

# 第一章 緒論

本論文之標的化合物為 2,3,5,6,7,8,9-substituted 2,3,4,9-tetrahydrofuro-[2,3-*b*]quinolin-4-dione 及其衍生物係屬於 Furoquinolones 衍生物。所評估之生理活性包括抗心律不整、抗血小板凝集、抗發炎及抗過敏活性等。著者在此先將 furoquinolones 類化合物之研究概況，以及抗發炎、抗過敏相關的肥胖細胞、嗜中性白血球、小神經膠原細胞、巨噬細胞等生理功能及活性測定原理，加以敘述以作為本論文之背景資料。

## 第一節 Furoquinolones 類化合物之研究概況

### 壹. 自然界中已知之 Furoquinolones 類植物成分

線型 喃 類(linear furoquinolines)生物鹼常見於自然界芸香科 (*Rutaceae*)植物中，此類生物鹼具有顯著之生理活性，例如: skimmianine (茵芋鹼)有抗菌、鎮靜、降溫及抗利尿作用，pteleatinium chloride 具有抗菌作用，hapliphylidine、dubinidine、perfoline 具有鎮靜安神作用，foliosidine 具有抗心律不整活性，dictamnine (白鮮鹼)具有強烈平滑肌收縮，子宮收縮作用<sup>1</sup>，抗黴菌作用<sup>2</sup>及抑制鈣離子通道而造成血管擴張<sup>3</sup>，confusameline 及 *o*-methylconfusameline 則有抗血小板凝集活性<sup>4</sup>，skimmianine 和 kokusaginine 有選擇性抑制 5-HT<sub>2</sub> 活性<sup>5</sup> 等等。但此類生物鹼之未被廣泛應用於臨床上，主要可能是因溶解度太低之故。

然而結構與之相近之 喃 酮類(furoquinolones)生物鹼則較少見之於文獻 根據文獻報告此類生物鹼為自然界較為罕見，自 1968 年 F.N. Lahey 等由 *Acronyia* 分離出 acrophylline 及 acrophyllidine<sup>6</sup> 以來，迄今已知此類生物鹼(如 Table 1 所示)大多存在於 *Acronyia* 屬、*Dictamnus* 屬、*Ptelea* 屬、*Glycosmis* 屬和 *Ruta* 屬植物中<sup>6-9</sup>。其中 acrophyllidine 具有強烈之抗心律不整活性，其抑 ischemia / reperfusion-induced polymorphic ventricular tachyarrhythmias 之 EC<sub>50</sub> 為 4.4 μM<sup>10</sup>；acrophylline 具有抗過敏活性，其活性略低於 diphenhydramine<sup>11</sup>。而其他有關此類生物鹼之合成及生理活性研究則極為少見，因此引起著者從事其合成研究之興趣。

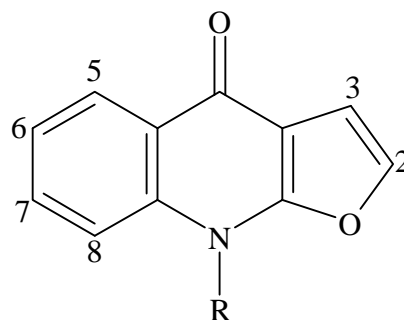
根據文獻記載芸香科植物白鮮(*Dictamnus dasycarpus*. Turcz.)之根皮含有多種成分如 limonoids, limonin, fraxinellone (梣皮酮), isofraxinellone<sup>12</sup>, 6β-hydroxyfraxinellone, calodendrolide, obacunon (白鮮酮)等內酯(lactones)類及一些 furoquinoline alkaloids 例如 dictamnine (白鮮鹼), haplopine<sup>2</sup>。此

外,亦曾由 *Dictamnus albus* 得到 skimmianine (茵芋鹼),  $\gamma$ -fagarin (崖椒鹼), maculosidine 及 isomaculosidine<sup>8</sup>。

