

苯并噻唑功能化的金属螯合剂的合成及生物活性

孙 斌^{*,1,2} 王江淋^{1,2}

(¹重庆高校天然药物研究重点实验室, 重庆 400067)

(²重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067)

摘要: 设计、合成了2种苯并噻唑功能化的金属螯合剂:*N,N'*-双(水杨醛)缩-2,2'-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺 L1 和 *N,N'*-双(水杨醛)缩-2,2'-(4-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺 L2。并通过比浊度分析、BCA 实验、HRP/Amplex Red 实验以及 MTT 实验检测它们的生物活性。发现这2种螯合剂都能有效抑制金属离子(Zn^{2+} 、 Cu^{2+})诱导的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的聚集,能大幅减少 $\text{Cu-A}\beta$ 加合物产生 H_2O_2 的量,有效抑制 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 诱导 $\text{A}\beta$ 聚集而产生的神经细胞毒性,并大幅提高细胞存活率。作为比较,对非苯并噻唑功能化但螯合部位相同的螯合剂做了相同的生物活性测试,但其生物活性明显比苯并噻唑功能化的金属螯合剂的低。

关键词: 合成; 阿尔茨海默病; 苯并噻唑功能化; 金属螯合剂; 抗氧化

中图分类号: O614.121; O614.24*1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2020)07-1275-08

DOI: 10.11862/CJIC.2020.158

Benzothiazole Functionalized Metal Chelators: Synthesis and Bioactivities

SUN Bin^{*,1,2} WANG Jiang-Lin^{1,2}

(¹Key Laboratory of Natural Medicine Research of Chongqing Education Commission, Chongqing 400067, China)

(²College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: Two benzothiazole modified metal chelators (*N,N'*-bis (salicylaldehyde)-2,2'-(3-(benzo[d]-thiazol-2-yl)-1,2-phenylene-dioxyethyldiamine (L1), *N,N'*-bis (salicylaldehyde)-2,2'-(4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-1,2-phenylene-dioxyethyldiamine (L2) were designed and synthesized. The biological activities of chelators were determined by Turbidity Assay, BCA Protein Assay, HRP/Amplex Red Assay and MTT Assay. The results show that these two chelators could effectively prevent aggregation of $\text{A}\beta_{1-40}$ induced by metal ion (such as Zn^{2+} , Cu^{2+}), dramatically reduce the product of H_2O_2 which caused by Cu^{2+} - $\text{A}\beta$ species, and inhibit $\text{A}\beta$ aggregation mediated cytotoxicity on PC12 cells. The same assays were carried out for non-benzothiazole functionalized analogue. The non-specific chelator also has above bioactivities, however, its effect was far less than that of the benzothiazole functionalized varieties.

Keywords: synthesis; Alzheimer's disease; benzothiazole functionalized; metal chelator; antioxidant

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的与年龄相关的老年性疾病,截止到2016年,全球约有4 600万人患有这种老年性疾病^[1]。迄今为止,还没有真正意义上的治疗AD的方法,其诊断的高准确性来自于对因该病致死患者脑部的尸检。AD最典型的病理特征是神经细胞外的淀粉样斑块

(amyloid plaques, AP)和细胞内的神经缠结(neurofibrillary tangles, NFT)^[2]。AP的主要成分是 β -淀粉样肽(β amyloid peptide, $\text{A}\beta$)^[3]。 $\text{A}\beta$ 的主要异形体是分别由42和40个氨基酸残基组成的肽 $\text{A}\beta_{1-42}$ 和 $\text{A}\beta_{1-40}$ ^[4-5]。 $\text{A}\beta_{1-40}$ 在大脑中含量较高,但 $\text{A}\beta_{1-42}$ 则具有更大的神经毒性、并且更具聚集倾向。根据 $\text{A}\beta$ 级联

收稿日期: 2019-11-25。收修改稿日期: 2020-02-14。

重庆工商大学重点研究项目(No.1352002)和重庆高校市级重点实验室开放课题(No.CQCM-2016-09)资助。

*通信联系人。E-mail: sunbin@ctbu.edu.cn

假说, $A\beta$ 的过度产生与积聚促进 $A\beta$ 寡聚物、原纤维以及最终导致神经变性的纤维生成。然而,近期研究显示,可溶性 $A\beta$ 寡聚物可能更具神经毒性,可能会导致AD患者以及AD动物模型中的触突功能障碍与记忆丧失^[6-9]。在这方面,由于缺乏对各种 $A\beta$ 聚集形态的神经毒性作用的全面了解,20多年来,基于 $A\beta$ 级联假说研发的治疗AD的药物都遭到失败。

在AD患者大脑淀粉样斑块中,发现有高浓度的铜($394\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、锌($1\ 055\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和铁($940\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),研究表明金属离子能与 $A\beta$ 相互作用并促使淀粉样斑块的形成^[10-13]。这些金属离子不仅加速了 $A\beta$ 聚集,而且具有氧化-还原活性的金属(如铜、铁)还会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成与氧化应激^[14-18]。鉴于 $A\beta$ 与过渡金属离子的相互作用,一些体外实验研究发现金属螯合剂能降低金属-介导的 $A\beta$ 聚集、减少ROS的生成、降低神经毒性^[19-22]。有几种螯合剂如去铁胺(desferrioxamine, DFO)、DP-109、氯碘羟喹(clioquinol, CQ)等(图1)已被评估在转基因小白鼠试验中取得成功^[23-25]。这些螯合剂除螯合金属离子外,还能设计成具有抗氧化性

