.2 红外图谱解析

如图1-4所示，在3358 cm-1有一个强而尖锐的峰，为仲氨基的伸缩振动峰νNH；2900-3200 cm-1有几个较弱的峰，应为亚甲基的伸缩振动峰νCH2；1650 cm-1处有一个中强峰，为酰胺羰基的伸缩振动峰νC＝O；1500-1600 cm-1有3个强而尖的峰，为芳环骨架伸缩振动峰νC＝C；1300-1445 cm-1有中强峰，为亚甲基的面内弯曲振动峰δCH。由于氢键缔合的原因，红外图谱上看不到酚羟基的伸缩振动峰。



图1-4 N-苄基-2-羟基水杨酰胺的红外光谱图Fig.1-4 The IR spectrum of N-benzyl-2-hydroxybenzamide

#### 3.1.3 质谱图解析

N-苄基-2-羟基水杨酰胺的分子式为C14H13O2N，分子量为227，在一级全扫描质谱图中获得分子离子峰为m/z 228.5，[M+H] +。

### 3.2 酰氯化反应

#### 3.2.1 酰氯化温度、时间对产率的影响

酰氯化温度对乙酰水杨酸酰氯的产率影响较大，从而直接影响终产物产率，如表1-1

可知在50-60℃最宜，温度太高或过低均会使产率降低，温度太高，由于氯化亚砜沸点较低易受热挥发，使酰氯化进行不完全；温度过低使反应速度太慢而不利于酰氯化反应的进行。在催化剂DMF存在的条件下，通过TLC跟踪，反应时间3 h最适宜，反应时间缩短，原料乙酰水杨酸仍很多未反应。

表1-1 温度对终产物产率的影响

Table 1 The effects of acylchloridation temperature on yield

| 温度（℃） | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 产率（%） | 42.4 | 48.2 | 58.7 | 68.5 | 62.6 |

#### 3.2.2 投料比对产率的影响

氯化亚砜作为液体，且沸点较低，较之固体的乙酰水杨酸易除去。为使反应进行完全， 氯化亚砜应当过量，但氯化亚砜过多，除去不易，且氯化亚砜具有很强的腐蚀性，易损坏旋转蒸发仪和真空泵。通过比较不同投料比后的产率，如表1-2得出当氯化亚砜（a）与乙酰水杨酸（b）的物质的量之比为3时产率最高，但考虑氯化亚砜对仪器的损耗及原料除去的不便，且na: nb为2时产率已接近最高值，最终取配料比为2最合适。

表1-2 投料比对终产物产率的影响

Table 1-2 The effects of rate of charge

| 投料比(na : nb) | 1.5 : 1.0 | 2.0 : 1.0 | 3.0 : 1.0 |
| --- | --- | --- | --- |
| 产率（%） | 54.7 | 67.0 | 68.5 |

### 3.3 酰胺化反应

酰胺化反应激烈，反应除了需对反应的原料进行稀释，还需对反应物的投料顺序、反应温度、反应时间进行适当控制。

###### （1）投料顺序对酰胺化反应的影响

将苯甲胺滴入2-氯甲酰基乙酸苯酯中，反应无法得到终产物N-苄基-2-羟基水杨酰胺；将2-氯甲酰基乙酸苯酯加入到苯甲胺和缚酸剂三乙胺的混合液中，可以得到终产物。

###### （2）反应温度对酰胺化反应的影响

酰胺化反应激烈，反应会放出大量的热，影响酰胺化反应的进行和产率。应慢滴且不停搅拌，还应将温度控制在4℃以下，否则反应液会变深黄甚至变黑，无法得到产物。

###### （3）反应时间对酰胺化反应的影响

酰胺化反应随着时间的延长产率增加，反应2 h后，产率增加很少，而且TLC跟踪。反应2.5 h后，原料已基本完全反应。

## **4** 本章小结

本实验以乙酰水杨酸为原料，经氯化亚砜酰氯化后，再与苯甲胺在有机碱（三乙胺）性环境下酰胺化得到目标产物N-苄基-2-羟基水杨酰胺。产物经IR、MS、1H NMR分析得到确认。

实验第一步酰氯化用乙酰水杨酸做反应原料而不用水杨酸是因为水杨酸的羧基被酰氯化的同时，酚羟基亦易被氯化而产生副产物，乙酰水杨酸保护了酚羟基，该步反应加CH2Cl2是为了稀释SOCl2从而减少其加热挥发，还可加大SOCl2与乙酰水杨酸的接触，防止搅拌过程中乙酰水杨酸粘附于玻璃壁上，但CH2Cl2加入的量不可大，否则会使反应时间延长；第二步酰胺化中缚酸剂三乙胺使乙酰苯酯基水解，省去了后面除去乙酰基的步骤。使用DMF作为催化剂，反应时间缩短了3 h，减少加热过程中挥发损失的氯化亚砜。

实验使用氯化亚砜作为酰氯化试剂，反应条件温和，加热温度不需太高，产物除了酰氯外其它均为气体，较易除去，不需提纯即可应用，纯度好，产率高。最大的缺点是氯化亚砜具有很强的腐蚀性，易腐蚀仪器设备，且毒性较大，对人的眼睛和呼吸道等伤害较大。

# 第二章 药理部分

## **1** 材料与试剂

### 1.1 试剂

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS): sigma公司，美国二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO): 上海生工

羧甲基纤维素钠(Sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na): 上海凌峰化学试剂有限公司一氧化氮(Nitric oxide, NO)试剂盒：南京建成生物工程研究所

丙二醛（Malondialdehyde, MDA）测试盒：南京建成生物工程研究所

总抗氧化能力（Total Antioxidant Capacity, T-AOC）测试盒：南京建成生物工程研究所

### 1.2 仪器与设备

超净工作操作台：江苏净化仪器厂Milli-Q超纯水机：Millipore PB602-E 型精密天平：Sartorius离心机：Eppendorf

高速冷冻离心机：Eppendorf漩涡混匀器：德国IKA

高速匀浆机：德国IKA

普通加热恒温水浴箱：DKS-12，上海沈荡中新电器厂

### 酶标仪：Thermo

RF-5000荧光分光光度计：SHIMADZU冰箱：Thermo Scientific; Sanyo

### 1.3 实验动物

清洁级（SPF）昆明（KM）小鼠，30-35 g，购自广东省动物中心。

## **2** 实验方法

### 2.1 药理模型的建立

实验小鼠随机分成5组，即阴性对照组、LPS模型组、N-苄基-2-羟基水杨酰胺组、DMSO溶剂对照组和阿司匹林对照组，每组10只。腹腔注射药物（三组：N-苄基-2-羟基水杨酰胺组、溶剂对照组、阿司匹林对照组）15 min后，除了阴性对照组外，其余每组腹腔注射LPS 5 mg/kg，诱导内毒性血症[23]。LPS注射后12 h乙醚麻醉，开胸腔心脏取血，分离血浆，-80℃冻存。同时取肝和脑组织速冻后转入-80℃冰箱冻存。本实验受试药物腹腔注射所用溶剂为DMSO[24], LPS所用溶剂为生理盐水。溶剂DMSO对照组以40μL/20 g给药。

### 2.2 血浆NO含量测定

测定原理：NO化学性质活泼，在体内代谢很快转为NO2-和NO3-，而NO2-又进一步转化为NO3-，本法利用硝酸还原酶特异性将NO3-还原为NO2-，通过显色深浅测定其浓度高低。