在這些成分中, 喃 酮類生物鹼具有其生理活性, 因此引發著者研究其成分衍生物之合成與生理活性之興趣。

**Table 1** Some furoquinolones have been isolated from plants

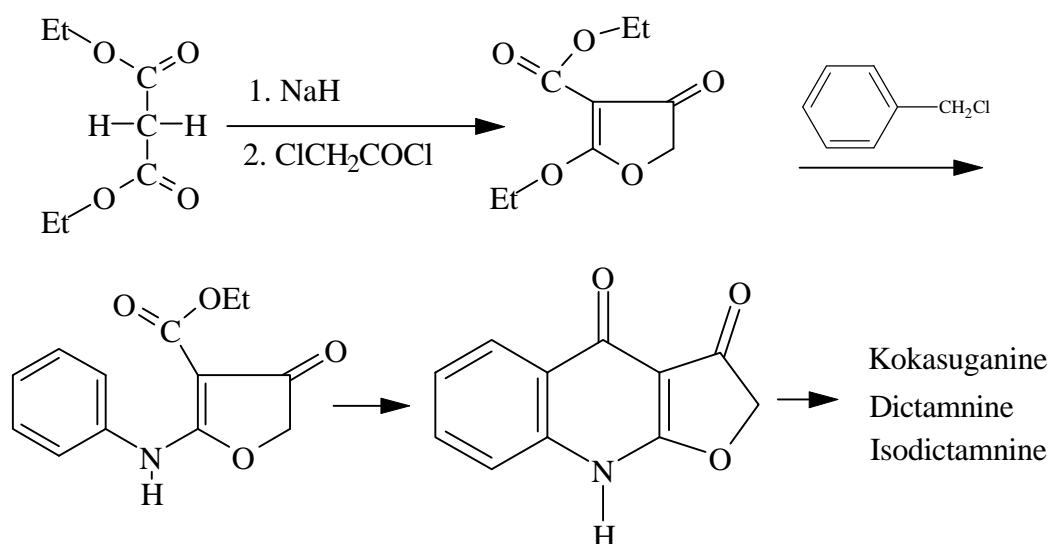
Alkaloids	Botanical source (genus)	Structures				
		5	6	7	8	R
1. Acrophylline	<i>Acronychia</i> <sup>6</sup>	-	-	-OMe	-	-CH <sub>2</sub> CH=C(Me) <sub>2</sub>
2. Acrophyllidine	<i>Acronychia</i> <sup>6</sup>	-	-	-OMe	-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(OH)Me <sub>2</sub>
3. Glycarpine	<i>Glycosmis</i> <sup>7</sup>	-OMe	-	-OMe	-	-CH <sub>3</sub>
4. Isomaculosidine	<i>Dictamnus</i> <sup>8</sup> , <i>Ptelea</i>	-	-OMe	-	-OMe	-CH <sub>3</sub>
5. Isotaifine	<i>Ruta</i> <sup>9</sup>	-	-	-	-OMe	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
6. 8-Methoxytaifine	<i>Ruta</i> <sup>9</sup>	-	-	-	OMe	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
7. Taifine	<i>Ruta</i> <sup>9</sup>	-	-	-OMe	-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>



## 貳. Furoquinolones 類化合物之合成方法

一般線型 喃 酮類 (linear furoquinolones) 之合成法見之文獻者有 Tüppy-Böhm<sup>1</sup> 法; Ramachandran<sup>1</sup> 法; Lemieux-Von Rudloff<sup>1</sup> 法; Govindachari<sup>1,13</sup> 法; Narasimhan<sup>1,14-17</sup> 法; Huffman<sup>1,18,19</sup> 法; Grundon<sup>1,20,21</sup> 法; Kuwayama<sup>1,22,23</sup> 法及其他等。

著者為了確立 furoquinolones 之結構及合成方法，因以合成簡易及方便為考量，參照上述文獻擬定採用 Tüppy-Böhm 法並稍加修飾作為合成之方法。其合成方法如下：



## 第二節 心室肌細胞的電氣生理及病理概述

依照 Hoffman 等人所述將心室肌細胞的動作電位(transmembrane action potential)分為 phase 4 , phase 0 , phase 1 , phase 2 及 phase 3 等分期:

