

第一章 緒論

本論文旨在討論 2-substituted benzyloxy benzoic acid derivatives 之合成及其抗下痢、抗過敏、抗發炎等生理活性。在此著者將抗下痢相關之病理及抗過敏、抗發炎相關之肥胖細胞、嗜中性白血球、小神經膠質細胞與巨噬細胞等生理活性加以敘述，並說明研究動機與目的，以作為本論文之背景資料。

第一節 細菌性下痢之病理¹

位於細胞膜上的神經節？脂 GM1(ganglioside GM1)(Fig. 1)是霍亂毒素(cholera toxin; CT)和忌熱型腸毒素(heat-labile enterotoxin; LT)的天然受體，由霍亂弧菌(*vibrio cholerae*)產生的 CT 和大腸桿菌(*Escherichia coli*)產生的 LT 是分別造成霍亂和旅行者腹瀉的主要原因。根據估計每年有超過十億個由 enterotoxigenic *E. coli* 所導致的腹瀉案例，並造成近一百萬人的死亡²；另外，根據 1996 年 W.H.O.之報導全球約有八十個國家有霍亂，這種地方性的疾病造成每年有十二萬的傷亡人數³。

CT 和 LT 在型態上關係密切，皆屬於 AB₅ 毒素族(toxin-family)⁴，由次單元 A 和 B 組成(Fig.2)，不耐酸，不耐熱；它們利用宿主細胞內的運輸機制而得以進入細胞溶質(cytosol)⁵，在細胞溶質內發揮他們有害的活性⁶。這些毒素可以藉由它們的 B subunits 來認出位於上皮細胞膜表面的 GM1 ganglioside 上寡醣(oligosaccharide)的部分^{7,8}，並與之結合。當毒素的每個 B subunits 和 GM1 ganglioside 的 pentasaccharide 結合後，A subunits 便會進入細胞膜；隨後 A subunits 由於 disulfide bridge 的斷裂而從毒素的其他部分脫離⁹，通常把脫離出的這部分稱為 A1；接著，A1 進行逆行的路徑(retrograde route)進入到內質網(endoplasmic reticulum)¹⁰，並且易位到細胞溶質(cytosol)；A1 具有二磷酸腺苷-核糖基轉移酶(ADP-ribosyltransferase)的活

性，會刺激 ADP-核糖(ribose)，使其轉移到具有控制腺？環化？(adenylate cyclase)活性的三磷酸鳥嘌呤？(GTP)結合蛋白 Gs 中，使得 GTP？活性受到抑制，GTP 不能水解成 GDP，這使得 adenylylase 持續性的被活化，促使細胞內三磷酸腺？(ATP)轉變？環磷酸腺？(cAMP)(Scheme 1)，cAMP 濃度的急劇升高，會抑制腸粘膜細胞對鈉的正常吸收¹¹，並刺激隱窩細胞分泌氯化物和水，導致腸腔水份與電解質大量聚集，因而出現劇烈的水樣腹瀉。

對於細菌性下痢的治療而言，抗生素具有顯著的療效，但長期使用抗生素會導致抗藥性菌株的出現，因此並不建議作為預防性用藥。過去十年來，quinolone 被建議作為旅行者對抗下痢的預防性用藥，但是這類藥物不適用於小孩及孕婦，而且抗 quinolone 藥物的菌株也逐漸被分離出來。因此開發更理想、更安全的新型抗下痢藥物，是醫藥界亟待解決的問題。

本校中國醫學研究所侯庭鏞教授應用忌熱型腸毒素的 B 次單元(LTB)與 GM1-receptor 結合的原理，設計了一套 GM1-ELISA 之快速篩選方法，來測試化合物抑制 LTB 與 GM1-receptor 結合的百分比，本研究之標的化合物是利用該方法測試其抗下痢活性。另外，由於 CT 與 LT 主要的胺基酸序列有高達 83 %的相似度，因此在以 LTB 測試藥理活性之外，也期望化合物對 CT 所造成的下痢亦具有同樣的抗下痢活性。