具体按试剂盒说明操作：50μL样本与200μL Griess试剂混匀，37℃孵育1 h，加沉淀试剂振荡30 s，放置40 min沉淀蛋白质，10000 r/min离心8 min，取100μL上清与

120μL显色剂混匀，室温静置10 min，双蒸水调零，于酶标仪检测波长550 nm处吸光值

（A）。

### 操作表：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
| 双蒸水（μL） | 50 |  |  |
| 100 μmol/L 标准应用液（μL） |  | 50 |  |
| 样本（μL） |  |  | 50 |
| 混合试剂（μL） | 200 | 200 | 200 |

混匀，37℃孵育1 h

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂三（μL） | 100 | 100 | 100 |
| 试剂四（μL） | 100 | 100 | 100 |

充分漩涡混匀30 s，室温静置40 min, 10000 r/min，离心8 min，取上清显色

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 上清 （μL） | 100 | 100 | 100 |
| 显色剂（μL） | 120 | 120 | 120 |

混匀，室温静置10 min，双蒸水调零，波长550 nm处，测各管吸光度值A。

NO含量计算：

NO（μmol/L）=(AT - AB) /（AS - AB）×CS

其中AB为空白管A；AT为测试管A；AS为标准管A；CS为标准品浓度（100µmol/L）。

### 2.3 丙二醛（MDA）及总抗氧化能力（T-AOC）含量的测定

#### 2.3.1 血浆MDA及T-AOC含量的测定

(1)血浆MDA含量的测定

测定原理：过氧化脂质降解产物的丙二醛（MDA）可与硫代巴比妥酸（TBA）缩合， 形成红色产物，在波长532 nm处有最大吸收峰。

具体按试剂盒操作：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
| 10 nmol/mL 标准品（μL） |  | 40 |  |
| 无水乙醇（μL） | 40 |  |  |
| 血浆样本（μL） |  |  | 40 |
| 试剂一（μL） | 40 | 40 | 40 |

混匀

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂二（μL） | 600 | 600 | 600 |
| 试剂三（μL） | 200 | 200 | 200 |

漩涡混匀器混匀，ep管顶盖用针头刺一小孔，95℃水浴40 min，取出冷水冷却，然后4000 r/min，离心10 min。取上清200μL于96孔板中，酶标仪532 nm处测定吸光度值。

血浆中MDA含量计算公式：

血浆中MDA含量（nmol/mL）=（A测定-A空白）/（A标准-A空白）×标准品浓度（10 nmol/mL）

(2)血浆中T-AOC含量的测定

测定原理：机体中有许多抗氧化物质，能使Fe3+还原成Fe2+，后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物，通过比色可测出其抗氧化能力的高低。

具体按试剂盒操作：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 测定管 | 对照管 |
| 试剂一（μL） | 400 | 400 |
| 血浆 （μL） | 40 |  |
| 试剂二（μL） | 800 | 800 |
| 试剂三（μL） | 200 | 200 |

漩涡混匀器充分混匀，37℃水浴30 min

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂四（μL） | 40 | 40 |
| 血浆（μL） |  | 40 |

混匀，放置10 min，双蒸水调零，酶标仪520 nm处测定吸光度值。单位定义及计算公式：

1）定义：在37℃时，每分钟每毫升血浆使反应体系的吸光度值每增加0.01时，为一个总抗氧化能力单位。

2）计算公式：

总抗氧化能力（U/mL）=（A测定-A对照）/ 0.01÷30×反应液总量/取样量×样本测试前稀释倍数

#### 2.3.2 肝、脑组织中MDA及T-AOC含量的测定

组织匀浆的制备：准确称取组织重量，按重量体积比加入4倍体积的冰冷生理盐水，冰浴下匀浆，制成组织匀浆液；4℃，2500 r/min，离心10 min，取上清，冻存于-80℃待用。

(1)组织蛋白浓度测定——采用 BCA（BCA）法：1)试剂A: 1% BCA二钠盐，2%无水碳酸钠，0.16%酒石酸钠，0.4%氢氧化钠，0.95%

碳酸氢钠；

2）试剂B: 4%硫酸铜；

3）工作液的配制：临用时A、B液按50: 1的比例混合；

4）蛋白质标准液：牛血清白蛋白用纯水配制成1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL；

5）取浓度为0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0 mg/mL的蛋白质标准液各20μL加至96

孔板中，取50倍稀释的组织匀浆上清20μL加至96孔板中；

6）各孔加200μL BCA工作液，封口膜覆上，60℃放置30 min；

7）酶标仪于562 nm处测吸光度值；

8）绘制标准曲线，计算蛋白含量。

###### （2) 肝及脑组织MDA含量的测定

取上述组织匀浆上清液测定，具体按试剂盒操作：

1）混合试剂的配制：试剂一：试剂二：试剂三= a\*：3: 1（a\*为取样量）；

2）操作：分别取组织上清液，加入混合试剂840μL，漩涡混匀器混匀，ep管顶盖用小针头刺一小孔，95℃水浴40 min，取出后冷水冷却，然后4000 r/min，离心10 min。取上清200μL于96孔板中，酶标仪532 nm处测定吸光度值。同时测定2个标准管和空白管。

### 操作表同血浆MDA的测定。

计算公式：

组织中MDA含量（nmol/mg pro）=（A测定-A空白）/（A标准-A空白）×标准品浓度÷待测样本蛋白浓度

###### （3) 肝、脑组织中T-AOC含量的测定

取上述组织匀浆上清液测定，具体按试剂盒操作：

1）混合试剂的配制：试剂一：试剂二：试剂三=1: 2: 0.5的比例进行配制，现用现配。

2）操作：取40μL组织匀浆上清液于测定管中，往测定管和对照管中各加入混合试剂1.4

mL，充分混匀，37℃水浴30 min，测定管中先后加入试剂四和试剂五各80μL，对

照管中先后加入试剂四80μL、组织匀浆上清液40μL、试剂五80μL，充分混匀，放

置10 min，双蒸水调零，于520 nm酶标仪测定吸光度值。具体按试剂盒操作：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 测定管 | 对照管 |
| 组织匀浆液 （μL） | 40 |  |
| 混合试剂（μL） | 1400 | 1400 |

漩涡混匀器充分混匀，37℃水浴30 min

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂四（μL） | 80 | 80 |
| 组织匀浆液 （μL） |  | 40 |
| 试剂五（μL） | 80 | 80 |

混匀，放置10 min，双蒸水调零，酶标仪520 nm处测定吸光度值。计算公式：

总抗氧化能力（U/mg pro）= (A测定-A对照) / 0.01÷30×反应液总量/取样量÷匀浆液组织蛋白浓度

### 2.4 统计学处理

结果以均数±标准差表示，采用SPSS 17.0 for window统计学分析软件的One-Way ANOVA方法进行显著性判断，P<0.05认为差别有统计学意义。