Phase 4 : 細胞內外之  $\text{Na}^+$  ,  $\text{K}^+$  及  $\text{Ca}^{++}$  處於平衡狀態而將電位維持在  $-90$  mv (millivolt)。

Phase 0 :  $\text{Na}^+$  通道快速打開, 使得  $\text{Na}^+$  快速內流產生去極化(depolarization), 然後通道隨即關閉, 在此期間  $\text{Ca}^{++}$  通道打開  $\text{Ca}^{++}$  因濃度梯度的關係而開始內流。

Phase 1 : 因一部份  $\text{K}^+$  外流使得胞內電位下降。

Phase 2 :  $\text{Ca}^{++}$  大量內流, 而  $\text{K}^+$  持續外流維持一個動態平衡, 維持高原期, 而  $\text{Ca}^{++}$  在此期間造成心肌收縮。

Phase 3 :  $\text{Ca}^{++}$  通道關閉,  $\text{K}^+$  大量外流使得電位再次下降至靜止膜電位。最後再由  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump 將胞內  $\text{Na}^+$  及胞外  $\text{K}^+$  exchange 以備下次細胞的再極化。而胞內  $\text{Ca}^{++}$  會藉由  $\text{Ca}^{++}$ -pump 將  $\text{Ca}^{++}$  帶出細胞外。如 Fig. 1 所示。

隨著社會經濟之發達，人民生活之富裕及高齡化的趨勢，心臟疾病患者日益增加，近年來被列為國內十大死亡原因之一，其中以心律不整，心絞痛及心臟衰竭最為常見，而且這三種症狀常併發於同一病患。

大部分的心律不整的發生是由於電氣訊號的產生或傳遞過程或兩者都出現問題。而心室性心律不整與鬱血性心臟衰竭（congestive heart failure）又有相當密切之關係。例如嚴重之心臟衰竭的病人，其實發生死亡原因大多是由於心室之纖維顫動（ventricular fibrillation）所引起的，很少是單純由於心室功能喪失所致<sup>24-26</sup>。

因此預防及治療心臟衰竭的藥物除了必須具有強心作用外尚須具抗心律不整的作用。

現今之抗心律不整的藥物，依據其電生理的效應，大致可分成下列四大類：

(一)鈉通道阻斷劑（Sodium channel blocker）：

這類藥物如 quinidine、lidocaine、flecainide 等能抑制心肌鈉離子之快速內流，因此延長有效不應期及減少第四期之去極化。

(二)乙型腎上腺素接受體阻斷劑（ $\beta$ -Adrenergic receptor blocker）：

藥物如 propranolol 等，能減少心臟受到交感神經傳導物質（catecholamines）之刺激，抑制第四期之去極化。

(三)鉀通道阻斷劑（Potassium channel blocker）：

因抑制鉀通道，延長動作電位期（action potential duration）導致細胞內鈣離子濃度增加，產生 positive inotropic effect，例如 OPC-8212<sup>27,28</sup>、thaliporphine<sup>29</sup>、RP-62719<sup>30</sup> 等近年來被開發出來之藥物。

(四)鈣通道阻斷劑（Calcium channel blocker）：

如 verapamil 等，能選擇性的阻斷慢速鈣離子孔道。

這四類抗心律不整藥物當中，第一、二、四類藥物常常會產生 negative inotropic effect 之副作用，因此限制了心衰竭病患之使用。而第三類鉀通道阻斷劑不僅能緩解心律不整現象，同時具有 positive inotropic effect，適用心衰竭之心律不整病患，目前被認為是最理想藥物。