能的自由基清除剂。因此金属螯合剂疗法可能是一种有前途的AD治疗策略。尽管像CQ这样的螯合剂能有效抑制 $A\beta$ 聚集并改善认知,但是CQ不会与 $A\beta$ -金属选择性地相互作用,会出现副作用,这可能会限制其长期的临床应用。现有的研究表明,对 $A\beta$ 具有强亲和力的配体更能有效地阻止 $A\beta$ 聚集和抑制 $A\beta$ 的神经毒性。使用多重同时作用来增强靶点结合亲和力及特异性是生物学中的重要概念且用途广泛。相比较非特异性螯合剂,能识别 $A\beta$ 的配体显示出了更强的阻止纤维状 $A\beta$ 形成的能力^[26-27]。

众所周知,苯并噻唑经适当修饰后与 β -淀粉样斑块有良好的结合性,是某些 β -淀粉样蛋白的显像剂的重要组成部分。曲晓刚教授的研究表明,苯并噻唑修饰的螯合剂能有效抑制铜离子诱导的 $A\beta$ 聚集,并能将聚合的 $A\beta$ -Cu加合物中的Cu螯合出来,使聚集的 $A\beta$ 解聚^[28]。因此我们设计合成了2种苯并噻唑修饰的螯合剂(L1、L2,图2),研究了它们抑制金属离子诱导的 $A\beta$ 聚集,对其控制 $A\beta$ -Cu产生 H_2O_2 的量以及缓解 $A\beta$ 聚集产生的神经毒性等生物活性进行研究,并与螯合部位结构相同但没有苯并噻唑功能化的螯合剂(L3)进行了对比。

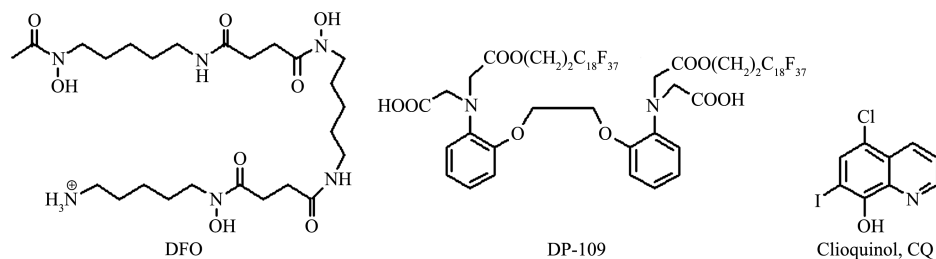


图1 几种重要的治疗AD的金属螯合剂

Fig.1 Several important chelators for AD therapy

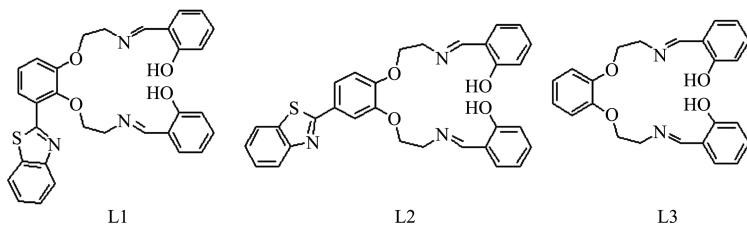


图2 能识别 $A\beta$ 的金属螯合剂的结构

Fig.2 Structure of metal chelators with function of recognizing $A\beta$

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

所有试剂都是从试剂公司购买,如未特别指

明,使用前所有试剂都未进行特别处理。螯合剂L3是已知化合物,由本实验室按文献^[29]方法自制。反应进程由薄层层析监控,斑点用紫外灯或含有Ce(NH_4)₂(NO₃)₆(0.5 g)和(NH_4)₆Mo₇O₂₄·4H₂O(24.0 g)的6% H_2SO_4 (500 mL)的黄色溶液显色。反应产物的核

磁共振氢谱由 Varian mercury plus 400 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标)测定,ESI 质谱由 Q-TOF Ultima API LC-MS 液-质联用仪分析确定。

