

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520121153220

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂的设计合成及药
效和毒性评价

**Design and synthesize oxazolidinone NAAA inhibitors,
evaluate its pharmacological effects and toxicity**

李燕婷

指导教师姓名: 邱彦副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

学位授予日期 2015 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年

噻唑烷酮类 MMP 抑制剂的设计合成及药效和毒性评价

李燕婷

指导教师

邱彦

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(邱彦)课题(组)的研究成果,获得(邱彦)课题(组)经费或实验室的资助,在(邱彦)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

研究背景: *N*-棕榈酰乙醇胺 (*N*-palmitoylethanolamide, PEA) 是一种内源性的脂质, 通过抑制内源性大麻素水解酶 *N*-酰基乙醇胺水解酶 (NAAA) 的活性可有效提高细胞和动物机体内 PEA 浓度, 从而发挥镇痛, 抗炎, 抗癫痫, 神经保护等作用。然而现有的 NAAA 抑制剂活性低、稳定性差, 无法应用于整体动物实验和口服给药, 所以研制出新型的 NAAA 抑制剂成了当务之急。

目的: 本研究通过设计合成一系列噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂, 从中寻找到结构稳定, 活性强, 毒副作用小的化合物, 能够应用于整体动物实验和口服给药的新型 NAAA 抑制剂。

方法: 在课题组已合成的 NAAA 抑制剂结构基础上, 以噁唑烷酮为母核进行结构改造, 采用化学合成的方法合成 NAAA 抑制剂; 使用 LC-MS 联用技术建立化合物的检测方法, 评价其在 pH5.0 和 pH7.4 及血浆中的稳定性, 分析其在细胞中的代谢及产物; 使用 LC-MS/MS 检测组织样本中内源性大麻素含量; 用 TPA 建立小鼠耳肿胀模型, Real-time PCR 检测组织中相关炎症因子的表达; 利用 CCK-8 试剂盒检测化合物的细胞毒性, 用斑马鱼模型评价化合物的胚胎毒性, 用全自动膜片钳技术评价化合物的心脏毒性, 使用小鼠旷场实验评价化合物的依赖性。

结果: 合成并筛选出了一个活性好、选择性强且稳定好的化合物 **F96** (IC_{50} of NAAA = 0.210 μ M, IC_{50} of FAAH = 41.84 μ M); 在 pH5.0、pH7.4 和血浆中的半衰期分别为: $t_{1/2}$ (pH = 5.0) > 1440 min, $t_{1/2}$ (pH = 7.4) > 1440 min, $t_{1/2}$ (Rat plasma) = 188 min; 腹腔注射 **F96** 能剂量依赖地减轻 TPA 诱导的耳肿胀, 且能够剂量依赖地提高肿胀部位 PEA 水平; 口服 **F96** 能抑制 TPA 诱导的耳肿胀, 显著降低肿胀部位炎症因子的表达, 抗炎效果比布洛芬好; 100 μ M **F96** 对细胞几乎没有毒性; 相比于布洛芬, **F96** 对斑马鱼胚胎发育毒性明显减小; **F96** 对 hERG 钾通道的 IC_{50} 大于 40 μ M, 几乎没有心脏毒性; **F96** 对小鼠几乎没有中枢副作用。

结论: 合成和筛选出选择性好、活性强、化学和血浆稳定性好、细胞和胚胎发育毒性小且能用于整体动物实验和口服给药的 NAAA 抑制剂 **F96**。

关键词: NAAA 抑制剂, 稳定性, 炎症, 药物代谢, 毒理学

Abstract

Background: N-palmitoyl ethanolamine (PEA) is a kind of endogenous lipid, inhibiting the activity of endocannabinoids hydrolase N-acylethanolamine acid amidase (NAAA) can improve PEA concentration in cells and animals, thus exerting effects such as analgesic, anti-inflammatory, antiepileptic and nerve protection. However, the existing NAAA inhibitors show low activity and poor stability, which cannot be applied in the whole animal experiment or oral administration. So it is urgent and of great value to find potent NAAA inhibitor.