### 第三節 血小板 (Platelet) 之生理及病理功能

血小板在血液凝集的過程中扮演相當重要的角色，當血管內皮細胞受損或血管受傷破裂時，血管會先收縮，同時暴露出來的組織會分泌出膠原 (collagen) 及 ADP (adenosine 5'-diphosphate)，促使血小板改變形狀，以便附著於受損處並引起血小板的凝集與釋放反應<sup>31</sup>。另外，受損的組織會釋出組織血栓形成素 (tissue thromboplastin)，進而活化凝血機制的外在系統產生 thrombin。Thrombin 會使纖維蛋白原 (fibrinogen) 形成纖維蛋白 (fibrin)，而纖維蛋白再受到 ADP 之牽引，與附著凝集在受損處之血小板集團結合，進而產生凝血塊 (fibrin clot)，再聚集成堅固的血小板止血栓 (thrombus)，達到止血的效果<sup>32</sup>。Collagen 與 thrombin 除了會促使凝血塊的形成來幫助止血外，也可以活化血小板引起血小板釋放 ADP、serotonin 等物質，幫助血液凝集。

當 thrombin、collagen、ADP、PAF (platelet-activating factor) 及 thromboxane A<sub>2</sub> 等物質與血小板細胞膜上之特定接受體結合後，再經由 G protein (GTP-binding protein) 將訊息傳遞出去，經由 G protein 活化 PLC (phospholipase C)，促使 inositol phospholipids 的水解，增加細胞內 diacylglycerol 及 IP<sub>3</sub> (inositol-1,4,5-triphosphate) 的含量，IP<sub>3</sub> 會促使鈣離子從血小板 dense tube 釋放出來，當鈣離子的濃度增加時，可活化 PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>) 釋放出 AA (arachidonic acid)，AA 受 cyclooxygenase 的作用轉變成 prostaglandin endoperoxides (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>)，再經由 thromboxane synthetase 的作用，轉變成 TXA<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>) 促進血小板凝集及釋放反應<sup>33</sup> (Fig. 2；感謝台大鄧哲明教授提供本圖)，而 PGH<sub>2</sub> 在血小板中經 prostacyclin I<sub>2</sub> Synthetase 的作用，產生 PGI<sub>2</sub> (prostacyclin I<sub>2</sub>)，因此 TXA<sub>2</sub> 所扮演的角色是血小板凝集引發劑，而 PGI<sub>2</sub> 則是血小板凝集抑制劑。除此之外，鈣離子亦會與一種稱之為 calmodulin 的蛋白質結合，形成 Ca<sup>2+</sup>-calmodulin 的複合體，促使血小板收縮。

血小板雖可參與形成血栓，達到止血的效果，但血栓若無法及時消除，則會阻塞較小之血管造成栓塞，引起急性血管併發症。而不適當之凝血或由於高血脂、糖尿病、腫瘤、動脈或靜脈硬化等，所造成血小板之不正常活化，均是造成血栓栓塞疾病的主因，及可能引發動脈硬化、心肌梗塞、腦中風與腎血管疾病，這些都是文明社會中常見之死因<sup>34</sup>。

目前臨床上最常被使用的抗血小板藥物 aspirin，是抑制血小板 cyclooxygenase 而阻斷 TXA<sub>2</sub> 生成，但是對細胞作用的選擇性差，會抑制

內皮細胞合成 prostacyclin。另一個用於臨床的抗血小板藥物 ticlopidine，則是選擇性抑制 ADP 引起血小板活化，但是藥效緩慢，可能引起白血球缺乏。近年來也有不少新型的化合物具有抗血小板活性，主要抑制 TXA<sub>2</sub> (1) synthetase 及(2)其與 TXA<sub>2</sub> receptor，其中 oragrel sodium (xanbon, OKY-046)已在日本核准上市。然而至目前為止，aspirin 仍是臨床上公認最安全的少數抗血小板藥物之一。因此開發更理想之新型抗血小板凝集藥物，是醫藥界急待解決之課題。

本論文之實驗即應用上述之原理，分別以 thrombin、AA、collagen、PAF 引發血小板凝集，測試化合物抑制其凝集的程度。

## 第四節 肥胖細胞 (Mast cells) 與嗜中性白血球 (Neutrophils) 之生理功能

如 Fig. 3 所示，肥胖細胞在即時型過敏反應中扮演相當重要的角色，當肥胖細胞受到外來的刺激被活化後，會釋放出多種發炎誘導物質 (inflammatory mediators)<sup>35,36</sup>，如 vasoactive mediators (如 histamine, kininogenase, PAF) 及 spasmogens (如 histamine, PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>)，這些物質分別會導致血管擴張、通透性增加，或引發支氣管平滑肌、黏膜水腫及分泌增加，造成過敏及氣喘的發生<sup>37,38</sup>。