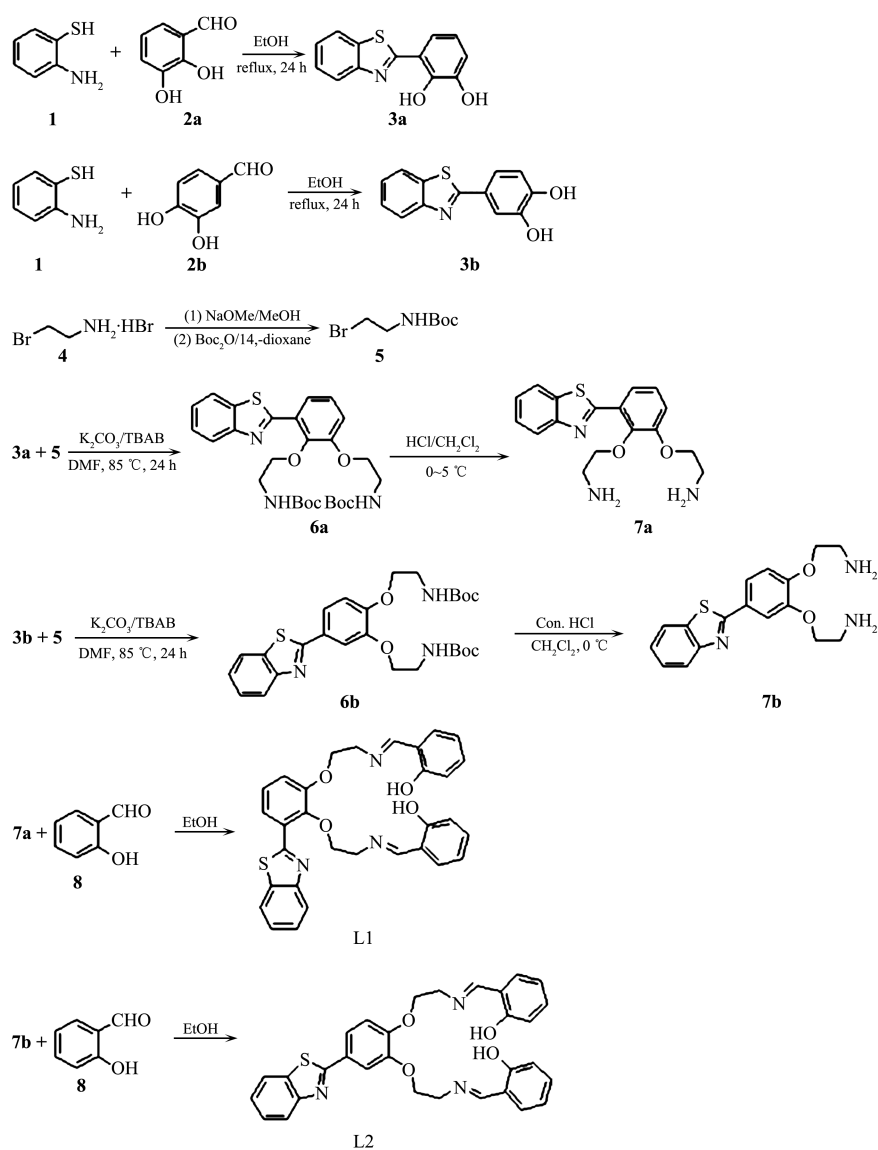
$A\beta$ 储备液是将 $A\beta_{1-40}$ (人)(2 mg)溶于氢氧化钠(500 μL , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),经超声处理 30 s 后,用超纯水(1.5 L)稀释,再超声处理 30 s 后,用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸调 pH 值到 7.4,用 0.22 μm 的滤器(Millipore)过滤, $A\beta$ 储备液浓度由 BCA 蛋白试验测定后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 以 pH=7.4 的 HEPES(2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid)缓冲液配制)分别用 Aldrich 原子吸收标准溶液配制。螯合剂 L1, L2 和 L3 分别溶于 DMSO 中配成最终浓度为 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。实验所用水均

为蒸馏去离子水用超滤膜过滤所得,所用仪器还有 TECAN 多功能酶标仪(瑞典)。

1.2 合成

螯合剂按 Scheme 1 合成。

3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯二酚(**3a**): 2-氨基苯硫酚(**1**)(2.5 g, 20 mmol)与 2,3-二羟基苯甲醛与无水乙醇(40 mL)混合,回流搅拌 24 h。冷却后,有大量固体出现,过滤,滤饼用冷乙醇洗涤 2 次后,用乙酸乙酯重结晶得到 **3a**(3.65 g, 75%)。 ^1H NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.66(s, br, 1 H, OH), 9.44(s, br, 1 H, OH), 8.30(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.93(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.50(d, $J=1.6$ Hz, 1 H), 7.46(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.39~7.33(m, 2 H), 6.86(d, $J=8.2$ Hz, 1 H)。 ^{13}C NMR



Scheme 1 Synthesis of the chelators

(100 MHz, DMSO- d_6): δ 168.0, 151.1, 149.4, 146.2, 134.5, 126.8, 125.3, 122.7, 122.5, 119.9, 116.6, 114.4。ESI-HRMS: $C_{13}H_9NO_2SNa$ $[M+Na]^+$, 理论值 266.025 2, 实验值 266.026 6。

4-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯二酚(**3b**): **3b**的合成方法与**3a**相同(3.84 g, 79%)。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.5(s, br, 1 H, OH), 9.67(s, br, 1 H, OH), 8.11(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 8.03(d, $J=8.2$ Hz, 1 H), 7.55~7.48(m, 2 H), 7.42(t, $J=7.8$ Hz, 1 H), 6.95(dd, $J=7.8$, 1.2 Hz, 1 H), 6.81(t, $J=8.2$ Hz, 1 H)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6): δ 166.9, 151.8, 146.7, 146.1, 134.2, 127.0, 125.6, 122.5, 120.0, 118.9, 118.7, 118.3。ESI-HRMS: $C_{13}H_{10}NO_2S$ $[M+H]^+$, 理论值 244.043 2, 实测值 244.044 4。

Boc保护的2-溴乙胺(**5**): 2-溴乙胺氢溴酸盐(**4**) (8.2 g, 40 mmol)溶于干燥的甲醇(40 mL)中,向溶液中加入甲醇钠(2.16 g, 40 mmol),室温搅拌30 min后,加入1,4-二氧六环(120 mL)和二碳酸二叔丁酯(6.96 g, 40 mmol)以及三乙胺(4.04 g, 40 mmol)。混合物在室温下继续搅拌2 h。滤去溴化钠,旋干,残余物溶于二氯甲烷(600 mL),水洗3次。有机相经无水硫酸钠干燥后,旋干,残余物经硅胶柱色谱($V_{EtOAc}:V_{hexane}=1:3$)纯化后得到**5**(7.62 g, 85%)。