Objective: Design and synthesize a series of oxazolidinone derivatives to find a potent and highly selective NAAA inhibitor with low toxicity, which can be applied in the whole animal experiment.

Methods: Based on the structure of NAAA inhibitors in our lab, we synthesized a series of oxazolidinone NAAA inhibitors by the method of chemical synthesis; established the detection method of NAAA inhibitors by LC-MS/MS, evaluated their stability in acid buffer, alkaline buffer and rat plasma, analyzed its metabolism products in cells; detected the concentration of endocannabinoids in tissues by LC-MS/MS; studied its anti-inflammation effects in TPA induced ear edema model and used Real-time PCR to detect the expression of inflammatory factors in tissues; evaluated toxicity by CCK-8 kits, zebrafish model, automatic patch clamp technique and open-field test.

Results: We have synthesized a potent and highly selective NAAA inhibitor **F96** (IC_{50} of NAAA = 0.210 μ M, IC_{50} of FAAH = 40.84 μ M) which showed highly stability in acid buffer (pH 5.0, $t_{1/2}$ > 1440 min), alkaline buffer (pH 7.4, $t_{1/2}$ > 1440 min) and rat plasma ($t_{1/2}$ = 188 min). Intraperitoneal injection **F96** can inhibit TPA-induced ear edema dose dependently and increase PEA concentration in the swelling area. Oral administration of **F96** can also inhibit ear edema in TPA model and decrease the expression of inflammatory factors in the swelling area significantly,

whose effect was better than ibuprofen. **F96** (100 μM) showed no toxicity on Raw246.7 cell. It had much less toxicity than ibuprofen on the development of zebrafish embryo, and it almost had no cardiac toxicity (IC_{50} of hERG potassium channel $> 40 \mu\text{M}$) or psychic dependence.

Conclusion: We have synthesized a potent and highly selective NAAA inhibitor **F96** with good chemical and plasma stability. **F96** exhibits low toxicity on raw cell, the development of zebrafish embryo and mice, which can be used in the whole animal experiment and oral administration.

Keywords: NAAA inhibitor; stability; inflammation; pharmacokinetics; toxicology

摘 要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 内源性大麻素系统	1
1.1.1 内源性大麻素系统简介	1
1.1.2 N-棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoyl-ethanolamine, PEA)	3
1.1.3 N-酰基乙醇胺水解酶 (N-acylethanolamide hydrolyzing acid amidase, NAAA)	7
1.2 立题依据	13
参考文献	14
第二章 噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂筛选	20
2.1 噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂的设计、合成与活性评价	21
2.1.1 仪器和试剂	21
2.1.2 实验方法	22
2.2.3 实验结果与讨论	25
2.2 噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂的稳定性研究	28
2.2.1 仪器和试剂	28
2.2.2 实验方法	29
2.2.3 实验结果与讨论	30
2.3 F96 的选择性和构效关系研究	33
2.3.1 仪器和试剂	33
2.3.2 实验方法	34
2.3.3 实验结果与讨论	35
2.4 本章小结	37
参考文献	38