另外也會釋放出化學誘引劑 (chemoattractants)，例如 ECF-A 及 NCF(neutrophil chemotactic factor)，這些化學媒介物會活化嗜中性白血球，當嗜中性白血球被活化後，會產生高反應性之超氧自由基 (superoxide anion; O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、hydroxy radical (OH<sup>·</sup>) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 等具有細胞毒性的 oxygen species<sup>39</sup>，而導致細胞損傷，這些細胞損傷包括老化(aging)<sup>40</sup>、類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)<sup>41,42</sup> 及腸炎 (inflammatory bowel disease)<sup>43,44</sup> 而 ischemia-reperfusion injury 也容易產生 oxygen species<sup>45-47</sup>；同時當嗜中性白血球被活化時，也會釋放大量的 lysosomal enzymes，這些酵素含對組織進行蛋白質分解<sup>48</sup>，而導致肺氣腫 (pulmonary emphysema)、類風濕性關節炎、動脈硬化 (arteriosclerosis) 及腎小球腎炎 (glomerulonephritis) 等疾病的發生與惡化<sup>49-51</sup>。

因此，若能研發出抑制肥胖細胞及嗜中性白血球活化之藥物，即可減緩發炎症狀之痛苦，對過敏及發炎的預防與治療將有莫大的助益。

本論文即利用此模式篩選抗過敏及抗發炎物質，以 compound 48/80 [a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl) methylamine with formaldehyde] 誘發肥大細胞釋放 β-glucuronidase 及 histamine，測試化合物抑制反應的程度。同時測試化合物對 fMLP (*N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) 引起嗜中性白血球釋放 β-glucuronidase 及 lysozyme 反應之抑制作用。另外也測試化合物對因 fMLP 及 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 引起嗜中性白血球超氧自由基形成之抑制作用，其中 fMLP 與 PMA 是分別作用在細胞膜之接受體及細胞內之 PKC 上。



## 第五節 小神經膠質細胞 (Microglial cells) 之生理功能

小神經膠質細胞是存在腦中之巨噬細胞，它與大部分的發炎、感染以及中樞神經系統之退化性疾病都有密切的關係<sup>52,53</sup>。

小神經膠質細胞與許多中樞神經系統疾病的病發有關，例如多發性硬化(multiple sclerosis)<sup>54</sup>、阿茲海默症 (Alzheimer's disease)<sup>55</sup>、巴金森氏症 (Parkinson's disease)<sup>56</sup> 及愛滋病引起之痴呆 (AIDS dementia)<sup>57</sup>。

當小神經膠質細胞被細菌性內毒素 (lipopolysaccharide; LPS) 活化時，一氧化氮 (nitric oxide; NO) 及腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor; TNF) 等物質就會被釋放出來<sup>58,59</sup>，NO 可導致缺血性及神經退化性疾病之神經元細胞死亡<sup>60</sup>，也會產生多發性硬化 (multiple sclerosis) 之病變<sup>61</sup>。

