

含苯并咪唑结构的萹类衍生物的设计合成及抗炎活性研究

肖梦佳^{a,b} 高希珂^{*,b}^(a) 四川师范大学化学与材料科学学院 成都 610066)^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 中国科学院有机功能分子合成与组装化学重点实验室 上海 200032)

摘要 苯并咪唑(BI)结构广泛存在于多种生物活性化合物中,在药物合成领域受到越来越多的关注.萹类衍生物是一类可从药用植物中获得的天然产物,具有抗炎、抗氧化及低毒等特点.以萹类衍生物与 BI 为原料,通过 Buchwald-Hartwig 偶联得到了 14 个含苯并咪唑结构的萹类衍生物,并研究了其抗炎活性和构效关系.结果表明,这些化合物能有效抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞中 NO 的产生,具有比愈创木萹磺酸钠(GAS-Na)更好的抗炎活性.其中有三个萹类衍生物具有低毒性和高抗炎效果,酶联免疫吸附测定法(ELISA)表明其以浓度依赖性的方式抑制 LPS 诱导的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 6 (IL-6)的释放.研究表明 1-愈创木萹-苯并咪唑(GABI-1)具有高抗炎活性(给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的 NO 抑制率为 33.69%)和低细胞毒性,有望成为新型抗炎药候选分子.

关键词 萹;愈创木萹;苯并咪唑;愈创木萹磺酸钠;抗炎活性

Design, Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Azulene Derivatives Containing Benzimidazole Unit

Xiao, Mengjia^a Gao, Xike^{*,b}^(a) College of Chemistry and Materials Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066)^(b) Key Laboratory of Synthetic and Self-Assembly Chemistry for Organic Functional Molecules, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Benzimidazole (BI) unit exists in many bioactive compounds and has attracted more and more attention in the field of drug synthesis. Azulene derivatives are natural products obtained from medicinal plants, which have the characteristics of anti-inflammatory, antioxidant, and low toxicity. Using azulene derivatives and BI as raw materials, fourteen azulene derivatives that contain benzimidazole unit were synthesized by using Buchwald-Hartwig coupling strategy. Then their anti-inflammatory activity and structure-activity relationship were studied. The results showed that these compounds can effectively inhibit the production of NO in lipopolysaccharide (LPS) induced macrophages and have higher anti-inflammatory activity than sodium guaiazulene sulfonate (GAS-Na). Among them, three derivatives were screened with low toxicity and high anti-inflammatory activity, and they can inhibit the release of LPS-induced interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in a dose-dependent manner by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results show that 1-guaiazulene benzimidazole (GABI-1) has high anti-inflammatory activity (the inhibitory rate of NO was 33.69% at the doses of 20 $\mu\text{mol/L}$) and low cytotoxicity, which is expected to become a candidate molecule for new anti-inflammatory drugs.

Keywords azulene; guaiazulene; benzimidazole; sodium guaiazulene sulfonate; anti-inflammatory activity

炎症是机体对外部病原体刺激产生的自我保护反应^[1].巨噬细胞受 LPS 刺激后,会产生炎症介质如一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂ (PGE₂)等,以及促炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-6 和白细胞介素 1 β (IL-1 β)等^[2].当这些炎症介质和促炎性细胞因子过度产生时,会损害组织,并导致一些慢性疾病的产生,如阿尔茨海默症、溃

疡性结肠炎、心血管疾病或骨关节炎等^[3].研究表明,慢性炎症也是造成癌症的因素之一^[4].因此,治疗和预防炎症性疾病具有重要的科学意义和研究价值.

萹(Azulene, 以下简称 Az)是一种由环戊二烯和环庚三烯稠合而成的非苯芳烃类化合物(图 1)^[5].一些萹类衍生物可从自然界中的一些植物如洋甘菊、苦艾、千叶

* Corresponding author. E-mail: gaoxk@mail.sioc.ac.cn

Received February 9, 2023; revised April 12, 2023; published online May 23, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22075310).

国家自然科学基金(No. 22075310)资助项目.

薯和蓝乳菇中获得, 应用于抗过敏、抗菌和抗炎治疗. 其中, 愈创木萘(Guaiiazulene, 以下简称 **GA**)是萘类化合物中常见的双环倍半萜类天然产物(图 1), 其在抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗菌^[8]、抗溃疡^[9]和抗肿瘤^[10]等方面均有良好的疗效.

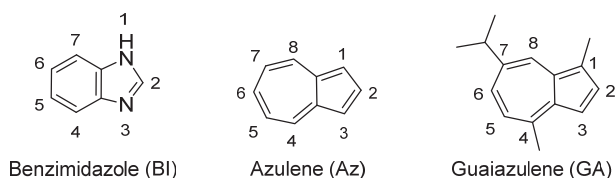


图 1 苯并咪唑、萘和愈创木萘的结构式

Figure 1 Chemical structures of benzimidazole, azulene and guaiiazulene

苯并咪唑(Benzimidazole, 以下简称 **BI**)是最常见的氮杂环之一(图 1)^[11]. 由于 **BI** 具有特殊的环互变异构结构和富电子特性, 含有 **BI** 的药物可与多种治疗靶点相结合^[12], 其衍生物在抗炎^[13]、抗癌^[14]、抗菌^[15]、抗结核^[16]、抗病毒^[17]、抗溃疡^[18]和抗疟疾^[19]等方面表现出独特的生物活性. 同时, **BI** 具有类似嘌呤核苷酸的结构, 这也使其更容易与生命系统中的生物大分子相结合^[20].

BI 的 1 位具有活泼氢, 有较高的化学反应活性, 当其被位阻较大的杂环取代时, 可能得到高抗炎活性化合物. Sabat 等^[21]设计合成了一类 **BI** 的 1 位被噻啉取代的衍生物, 其在纳摩尔级浓度表现出了对酪氨酸激酶的抑制活性. 而 **BI** 的 1 位被噻吩取代的另一类衍生物被证明

是具有中等效力的 IKK- ϵ 激酶抑制剂^[22]. 此外, **BI** 在 1 位键连吡咯类的衍生物是一种高效 IRAK4 抑制剂^[23]. 研究发现^[24]在不同药物开发阶段约有 40% 的药物含有卤素原子, 其中氟、氯原子的应用较多, 而甲氧基具有一定的亲水性和适中的分子量. 因此, 我们考虑在 **BI** 的 1 位键连萘类化合物, 并在 **BI** 结构上引入 F、Cl 等卤素原子和甲氧基, 以期获得高效低毒的抗炎活性小分子.

1 结果与讨论

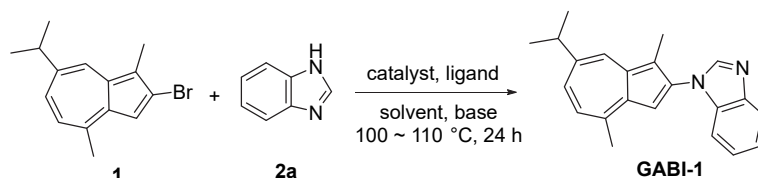
1.1 目标化合物的合成

对 **GA** 的 2 位进行 C—H 键活化硼基化和溴化反应后, 得到紫色固体 2-溴愈创木萘, 并将其与 **BI** 在 1 位进行偶联, 以 0.05 equiv. 的 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 为催化剂、0.1 equiv. 的 2-二环己基膦基-2'-(*N,N*-二甲胺)-联苯(DavePhos)为配体, 在 110 °C、 N_2 氛围反应 24 h 后, 以中等收率(49%)得到了目标产物 **GABI-1**(表 1, Entry 1). 随后对反应条件进行优化, 如表 1 所示.