第三章 噁唑烷酮类 NAAA 抑制剂 F96 的抗炎作用评价	39
3.1 腹腔注射 F96 呈剂量依赖抑制 TPA 诱导的炎症疼痛模型	39
3.1.1 仪器和试剂	39
3.1.2 实验方法	40
3.1.3 实验结果与讨论	42
3.2 口服 F96 抑制 TPA 诱导的炎症疼痛模型	44
3.2.1 仪器和试剂	44
3.2.2 实验方法	45
3.2.3 实验结果和讨论	47
3.3 本章小结	50
参考文献	50
第四章 F96 的代谢研究	51
4.1 F96 在 Raw264.7 细胞中的代谢及产物分析	51
4.1.1 仪器和试剂	51
4.1.2 实验方法	52
4.1.3 实验结果与讨论	53
4.2 F96 主要代谢产物对 TPA 诱导炎症模型的作用	54
4.2.1 仪器和试剂	54
4.2.2 实验方法	54
4.2.3 实验结果与讨论	54
4.3 F96 在大鼠体内的药物代谢动力学研究	55
4.3.1 仪器和试剂	55
4.3.2 实验方法	56
4.3.3 实验结果	57
4.4 本章小结	58
参考文献	58
第五章 F96 的毒理学研究	59
5.1 F96 的细胞毒性研究	59
5.1.1 仪器和试剂	59
5.1.2 实验方法	60

5.1.3 实验结果与讨论	61
5.2 F96 对斑马鱼的胚胎早期发育毒性研究	61
5.2.1 仪器和试剂	61
5.2.2 实验方法	62
5.2.3 实验结果与讨论	63
5.3 F96 对斑马鱼的胚胎后期发育毒性研究	67
5.3.1 仪器和试剂	67
5.3.2 实验方法	67
5.3.3 实验结果与讨论	68
5.4 F96 心脏毒性（对 hERG 钾通道作用）研究	72
5.4.1 仪器和试剂	72
5.4.2 实验方法	72
5.4.3 实验结果与讨论	73
5.5 F96 的长期毒性研究	75
5.5.1 仪器和材料	75
5.5.2 实验方法	75
5.5.3 实验结果与讨论	75
5.6 F96 的中枢副作用研究	77
5.6.1 仪器和材料	77
5.6.2 实验方法	77
5.6.3 实验结果与讨论	77
5.7 本章小结	78
参考文献	79
第六章 结论	80
缩略语表	82
致谢语	84
附录	85

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter1 Introduction	1
1.1 Endocannabinoid system	1
1.1.1 About endocannabinoid system	1
1.1.2 N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA).....	3
1.1.3 N-acyl ethanolamide hydrolyzing acid amidase (NAAA).....	7
1.2 Foundation	13
Reference	14
Chapter2 NAAA inhibitors of oxazolidinone derivatives	20
2.1 Synthesis and evaluation of oxazolidinone NAAA inhibitors	21
2.1.1 Instruments and reagents	21
2.1.2 Experimental methods	22
2.2.3 Results and discussions.....	25
2.2 Stability evaluation of NAAA inhibitors	28
2.2.1 Instruments and reagents	28
2.2.2 Experimental methods	29
2.2.3 Results and discussions.....	30
2.3 Structure-activity relationship and selectivity F96	33
2.3.1 Instruments and reagents	33
2.3.2 Experimental methods	34
2.3.3 Results and discussions.....	35
2.4 Conclusion	37
Reference	37
Chapter3 Anti-inflammation effects of F96	39

3.1 Intraperitoneal injection of F96 inhibit inflammation on TPA induced ear edema dose dependently	39
3.1.1 Instruments and reagents	39
3.1.2 Experimental methods	40
3.1.3 Results and discussions.....	42
3.2 Oral administration of F96 inhibit inflammation on TPA induced ear edema.....	44
3.2.1 Instruments and reagents	44
3.2.2 Experimental methods	45
3.2.3 Results and discussions.....	47
3.3 Conclusion.....	50
Reference.....	50
Chapter4 Metabolic research of F96.....	51
4.1 Metabolic research of F96 in raw264.7 cell.....	51
4.1.1 Instruments and reagents	51
4.1.2 Experimental methods	52
4.1.3 Results and discussions.....	53
4.2 The main metabolites of F96 on TPA induced ear edama.....	54
4.2.1 Instruments and reagents	54
4.2.2 Experimental methods	54
4.2.3 Results and discussions.....	54
4.3 Pharmacokinetic study of F96 in rat	55
4.3.1 Instruments and reagents	55
4.3.2 Experimental methods	56
4.3.3 Results and discussions.....	57
4.4 Conclusion.....	58
Reference.....	58
Chapter5 Toxicology research of F96.....	59
5.1 Cell toxicity study of F96 and F247	59
5.1.1 Instruments and reagents	59
5.1.2 Experimental methods	60