TNF- $\alpha$  在老化性阿茲海默症中神經元退化之病發過程也扮演了相當重要的角色<sup>62</sup>。

總而言之，抑制產生 NO 及 TNF- $\alpha$  之物質，可當作治療多種中樞神經系統疾病之用藥。

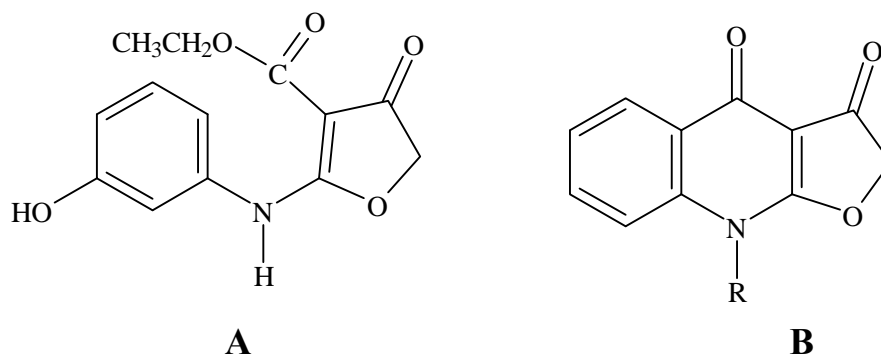
## 第六節 巨噬細胞 (Macrophages) 之生理功能

巨噬細胞在對抗病毒及微生物致病原 (microbial pathogen) 侵犯人體功能時，扮演重要的角色，同時也是身體免疫功能的調適者<sup>63</sup>。巨噬細胞也會與免疫系統中的其他細胞產生反應，當巨噬細胞受到 LPS 活化時，就會產生 TNF、NO 及前列腺素 (prostaglandins; PGs) 等發炎物質<sup>64-66</sup>。

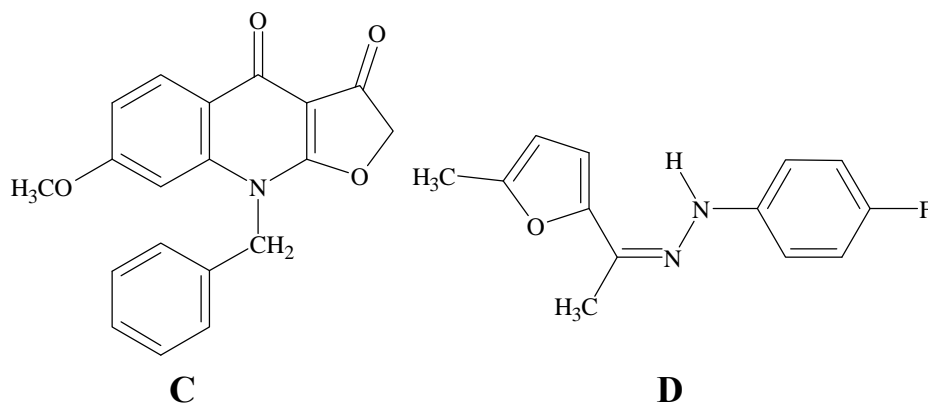
TNF 能引發致死性休克 (lethal shock)、組織損傷 (tissue injury)、急性與慢性發炎以及惡病質 (cachexia) 等病症<sup>65,67</sup>。而 NO 則是扮演巨噬細胞引發細胞毒性 (macrophage-induced cytotoxicity) 之主要角色，但是過量的 NO 卻會引發敗血性休克 (septic shock)<sup>68</sup>。PGE<sub>2</sub> 則被視為是導致發炎特有的血管擴張及紅腫的物質，也會與其他物質產生協同作用，使發炎更惡化<sup>69</sup>。

## 第七節 研究動機與目的

芸香科植物如白鮮皮(*Dictamnus dasycarpus*. Turcz.)所含之 furoquinoline 或 furoquinolone 具有抗過敏抗發炎、抗血小板凝集、抗心律不整及多種生理活性<sup>1-5,10,11</sup>。本研究室在合成 furoquinoline alkaloids<sup>70-73</sup> 過程中，發現其中間產物 ethyl 2-(3-hydroxyanilino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (A)<sup>74</sup>、*N*-alkyl-2,3,4,9-tetrahydrofuro[2,3-*b*]quinolin-3,4-diones (B)<sup>75</sup> 衍生物具有抗過敏活性。同時本研究室在新型抗心律不整藥物開發研究中發現 *N*-benzyl-7-methoxy-2,3,4,9-tetrahydrofuro[2,3-*b*]quinolin-3,4-dione (C) 對瞬間外流鉀電流具有抑制活性，動作電位週期延長，心收縮力增強，但對 RA 自主節律心跳頻率幾乎不會影響，係屬於第三類鉀管道阻斷劑<sup>76</sup>，也可以說是最適用於心衰竭之心律不整病人的預防與治療。