首先对配体进行了筛选, 结果表明, 当配体为 2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯(Xphos)或 2-二环己基膦基-2',6'-二甲氧基联苯(Sphos)时, 产物的收率提高至 80% (Entries 2, 3), 而使用 2-二叔丁基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯('Bu-Xphos)为配体时的收率最高, 可达 85% (Entry 5). 当以 2-二叔丁基膦基-3,4,5,6-四甲基-2',4',6'-三异丙基联苯(Me'Bu-Xphos)为配体时, 反应活性较低, 只有极少量产物生成(Entry 4). 综合考虑, 选择 'Bu-Xphos 作为后续反

表 1 Buchwald-Hartwig 偶联反应条件优化^a

Table 1 Optimization of Buchwald-Hartwig coupling reaction conditions



Entry	Solvent	Catalyst	Ligand	Base	Temp./°C	Yield ^b /%
1	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Davephos	NaO^tBu	110	49
2	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Xphos	NaO^tBu	110	80
3	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Sphos	NaO^tBu	110	80
4	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Me'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	5
5	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	85
6	Toluene	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	79
7	Toluene	$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$	'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	74
8	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	K_2CO_3	110	24
9	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	Cs_2CO_3	110	67
10	Toluene	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	K_3PO_4	110	30
11	1,4-Dioxane	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	83
12	DMB	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	'Bu-Xphos	NaO^tBu	110	82

^a Reaction conditions: **1** (0.3 mmol, 1.0 equiv.), **2a** (0.45 mmol, 1.5 equiv.), catalyst (0.05 equiv.), ligand (0.1 equiv.), base (0.42 mmol, 1.4 equiv.), solvent (3 mL), reaction time is 24 h; ^b yield calculated from column chromatography separation.

应条件优化的配体. 随后对常见 Pd 催化剂进行筛选发现, 使用二价钯 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 为催化剂时的收率低于 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 且杂质较多, 因此后续选择 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 作为反应催化剂(Entries 6, 7). 接下来考察了碱的种类对该反应的影响. 当使用无机碱类 K_2CO_3 、 K_3PO_4 和 Cs_2CO_3 作反应应用碱时的产物收率较低(Entries 8~10). 之后考察了溶剂对反应的影响, 当使用甲苯(toluene)、1,4-二氧六环(1,4-dioxane)或二甲苯(DMB)时, 反应收率相当(Entries 11, 12). 综合考虑, 确定以 0.05 equiv. 的 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 为催化剂、0.1 equiv. 的 $t\text{-Bu-Xphos}$ 为配体、1.4 equiv. NaOtBu 为碱和 3 mL 甲苯为溶剂在 110 °C、 N_2 氛围下反应 24 h 为最优条件.

含苯并咪唑结构的萘类衍生物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的合成路线如 Scheme 1 所示, 并通过柱层析计算收率. 在最优条件下以 1.0 equiv. 的 **1** 或 **3** 和 1.5 equiv. 的 **2a** 为原料, 分别以 85% 和 76% 的收率得到目标产物 **GABI-1** 和 **AzBI-1**.

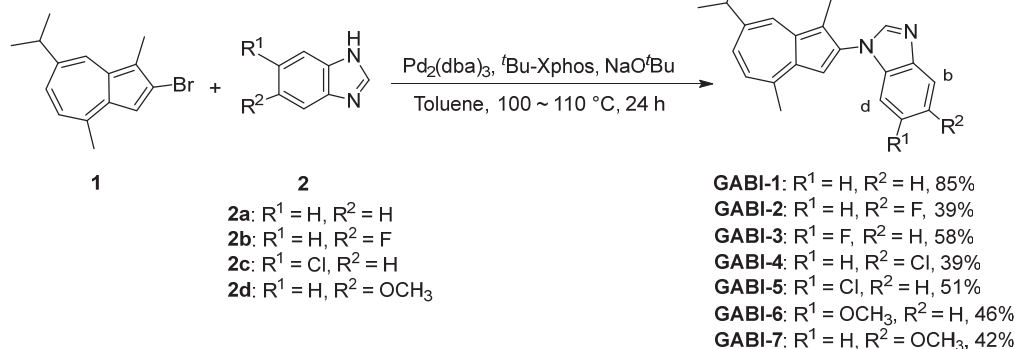
BI 由咪唑和苯环稠合而成, 具有典型的环互变异构结构^[25], 当含取代基的 **BI** 在 1 位键连位阻较大的取代基时, 由于环互变异构, 会存在两种异构化合物^[26]. 因此 **1** 与 **2b** 在最优反应条件下得到两种氟取代的异构体化合物 **GABI-2** 和 **GABI-3**. 该反应总收率为 97%, 其中 5 位氟取代化合物 **GABI-2** 的收率(39%)低于 6 位氟

取代化合物 **GABI-3** (58%), 这可能是因为电子效应导致 1 位 N 原子的反应能垒略低于 3 位 N 原子的反应能垒. 同理, **1** 与 **2c** 偶联得到了两种氯取代的异构体化合物 **GABI-4**(收率为 39%)和 **GABI-5**(收率为 51%), 总收率为 90%. 氟取代异构体化合物 **AzBI-2** 和 **AzBI-3** 由 1.0 equiv. 的 **3** 和 1.5 equiv. 的 **2b** 偶联得到, 收率分别为 36% 和 47%, 总收率为 83%; 氯取代异构体化合物 **AzBI-4** 和 **AzBI-5** 由 **3** 和 **2c** 偶联得到, 收率分别为 33% 和 44%, 总收率为 77%.

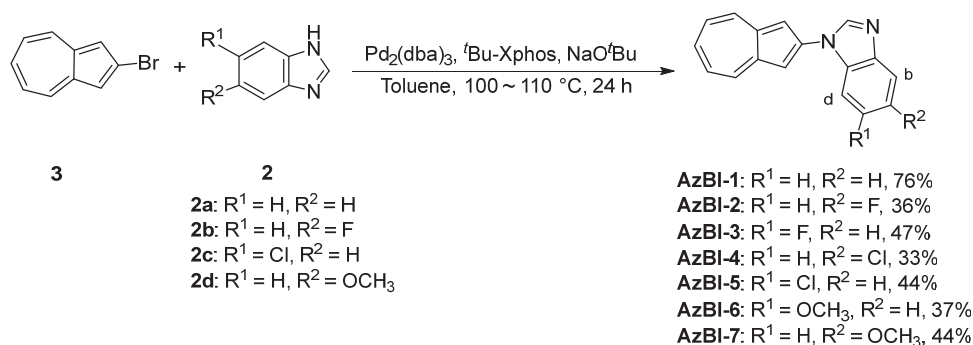
1 与 **2d** 以 88% 的总收率偶联得到了两种含甲氧基的异构体化合物 **GABI-6** 和 **GABI-7**, 收率分别为 46% 和 42%, 而 **3** 与 **2d** 偶联得到的两种含甲氧基的异构体 **AzBI-6** 和 **AzBI-7** 的收率分别为 37% 和 44%. 为排除因柱层析等原因导致的产物损失, 比较了其核磁产率. 结果表明 6 位甲氧基取代的化合物 **GABI-6** 的核磁产率(46%)低于 5 位甲氧基取代的化合物 **GABI-7** 的核磁产率(47%); 6 位甲氧基取代的化合物 **AzBI-6** 的核磁产率(40%)低于 5 位甲氧基取代的化合物 **AzBI-7** 的核磁产率(48%), 这可能是因为甲氧基的位阻效应大于电子效应, 使得 1 位 N 原子的反应能垒略高于 3 位 N 原子的反应能垒.