5.1.3 Results and discussions.....	61
5.2 Early-life stage toxic test of F96 in zebrafish embryo	61
5.2.1 Instruments and reagents	61
5.2.2 Experimental methods	62
5.2.3 Results and discussions.....	63
5.3 Later-life stage toxic test of F96 in zebrafish embryo	67
5.3.1 Instruments and reagents	67
5.3.2 Experimental methods	67
5.3.3 Results and discussions.....	68
5.4 Cardiac toxicity study of F96 (on hERG channel)	72
5.4.1 Instruments and reagents	72
5.4.2 Experimental methods	72
5.4.3 Results and discussions.....	73
5.5 Long-term toxicity studies of F96 in mice	75
5.5.1 Instruments and reagents	75
5.5.2 Experimental methods	75
5.5.3 Results and discussions.....	75
5.6 Central side effect research of F96	77
5.6.1 Instruments and reagents	77
5.6.2 Experimental methods	77
5.6.3 Results and discussions.....	78
5.7 Conclusion.....	78
Reference.....	79
Chapter 6 Conclusion	80
Abbreviations	82
Acknowledgement.....	84
Appendix.....	85

第一章 前言

1.1 内源性大麻素系统

1.1.1 内源性大麻素系统简介

大麻 (cannabis) 一词最早在印度和中药中被提及和使用, 而后在十世纪从波斯传到阿拉伯。到目前为止已经从大麻中提取和鉴别出 60 多种大麻类成分, 其中大麻的主要活性成分是 Δ^9 -四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC)^[1], 也是第一个被分离提纯的外源性大麻素。在 19 世纪早期, 爱尔兰医生威廉·奥肖已经研究证明大麻素能够治疗霍乱、风湿性疾病、精神错乱和小儿惊厥等疾病^[2]。在之后的研究中, 大麻广泛用于治疗疼痛、偏头痛、肌肉痉挛、癫痫、恶心和呕吐以及癌症化疗等^[3]。

内源性大麻素系统由内源性大麻素受体、内源性大麻素、合成和降解内源性大麻素的酶以及细胞膜上转运内源性大麻素的转运系统组成。

1.1.1.1 内源性大麻素受体

现在已经发现 3 种大麻素受体均为 G 蛋白偶联受体 (G-Protein Coupled Receptor, GPCR): 大麻素受体 I 型 (CB_1)^[4]、大麻素受体 II 型 (CB_2)^[5]和 G 蛋白偶联受体 55 (GPR55)。 CB_1 受体于 1988 年被鉴别出来^[6], 随后于 1990 年在大鼠的大脑皮质中被克隆^[4], 其主要分布于中枢神经系统中 (如基底神经节、海马 CA 锥体细胞层、小脑和大脑皮质等) 参与疼痛的传递, 并且 CB_1 受体是中枢神经系统中表达量最高的 G 蛋白偶联受体^[7]; 此外, CB_1 受体在外周神经系统中 (如肺、肝脏、肾脏、消化道以及生殖系统) 也有少量的表达^[8]。 CB_2 受体于 1993 年在人的白血病细胞 (HL-60) 中被克隆^[5], 其主要表达于免疫系统和胃肠道中如脾脏边缘区、扁桃体、胸腺及胃肠道中, 在背根神经节、脊髓等中枢神经系统也有少量表达^[9]。内源性大麻素受体主要通过 G 蛋白介导的环磷腺苷和磷脂酰肌醇这两种信号转导途径参与信号的传导, 与内源性大麻素结合发挥特定的生理作用^[10]。