Boc保护的2,2'-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺(**6a**): 化合物**3a**(2.43 g, 10 mmol)与化合物**5**(4.28 g, 20 mmol)溶于DMF(40 mL)中,向溶液中加入 K_2CO_3 (2.76, 20 mmol)与四丁基溴化铵(1.61 g, 5 mmol)。混合物在85℃下搅拌24 h。滤去固体物后,滤液用乙酸乙酯(200 mL)稀释。用饱和食盐水洗涤3次,有机相经无水硫酸钠干燥后,旋干,残余物经硅胶柱色谱($V_{EtOAc}:V_{hexane}=1:3$)纯化得**6a**(3.87 g, 73%)。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.07(d, $J=5.4$ Hz, 1 H), 8.04(d, $J=5.4$ Hz, 1 H), 7.93(d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 7.51(t, $J=5.4$ Hz, 1 H), 7.43(t, $J=5.4$ Hz, 1 H), 7.24~7.14(m, 2 H), 7.01(s, br, 1 H, NH), 6.92(s, br, 1 H, NH), 4.15(t, $J=4.0$ Hz, 2 H), 4.05(t, $J=3.6$ Hz, 2 H), 3.45~3.35(m, 4 H), 1.36(s, 9 H), 1.33(s, 9 H)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6): δ 170.7, 162.7, 156.1, 156.0, 152.1, 146.4, 136.0, 126.73, 126.70, 125.7, 124.7, 123.1, 122.2, 120.7, 116.5, 78.2, 71.8, 68.0, 60.2, 40.1, 28.7。ESI-HRMS: $C_{27}H_{35}N_3O_6SNa$ $[M+Na]^+$, 理论值 552.214 4, 实验值 552.216 8。

Boc保护的2,2'-(4-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯

基)二氧乙基二胺(**6b**): **6b**的合成方法与**6a**相同(4.08, 77%)。 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10(d, $J=8.2$ Hz, 1 H), 7.86(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.73(s, 1 H), 7.65~7.56(m, 1 H), 7.46(t, $J=5.4$ Hz, 1 H), 7.35(t, $J=7.6$ Hz, 1 H), 6.98(d, $J=8.2$ Hz, 1 H), 5.28(s, br, 2 H, 2 NH), 4.19(t, $J=4.6$ Hz, 2 H), 4.12(t, $J=5.2$ Hz, 2 H), 3.51(s, 4 H), 1.45(s, 18 H)。 ^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$): δ 167.4, 146.2, 154.1, 134.9, 132.8, 127.6, 126.3, 125.0, 124.8, 122.9, 122.1, 121.5, 119.7, 94.0, 82.4, 79.7, 69.6, 69.1, 40.1, 28.4。ESI-HRMS: $C_{27}H_{35}N_3O_6SNa$ $[M+Na]^+$, 理论值 552.214 4, 实验值 552.212 8。

2,2'-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺(**7a**): 化合物**6a**(2.65 g, 5 mmol)溶于二氯甲烷(15 mL),冷却至0℃,在此温度和搅拌下,滴加浓盐酸(4.1 mL),完毕后继续搅拌20 min,过滤,滤饼用蒸馏水溶解后,用1 mol·L⁻¹的NaOH溶液调pH值到9~10。用二氯甲烷萃取该混合物,有机相用饱和食盐水洗涤3次,经无水硫酸钠干燥后旋干,得**7a**(1.45 g, 88%)。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.11(d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 8.03(d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 7.93(d, $J=2.8$ Hz, 1 H), 7.51(t, $J=4.8$ Hz, 1 H), 7.43(t, $J=4.8$ Hz, 1 H), 7.22(s, 2 H), 4.12(s, 2 H), 4.04(s, 2 H), 3.04(s, 2 H), 2.98(s, 2 H)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6): δ 162.2, 152.4, 152.1, 146.7, 135.9, 126.8, 125.7, 124.8, 123.0, 122.4, 120.4, 116.5, 75.3, 70.9, 55.3, 42.0, 41.1。ESI-HRMS: $C_{17}H_{20}N_3O_2S$ $[M+H]^+$, 理论值 330.127 6, 实验值 330.126 0。

2,2'-(4-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺(**7b**): **7b**的合成方法与**7a**相同(1.43 g, 87%)。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.06(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.99(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.64(d, $J=1.5$ Hz, 1 H), 7.57(dd, $J=8.2$, 1.5 Hz, 1 H), 7.49(t, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.39(t, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.10(d, $J=8.2$ Hz, 1 H), 4.05~3.95(m, 4 H), 2.94~2.85(m, 4 H)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6): δ 167.6, 154.0, 151.9, 149.2, 134.7, 127.0, 126.2, 125.6, 122.9, 122.6, 121.6, 114.2, 112.2, 72.0, 71.7, 41.4, 41.0。ESI-HRMS: $C_{17}H_{20}N_3O_2S$ $[M+H]^+$, 理论值 330.127 6, 实验值 330.129 0。

N,N'-双(水杨醛)缩-2,2'-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1,2-苯基)二氧乙基二胺(L1): 化合物**7a**(0.66 g, 2 mmol)溶于无水乙醇(10 mL)中,向溶液中加入水杨醛(0.488 g, 4 mmol)。反应混合物在室温下搅拌2 h,得大量黄色结晶,过滤,滤饼用冷乙醇洗涤3次,真

空干燥得产物 L1 (0.91 g, 85%)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.47(s, br, 1 H, OH), 13.36(s, br, 1 H, OH), 8.67(s, 1 H, CH=N), 8.47(s, 1 H, CH=N), 7.97(d, $J=5.2$ Hz, 1 H), 7.94(d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 7.72(d, $J=5.2$ Hz, 1 H), 7.48~7.43(m, 2 H), 7.38~7.27(m, 5 H), 7.23~7.19(m, 1 H), 6.94~6.87(m, 4), 4.39(t, $J=3.0$ Hz, 2 H), 4.33(t, $J=3.0$ Hz, 2 H), 4.03(t, $J=3.0$ Hz, 2 H), 3.87(t, $J=3.0$ Hz, 2 H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 167.74, 167.70, 162.4, 161.1, 161.0, 152.2, 146.1, 136.8, 135.9, 132.93, 132.85, 132.2, 129.6, 126.7, 125.6, 123.0, 121.9, 120.6, 119.9, 119.1, 117.7, 117.0, 116.9, 116.5, 72.1, 68.6, 59.8, 58.2。 ESI-HRMS: $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 理论值 560.162 0, 实验值 560.164 4。