目标化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的化学结构经过 ^1H NMR 谱、 ^{13}C NMR 谱、 ^{19}F NMR 谱、

(a) Synthesis of products **GABI-1** ~ **GABI-7**



(b) Synthesis of products **AzBI-1** ~ **AzBI-7**



图式 1 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的合成路线
 Scheme 1 Synthesis routes of **GABI-1**~**GABI-7** and **AzBI-1**~**AzBI-7**

IR 光谱、NOESY 谱和高分辨质谱确证. 由于异构体之间极性不同, 因此可以通过柱层析进行分离. 利用单晶 X 射线衍射确认了化合物 **GABI-2** (CCDC 2223588) 和 **GABI-7** (CCDC 2223593) 的立体结构(图 2). 从化合物 **GABI-2** 单晶 X 射线衍射结构来看, 其 **GA** 环与 **BI** 环的二面角为 50.6° , 其氟取代基在 **BI** 的 5 位, 由此判断化合物 **GABI-3** 的氟取代基在 **BI** 的 6 位; 化合物 **GABI-7** 的单晶结构表明, 其 **GA** 环与 **BI** 环的二面角为 38.0° , 甲氧基在 **BI** 的 5 位. 由于异构体之间结构相似, 仅通过 ^1H NMR 谱、 ^{13}C NMR 谱、 ^{19}F NMR 谱和质谱难以确认其取代基位置, 因此通过 NOESY 谱进一步确认其化学结构. 结果表明, 化合物 **GABI-4** 的 d 位氢与 3 位氢存在空间偶合, 且其 d 位氢受到邻位氢偶合, 偶合常数为 8.6 Hz, 氯原子取代基在其 d 位氢的间位, 而其 b 位氢与 3 位氢不存在空间偶合. 化合物 **AzBI-3** 中, 其 d 位氢与 3 位氢存在空间偶合, 而其 b 位氢的间位偶合常数为 4.9 Hz, 其间位为氟原子. 同理, 化合物 **AzBI-5** 和 **AzBI-6** 的 d 位氢均与 3 位氢存在空间偶合, 且其 d 位氢均受到间位氢的偶合, 偶合常数分别为 2.0 和 2.4 Hz, 取代基位置均在 d 位氢的邻位. 此外, 5 位卤素取代的化合物 **GABI-2**、**GABI-4**、**AzBI-2** 和 **AzBI-4** 的极性均小于其对应的 6 位卤素取代的异构体分子, 而 6 位甲氧基取代的化合物 **GABI-6** 和 **AzBI-6** 的极性均小于其对应的 5 位甲氧基取代的异构体分子. 研究了化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的水溶性, 发现其在水中的溶解度均小于 $100\ \mu\text{g/mL}$.

1.2 化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞产生 NO 的影响

LPS 是革兰氏阴性细菌外膜的成分之一, 能诱导多种促炎因子和炎症介质的表达, 并引起细胞炎症. 研究表明巨噬细胞 RAW 264.7 经过 LPS 诱导后会产生高浓

度的 NO, 损伤炎症部位. 因此 LPS 通常用于在体外建立巨噬细胞的炎症模型, 并以此来评估化合物的抗炎效果^[27]. 愈创木蓼磺酸钠(**GAS-Na**)是目前市售的蓼类生物功能分子, 是 Veralga azulene®凝胶的主要成分之一, 其抗炎活性与氢化可的松乳膏相当^[7]. Griess 法常用于检测 NO, 其原理是 NO 在体内或水溶液中转化生成亚硝酸盐, 并与显色剂生成偶氮化合物, 最后通过检测吸光度计算 NO 的浓度. 因此选择 **GAS-Na** 作为阳性对照, 利用 Griess 法测定细胞产生的 NO 来评估化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的抗炎活性.

图 3 为以 **GAS-Na** 为阳性对照, 目标化合物对 LPS 诱导巨噬细胞产生 NO 的抑制率, 该抑制率越高说明该化合物的抗炎效果越好. 如图 3 所示, 当给药浓度在 $1\ \mu\text{mol/L}$ 时, 在化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 中, 除 **GABI-6** 的 NO 抑制率(2.00%)低于阳性对照 **GAS-Na** 的 NO 抑制率(5.40%)外, 其余蓼类衍生物的 NO 抑制率均高于 **GAS-Na**; 而化合物 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的 NO 抑制率均低于 **GAS-Na** (5.40%). 当给药浓度在 $10\ \mu\text{mol/L}$ 时, **GABI-1** 具有最高的 NO 抑制率(21.77%), 而 **GABI-2** (19.97%) 和 **GABI-6** (20.25%) 亦表现出比 **GAS-Na** (10.16%) 高约两倍的 NO 抑制率, 具有较好的抗炎活性; 在化合物 **AzBI-1**~**AzBI-7** 中, 仅 **AzBI-1** 的 NO 抑制率(11.75%)优于 **GAS-Na**. 当给药浓度在 $20\ \mu\text{mol/L}$ 时, **GABI-1**~**GABI-3**、**GABI-5**~**GABI-7** 和 **AzBI-7** 表现出比 **GAS-Na** (23.07%) 更好的 NO 抑制率, 其中 **GABI-6** 的 NO 抑制率(35.85%)和 **GABI-7** 的 NO 抑制率(37.16%)显著优于 **GAS-Na**. 由图 3 可知, 相同位点的不同取代基对化合物的抗炎活性的影响不同. 例如在 $20\ \mu\text{mol/L}$ 时, 5 位甲氧基取代的化合物 **GABI-7** (抑制率为 37.16%) 抗炎活性最优, 其次是 5 位氟原子取代化合物 **GABI-2** (抑制率为 32.87%), 而 5 位氯原子取代化合物 **GABI-4**

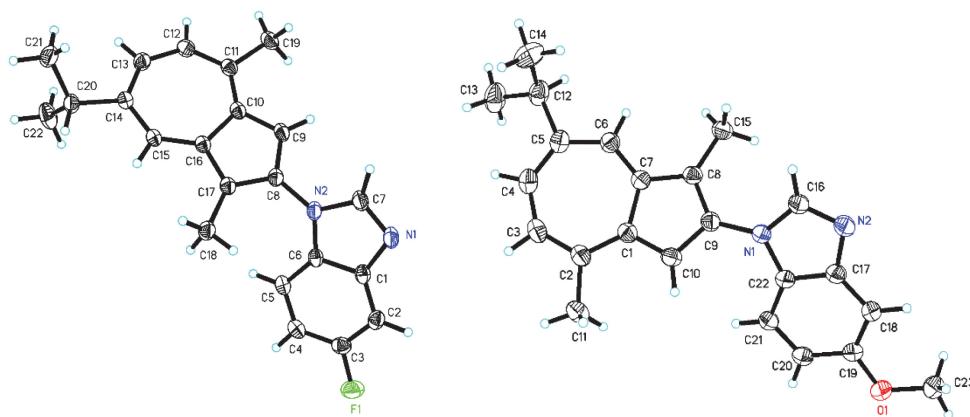


图 2 化合物 **GABI-2** 和 **GABI-7** 的单晶结构
Figure 2 X-Ray single crystal structures of products **GABI-2** and **GABI-7**

抗炎活性相对较低(抑制率为 18.54%)。同时,取代基的位置不同对化合物的抗炎活性的影响也有不同,例如在给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,对于含有相同氟原子取代基化合物 **GABI-2** 和 **GABI-3**,5 位氟取代的 **GABI-2** 的活性(抑制率为 32.87%)优于 6 位氟取代的 **GABI-3**(抑制率为 25.62%);对于含有相同氯原子取代基化合物 **GABI-4** 和 **GABI-5**,6 位氯取代的 **GABI-5** 的活性(抑制率为 28.27%)优于 5 位氯取代的 **GABI-4**(抑制率为 18.54%);对于含有相同甲氧基取代基化合物 **GABI-6** 和 **GABI-7**,5 位甲氧基取代的 **GABI-7** 的活性(抑制率为 37.16%)优于 6 位甲氧基取代的 **GABI-6**(抑制率为 35.85%)。给药浓度为 1、10、20 $\mu\text{mol/L}$,化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 的 NO 抑制率均高于与之相对应的化合物 **AzBI-1**~**AzBI-7**,这可能是因为结构片段 **GA** 的抗炎活性优于 **Az** 的抗炎活性。整体来看,化合物 **GABI-1**、**GABI-2**、**GABI-6** 和 **GABI-7** 的抗炎活性较高,这可能与取代基的大小、位置和与靶点的相互作用有关。这些化合物可作为治疗炎症的先导化合物进行深入研究。