## **3** 结果

### 3.1 药物对内毒素血症小鼠血浆中NO、MDA、T-AOC含量的影响

如表2-1、图2-1至图2-3所示，在LPS诱导的小鼠系统炎症中，NO及MDA明显升高（P<0.01），T-AOC水平下降（P<0.01），腹腔给予50 mg/kg（0.22 mol/kg）的N-苄基-2-羟基水杨酰胺能显著降低NO和MDA的含量（P<0.01），给予N-苄基-2-羟基水杨酰胺的小鼠NO降低水平优于给予阿司匹林（0.22 mol/kg）的小鼠（P<0.05），而降低MDA含量作用与阿司匹林相当（P> 0.05），对血浆中T-AOC无明显影响（P> 0.05）。40μL/20g的DMSO不能降低LPS诱导的系统炎症小鼠血浆NO的浓度（P> 0.05）。

表2-1 内毒素血症血浆中NO及MDA、T-AOC浓度

Table.2-1 The concentration of plasma NO、MDA、T-AOC in murine endotoxemia

| 组别 | NO (μmol/L) | MDA (nmol/mL) | T-AOC (U/mL) |
| --- | --- | --- | --- |
| 阴性对照组 | 18.8±3.7 | 4.27±1.03 | 8.71±0.77 |
| LPS 模型组 | 709±150△ | 7.94±0.96△ | 6.04±0.99△ |
| DMSO 组 | 654±104 | 7.61±1.31 | 5.81±0.76 |
| 乙酰水杨酸组 | 474±70▲★ | 5.75±1.27▲★ | 4.47±0.73 |
| N-苄基-2-羟基水杨酰胺组 | 370±44▲★☆ | 5.13±1.12▲★ | 3.67±0.88▲ |

△与阴性组比较P<0.01，▲与模型组比较依次为P<0.05，★与DMSO溶剂组比较为P<0.05，

☆与乙酰水杨酸组比较P<0.05



图2-1药物对血浆中NO含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05. Fig.2-1 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of NO in plasma.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.



图2-2 药物对血浆中MDA含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05Fig.2-2 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of MDA in plasma.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.



图2-3 药物对血浆中T-AOC含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05Fig.2-3 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of T-AOC in plasma.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.

### 3.2 药物对内毒素血症小鼠肝、脑组织中MDA及T-AOC含量的影响

#### 3.2.1 药物对内毒素血症肝组织中MDA、T-AOC含量的影响

表2-2、图2-4及图2-5所示，与阴性组比较，LPS模型组的MDA明显升高（P<0.01）；与阴性组和LPS模型组比较，小鼠肝中DMSO组的含量升高显著（P<0.01）,说明DMSO对组织有损伤作用，产生更多的过氧化脂质；与LPS模型组、DMSO对照组比较，N-苄基-2-羟基水杨酰胺能明显降低肝中MDA的含量（P<0.05、P<0.01），作用与阿司匹林相当（P> 0.05）。但是N-苄基-2-羟基水杨酰胺升高T-AOC的作用明显比阿司匹林强（P<0.01）。

表2-2 内毒素血症小鼠肝中MDA、T-AOC浓度

Table.2-2 The Concentration of liver MDA、T-AOC in endotoxemia

| 组别 | MDA (nmol/mg pro) | T-AOC (U/mg pro) |
| --- | --- | --- |
| 阴性对照组 | 1.10±0.30 | 0.35±0.02 |
| LPS 模型组 | 1.56±0.13△ | 0.41±0.10 |
| DMSO 组 | 2.31±0.31▲ | 0.36±0.04 |
| 乙酰水杨酸组 | 1.28±0.15▲★ | 0.36+0.08 |
| N-苄基-2-羟基水杨酰胺组 | 1.21±0.21▲★ | 0.52±0.03▲★☆ |

△与阴性组比较P<0.01，▲与模型组比较依次为P<0.05，★与DMSO溶剂组比较为P<0.05，

☆与乙酰水杨酸组比较平P<0.05。



图2-4 药物对肝组织中MDA含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05Fig.2-4 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of MDA in liver.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.



图2-5 药物对肝组织中T-AOC含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05Fig.2-5 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of T-AOC in liver.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.

#### 3.2.2 药物对内毒素血症小鼠脑组织中MDA、T-AOC含量的影响

如表2-3、图2-6及图2-7所示，与阴性组比较，LPS模型组、DMSO对照组脑组织中MDA升高明显（P<0.01），N-苄基-2-羟基水杨酰胺处理能显著降低脑中MDA的含量

（P<0.05），且作用与阿司匹林相当（P> 0.05）。而对T-AOC的含量没有升高作用（P> 0.05）。

表2-3 内毒素血症小鼠脑中MDA、T-AOC浓度

Table.2-3 The concentration of brain MDA、T-AOC in endotoxemia

| 组别 | MDA (nmol/mg pro) | T-AOC (U/mg pro) |
| --- | --- | --- |
| 阴性对照组 | 1.09±0.25 | 0.76±0.12 |
| LPS 模型组 | 1.83+0.33△ | 1.03±0.14△ |
| DMSO 组 | 1.80±0.19 | 1.27 ± 0.24▲ |
| 乙酰水杨酸组 | 1.45±0.23▲★ | 1.07±0.15★ |
| N-苄基-2-羟基水杨酰胺组 | 1.46±0.25▲★ | 1.05 ± 0.17★ |

△与阴性组比较P<0.01，▲与模型组比较依次为P<0.05，★与DMSO溶剂组比较为P<0.05



图2-6 药物对脑组织中MDA含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05Fig.2-6 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of MDA in brain.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.



图2-7药物对脑组织中T-AOC含量的影响。\*与相应的LPS组比较P<0.05. Fig.2-7 The effect of N-benzyl-2-hydroxybenzamide with contents of T-AOC in brain.

\*P<0.05, compared with corresponding LPS group.

## **4** 讨论

由于所合成的 N-苄基-2-羟基水杨酰胺水溶性较差，无法用一般注射剂进行腹腔注射。在给药途径的选择上，本课题选用两种方法：①是腹腔注射；将药物溶于小剂量的DMSO中，再腹腔注射给药；②是灌胃给药；将药物研细，溶于0.5%的CMC-Na后进行灌胃给药。预实验结果表明：腹腔注射给药抗炎效果明显，而灌胃给药作用效果较差。经 HPLC、

MS法测定其体内血浆中母体化合物及代谢产物的含量，发现灌胃给药生物利用度非常低。选用DMSO作为注射剂[24]，是因为DMSO溶解能力强，对动物模型及药物的作用效果干扰较小，且DMSO本身有刺激毒副作用，能产生脂质过氧化产物，可以作为评估药物抗氧化作用的一个模型。但是DMSO本身有抗炎镇痛作用，给予的量不能高，以免干扰药物作用。

NO是由L-精氨酸经NO合酶（NO synthase, NOS）催化氧化而形成的。NO除了有第二信使和神经递质的功能外，作为效应分子还介导细胞免疫和炎症毒性[25-26]。研究表明，炎症及感染情况下由诱导型一氧化氮合成酶（Inducible nitric synthase, iNOS）介导产生高浓度一氧化氮，具有炎症介质和氧自由基的性质，参与多种疾病发生。在白血症[27]、呼吸衰竭[28]、关节炎[29-31]等疾病已经观察到NO过量产生及诱导型一氧化氮合酶的高表达。有效抑制NO的生成不仅能在初始阶段影响炎症的发生，还能缓解对其他疾病的促进。阿司匹林具有抑制心肌细胞中可诱导性NO产生的作用，对促进损伤组织的修复、减轻炎症反应和维持