N, N' -双(水杨醛)缩-2, 2'-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-1, 2-苯基)二氧乙基二胺(L2): L2 的合成方法与 L1 相同 (0.85 g, 79%)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.35(s, br, 1 H, OH), 13.32(s, br, 1 H, OH), 8.52(s, 2 H, 2 CH=N), 8.03(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.98(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.64(s, 1 H), 7.60~7.55(m, 1 H), 7.48(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 7.42~7.34(m, 3 H), 7.29(t, $J=7.8$ Hz, 2 H), 7.16~7.09(m, 1 H), 6.89~6.81(m, 4 H), 4.35~4.24(m, 4 H), 3.87(s, 4 H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 167.8, 161.0, 154.0, 151.6, 148.9, 134.8, 132.1, 126.9, 126.6, 125.6, 123.0, 122.6, 121.9, 119.1, 119.0, 118.96, 117.0, 114.9, 113.2, 69.0, 68.6, 58.0, 57.9。 ESI-HRMS: $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 理论值 560.162 0, 实验值 560.159 8。

1.3 生物活性测试

1.3.1 $\text{A}\beta$ 比浊度测定

在 198 μL 的 HEPES 缓冲溶液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH}=7.4$) 中加入 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的锌离子或铜离子, 在室温下反应 5 min 后, 加入 2 μL 的 L1、L2 以及 L3 的 DMSO 储备液, 使螯合剂在样品溶液中的浓度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DMSO 含量 1%。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h, 每个样品溶液分别移至 96 孔板的一个孔中, 样品溶液的浊度通过 405 nm 处的吸光度获得。相同条件下, 以 $\text{A}\beta_{1-40}$ 溶液作对照, 相同实验做 3 组, 以计算误差。

1.3.2 Bicinchoninic acid (BCA) 蛋白测定

样品的配制方法与 1.3 节中的相同, 但 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 金属离子的浓度与 $\text{A}\beta_{1-40}$ 相同, 每个含有 Zn^{2+} (或 Cu^{2+}) 的样品准备 12 份, 样品溶

液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 48 h 后, 只含 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的样品和从含有 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 的样品中取出 3 份, 在 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下高速离心 20 min。取出上层清液用 Micro BCA protein Assay Kit 测定蛋白浓度。另外剩下的 9 份 Zn^{2+} (或 Cu^{2+}) 的样品分成 3 组, 分别加入与金属等物质的量的螯合剂 L1 和 L2 以及 L3, 然后再在 37 $^{\circ}\text{C}$ 并不断摇动下孵育 24 h, 样品在 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下高速离心 20 min。取出上层清液用 Micro BCA protein Assay Kit 测定蛋白浓度。相同实验做 3 组, 以计算误差。

1.3.3 H_2O_2 的测定

H_2O_2 的测定由 HRP/Amplex Red 实验完成。将试剂按以下次序加入到 96 孔板中, 使其体积为 100 μL , 样品溶液中含有 $\text{A}\beta_{1-40}$ (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和铜离子 (0.2 或 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及螯合剂 L1、L2、L3 (0.2 或 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、抗坏血酸 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 用只含有 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和铜离子的溶液作为对照组。样品在室温下孵育 30 min 后, 向每个孔中加入 50 μL 新配制的工作液, 其中含有 0.1 μL 的 Amplex Red (Sigma-Aldrich) 和 0.2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP (Sigma-Aldrich), 继续在室温下孵育 30 min, 荧光光谱用一台瑞典生产的 TECAN 多功能酶标仪 ($\lambda_{\text{ex}}=530$ nm, $\lambda_{\text{em}}=590$ nm) 测得。相同实验做 3 组, 以计算误差。

1.3.4 MTT 实验分析细胞毒性

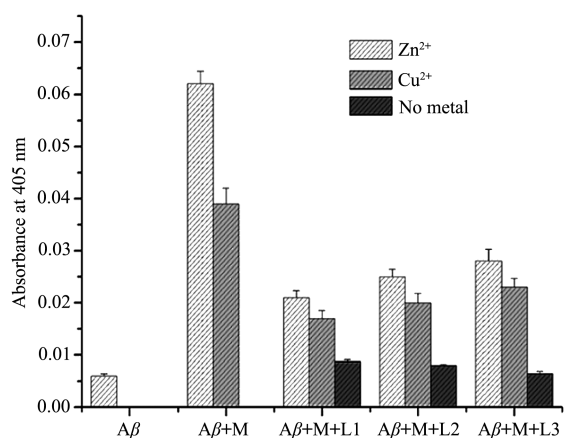
PC12 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% (CO₂) 培养箱中培养。细胞毒性检测时, 将对数生长期的 PC12 细胞接种于 12 孔板中, 孵育过夜后, 将实验分为正常细胞对照组、 $\text{A}\beta_{1-40}$ - M^{2+} (Zn^{2+} , Cu^{2+}) 组、 $\text{A}\beta_{1-40}$ - M^{2+} (Zn^{2+} , Cu^{2+})+不同待测螯合剂 (L1, L2, L3) 组, 按照分组, 分别加入不同浓度的待测样品 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铜离子继续孵育 48 h 后, 加入终浓度为 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。最后去掉上清液, 用 DMSO 室温裂解细胞, 溶解甲臞盐, 然后在酶标仪 570 nm 处检测吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 抑制 $\text{A}\beta$ 聚集