1.3 细胞毒性研究

CCK-8 (Cell Counting Kit-8)法是一种能快速灵敏测

定活细胞数目的比色检测法。该方法测试原理是 CCK-8 试剂中的 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)会被细胞线粒体中的脱氢酶氧化成黄色甲臢产物(Formazan),该甲臢产物的数量与活细胞成正比,在 450 nm 波长处用酶标仪测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。通过 CCK-8 法测定了化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 分别在 1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下与小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞共同培育 48 h 后的细胞毒性。

如图 4 所示,除 **AzBI-6** 外,其余化合物在 1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的细胞存活率都在 80%以上。整体来看,化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 的细胞毒性明显小于化合物 **AzBI-1**~**AzBI-7**,除 **GABI-7** 外,化合物 **GABI-1**~**GABI-6** 在各个给药浓度下的细胞存活率均在 90%以上。抗炎活性研究表明,**GABI-1**~**GABI-3** 和 **GABI-5**~**GABI-7** 在给药浓度 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 下的抗炎活性均高于 **GAS-Na**,但 **GABI-7** 的细胞毒性相对较大,因此考虑进一步探究 **GABI-1**~**GABI-3**、**GABI-5** 和 **GABI-6** 对 RAW 264.7 细胞中促炎性细胞因子如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 的影响。

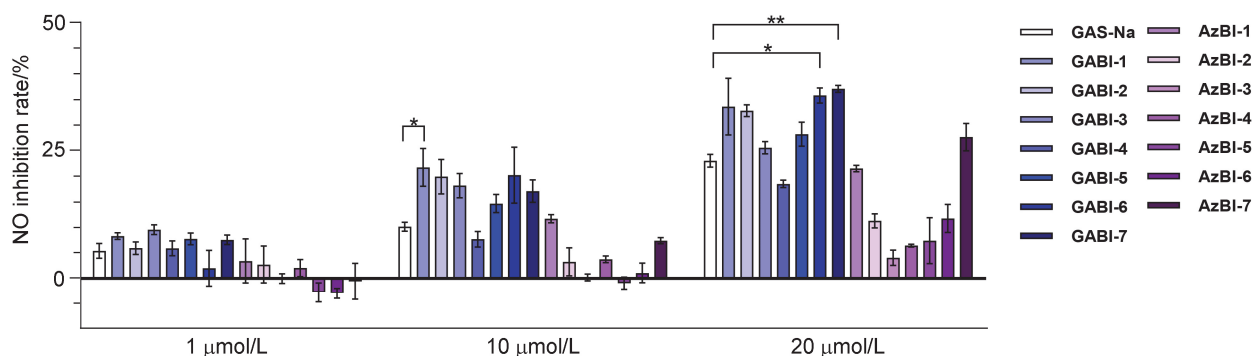


图 3 不同化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 的抑制活性

Figure 3 Inhibitory activities against NO of the different compounds in LPS-induced RAW 264.7 cells
Data are given as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to **GAS-Na**

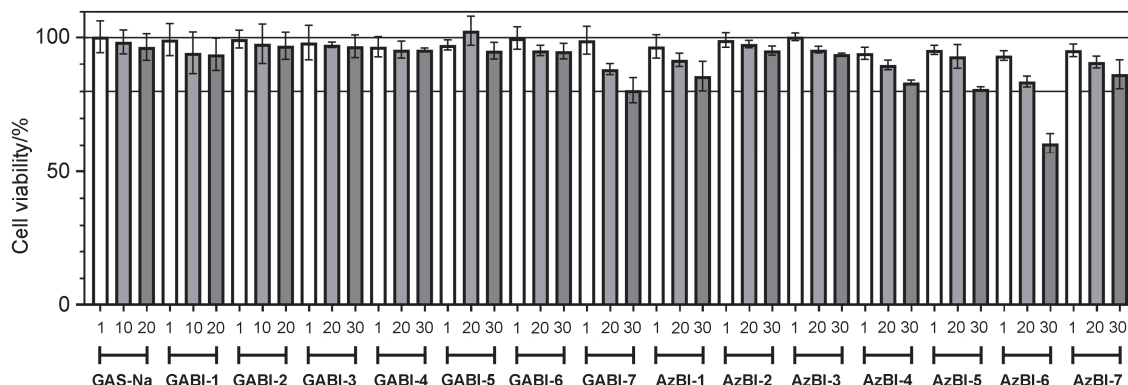


图 4 化合物对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Figure 4 Effects of compounds on the cell viability of macrophage RAW 264.7 cells

1.4 化合物对 LPS 诱导的小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞中促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的影响

在先天免疫中, TNF- α 、IL-6 或 IL-1 β 等促炎性细胞因子均起着关键作用. TNF- α 的主要作用是调节免疫细胞功能, 参与人体新陈代谢, 当其异常增多时, 会导致免疫应激, 从而使人体出现炎症反应. IL-6 是炎症免疫反应中的另一重要因子, 具有调节免疫细胞增殖和分化等作用, 当其持续性失调时, 可能会导致慢性炎症的产生. ELISA 法是一种通过将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上, 利用抗原抗体结合进行专一性免疫反应的定性和定量检测方法. 我们使用 ELISA 法分析了化合物 **GABI-1**~**GABI-3**、**GABI-5** 和 **GABI-6** 抑制 LPS 诱导的小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 产生的效果. 同时, 根据 Griess 法测得的抗炎活性研究结果, 化合物 **GABI-1**、**GABI-2** 和 **GABI-6** 在给药浓度为 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时抗炎活性最好, 因此将进一步研究这三个化合物对 LPS 诱导产生的 TNF- α 和 IL-6 的构效关系.

如图 5a 和 5b 所示, 模型组(只给 LPS 刺激但不给药)为对照值, 纵坐标表示为相对于对照值的倍数百分

比, 纵坐标数值越小, 说明该化合物对 LPS 诱导的巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 的抑制效果越明显, 抗炎效果越好. 当给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 **GABI-1**~**GABI-3**、**GABI-5** 和 **GABI-6** 可以显著降低 LPS 诱导巨噬细胞 RAW 264.7 中促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的表达. 其中化合物 **GABI-1** 的抑制效果最好, 其促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的含量相对于模型组(100%)分别降低至 87.12%和 91.03%, 化合物 **GABI-1** 的抗炎活性优于含卤素原子和甲氧基基团的化合物, 其具体的作用机制需进一步研究. 用给药浓度为 1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物分别预处理巨噬细胞 1 h, 随后与 LPS (500 ng/孔)共同培育 48 h, 结果如图 5c 和 5d 所示. 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下, 化合物 **GABI-1**、**GABI-2** 和 **GABI-6** 抑制 TNF- α 和 IL-6 产生的效果并不明显; 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下, 化合物 **GABI-1** 相对于模型组能明显抑制巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 的产生, 其含量相对于模型组分别下降至 90.73%和 93.89%; 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 给药浓度下, 化合物 **GABI-1**、**GABI-2** 和 **GABI-6** 均能显著抑制 TNF- α , 其含量分别下降至 87.12%、90.94%和 91.77%; 其也能显著抑制 IL-6, 含量分别下降至 91.03%、93.52%和