正常的血液动力学状态具有积极的作用[32-34]。本实验通过LPS建立小鼠系统性炎症模型，并腹腔给予N-苄基-2-羟基水杨酰胺对LPS诱导的炎症反应，以阿司匹林作为药物阳性对照， 结果表明N-苄基-2-羟基水杨酰胺能有效抑制LPS诱导的NO含量的生成，抗炎作用明显，且抑制NO生成的作用比阿司匹林强。

炎症反应过程中伴有大量自由基，包括超氧阴离子、过氧化氢物、氢自由基、NO等会攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而发生脂质过氧化反应，破坏脂肪酸链和细胞膜的完整性，损伤肝脏中的各种细胞[35]。MDA是自由基攻击生物膜产生脂质过氧化反应的产物，组织中的MDA含量可反映脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞受自由基攻击和损伤的程度[36]。T-AOC反映了机体酶及非酶促体系总的抗氧化水平高低。实验结果表明，腹腔给予LPS和

DMSO，MDA的含量均显著上升，提示LPS和DMSO均能引起氧化应激损伤。而N-苄基-2-羟基水杨酰胺处理后MDA含量明显降低，具有对抗脂质过氧化的能力，作用与阿司匹林相当，但并无升高T-AOC水平的作用。

## **5** 结论

本实验证明所合成的药物N-苄基-2-羟基水杨酰胺能抑制NO的释放和降低MDA的含量， 具有抗炎作用和对抗脂质过氧化的能力，且抗炎作用优于阿司匹林。

参考文献

[1]. Chou R, Fanciullo GJ, Fine PG, Adler JA, Ballantyne JC, Davies P*, et al.* Clinical Guidelines for the Use of Chronic Opioid Therapy in Chronic Noncancer Pain. Journal of Pain, 2009, 10: 113-130.

[2]. Sng BL, Schug SA. The role of opioids in managing chronic non-cancer pain. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38: 960-966.

[3]. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol, 1971, 231: 232-235.

[4]. Ratnasinghe LD, Graubard BI, Kahle L, Tangrea JA, Taylor PR, Hawk E. Aspirin use and mortality from cancer in a prospective cohort study. Anticancer Res, 2004, 24: 3177-3184. [5]. Moysich KB, Menezes RJ, Ronsani A, Swede H, Reid ME, Cummings KM*, etal.* Regularaspirin use and lung cancer risk. BMC Cancer, 2002, 2: 31.

[6]. Rodriguez LAG, Gonzalez-Perez A. Risk of breast cancer among users of aspirin and other antiinflammatory drugs. Br J Cancer, 2004, 91: 525-529.

[7]. Johnson TW, Anderson KE, Lazovich D, Folsom AR. Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11: 1586-1591.

[8]. Chattopadhyay M, Kodela R, Olson KR, Kashfi K. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid is a potent inhibitor of colon cancer cell growth in vitro and in a xenograft mouse model. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 419: 523-528.

[9]. Kodela R, Chattopadhyay M, Kashfi K. NOSH-Aspirin: A Novel Nitric Oxide-Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid: A New Class of Anti-inflammatory Pharmaceuticals. ACS Med Chem Lett, 2012, 3: 257-262.

[10]. Lin Z, Li H, Luo H, Zhang Y, Luo W. Benzylamine and methylamine, substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase, attenuate inflammatory response induced by lipopolysaccharide. International immunopharmacology, 2011, 11: 1079-1089.

[11]. Markwardt F, Landmann H, Walsmann P. Comparative studies on the inhibition of trypsin, plasmin, and thrombin by derivatives of benzylamine and benzamidine. European Journal

Of Biochemistry, 1968, 6:502-506.

[12]. 裴保香, 徐艳萍. 非甾体抗炎药的研究进展. 中国药物应用与监测, 2006, 5: 32-34.

[13].齐兵, 冯磊, 陈达, 吴引超, 巨修练. 水杨酸衍生物的合成及生物活性测定. 武汉工程大学学报, 2010: 49-52.

[14]. Ashton MJ, Cook DC, Fenton G, Karlsson J-A, Palfreyman MN, Raeburn D*, et al.* Selective Type IV Phosphodiesterase Inhibitors as Antiasthmatic Agents. The Syntheses and Biological Activities of 3-(Cyclopentyloxy) -4-methoxybenzamides and Analogs. J Med Chem. 1994, 37: 1696-1703.

[15]. Dinarello C, Fossati G, Mascagni P. DERIVATIVES OF N-HYDROXYBENZAMIDE FOR TREATING HIV INFECTIONS. In: Google Patents; 2010.

[16]. 刘贻孙, 周锡瑞, 候雪龙. 抗心律失常药棓酰苯胺(603)衍生物的合成. 复旦学报(医学版), 1984, 5: 003.

[17]. 刘贻孙, 周智善, 顾克家, 梁诚一. 抗心律失常药物的研究——Ⅰ. 3, 4, 5-三甲氧基苯甲酰胺衍生物的合成. 药学学报, 1981, 2: 015.

[18]. 周锡瑞, 刘贻孙, 朱菊良, 陆培民, 徐红, 王韦. 苯甲酰苯胺衍生物的合成和抗心律失常作用. 复旦学报(医学版), 1984, 6: 003.

[19]. Rajagopalan LE, Davies MS, Kahn LE, Kornmeier CM, Shimada H, Steiner TA*, et al.* Biochemical, cellular, and anti-inflammatory properties of a potent, selective, orally bioavailable benzamide inhibitor of Rho kinase activity. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 333: 707-716.

[20]. Barea C, Pabon A, Castillo D, Zimic M, Quiliano M, Galiano S*, et al.* New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1, 4-di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21: 4498-4502.

[21]. Kuziej J, Litinas E, Hoppensteadt DA, Liu D, Walenga JM, Fareed J*, et al.* In vivo neutralization of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin by a novel salicylamide derivative. Clin Appl Thromb Hemost, 2010, 16: 377-386.

[22]. McAllister RE. Heparin-antagonist PMX-60056 rapidly and completely reverses heparin anticoagulation in man. Thrombosis Research, 2010, 125: S162-S163.

[23]. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J*, etal.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science, 1999, 285: 248-251.

[24]. Sun X-Y, Hu C, Deng X-Q, Wei C-X, Sun Z-G, Quan Z-S. Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of some novel 6-alkoxy (phenoxy) -[1, 2, 4] triazolo [3, 4-<i> a </i>] phthalazine-3-amine derivatives. Eur J Med Chem, 2010, 45: 4807-4812.

[25]. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis & Rheumatism, 1998, 41: 1141-1151.

[26].蒋波, 楚正绪. 一氧化氮与炎症. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1998, 18: 44-47.

[27]. Duke T, South M, Stewart A. Activation of the L-arginine nitric oxide pathway in severe sepsis. Arch Dis Child, 1997, 76: 203-209.

[28]. Bonde J, Antonsen K, Henneberg S, Uhrbrandt B, Wanscher M. Nitrogen oxide inhalation in critically ill patients]. Ugeskrift for laeger, 2000, 162: 335.

[29]. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBS Lett, 1994, 350: 9-12.

[30]. Stefanovic‐Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey J, Hoffman R, Evans C. N ‐monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. Arthritis & Rheumatism, 1994, 37: 1062-1069.

[31]. Kondo S, Ishiguro N, Iwata H, Nakashima I, Isobe K-i. The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197: 1431-1437.