已有的研究表明, 金属离子如 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等都能促进 $\text{A}\beta$ 聚集, 而金属螯合剂则能阻止或减弱这种聚集作用^[30-31]。本实验通过 $\text{A}\beta$ 比浊度分析来检测螯合剂 L1 和 L2 在金属离子 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+}) 诱导的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 聚集的干预作用, 结果见图 3。

图3结果显示,在没有金属离子和螯合剂存在下, $A\beta_{1-40}$ 聚集很低,在405 nm的吸光度只有0.006,而有螯合剂(L1、L2、L3)存在,没有金属离子时,与纯的 $A\beta_{1-40}$ 相比,吸光度稍有变化,但都小于0.009。当有 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 存在时,样品溶液的比浊度大幅增加,吸光度分别达到0.062和0.039,这与文献报道的在pH=7.4条件下 Zn^{2+} 比 Cu^{2+} 更能促进 $A\beta$ 聚集的结果相符^[24]。螯合剂L1和L2虽然不能完全抑制 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 诱导的 $A\beta_{1-40}$ 聚集,但抑制效果非常显著。L1和L2分别使含锌的样品吸光度下降到0.021和0.025;分别使含铜的样品吸光度下降到0.017和0.020。不含苯并噻唑而螯合部位相同的螯合剂L3虽然也能



$c_{A\beta}:c_M:c_L=1:2:2$, $c_{A\beta}:c_L=1:2$; Error bars represent the standard deviation of 3 parallel experiments

图3 抑制 $A\beta$ 聚集实验中,螯合剂、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 $A\beta_{1-40}$ ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在37℃、pH 7.4的缓冲溶液中孵育24 h后样品溶液的比浊度(A_{405})

Fig.3 Turbidity (absorbance at 405 nm) of $A\beta_{1-40}$ ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) solutions without or with Zn^{2+} , Cu^{2+} ion in the absence and presence of chelators after incubation at 37 °C and pH 7.4 for 24 h

抑制 $A\beta_{1-40}$ 聚集,但其效果比L1和L2差。

考察螯合剂对 $A\beta_{1-40}$ 聚集的抑制作用,也可用micro bicinchoninic acid(BCA)蛋白标定试剂盒测试法测定样品溶液上层清液中可溶性的 $A\beta$ 百分含量来实现。测量可溶性的 $A\beta$ 百分含量时样品的配制方法与比浊度分析相同,但可溶的 $A\beta$ 以及相应的金属离子和螯合剂浓度都是比浊度分析时的5倍。结果见图4。

在没有金属离子存在下,无论样品中是否含有螯合剂,游离的 $A\beta$ 百分含量是93%左右,但是在

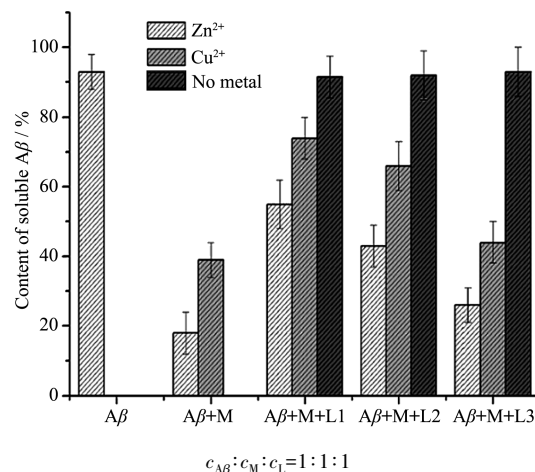


图4 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 $A\beta_{1-40}$ ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在37℃、pH 7.4下孵育24 h后,再加入螯合剂在相同条件下又共同孵育24 h后,上层清液中 $A\beta$ 的百分含量

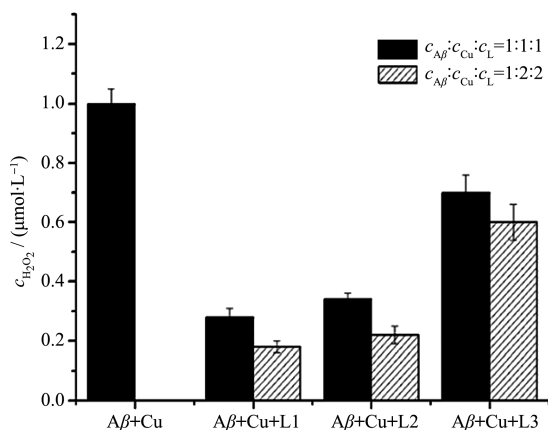
Fig.4 Percentage of soluble $A\beta_{1-40}$ after Zn^{2+} , Cu^{2+} and $A\beta_{1-40}$ ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) incubated at 37 °C, pH 7.4 for 24 h, then the mixture with chelator incubated under same conditions for 24 h

Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 存在,没有螯合剂存在时,其可溶性 $A\beta$ 百分含量分别下降到18%和46%。当 $A\beta$ 与金属离子的样品在37℃下孵育48 h后,再加入螯合剂又共同孵育24 h后,含有所合成的螯合剂L1和L2的样品上层清液中可溶性 $A\beta$ 的百分含量显著增加,L1和L2分别使含锌离子的上层清液中可溶性 $A\beta$ 的百分含量上升到55%和43%;分别使含铜离子的上层清液中可溶性 $A\beta$ 的百分含量上升到74%和66%。而当螯合剂是L3时,可溶性 $A\beta$ 的百分含量也有一定程度增加,但增幅不大,使含锌或铜离子的上层清液中可溶性 $A\beta$ 的百分含量分别上升到26%和44%。这可能是含有苯并噻唑的螯合剂能识别 $A\beta$,与 $A\beta$ -M加合物相互作用,从而将金属离子从 $A\beta$ -M加合物中螯合出来,促使聚合的 $A\beta$ 解聚^[28],而L3因不能识别 $A\beta$,不能很好地与 $A\beta$ -M加合物相互作用,因此其促使聚合的 $A\beta$ 解聚的作用并不明显。

2.2 控制 $A\beta$ -Cu的 H_2O_2 产物形成

$A\beta$ 肽与具有氧化-还原活性的金属离子(如 Cu^{2+})相互作用会形成活性氧(reactive oxygen species, ROS)(如 H_2O_2)和与 $A\beta$ 神经毒性相联系的氧化应激^[32-33],因此,从理论上讲,具有识别 $A\beta$ 功能的金属螯合剂可以控制活性氧的形成。L1和L2对 $A\beta$ - Cu^{2+} 形成 H_2O_2 的影响用HRP/Amplex Red实验测定。其结果如图5所示。

在还原条件下, Cu^{2+} - $A\beta$ 与氧气作用产生 H_2O_2 ,



$c_{A\beta}=0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{Cu}=0.2$ or $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c_{L1} , c_{L2} and $c_{L3}=0.2$ or $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{ascorbate}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{Amplex-Red}}=50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{HRP}}=0.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}=530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$

图5 Amplex Red分析中在Aβ、Cu²⁺、螯合剂、抗坏血酸钠存在下产生的标准过氧化氢的量

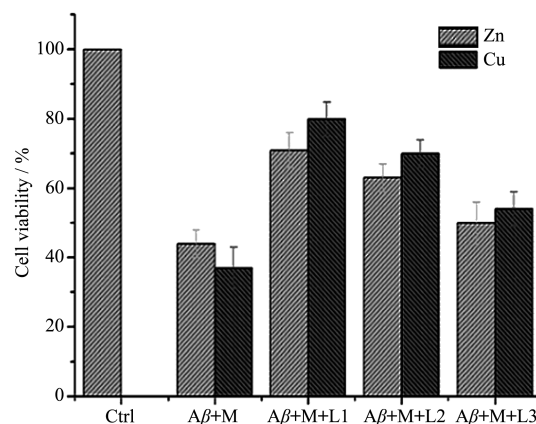
Fig.5 Normalized amounts of H₂O₂ produced in presence of Aβ, Cu, the chelating agent, and sodium ascorbate, as determined by the Amplex-Red assay

加入我们合成的螯合剂L1和L2后,能清除绝大部分(80%以上)由Cu²⁺-Aβ产生的H₂O₂,这说明螯合剂L1和L2能有效控制Aβ-Cu产生H₂O₂的量。而不能识别Aβ的螯合部位相同的螯合剂L3虽然也能使H₂O₂产生量减少,但其作用没有L1和L2明显,只能清除40%左右的H₂O₂。这可能是因为螯合剂L1(或L2)被苯并噻唑功能化后,增强了与Aβ相互作用的能力,从而更易接触Cu²⁺-Aβ加合物,将Cu²⁺从Cu²⁺-Aβ中螯合出来,从而阻止了H₂O₂产生。这与文献报道的结果相符^[34]。

2.3 抑制Aβ诱导的神经毒性

上文的结果表明,螯合剂L1和L2能有效抑制金属Zn²⁺、Cu²⁺诱导的Aβ聚集,同时具有抗氧化能力,因此,我们进一步利用PC12细胞株——一个常用的神经作用细胞株(来源于一种可移植的鼠嗜铬细胞瘤),来检测在细胞水平上,螯合剂L1或L2对Aβ₁₋₄₀聚集造成的神经细胞活力损伤的保护作用下由单体到聚合体进程变化,结果见图6。

图6的结果表明,当10 μmol·L⁻¹的Aβ₁₋₄₀与20 μmol·L⁻¹的Zn²⁺作用PC12细胞48 h后,PC12细胞存活率下降到44%;而10 μmol·L⁻¹的Aβ₁₋₄₀与20 μmol·L⁻¹的Cu²⁺作用PC12细胞48 h后,PC12细胞存活率下降到37%。当10 μmol·L⁻¹的Aβ₁₋₄₀、20 μmol·L⁻¹的Zn²⁺与20 μmol·L⁻¹的螯合剂L1或L2作用PC12细胞48 h后,细胞存活率分别为71%和63%;



$c_{A\beta}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{A\beta}:c_M:c_L=1:2:2$

图6 MTT法测定Aβ₁₋₄₀在金属离子与螯合剂存在与否时对PC12细胞的神经毒性

Fig.6 Neurocytotoxicity of Aβ₁₋₄₀ in the absence or presence of metal ions and chelators toward PC12 cells determined by MTT assay

20 μmol·L⁻¹的螯合剂L1或L2与10 μmol·L⁻¹的Aβ₁₋₄₀、20 μmol·L⁻¹的Cu²⁺作用PC12细胞48 h后,细胞存活率分别提升到80%与70%。螯合剂L3也具有抑制Aβ诱导的神经毒性的作用,但效果比螯合剂L1和L2差,当10 μmol·L⁻¹的Aβ₁₋₄₀、20 μmol·L⁻¹的Zn²⁺或20 μmol·L⁻¹的Cu²⁺与20 μmol·L⁻¹的螯合剂L3作用PC12细胞48 h后,细胞存活率分别提升到50%和54%。实验结果表明,相比较单一功能螯合剂,苯并噻唑功能化的螯合剂L1和L2更能抑制Aβ₁₋₄₀聚集介导的神经毒性并提高细胞存活率。