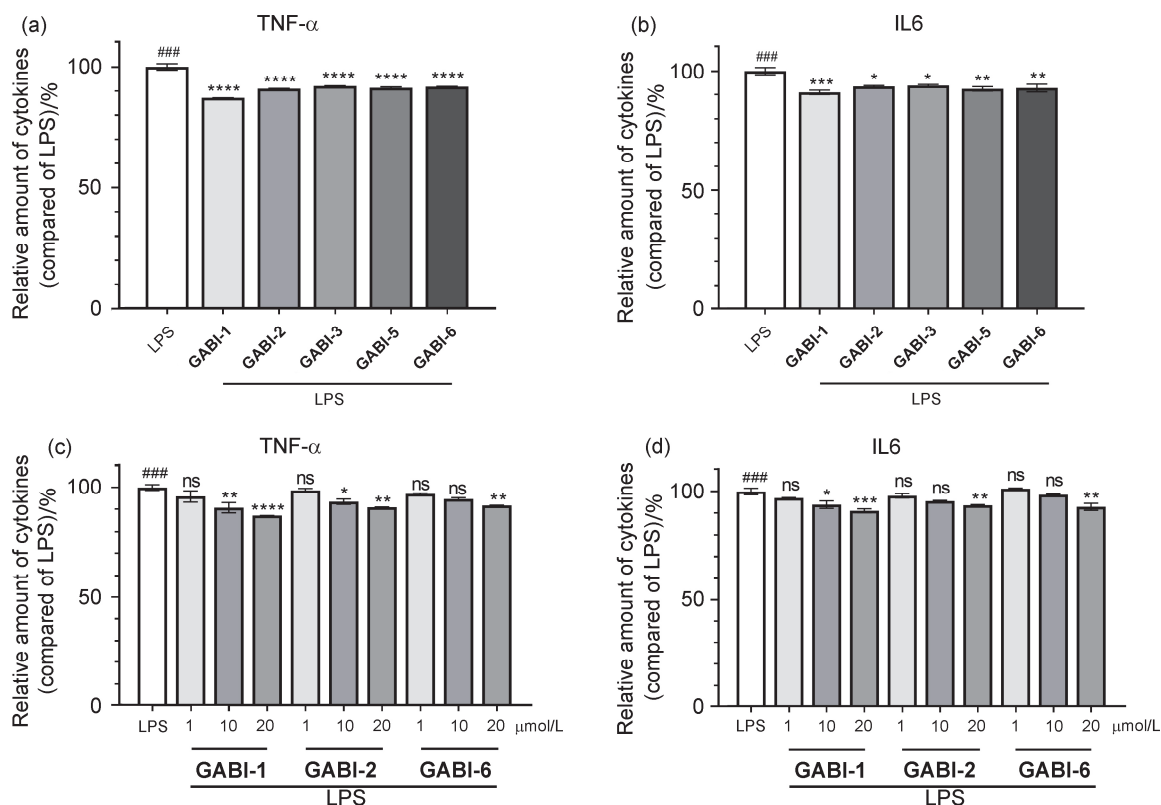


图 5 不同化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TNF- α 和 IL-6 的抑制活性

Figure 5 Inhibitory activities against TNF- α and IL-6 of the different compounds in LPS-induced RAW 264.7 cells

Data are given as mean $\pm$ SEM. (a, b) Inhibition of LPS-induced TNF- α and IL-6 of compounds **GABI-1**, **GABI-2**, **GABI-3**, **GABI-5**, and **GABI-6** at 20 $\mu\text{mol/L}$; (c, d) inhibition of LPS-induced TNF- α and IL-6 of compounds **GABI-1**, **GABI-2**, **GABI-6**. Data are expressed as fold change relative to control values (samples treated with LPS alone). **** p <0.0001, *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared to LPS.

92.84%。这三个化合物呈现一定的浓度依赖性。其中, **GABI-1** 的抗炎效果最好, 可以作为高效抗炎药的潜在候选分子。

为更好评估化合物 **GABI-1** 的抗炎活性, 将其与化合物 **Az**、**GA**、**BI** 以及常用的抗炎药物包括吲哚美辛、布洛芬、阿司匹林进行抗炎活性对比。结果表明, 化合物 **GABI-1** 的抗炎活性在给药浓度为 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 下均优于 **Az**、**GA** 和 **BI**, 且其在给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时优于布洛芬和阿司匹林, 但与吲哚美辛的抗炎活性相比仍有差距。

2 结论

通过 Buchwald-Hartwig 偶联高效合成了 14 个含苯并咪唑结构的萘类衍生物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7**, 并利用 Griess 法发现其在 1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 LPS 诱导巨噬细胞产生炎症介质 NO 有不同程度的抑制效果。利用 ELISA 法进一步研究发现化合物 **GABI-1**、**GABI-2** 和 **GABI-6** 能有效抑制 LPS 诱导巨噬细胞中促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的释放, 且具有一定的浓度依赖性。综合 CCK-8 法细胞毒性研究, **GABI-1** 具有最佳的抗炎活性, 在给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其 NO 抑制率达到约 33.69%, 能显著降低 LPS 诱导巨噬细胞中促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的含量。研究表明, 化合物 **GABI-1** 具有成为优秀抗炎药物的发展潜力, 其具体的作用机制和体内生物活性实验还有待于进一步研究。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振(^1H NMR, ^{13}C NMR 和 ^{19}F NMR)由 VARIAN 400 核磁共振波谱仪或 Bruker AV500 核磁共振波谱仪测定, 采用 CD_2Cl_2 为溶剂, TMS 作为内标; 红外光谱(IR)由 Thermo Fisher Nicolet FT-IR spectrometer 型红外分析仪测定; 高分辨质谱(HRMS)由 Thermo Fisher Scientific LTQ FTICR-MS 质谱仪测定; NOESY 谱由 BRUKER 600 核磁共振波谱仪测定。

所有试剂和溶剂均来自商业购买, 未经进一步纯化直接使用。一氧化氮(NO)检测试剂盒和 LPS (TLR4 激活剂)购自碧云天; Mouse IL-6 ELISA Kit 检测试剂盒和 Mouse TNF- α ELISA Kit 检测试剂盒购自联科生物; CCK-8 检测试剂盒购自 MesGen Biotech。

3.2 化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和 **AzBI-1**~**AzBI-7** 的合成

取 **1** 或 **3** (0.3 mmol), **2** (0.45 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.015 mmol), $t\text{Bu-Xphos}$ (0.03 mmol)和 NaO^tBu 于 25 mL 的

Schlenk 管中, 抽换 N_2 三次, 然后在 N_2 氛围下加入 3 mL 重蒸甲苯, 110 $^\circ\text{C}$ 下反应 24 h, 薄层色谱(TLC)监测[石油醚/乙酸乙酯, $V:V=1:1$]反应至完全。待反应液冷却至室温后, 将反应液倒入水中, 用乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥。蒸除溶剂后, 硅胶柱层析[石油醚/乙酸乙酯/ Et_3N , $V:V:V=200:200:1$]分离得到蓝色化合物 **GABI-1**~**GABI-7** 和紫色化合物 **AzBI-1**~**AzBI-7**。

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-苯并咪唑 (**GABI-1**): 产率 85%. m.p. 141~142 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.37 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.88~7.82 (m, 1H), 7.60~7.53 (m, 2H), 7.38~7.33 (m, 3H), 7.23 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.21~3.13 (m, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ : 145.80, 144.31, 143.80, 142.81, 140.34, 136.94, 136.37, 135.86, 135.02, 134.80, 127.40, 123.85, 122.94, 120.55, 117.29, 111.59, 108.22, 38.78, 24.88, 24.46, 10.65; IR (KBr) ν : 3450, 3054, 2960, 2923, 2863, 1897, 1776, 1725, 1710, 1609, 1556, 1531, 1496, 1456, 1403, 1390, 1373, 1299, 1270, 1217, 1154, 1142, 1121, 1098, 1070, 1051, 1004, 968, 931, 885, 864, 849, 815, 789, 779, 765, 746, 719, 667, 636, 628, 570, 546, 476, 432, 404 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 315.1856, found 315.1856。