[32]. Kimura A, Roseto J, Suh K-Y, Cohen AM, Bing RJ. Effect of Acetylsalicylic Acid on Nitric Oxide Production in Infarcted Heart<i> in Situ </i>. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 251: 874-878.

[33]. Amin AR, Vyas P, Attur M, Leszczynska-Piziak J, Patel IR, Weissmann G*, etal.* The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92: 7926-7930.

[34]. Katsuyama K, Shichiri M, Kato H, Imai T, Marumo F, Hirata Y. Differential inhibitory actions by glucocorticoid and aspirin on cytokine-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. Endocrinology, 1999, 140: 2183-2190.

[35]. Winrow V, Winyard P, Morris C, Blake D. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. British Medical Bulletin, 1993, 49: 506-522.

[36]. 代国杰, 朱建津, 高琳琳, 单立娟. 褪黑素对小鼠抗氧化作用的影响. 食品工业科技, 2010, **3**: 347-350.

综述

**炎症及抗炎药物的研究进展**

炎症作为人体多种重大疾病的共同通路，与许多重大疾病的发生及发展有关。炎症的抑制能减缓疾病。炎症是一种复杂性生理和病理反应，它既有防御和保护作用，又有损伤和致病作用。它的发病机制较为复杂，目前认为炎症的发病机制与多条反应通路、多种炎症介质有关。抗炎药作为炎症的抑制剂，是目前应用最多、最广泛的药物之一。但长期使用抗炎药物会导致胃肠损伤、再生贫血和肾毒性等副作用。随着新的炎症机制的发现， 对应的抗炎药物也在相应不断的开发。寻找更高活性、更低毒副作用的抗炎药已经成为药物化学的热门领域。本文将就炎症与抗炎药的研究做一综述。

1炎症的概述

炎症（Inflammation）是机体组织对内外环境的有害刺激所产生的一种复杂的生理和病理反应。它既是一种保护性防御反应，亦是引起人体多种重要疾病的共同通路。许多重大疾病如心血管疾病、哮喘、关节炎溃疡性肠炎、痛经、周期性头痛、神经性疾病如阿尔茨海默病以及肿瘤等的发生和发展均与炎症有关[[1](#_bookmark23)]。

一般认为炎症是局部组织的变性、渗出和增生，表现为“红、肿、热、痛”。而实际上它是一种复杂的Sophistricated调节网络性疾病：它既是一种对有害物质的适应性反应（An Adaptive Response of Noxions Condition），亦是一种组织应激反应（A Tissue Stress

Response），涉及到各种组织细胞和内质网、线粒体和各种细胞器；它既是一种适应性免疫反应，也是一种固有的免疫反应。它是一个多因素、多细胞、多通路、多层次、进行性的复杂的生理和病理的网络性的调节反应。如图1，目前认为炎症具有Inducers、Sensors 、

Mediators和Target Tissues四个基本的反应通路。Inducers，不仅有细菌、病毒的感染和各种物化的有害刺激，还有各种内源性损伤、细胞和介质的改变，包括DNA和蛋白质的变性损伤，细胞的坏死和内环境的变化等等。Sensores，主要是免疫和炎症细胞如Mast

Cell、Dendritic、Macrophage、嗜中性和嗜碱性粒细胞、内皮细胞等等，其中Macrophage起着核心和关键作用。在感受细胞上有三种模式识别受体（PPRs）：TLR主要识别细胞外表面和吞噬体的病原相关分子（PAMPs）。现在了解TLRs有10多种，是炎症反应中最主要Sensors ，它可启动适应免疫和内在性免疫，激活巨噬细胞；NLRs主要识别细胞内

PAMPs，它是一个Nod-Like Receptors的超家族，有20多种蛋白质，可组成一个蛋白复合体，称为炎症小体（inflammasome），它可以通过Caspase-1激活各种细胞因子，启动一系列防御反应；此外，还有RIG受体，主要识别病毒分子[1-2]。



图1 炎症反应通路

Fig. 1 Inflammatory Pathway Components

炎症反应为多种炎症介质所介导，目前发现的炎症介质主要有：①PGs和LTs，这两类是公认的强致炎介质[[2](#_bookmark23)]。其中，PGE2和PGI2能扩张血管，增加血管通透性，并能增强其他介质的的致炎作用。而PGH2能降低血小板cAMP(cyclic adenosine monophosphate)水平，导致炎症的发展[[3](#_bookmark23)]。LTB4能促使白细胞溶酶体酶的释放，导致炎症反应的扩大和加剧[4]。LTC4、D4及E4能增加血管通透性而促使炎症的产生和发展[[3](#_bookmark23)]。②生物胺类：组胺、5-羟色胺等。组胺通过激动组胺受体而发挥作用，使炎症反应的主要场所小血管扩张、血管壁通透性升高，同时对嗜酸性白细胞有趋化作用，从而促进炎症反应。5-羟色胺能激动受体而使血管壁通透性升高，促使血浆渗出，从而参与急性炎症。③激肽：缓激肽和舒血管肽。激肽有白细胞趋化作用，可激活磷脂酶A2（Phospholipase A2, PL A2）,促进代谢，加速炎症介质PGs、LTs的产生和释放，引起平滑肌收缩缓慢、全身血管扩张、血压降低、血管壁通透性升高及疼痛[5]。④补体系统、溶酶体酶。补体的激活过程中会产生许多具有生物活性的多肽片段，其中的过敏毒素可释放组胺，使血管壁通透性增加、白细胞趋化性增强。过敏素和膜攻击复合物C5b-9又能引起溶体酶的释放，导致炎症的加剧。⑤细胞因子如TNF、IL-1、IL-6、IFN、CCL、CXCL、COX、Elcosanoid等。

由于炎症是一种复杂性生理和病理反应，它既有防御和保护作用，又有损伤和致病作用。尽管从Celsus最先认识炎症开始，已有近2000年历史，最近20年亦有了显著进展。但是，迄今我们对炎症的发生机理和作用还是很不了解，亦缺乏十分有效的控制炎症的方

法和措施。对炎症的治疗，目前应用的抗炎药按其作用靶点、通路的不同有十几类，几百种，按其化学结构的不同主要分为甾体抗炎药与非甾体抗炎药。

2非甾体类抗炎药（NSAIDs）的研究进展

抗炎药按照其化学结构是否含有甾体结构可以分为两大类。一类是甾体抗炎药，即肾上腺皮质所分泌的糖皮质激素氢化可的松及其人工合成的衍生物。另一类是非甾体抗炎药(non-steroid-anti-inflammatory drugs)，是一类不含有甾体结构的具有解热、镇痛，多数还有抗炎、抗风湿作用的药物。由于甾体类药物能引起皮质功能亢进综合征、诱发或加重感染、诱发或加重溃疡病、诱发高血压和动脉硬化[、骨质疏松](http://baike.baidu.com/view/432077.htm)、[肌肉萎缩](http://baike.baidu.com/view/588430.htm)、伤口愈合延缓、 诱发精神病和癫痫、抑制儿童生长发育、负氮平衡、低血钙、高血糖倾向、消化性溃烂、 [股骨头坏死](http://baike.baidu.com/view/65501.htm)等不良反应，临床应用受限，现已不作为一般炎症疾病的首选药。而NSAIDs副作用较SAIDs小，结构多样化、种类繁多，可以通过修饰基团来不断开发抗炎效果优良、副作用小的新药物，因此，临床上抗炎药物主要以NSAIDs为主，本文重点介绍非甾体抗炎药（NSAIDs）。