1.1.1.2 内源性大麻素

研究发现体内也可以合成和分泌大麻素物质与内源性大麻素受体结合, 这些物质被称为内源性大麻素 (endocannabinoids, eCBs)。内源性大麻素种类繁多 (图 1.1), 目前研究发现主要有以下几种: N-花生四烯酰乙醇胺 (anandamide, AEA)、2-花生四烯酰甘油酯 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG)、2-花生四烯酰甘油乙醚酯 (2-Arachidonylglycerol ether, Noladin ether)、花生四烯酰多巴胺 (N-Arachidonyldopamine, NADA) 和 O-花生四烯酰乙醇胺 (Virodhamine)^[11]。此外, 油酰乙醇胺 (N-Oleylethanolamide, OEA)、棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoylethanolamide, PEA) (如图 1.1) 等脂类分子虽与 AEA 具有类似的 N-脂肪酰基乙醇胺类结构, 但不与大麻素受体相结合, 由于其与内源性大麻素有相似的结构和功能, 被视为类内源性大麻素物质。

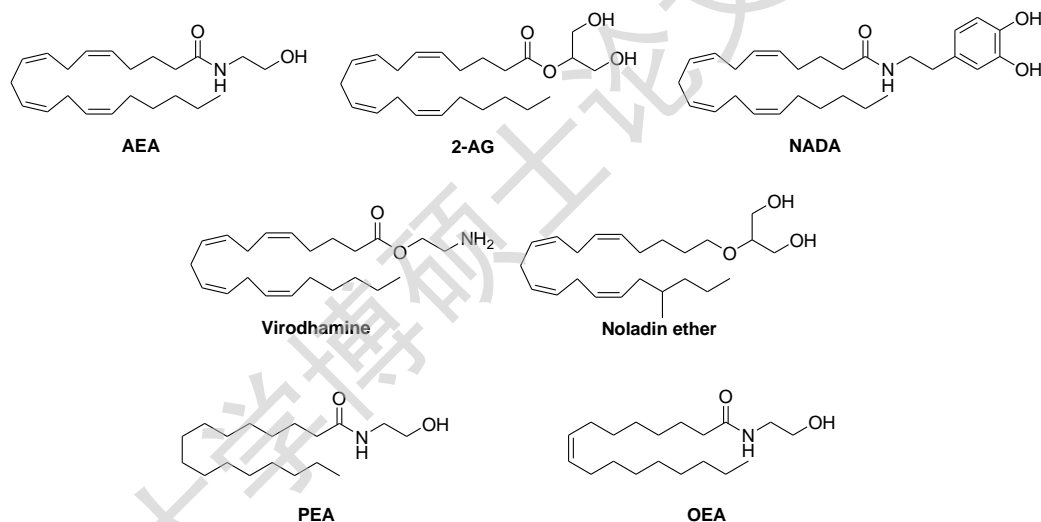


图 1.1 内源性大麻素及类内源性大麻素物质。

Fig 1.1 The endocannabinoids.

1.1.1.3 内源性大麻素的合成与降解 (图 1.2)

这些 N-酰基乙醇胺与传统的神经递质和神经肽不同, 它们并不储存在囊泡中, 而是在需要的时候在磷脂双分子层合成^[12], 并且能被其特异性的水解酶代谢成相应的脂肪酸和乙醇胺。其中, AEA 和 2-AG 是被研究的比较深入的两种内源性大麻素, AEA 是第一种被发现的内源性大麻素, 主要激动 CB₁ 受体, 2-AG 是体内含量最多的一种内源性大麻素, 对 CB₁ 和 CB₂ 这两种受体有着相近的激活作用。