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-5-氟-苯并咪唑 (**GABI-2**): 产率 39%. m.p. 115~117 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.38 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.61~7.54 (m, 2H), 7.48 (dd, $J=8.9, 4.7$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.24 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 7.11 (td, $J=9.1, 2.5$ Hz, 1H), 3.17 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 160.0 (d, $J=237.6$ Hz), 146.2, 145.3, 144.2 (d, $J=12.5$ Hz), 143.0, 139.7, 136.9, 136.4, 136.2, 135.1, 131.6, 127.6, 117.3, 112.3 (d, $J=7.2$ Hz), 112.2 (d, $J=8.7$ Hz), 108.1, 106.0 (d, $J=24.4$ Hz), 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CD_2Cl_2) δ : -108.10; IR (KBr) ν : 3434, 2961, 2923, 2863, 1859, 1731, 1622, 1607, 1591, 1563, 1530, 1497, 1439, 1391, 1373, 1360, 1309, 1297, 1260, 1216, 1129, 1115, 1095, 1051, 1003, 970, 951, 868, 851, 828, 817, 803, 782, 750, 720, 704, 669, 645, 630, 613, 558, 483, 439 cm^{-1} ; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FN}_2$ 333.1762, found 333.1761。

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-6-氟-苯并咪唑 (**GABI-3**): 产率 58%. m.p. 91~93 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.38 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.25 (s, 1H),

7.84 (dd, $J=8.9, 4.8$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=10.7, 2.0$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27~7.21 (m, 2H), 7.11 (td, $J=9.2, 2.5$ Hz, 1H), 3.17 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 160.7 (d, $J=239.8$ Hz), 146.3, 144.6, 143.0, 140.2, 139.5, 136.9, 136.4, 136.3, 135.2, 135.1, 127.6, 121.2 (d, $J=10.0$ Hz), 117.3, 111.5 (d, $J=25.8$ Hz), 107.9, 98.3 (d, $J=27.7$ Hz), 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CD_2Cl_2) δ : -105.72; IR (KBr) ν : 3458, 3106, 2956, 2922, 2865, 1862, 1715, 1617, 1595, 1557, 1530, 1497, 1401, 1389, 1371, 1347, 1312, 1263, 1212, 1172, 1111, 1086, 1071, 1050, 1000, 968, 952, 936, 900, 842, 818, 808, 771, 749, 720, 665, 627, 613, 564, 538, 440 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FN}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 333.1762, found 333.1761.

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-5-氯-苯并咪唑 (**GABI-4**): 产率 39%. m.p. 141~143 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.37 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.86 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J=10.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.35~7.29 (m, 2H), 7.24 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.17 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 146.3, 145.1, 144.9, 143.0, 139.6, 136.9, 136.4, 136.2, 135.2, 133.7, 128.5, 127.6, 124.3, 120.2, 117.4, 112.6, 108.1, 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; IR (KBr) ν : 2955, 2920, 2863, 1873, 1726, 1605, 1562, 1530, 1495, 1461, 1431, 1392, 1372, 1306, 1294, 1240, 1215, 1099, 1072, 1052, 1001, 968, 938, 910, 870, 819, 805, 780, 732, 719, 691, 666, 637, 624, 597, 555, 485, 422 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClN}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 349.1464, found 349.1464.

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-6-氯-苯并咪唑 (**GABI-5**): 产率 51%. m.p. 58~59 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.38 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.80 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=10.6, 2.0$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.34~7.30 (m, 2H), 7.25 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.17 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 146.4, 144.7, 143.0, 142.5, 139.4, 136.8, 136.4, 136.3, 135.7, 135.2, 129.7, 127.6, 123.7, 121.4, 117.5, 111.7, 108.1, 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; IR (KBr) ν : 3076, 2957, 2865, 1712, 1611, 1530, 1494, 1451, 1401, 1388, 1371, 1332, 1303, 1275, 1262, 1210, 1137, 1108, 1086, 1051, 999, 967, 907, 849, 811, 781, 749, 731, 694, 666, 632, 599, 560, 538, 499, 428, 405 cm^{-1} ; HRMS (ESI)

calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClN}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 349.1464, found 349.1465.

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-6-甲氧基-苯并咪唑 (**GABI-6**): 产率 46%. m.p. 53~55 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.38 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.81 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J=10.6, 2.0$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.24 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 7.02~6.94 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.17 (hept, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.41 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 158.0, 146.2, 143.3, 143.0, 139.8, 136.9, 136.3, 136.2, 135.6, 135.2, 127.5, 120.6, 117.7, 113.1, 108.3, 94.9, 56.2, 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; IR (KBr) ν : 2958, 2866, 2833, 1717, 1618, 1588, 1558, 1532, 1493, 1456, 1402, 1388, 1372, 1345, 1308, 1274, 1224, 1089, 1050, 1027, 969, 944, 821, 769, 735, 710, 668, 633, 565, 419 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 345.1960, found 345.1960.

1-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-5-甲氧基-苯并咪唑 (**GABI-7**): 产率 42%. m.p. 139~141 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.40~8.31 (m, 2H), 7.58 (dd, $J=10.7, 2.0$ Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.43 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.24 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J=8.9, 2.4$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.17 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.40 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 157.4, 146.3, 144.2, 143.4, 143.0, 139.6, 136.9, 136.3, 136.2, 135.2, 129.3, 127.6, 117.3, 114.5, 112.4, 108.1, 102.0, 56.2, 38.8, 24.9, 24.5, 10.6; IR (KBr) ν : 3416, 3104, 2960, 1619, 1593, 1555, 1532, 1488, 1452, 1400, 1385, 1372, 1305, 1275, 1235, 1215, 1197, 1184, 1151, 1136, 1102, 1086, 1049, 1031, 995, 967, 946, 892, 852, 840, 827, 817, 806, 785, 752, 720, 669, 650, 634, 607, 566, 544, 477, 437, 403 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 345.1960, found 345.1960.

1-萘基-苯并咪唑 (**AzBI-1**): 产率 76%. m.p. 128~129 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.48 (s, 1H), 8.43 (d, $J=9.3$ Hz, 2H), 8.05 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.61 (s, 2H), 7.45 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.41~7.33 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 145.1, 143.5, 143.0, 140.4, 136.9, 136.4, 133.4, 125.5, 124.4, 123.5, 120.9, 112.0, 107.4; IR (KBr) ν : 3126, 3051, 3016, 1689, 1609, 1570, 1538, 1513, 1500, 1452, 1405, 1297, 1282, 1259, 1224, 1216, 1189, 1155, 1133, 1020, 947, 930, 899, 885, 853, 841, 787, 726, 643, 615, 584, 519, 472, 423 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$ 244.1000, found 244.1001.

1-萘基-5-氟-苯并咪唑(**AzBI-2**): 产率 36%. m.p. 160~162 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.50 (s, 1H), 8.43 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 7.97 (dd, $J=8.9$, 4.6 Hz, 1H), 7.69 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.53 (dd, $J=9.2$, 2.5 Hz, 1H), 7.38 (t, $J=9.8$ Hz, 2H), 7.20 (td, $J=9.1$, 2.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 160.1 (d, $J=238.3$ Hz), 145.6 (d, $J=12.7$ Hz), 144.4, 143.1, 140.4, 137.3, 136.7, 130.1, 125.6, 112.6 (d, $J=14.5$ Hz), 112.4, 107.4, 106.6 (d, $J=24.0$ Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CD_2Cl_2) δ : -107.53; IR (KBr) ν : 3125, 3029, 1710, 1617, 1597, 1574, 1538, 1511, 1496, 1473, 1440, 1404, 1372, 1310, 1284, 1230, 1209, 1193, 1144, 1100, 1016, 953, 909, 899, 886, 864, 821, 788, 734, 644, 631, 584, 544, 481, 444, 430, 404 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 263.0979, found 263.0978.