2.1非甾体抗炎药的作用机制

1952年保泰松用于临床，国际上首次提出NSAIDs这一概念，与SAIDs相区别。在其后的几十年里涌现出了一大批具有优良抗炎作用的NSAIDs，如1964年英国医生John Vane等人发现阿司匹林具有阻断内源性前列腺素（PGs）合成酶的作用，并在此基础上于1971年指出NSAIDs主要是通过抑制环氧化酶（cycloxygenase, COX）进而阻断PGs生成过程来实现其抗炎作用的[[3](#_bookmark23)]。

近20年来， 随着对NSAIDs 抗炎止痛机制的认识不断加深， 了解到体内的花生四烯酸（arachidonic acid）除了由COX催化代谢产生前列腺素外，还可由5-LOX催化产生白三烯（leurotriens），如图2。在NSAIDs抑制COX活性，阻断前列腺素生物合成的同时, 5-LOX催化的代谢产物白三烯之生成将相对增加，而后者也是一类重要的致炎物质， 包括双羟白三烯（LTB4）、胱氨酰白三烯（LTC4）、白三烯D4（LTD4）和白三烯E4（LTE4）, 它们在哮喘、过敏性鼻炎、慢性阻塞性肺病（COPD）以及黏膜缺血和溃疡中起重要作用。研究结果提示，同时抑制COX和5-LOX的活性，可减少前列腺素和白三烯的生成，能更有效地控制炎症[[6-8](#_bookmark24)]。



图2 NSAIDs的作用机制

Fig. 2 Mechanism of action of NSAIDs

2.2 NSAIDs的分类

目前，如图3，根据NSAIDs对COX-1和COX-2的作用强弱，可将其分为三类：第一类为选择性COX-1抑制剂，只对COX-1有抑制作用，对COX-2无作用，目前公认小剂量肠溶性阿司匹林属此类，这一类副作用较大，抗炎作用较弱，目前应用较少；第二类为非选择性

COX抑制剂（Classic）, 是指对COX-1和COX-2的抑制作用无差异，吲哚美辛、布洛芬等属此类；第三类为选择性COX-2抑制剂，指在有效治疗剂量时，对COX-2的抑制作用明显大于COX-1, 这类药物对COX-2的选择性比对COX-1强2~ 100倍，代表药物如美洛昔康等。此类药物中有些药物对COX-2的抑制作用比对COX-1大100倍以上，最大治疗剂量也不会对COX-1产生抑制作用，因此又被称为特异性COX-2抑制剂，如塞来昔布和罗非昔布等[[9](#_bookmark24)]。本部分将重点阐述COX-2抑制剂。



图3 COX-1和COX-2的作用Fig.3 Roles of COX-1 and COX-2

2.2.1 COX抑制剂类

（1）非选择性COX抑制剂（Classic NSAIDs）

非选择性COX抑制剂是最早应用于抗炎镇痛的非甾体药物，又称传统非甾体抗炎药物

（Classic NSAIDs）。该类药物能抑制COX的活性使前列腺素的生成减少而发挥解热镇痛抗炎作用，但其无选择性的抑制COX-1和COX-2，胃肠道不良反应较多见[[10](#_bookmark24)]。目前，科学研究将其改造为选择性COX-2抑制剂。按照化学结构的不同将非选择性COX抑制剂主要分为以下几类[[11](#_bookmark24)]：

1）芬酸类衍生物



2）布洛芬衍生物



3）昔康类



4）其它



（2）选择性COX-2抑制剂

20世纪90年代Needleman等[[12](#_bookmark24)]发现COX有两种同工酶以后，NSAIDs的发展出现转机。

1990年Gans等[[13](#_bookmark24)]研制出COX-2特异性抑制剂中的原型药物DuP-697，该药的抗炎、镇痛、解热作用颇强，却很少一般NSAIDs常见的胃肠道和肾脏损害作用。1999年相继上市的塞来昔布和罗非昔布等昔布类（coxibs）药物能够特异性地抑制COX-2，而对COX-1的活性没有影响或很少影响。沿此思路，此后不断有性能更好的COX-2选择性抑制剂络绎出现。COX-2抑制剂的主要有以下几类：

1）二芳基或芳基杂环芳基醚或硫醚类（甲磺酰胺类）

尼美舒利（Nimesulide）自1985年上市，至今仍广泛应用于急、慢性关节炎、手术和记

性创伤后的疼痛及炎症。体外实验显示其COX-2选择性比值为1/5-1/16[[14](#_bookmark31)]；解热镇痛作用

（ED50）为扑热息痛的200倍，镇痛作用为阿司匹林的25倍[[15](#_bookmark31)]。但在减少溃疡等方面的作用并不比其他NSAIDs优越，且生物利用度低、化合物中硝基代谢产物毒性大，故药物化学研究者以其为母体进行结构改造并优化，用环己烷代替尼美舒利的苯环，得到药物NS-398。 该化合物抑制COX-2的IC50为0.03µmol/L，而COX-1的IC50大于100µmol/L[[16](#_bookmark31)]。将连有甲磺酰胺基团的苯环用二氢化茚酮代替，得到一个高效的选择性COX-2抑制剂Flosulid. Merck公司将Flosulid进行改造，将硫原子代替氧原子，得到L-745337，L-745337是至今所得到的具有抗炎活性的甲磺酰胺类COX-2抑制剂中最有效的药物之一。



2）芳基杂环类

该类化合物的结构特征为具有不饱和脂环或杂环的分子中心，并连有两个相邻的芳基部分。塞来昔布（celecoxib）是美国FDA第一个批准上市的COX-2抑制剂，该药物与其他杂环衍生物相比有较好的COX-2抑制活性。Merck公司研制的COX-2抑制剂罗非昔布

（Rofecoxib）[[18](#_bookmark31)]，1999年经美国FDA批准在美国上市，该药为口服药物，IC50为1.8×10-8

mol/L. Dup-697是由Dupont公司研制开发的一类强抗炎药，该药对COX-2选择性比值为

0.01，几乎对大鼠胃无损伤[[13](#_bookmark24)]。SC-58125是Searle公司开发的对慢性炎症具有较强作用的口服药，且对胃肠道毒副作用小于传统的NSAIDs[[19](#_bookmark31)]。



3）通过改变传统NSAIDs结构

这类化合物是通过对传统的NSAIDs进行结构改造并优化，得到COX-2选择性更强的化合物。

如吲哚美辛为非选择性COX抑制剂，用三氯苯基甲酰基取代吲哚美辛的4-氯苯甲酰基得到COX-2选择性抑制剂L-748780。而对侧链的改造，在分子中引入4-溴苯甲酰基得到一生物活性更好，对COX-2选择性更强的化合物L-761066[[20](#_bookmark31)-2[1](#_bookmark31)]。



4）有抗氧化成分的化合物

这类化合物的主要结构特征是具备一个具有抗氧化作用的基团（如二叔丁基酚），酚芳环部分取代一个二氢噻唑酮、恶唑酮、噻二唑或恶唑类。该类化合物作用最强、COX-2选择性最好的是噻二唑类衍生物，其对COX-1和COX-2的IC50分别为大于100µmol/L和