3 结 论

合成了2种未见文献报道的苯并噻唑功能化的金属螯合剂L1和L2。通过比浊度分析、BCA蛋白测定考察了这2种螯合剂抑制金属Zn²⁺与Cu²⁺诱导的Aβ₁₋₄₀聚集的性能;通过HRP/Amplex Red实验测定了它们控制Cu-Aβ加合物产生H₂O₂的量;通过MTT实验检测其存在与否对金属离子诱导的Aβ₁₋₄₀聚集对PC12细胞神经细胞毒性的影响,并与非苯并噻唑功能化的螯合部位相同的螯合剂进行了比较。发现这2种螯合剂都能有效抑制Zn²⁺与Cu²⁺诱导的Aβ₁₋₄₀聚集;大幅减少Cu-Aβ加合物产生H₂O₂的量;有效抑制Zn²⁺、Cu²⁺诱导Aβ聚集而产生的神经细胞毒性并大幅提高细胞存活率。作为对比,非苯并噻唑功能化但螯合部位相同的螯合剂虽然在相同条件下也有作用,但其活性远低于苯并噻唑功能化的金属螯合剂。这一研究表明,对照单一功能的金属

螯合剂,苯并噻唑功能化的金属螯合剂更有可能成为治疗AD的药物。

Supporting information is available at <http://www.wjhxxb.cn>

参考文献:

- [1] Wang Y Y, Yang Y, Hong K H, et al. *Bioorg. Chem.*, **2019**, **87**:720-727
- [2] Zhang Y W, Thompson R, Zhang H, et al. *Mol. Brain*, **2011**, **4**(3):1-13
- [3] Masters C L, Simms G, Weinman N A, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, **82**(12):4245-4249
- [4] Barage S H, Sonawane K D. *Neuropeptides*, **2015**, **52**:1-18
- [5] Savelieff M G, Lee S, Liu Y, et al. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, **8**(5):856-865
- [6] Lee S J C, Nam E, Lee H J, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, **46**(2):310-323
- [7] Nagel-Steger L, Owan M C, Strodel B. *ChemBioChem*, **2016**, **17**(8):657-676
- [8] Fändrich M. *J. Mol. Biol.*, **2012**, **421**(4/5):427-440
- [9] Kirkitadze M D, Bitan G, Teplow D. *J. Neurosci Res.*, **2002**, **69**(5):567-577
- [10] Lovell M A, Robertson J D, Teesdale W J, et al. *J. Neurol. Sci.*, **1998**, **158**(1):47-52
- [11] Miller L M, Wang Q, Telivala T P, et al. *J. Struct. Biol.*, **2006**, **155**(1):30-37
- [12] Smith M A, Harris P L, Sayre L M, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, **94**(18):9866-9868
- [13] LÜ Xiao-Ping(吕小平), TAN Xiang-Si(谭相石). *Prog. Chem.* (化学进展), **2013**, **25**(4):511-519
- [14] Bush A I, Pettingell W H, Multhaup G, et al. *Science*, **1994**, **265**:1464-1467
- [15] Duce J A, Bush A I, Adlard P A. *Future Neurol.*, **2011**, **6**(5):641-659
- [16] ZHANG Yue(张悦), XIA Qing(夏青), YANG Xiao-Da(杨晓达), et al. *Sci. Sin. Chim.*(中国科学:化学), **2014**, **44**(4):541-554
- [17] Bush A I. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, **4**(2):184-191
- [18] Bush A I. *J. Alzheimers Dis.*, **2008**, **15**(2):223-240
- [19] Bush A I, Tanzi R E. *Neurotherapeutics*, **2008**, **5**(3):421-432
- [20] Bagheri S, Squitti R, Haertlé T, et al. *Front. Aging Neurosci.*, **2018**, **9**:446
- [21] Kepp K P. *Chem. Rev.*, **2012**, **112**(10):5193-5239
- [22] Telpoukhovskaia M A, Orvig C. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, **42**(4):1836-1846
- [23] Huang X, Atwood C S, Hartshorn M A, et al. *Biochemistry*, **1999**, **38**(24):7609-7616
- [24] Cherny R A, Atwood C S, Xilinas M E, et al. *Neuron*, **2001**, **30**(3):665-676
- [25] Yurdakul S, Arici K. *J. Mol. Struct.*, **2004**, **691**(1/2/3):45-49
- [26] Wang X H, Wang X Y, Zhang C L, et al. *Chem. Sci.*, **2012**, **3**:1304-1312
- [27] Nunes A, Marques S M, Quintanova C, et al. *Dalton Trans.*, **2013**, **42**:6058-6073
- [28] Geng J, Li M, Wu L, et al. *J. Med. Chem.*, **2012**, **55**:9146-9155
- [29] Dwyer F P, Gill N S, Gyrfas E C, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, **75**(7):1526-1528
- [30] Wang B, Wang Z R, Chen H, et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, **24**(19):4741-4749
- [31] Wang X H, Wang X Y, Guo Z J. *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, **362**:72-84
- [32] Gaggelli E H, Kozłowski D, Valensin D, et al. *Chem. Rev.*, **2006**, **106**(6):1995-2044
- [33] Hureau C, Faller P. *Biochimie*, **2009**, **91**(10):1212-1217
- [34] Sharma A K, Pavlova S T, Kim J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, **134**(15):6625-6636