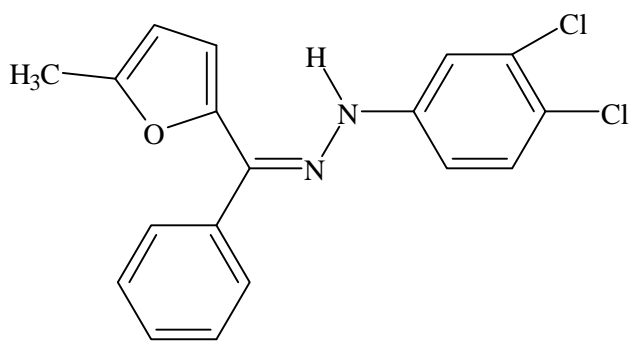


此外，在合成 furopyrazoles 衍生物過程中發現中間產物如 5-methyl-2-furyl methyl ketone 4'-fluorophenylhydrazone(D)<sup>77</sup>、5-methyl-2-furylphenyl ketone 3',4'-dichlorophenylhydrazone (E)<sup>78</sup>、diaryl ketone phenylhydrazone(F)衍生物具有抗血小板凝集活性<sup>79</sup>。而這類化合物會有 *E* 及 *Z*-form 的 isomers 混合物，此 isomers 容易在有機溶媒 (DMSO) 中互換，又測試生理活性時用 DMSO 等溶媒，所以沒做 isomers 的分離。

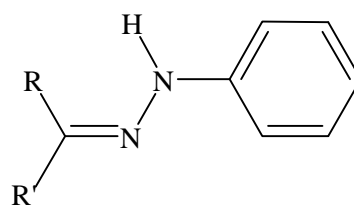


根據以上結果，著者擬定幾個方向進行研究:

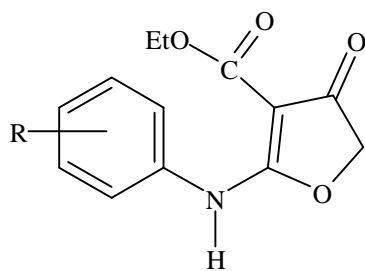
- (1) 合成 ethyl 2-(substituted anilino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (G)及 *N*-substituted benzyl-5,6,7,8-substituted 2,3,4,9-tetrahydrofuro[2,3-*b*]quinolin-3,4-diones (H) 並測試其心收縮力及自發性心跳頻率，抗發炎、抗過敏相關的肥胖細胞、嗜中性白血球、小神經膠原細胞、巨噬細胞等生理反應與抗血小板凝集活性。
- (2) 合成 2,6,7,8-substituted 4-oxo-2,3,4,9-tetrahydrofuro[2,3-*b*]quinolin-3-one substituted phenylhydrazone (I) 並測試其抗血小板凝集活性。



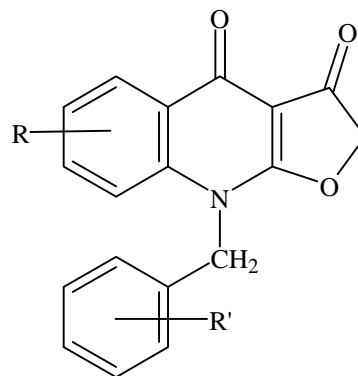
**E**



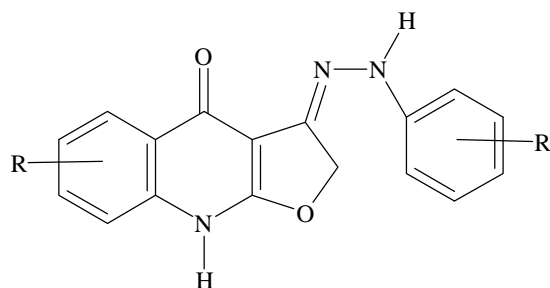
**F**



**G**



**H**



**I**

最後再探討結構改變與活性關係，以期尋覓更理想及更具潛力的化合物。