0.14µmol/L[[22](#_bookmark31)]. S-2474已被开发为抗关节炎的候选药物，它能有效抑制COX-2和5-LOX，还能抑制IL-1的产生，且无溃疡副作用，目前已经进入临床试验[[23](#_bookmark31)]。



5）顺式二苯乙烯类

该类化合物与芳基杂环类相比就是用一个具有抑制活性的开放二醇结构取代呋喃环，该类化合物目前还处于生物活性测试阶段。



近几年来关于COX-2抑制剂的合成及改造仍在不断进行中。Abdel-Meged等人报道合成了系列酰化了的1, 2,4-三氮唑-3-醋酸酯类化合物，并检测其抗炎活性、胃肠道副作用以及急性毒性[[24](#_bookmark32)]，该类化合物抑制COX-2的能力与吲哚美辛相当，但抑制COX-1的活性比吲哚美辛小的多。Rathish等[[25](#_bookmark32)]合成19个新的2-吡唑啉苯磺酰胺类衍生物， 这些化合物作用比塞来昔布强且口服剂量60 mg/kg仍不会产生溃疡性反应。

与传统的NSAIDs相比，选择性COX-2抑制剂虽然能有效减轻其胃肠道不良反应。然而，近几年来的研究发现，在正常的脑[[26](#_bookmark32)]、血管内皮细胞[[27](#_bookmark32)]、脊髓[[28](#_bookmark32)]等组织中也存在COX-2的结构性表达，抑制这些组织的表达有可能引发其他副作用。由于罗非昔布有严重的心血管不良反应（包括心脏病发作和心肌梗死）, 默克公司于2004年主动将罗非昔布撤出市场。新的临床数据显示其他昔布类药物也有此类反应，辉瑞公司的伐地昔布已被FDA 要求撤出市场[[29](#_bookmark32)]。所以，对COX-2抑制剂的全面评价还需进一步考察研究。

2.2.2 COX/5-LOX双重抑制剂

5-LOX是花生四烯酸代谢合成白三烯的关键酶。如图4[[30](#_bookmark32)]，花生四烯酸（AA）首先转化为5-HPETE[[31](#_bookmark32)]，后者经5-LOX催化生成LTA4，LTA4既可以被LTA4水解酶催化生成

LTB4，亦可以经谷胱甘肽转移酶代谢生成LTC4[[32](#_bookmark32)]，LTC4再由几种特殊的酶催化转化生成

LTD4、LTE4. LTC4、LTD4和LTE4是过敏性反应的慢反应物质的组分，在炎症反应起积极作用，促进白细胞趋向破坏组织。白三烯是许多炎症和过敏性疾病的重要介质，也被认为与心血管疾病和癌症密切相关[[33](#_bookmark32)]。



图4 5 -LOX生物合成白三烯类的途径

Fig.4 The 5-lipoxygenase pathway; biosynthesis of leukotrienes

经典的NSAIDs和选择性COX-2抑制剂都主要通过抑制COX减少炎症过程产生的前列腺素而发挥作用。然而, COX被抑制也减少了对胃肠、肾、心血管等具有保护作用的前列腺素。而且COX被抑制后，花生四烯酸经过5-LOX代谢代偿性增加，导致强炎性介质白三烯合成增加，进一步促进炎症的形成和NSAID引发的副作用。而前列腺素和白三烯有互补作用[[34](#_bookmark33)]，尽管5-LOX在炎症和过敏性疾病等许多疾病中扮演重要角色，但是作为抗炎药物，5-LOX抑制剂的抗炎强度不够[[35](#_bookmark33)]。因此，COX /5-LOX双重抑制剂具有和COX抑制剂等效或增强的抗炎作用，同时避免其胃肠损伤、肾毒性以及心血管副作用。COX/5-LOX双重抑制剂主要有以下几类：

（1） 吡咯类[[36](#_bookmark33)]

由Merck公司研制，EuroAlliance公司开发的COX-2/5-LOX双重抑制剂ML3000具有

显著的镇痛抗炎效果，且胃肠道毒副作用较小。ML3000对COX-2和5-LOX的IC50分别为0.24µmol/L和0.18µmol/L。

ML3000



(2)二叔丁基苯酚类[[37](#_bookmark33)]

二叔丁基苯酚类化合物是一类被广泛研究的COX /5-LOX双重抑制剂。这类化合物共同的结构特征是4位以五元杂环、六元杂环或链取代2, 6-二叔丁基苯酚化合物。苯酚部分具有抗氧化性， 被认为与其抗炎作用和低溃疡特性相关[[34](#_bookmark33)]。达布非隆是由美国Warmer

Lambert公司研发的COX-2和5-LOX双重抑制剂。而盐野义制药公司开发的化合物S-2474

已经开始进入临床研究阶段。



(3)苯骈二氢呋喃类化合物[[37](#_bookmark33)-[38](#_bookmark33)]

此类化合物是在特布芬龙的代谢产物中发现的。对该类化合物进行修饰得到苯骈二氢

呋喃类衍生物，如PGV-20229，它不仅具有COX/5-LOX双重抑制活性，还有优良的胃肠道安全性。



（4） 噻吩类[[39](#_bookmark33)]



RWJ-63556是强效的口服COX/5-LOX双重抑制剂[[40](#_bookmark33)]，其结构也尼美舒利相似，在卡拉胶诱导的炎症模型中显示出明显的抗炎活性。

RWJ-63556

（5）NSAIDs衍生物

这类化合物，通过改变COX抑制剂的某个基团，不但能改变COX的抑制活性，还能增强5-LOX的抑制活性。

吲哚美辛的衍生物：



氟芬那酸的衍生物：



除了上述几类NSAIDs外，IL-1阻断剂[[41](#_bookmark33)]、PLA2抑制剂[[42](#_bookmark33)]、NO供体型NDAIDs[[43](#_bookmark33)]

也是研究开发高效低毒NSAIDs的热点领域。

参考文献

[1]. Lieb J. Antidepressants, eicosanoids and the prevention and treatment of cancer. A review. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2001, 65: 233-239.

[2]. Samuelsson B. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. Drugs, 1987, 33 Suppl 1: 2-9.

[3]. Vane J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. Drugs, 1987, 33 Suppl 1: 18-27.

[4]. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature, 1980, 286: 264-265.

[5]. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. Pharmacological Reviews, 1980, 32: 1-46.

[6]. Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. Eur J Med Chem, 2003, 38: 645-659.

[7]. Gaddi A, Cicero AF, Pedro EJ. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX) /cycloxigenase (COX) inhibition concept. Arch Gerontol Geriatr, 2004, 38: 201-212.

[8]. 刘武昆, 周金培. 非甾体抗炎药环氧化酶/5-脂氧化酶双重抑制剂的研究进展. 药学进展, 2007: 64-67.

[9]. Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease: a reappraisal. Arthritis Rheum, 2003, 48: 12-20.

[10]. Cryer B. NSAID gastrointestinal toxicity. Curr Opin Gastroenterol, 2000, 16: 495-502. [11]. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. Eur J Med Chem, 2001, 36: 109-126.

[12]. Needleman P, Isakson P. The discovery and function of COX-2. The Journal of rheumatology. Supplement, 1997, 49: 6.

[13]. Gans KR, Galbraith W, Roman RJ, Haber SB, Kerr JS, Schmidt WK, et al.