1-萘基-6-氟-苯并咪唑(**AzBI-3**): 产率 47%. m.p. 160~162 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.49~8.39 (m, 3H), 7.80 (dd, $J=8.8$, 4.9 Hz, 1H), 7.75~7.66 (m, 2H), 7.55 (s, 2H), 7.39 (t, $J=9.8$ Hz, 2H), 7.14 (td, $J=9.2$, 2.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 160.9 (d, $J=239.9$ Hz), 143.7 (d, $J=3.1$ Hz), 143.0, 141.5, 140.4, 137.4, 136.9, 133.6 (d, $J=13.4$ Hz), 125.7, 121.7 (d, $J=10.2$ Hz), 111.7 (d, $J=25.0$ Hz), 107.4, 98.9 (d, $J=28.8$ Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CD_2Cl_2) δ : -105.00; IR (KBr) ν : 3122, 3033, 1688, 1615, 1597, 1575, 1538, 1509, 1472, 1456, 1409, 1343, 1295, 1273, 1225, 1195, 1167, 1117, 1096, 1012, 959, 951, 899, 866, 846, 817, 784, 772, 736, 701, 643, 625, 615, 607, 585, 570, 489, 455, 434, 417 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 263.0979, found 263.0978.

1-萘基-5-氯-苯并咪唑(**AzBI-4**): 产率 33%. m.p. 154~155 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.48 (s, 1H), 8.44 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.44~7.35 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 146.0, 144.3, 143.0, 140.4, 137.4, 136.9, 132.2, 128.9, 125.7, 124.8, 120.7, 112.8, 107.5; IR (KBr) ν : 3066, 3020, 1609, 1573, 1537, 1518, 1457, 1426, 1403, 1372, 1342, 1305, 1281, 1212, 1194, 1117, 1057, 1020, 951, 911, 898, 861, 850, 798, 725, 653, 629, 606, 588, 581, 476, 429, 411 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 279.0684, found 279.0682.

1-萘基-6-氯-苯并咪唑(**AzBI-5**): 产率 44%. m.p. 156~158 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.50~8.40 (m, 3H), 8.04 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J=8.6$ Hz, 1H),

7.71 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.43~7.33 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 143.8, 143.7, 142.8, 140.4, 137.5, 136.9, 134.1, 130.2, 125.7, 124.1, 121.8, 112.1, 107.5; IR (KBr) ν : 3090, 3018, 1612, 1594, 1577, 1541, 1518, 1453, 1404, 1373, 1335, 1312, 1286, 1269, 1224, 1195, 1138, 1108, 1066, 1018, 936, 912, 900, 847, 831, 800, 750, 718, 687, 654, 646, 617, 598, 582, 554, 482, 419 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 279.0684, found 279.0683.

1-萘基-6-甲氧基-苯并咪唑(**AzBI-6**): 产率 37%. m.p. 132~134 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.43 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 8.39 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J=9.8$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J=8.8$, 2.4 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 158.1, 143.5, 142.3, 140.4, 139.2, 137.1, 136.6, 134.1, 125.6, 121.2, 112.5, 107.5, 95.8, 56.3; IR (KBr) ν : 3093, 3081, 3004, 2956, 2836, 1975, 1854, 1793, 1625, 1590, 1574, 1539, 1517, 1494, 1479, 1467, 1453, 1439, 1409, 1375, 1349, 1319, 1287, 1276, 1230, 1216, 1204, 1174, 1130, 1112, 1035, 930, 898, 817, 809, 789, 765, 744, 732, 701, 642, 622, 583, 467, 441, 420 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 275.1179, found 275.1178.

1-萘基-5-甲氧基-苯并咪唑(**AzBI-7**): 产率 44%. m.p. 118~119 °C; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ : 8.45 (s, 1H), 8.41 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 7.92 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.40~7.32 (m, 3H), 7.07 (dd, $J=8.9$, 2.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2) δ : 157.2, 145.9, 143.6, 143.2, 140.5, 136.9, 136.4, 127.9, 125.6, 114.2, 112.4, 107.2, 103.0, 56.1; IR (KBr) ν : 3300, 3115, 3075, 3010, 2979, 2943, 2843, 1702, 1671, 1615, 1593, 1574, 1539, 1521, 1483, 1441, 1411, 1388, 1379, 1354, 1313, 1297, 1278, 1239, 1197, 1157, 1106, 1016, 945, 926, 900, 871, 824, 808, 790, 752, 727, 696, 646, 621, 598, 586, 565, 508, 474, 433 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 275.1179, found 275.1179.

3.3 活性测试方法

3.3.1 Griess 法检测化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症模型的 NO 的抑制作用

在 37 °C, 5% CO_2 恒温培养箱, 将小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 接种于含体积分数为 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM (dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基中, 每 24 h 更换培养基, 待细胞传至三代后, 以 5×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板, 孵育 24 h. 给药组和模型对

照组加入不同给药浓度(1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)的化合物培养 1 h. 随后加入 LPS (500 ng/孔), 用 GAS-Na 作为阳性对照继续培养 48 h, 离心(转速 1000 r/min、时间 1 min)后收集上清液. 然后按照 NO 说明书操作, 并计算其相对于模型组的 NO 抑制率. NO 抑制率(%)=[1-(OD 值/模型组)] $\times$ 100%.

3.3.2 ELISA 法检测化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症模型的 TNF- α 和 IL-6 的抑制作用

在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱, 将小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 接种于含体积分数为 10%的 FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 每 24 h 更换培养基, 待细胞传至三代后, 以 5×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板, 孵育 24 h. 给药组和模型对照组加入不同给药浓度(1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)的化合物, 培养 1 h. 随后加入 LPS (500 ng/孔), 继续培养 48 h, 离心(转速 1000 r/min、时间 1 min)后收集上清液. 然后按照试剂盒说明书操作, 通过 ELISA 试剂盒(联科生物)测试细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α). 细胞因子相对含量(%)=[给药组细胞因子含量/模型组细胞因子含量] $\times$ 100%, 细胞因子含量是根据预先建立的细胞因子含量和 OD 值之间的标准曲线计算得到.

3.3.3 CCK-8 法检测化合物对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞活力的影响

将巨噬细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 孵育 24 h. 分别加入不同给药浓度(1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)的化合物作为给药组, 以及加入同样体积的细胞培养液作为空白对照组, 继续培养 48 h. 继续加入体积分数为 10%的 CCK-8 无血清 DMEM 液 100 μL , 并在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱孵育 45 min, 于 490 nm 处测 OD 值. 细胞存活率(%)=(给药组 OD 值/空白对照组 OD 值) $\times$ 100%.

3.3.4 统计方法

图中数据均为 mean $\pm$ SEM. 使用 GraphPad 8.0 软件对数据进行处理, 显著水平为 0.05. 所有体外实验重复三次.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 GABI-1~GABI-7 和 AzBI-1~AzBI-7 的核磁共振谱图, 化合物 GABI-2 和 GABI-7 的单晶数据以及生物活性测试数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Coussens, L. M.; Werb, Z. *Nature* **2002**, 420, 860.
- [2] (a) Jin, S. E.; Kim, O. S.; Yoo, S. R.; Seo, C. S.; Kim, Y.; Shin, H. K.; Jeong, S. J. *BMC Complementary Altern. Med.* **2016**, 16, 219.