AEA 的合成主要通过 Ca^{2+} 依赖的 NAPE-PLD 合成途径: 突触后神经元受到刺激后, 细胞膜上去极化引起 Ca^{2+} 内流, 激活 N-酰基转移酶 (N-acyltransferase, NAT), 在 NAT 的催化下细胞膜上磷脂酰胆碱 (Phosphatidylcholine, PC) 与磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamide, PE) 发生反应, 形成 N-酰基磷脂酰乙醇胺 (N-Acylphosphatidylethanolamides, NAPE)。最后, NAPE 经磷脂酶 D (NAPE-phospholipase D, NAPE-PLD) 水解生成 AEA^[13]。AEA 主要被脂肪酸酰胺水解酶 (fatty acid amide hydrolase, FAAH) 水解成花生四烯酸和乙醇胺而失去作用, 此外 AEA 还可以被十六酰胺乙醇酸性酰胺酶、环氧合酶-2 以及细胞色素酶 P450 等降解^[14]。

2-AG 的合成是由 PLC 水解膜磷脂酰肌醇二磷酸酯 (Phosphatidylinositol Bisphosphate) 形成甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG), 然后 DAG 被二酰甘油酯酶 (Diacylglycerol Lipase) 裂解产生 2-AG。2-AG 主要被单酰甘油酯酶 (Monoacylglycerol Lipase, MGL) 水解成花生四烯酸和甘油, 少部分也被 FAAH 水解灭活^[11]。

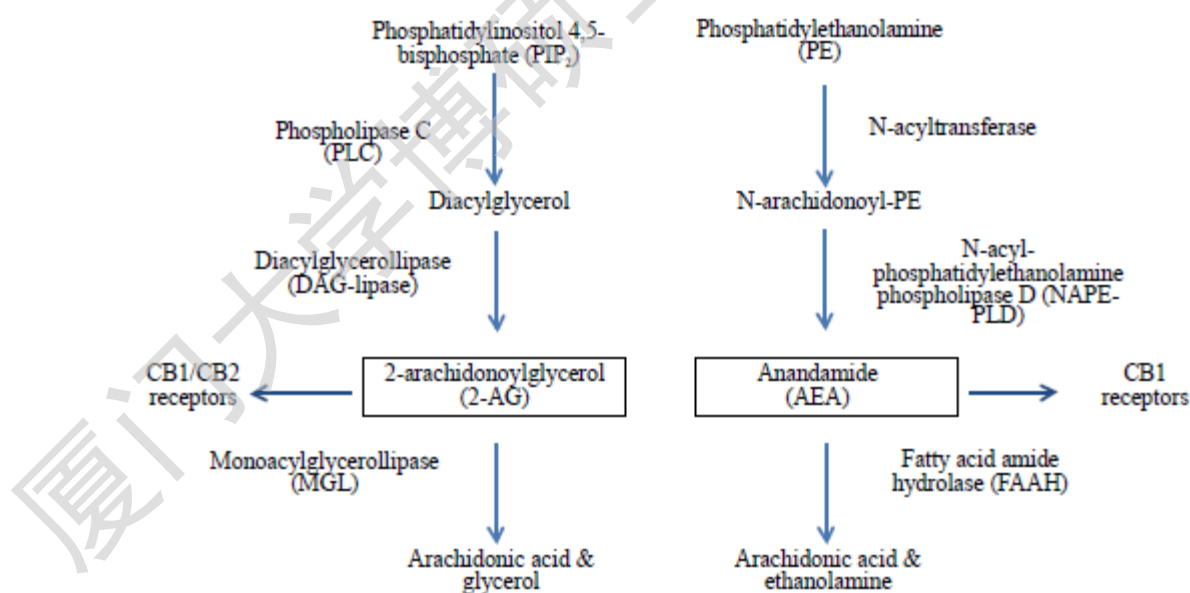


图 1.2 AEA 和 2-AG 的主要合成和降解途径。

Fig1.2 Major pathways for the synthesis and degradation of 2-AG and AEA.

1. 1. 2 N-棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoyl-ethanolamine, PEA)

1. 1. 2. 1 PEA 及其代谢途径简介

N-棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoyl-ethanolamine, PEA) 首先在 19 世纪 50 年

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.