Anti-inflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin

Synthesis inhibitor. J Pharmacol Exp Ther, 1990, 254:180-187.

[14]. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 7563-7568.

[15]. Shah AA, Murray FE, Fitzgerald DJ. The in vivo assessment of nimesulide cyclooxygenase-2 selectivity. Rheumatology (Oxford), 1999, 38 Suppl 1: 19-23.

[16]. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Drugs, 1997, 53: 563-582.

[17]. Otterness IG, Moore PF. Carrageenan foot edema test. Methods Enzymol, 1988, 162: 320-327.

[18]. Chan C, Boyce S, Bridea C. Rofecoxib: A potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor–pharmalogical and biolchemical profiles. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290: 551-560.

[19]. Reitz DB, Li JJ, Norton MB, Reinhard EJ, Collins JT, Anderson GD, et al. Selective cyclooxygenase inhibitors: novel 1, 2-diarylcyclopentenes are potent and orally active COX-2 inhibitors. J Med Chem, 1994, 37: 3878-3881.

[20]. Black W, Bayly C, Belley M, Chan C-C, Charleson S, Denis D, et al. From indomethacin to a selective COX-2 inhibitor: development of indolalkanoic acids as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6: 725-730.

[21]. Leblanc Y, Black W, Chan C, Charleson S, Delorme D, Denis D, et al. Synthesis and biological evaluation of both enantiomers of L-761, 000 as inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6: 731-736.

[22]. Song Y, Connor DT, Doubleday R, Sorenson RJ, Sercel AD, Unangst PC, et al. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and in Vivo Evaluations of SubstitutedDi-tert-butylphenols as a Novel Class of Potent, Selective, and Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitors. 1. Thiazolone and Oxazolone Series 1. J Med Chem, 1999, 42: 1151-1160.

[23]. Inagaki M, Tsuri T, Jyoyama H, Ono T, Yamada K, Kobayashi M, et al. Novel antiarthritic

Agents with 1, 2-isothiazolidine-1, 1-dioxide (γ-sultam) skeleton: cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. J Med Chem, 2000,

43:2040-2048.

[24]. Abdel-Megeed AM, Abdel-Rahman HM, Alkaramany G-ES, El-Gendy MA. Design, synthesis and molecular modeling study of acylated 1, 2, 4-triazole-3-acetates with potential anti-inflammatory activity. Eur J Med Chem, 2009, 44: 117-123.

[25]. Rathish I, Javed K, Ahmad S, Bano S, Alam M, Pillai K, et al. Synthesis and antiinflammatory activity of some new 1, 3, 5-trisubstituted pyrazolines bearing benzene sulfonamide. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 255-258.

[26]. Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber A-A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. Molecular pharmacology, 1998, 54: 536-540.

[27]. McAdam B, Catella-Lawson F, Mardini I, Kapoor S, Lawson J, FitzGerald G. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX) -2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96: 272-277.

[28]. Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. FEBS Lett, 1996, 390: 165-169.

[29]. Moore RA, Derry S, Phillips CJ, McQuay HJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyxlooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice. BMC musculoskeletal disorders, 2006, 7: 79.

[30]. Julemont F, Dogne JM, Pirotte B, de Leval X. Recent development in the field of dual COX / 5-LOX inhibitors. Mini Rev Med Chem, 2004, 4: 633-638.

[31]. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. Annu Rev Med, 2001, 52: 1-14.

[32]. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7663-7667.

[33]. Werz O, Steinhilber D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. Pharmacol Ther,

2006, 112:701-718.

[34]. 李海涛, 仲伯华. 环氧合酶/5-脂氧合酶双重抑制剂的研究进展. International Journal of Pharmaceutical Research, 2007, 34.

[35]. Hawkey C, Dube L, Rountree L, Linnen P, Lancaster J. A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. The European Zileuton Study Group For Ulcerative Colitis. Gastroenterology, 1997, 112: 718.

[36]. Algate D, Augustin J, Atterson P, Beard D, Jobling C, Laufer S, et al. General pharmacology of [2, 2-dimethyl-6-(4-chlorophenyl) -7-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrrolizine-5-yl] -acetic acid in experimental animals. Arzneimittelforschung, 1995, 45: 159.

[37]. Janusz JM, Young PA, Ridgeway JM, Scherz MW, Enzweiler K, Wu LI, et al. New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 1. 7-tert-Butyl-2, 3-dihydro-3,

3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: discovery and variation of the 5-keto substituent. J Med Chem, 1998,

41:1112-1123.

[38]. Zheng M, Zhang Z, Zhu W, Liu H, Luo X, Chen K, et al. Essential structural profile of a dual functional inhibitor against cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX): molecular docking and 3D-QSAR analyses on DHDMBF analogues. Bioorganic & medicinal chemistry, 2006, 14: 3428-3437.

[39]. Beers SA, Malloy EA, Wu W, Wachter M, Ansell J, Singer M, et al. <i> N </i> -(5-substituted) thiophene-2-alkylsulfonamides as potent inhibitors of 5-lipoxygenase. Bioorganic & medicinal chemistry, 1997, 5: 779-786.

[40]. Kirchner T, Argentieri D, Barbone A, Singer M, Steber M, Ansell J, et al. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997, 282: 1094-1101.

[41]. Higgs G, Moncada S. Leukotrienes in Disease. Drugs, 1985, 30: 1-5. [42]. Friebe W-G. Phospholipase A2 inhibitors in development. Expert opinion oninvestigational drugs, 1997, 6: 279-298.

[43]. 李瑞文, 张奕华. 一氧化氮供体型非甾体抗火药的研究. 药学进展, 2000, 24: 145-148.

附 **录**

硕士期间发表的文章

1.卢武林，罗红军，李慧，罗文鸿.黑面神提取物对酪氨酸酶的抑制动力学.汕头大学医学院院报，2011, 24（4）.

致 **谢**

时光荏苒，不觉三年。回忆点滴，感慨万千。于此，谨向帮助过我的人表示感谢！首先要衷心感谢我尊敬的导师罗文鸿教授！本实验是在罗老师的精心指导下完成的。

感谢罗老师三年来对我学习、生活上无微不至的关怀和帮助。恩师严谨的治学态度、敏锐的学术思想、求真务实的科研作风及光明磊落的人格魅力对我影响深远，为我树立了一辈子学习的典范，将激励我一生。师恩似海，毕生难忘！

特别感谢郑锦鸿教授提供实验平台及在实验技术上的真诚帮助，实验的顺利完成离不开郑老师的无私帮助。

特别感谢李慧老师三年来在实验上的指导及生活上的照顾。李老师不仅在实验给予细微的指导和帮助，还为我们营造了优良学习环境及和谐的实验室氛围。

特别感谢张源老师、林哲绚师姐、罗红军师兄在实验技术和科研方面的帮助和指导，感谢同学刘海凤、陈侨在实验过程的鼎力支持与帮助，面对永无止境的纠缠，谢谢你们三年来不厌其烦的忍耐和包容。

感谢师姐李蕊、王锦芝、刘燕英、曾英、叶婷君，师兄彭建华、殷秀凯、王钦荣，师弟师妹林芸、张琼丽、谢树鑫给予我科研工作方面的鼓励和支持，生活方面的关心和帮助。

感谢我的家人，是他们默默的关爱和支持给予我继续前进的动力！谢谢！