- (b) Liu, X. C.; Zheng, L.; Li, Q. F.; Liu, Y.; Ruan, X. C.; Hou, W. Q.; Ding, Y. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, 48, 1.
- [3] Pan, M.-H.; Chiou, Y.-S.; Tsai, M.-L.; Ho, C.-T. *J. Tradit. Complementary Med.* **2011**, 1, 8.
- [4] (a) Catalano, M.; Roviello, G.; Santi, R.; Villari, D.; Spatafora, P.; Galli, I. C.; Sessa, F.; Conte, F. L.; Mini, E.; Cai, T. M. S.; Nesi, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24.
- (b) Mantovani, A. *Curr. Mol. Med.* **2010**, 10, 369.
- [5] (a) Safayhi, H.; Sabieraj, J.; Sailer, E. R.; Ammon, H. P. T. *Planta Med.* **1994**, 60, 410.
- (b) Ornano, L.; Venditti, A.; Ballero, M.; Sanna, C.; Quassinti, L.; Bramucci, M.; Lupidi, G.; Papa, F.; Vittori, S.; Maggi, F.; Bianco, A. *Chem. Biodiversity* **2013**, 10, 1464.
- [6] Guarrera, M.; Turbino, L.; Rebor, A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2001**, 15, 486.
- [7] Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, 4, 118.
- [8] Cao, T. T.; Li, Y.; Yang, Z. Y.; Yuan, M. X.; Li, Y.; Yang, H. J.; Feng, Y. C.; Yin, S. F. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, 88, 264.
- [9] Zhang, L. Y.; Yang, F.; Shi, W. Q.; Zhang, P.; Li, Y.; Yin, S. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5722.
- [10] (a) Pratsinis, H.; Haroutounian, S. A. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 16, 201.
- (b) Zheng, J. J.; Shao, C. L.; Chen, M.; Gan, L. S.; Fang, Y. C.; Wang, X. H.; Wang, C. Y. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 1569.
- [11] Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 10257.
- [12] Mantovani, A.; Pierotti, M. A. *Med. Chem. Res.* **2016**, 25, 173.
- [13] (a) Caroff, E.; Meyer, E. A.; Aanismaa, P.; Froidevaux, S.; Keller, M.; Piali, L. *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 11533.
- (b) Veerasamy, R.; Roy, A.; Karunakaran, R.; Rajak, H. *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 663.
- (c) Can, N. O.; Cevik, U. A.; Saglik, B. N.; Ozkay, Y.; Atli, O.; Baysal, M.; Ozkay, U. D.; Can, O. D. *Molecules* **2017**, 22.
- [14] (a) Nishigaya, Y.; Takase, S.; Sumiya, T.; Kikuzato, K.; Sato, T.; Niwa, H.; Sato, S.; Nakata, A.; Sonoda, T.; Hashimoto, N.; Namie, R.; Honma, T.; Umehara, T.; Shirouzu, M.; Koyama, H.; Yoshida, M.; Ito, A.; Shirai, F. *J. Med. Chem.* **2023**, 66, 4059.
- (b) Chen, Z. L.; Li, J. Y.; Yang, H.; He, Y. L.; Shi, Q. Y.; Chang, Q.; Liu, R. Q.; Huang, X.; Li, Y. X. *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 66, 116784.
- (c) Satija, G.; Sharma, B.; Madan, A.; Iqbal, A.; Shaquiquzzaman, M.; Akhter, M.; Parvez, S.; Khan, M. A.; Alam, M. M. *J. Heterocycl. Chem.* **2022**, 59, 22.
- [15] (a) Baron, A.; Le Sann, C.; Mann, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 58, 116656.
- (b) Lungu, L.; Blaja, S.; Cucicova, C.; Ciocarlan, A.; Barba, A.; Kulcitki, V.; Shova, S.; Vornicu, N.; Geana, E. I.; Mangalagiu, I. I.; Aricu, A. *Molecules* **2023**, 28, 116656.
- [16] (a) Sindhu, G.; Kholiya, R.; Kidwai, S.; Singh, P.; Singh, R.; Rawat, D. S. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2022**, 36, e23123.
- (b) Bhaskar, V.; Kumar, S.; Nair, A. S.; Rajappan, K. P.; Sudevan, S. T.; Parambi, D. G. T.; Al-Sehemi, A. G.; Zachariah, S. M.; Papachen, L. K. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2023**, 26, 668.
- [17] (a) Chen, J. W.; Xu, L. K.; Wang, B. G.; Zhang, D. N.; Zhao, L. L.; Bei, Z. C.; Song, Y. B. *Molecules* **2023**, 28, 1579.
- (b) Tonelli, M.; Simone, M.; Tasso, B.; Novelli, F.; Boido, V.; Sparatore, F.; Paglietti, G.; Priol, S.; Giliberti, G.; Blois, S.; Ibba, C.; Sanna, G.; Loddo, R.; La Colla, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2937.
- (c) Vausselin, T.; Seron, K.; Lavie, M.; Mesalam, A. A.; Lemasson, M.; Belouard, S.; Feneant, L.; Danneels, A.; Rouille, Y.; Cocque-rel, L.; Foquet, L.; Rosenberg, A. R.; Wyckowski, C.; Meuleman, P.; Melnyk, P.; Dubuisson, J. *J. Virol.* **2016**, 90, 8422.
- [18] (a) Noor, A.; Qazi, N. G.; Nadeem, H.; Khan, A. U.; Paracha, R. Z.; Ali, F.; Saeed, A. *Chem. Cent. J.* **2017**, 11.
- (b) Radhamanan, R.; Alagumuthu, M.; Nagaraju, N. *Future Med. Chem.* **2018**, 10, 1805.

- [19] (a) Mambwe, D.; Korkor, C. M.; Mabhula, A.; Ngqumba, Z.; Cloete, C.; Kumar, M.; Barros, P. L.; Leshabane, M.; Coertzen, D.; Taylor, D.; Gibbard, L.; Njoroge, M.; Lawrence, N.; Reader, J.; Moreira, D. R.; Birkholtz, L. M.; Wittlin, S.; Egan, T. J.; Chibale, K. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 16695.
(b) Toro, P.; Klahn, A. H.; Pradines, B.; Lahoz, F.; Pascual, A.; Biot, C.; Arancibia, R. *Inorg. Chem. Commun.* **2013**, *35*, 126.
(c) Okombo, J.; Brunschwig, C.; Singh, K.; Dziwornu, G. A.; Barnard, L.; Njoroge, M.; Wittlin, S.; Chibale, K. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 372.
- [20] Woolley, D. W. *J. Biol. Chem.* **1944**, *152*, 225.
- [21] Sabat, M.; VanRens, J. C.; Laufersweiler, M. J.; Brugel, T. A.; Maier, J.; Golebiowski, A.; De, B.; Easwaran, V.; Hsieh, L. C.; Walter, R. L.; Mekel, M. J.; Evdokimov, A.; Janusz, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5973.
- [22] Bamborough, P.; Christopher, J. A.; Cutler, G. J.; Dickson, M. C.; Mellor, G. W.; Morey, J. V.; Patel, C. B.; Shewchuk, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6236.
- [23] Buckley, G. M.; Ceska, T. A.; Fraser, J. L.; Gowers, L.; Groom, C. R.; Higuieruelo, A. P.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3291.
- [24] Xu, Z. J.; Yang, Z.; Liu, Y. T.; Lu, Y. X.; Chen, K. X.; Zhu, W. L. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 69.
- [25] (a) Nieto, C. I.; Cabildo, P.; Garcia, M. A.; Claramunt, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1620.
(b) Garcia, M. A.; Claramunt, R. M.; Solcan, T.; Milata, V.; Alkorta, I.; Eguero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 100.
(c) Claramunt, R. M.; Lopez, C.; Alkorta, I.; Elguero, J.; Yang, R.; Schulman, S. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 712.
- [26] García-Báez, E. V.; Padilla-Martínez, II; Cruz, A.; Rosales-Hernández, M. C. *Molecules* **2022**, *27*, 6268.
- [27] (a) Limtrakul, P.; Yodkeeree, S.; Pitchakarn, P.; Punfa, W. *Nutr. Res. Pract.* **2016**, *10*, 251.
(b) Chen, L.; Teng, H.; Fang, T.; Xiao, J. B. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 846.
(c) Moshage, H.; Kok, B.; Huizenga, J. R.; Jansen, P. L. M. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 892.

(Zhao, C.)