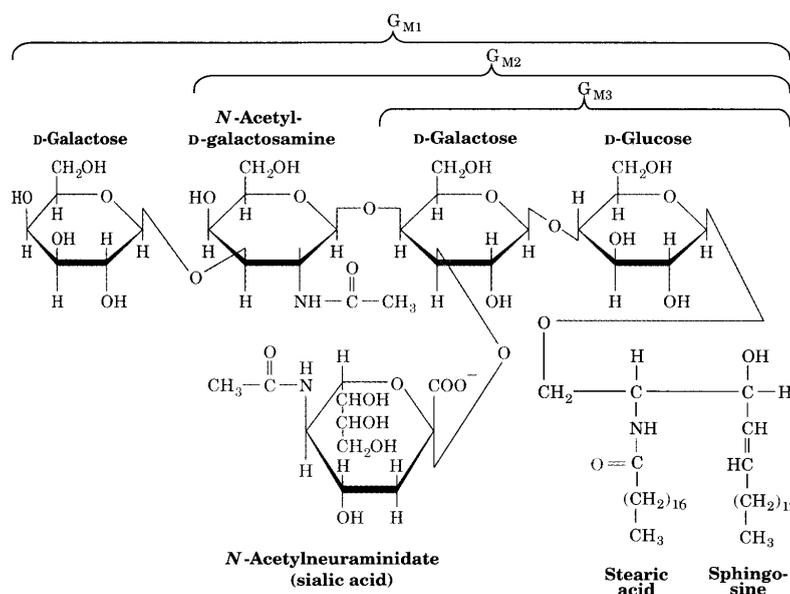


Fig. 1 Ganglioside GM1: structural formula with its sphingosine residue.¹²

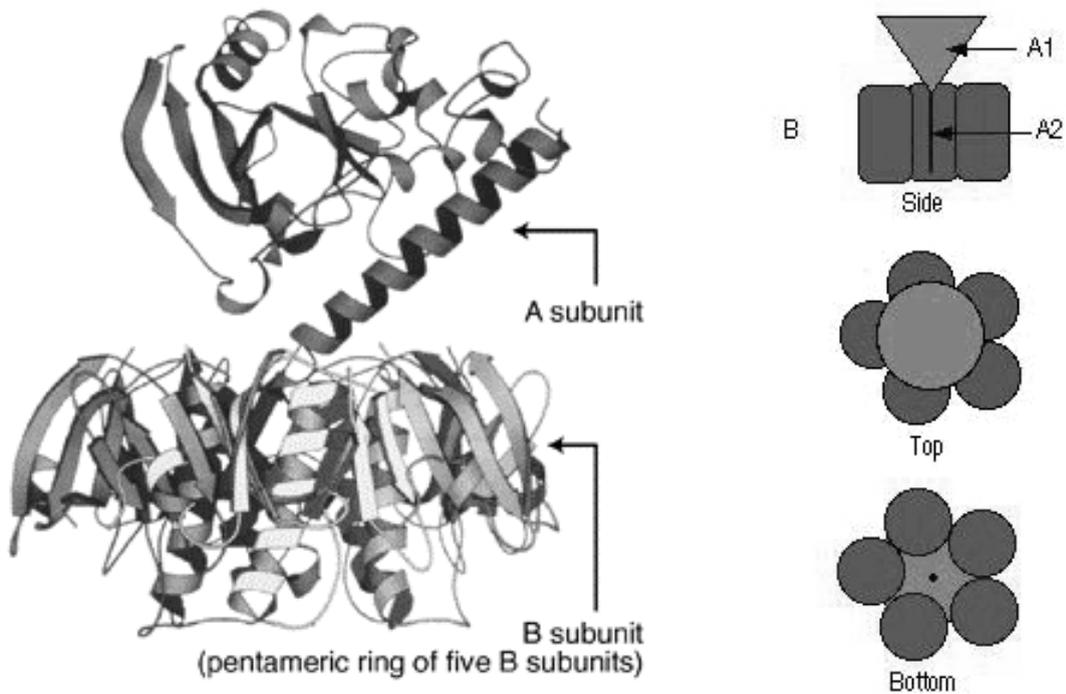


Fig. 2 Cholera toxin (CT) 和 heat-labile enterotoxin (LT) 的結構¹³，含有 1 個 A subunit 和 5 個 B subunits.

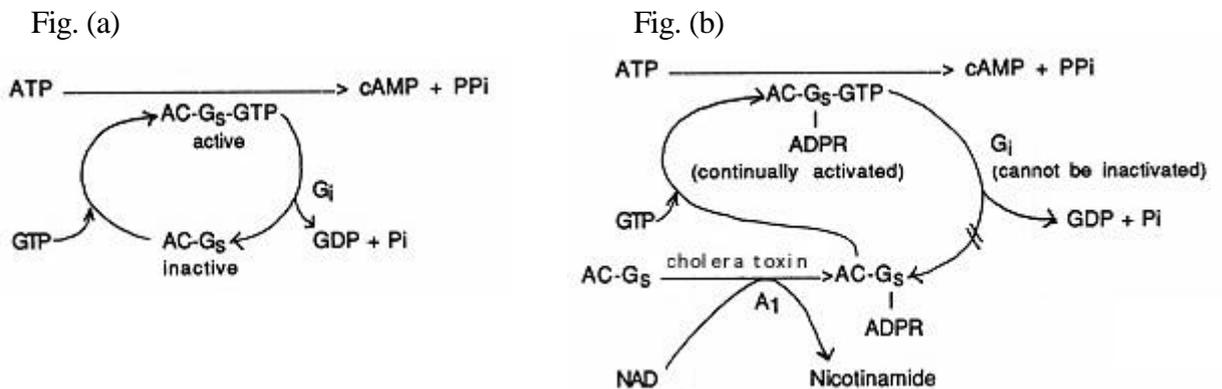


Fig. (a)：正常情況下，adenylate cyclase (AC) 的活化是受 GTP-Gs 所調控，而 Gi 會使 GTP 水解成不具活性的 GDP，因而這個活化過程通常是短暫的。

Fig. (b)：CT 或 LT 中的 A1 部分會促使 ADP-Ribose (ADPR) 附著到 Gs 上，形成 Gs-ADPR，這使得 GTP 無法被水解 adenylyate cyclase 因而持續地被活化。

Scheme 1¹⁴

第二節 肥胖細胞(Mast cells)與嗜中性白血球(Neutrophils)之生理功能

如Fig. 3所示，肥胖細胞在過敏反應(anaphylaxis)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)^{15, 16}，如 vasoactive mediators (如 histamine, kininogenase, PAF)及 spasmogens (如 histamine, PGD₂, LTC₄, LTD₄)，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^{17, 18}。

另外也會釋放出化學誘引劑(chemoattractants)，例如過敏性嗜伊紅性白血球化學趨化因子(eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis; ECF-A) 及嗜中性白血球化學趨化因子(neutrophil chemotactic factor; NCF)，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; O₂⁻)、羥基自由基(hydroxy radical; OH[·])及過氧化氫(hydrogen peroxide; H₂O₂)等具有細胞毒性的oxygen species¹⁹，而導致細胞損傷，這些細胞損傷包括老化(aging)²⁰、ischemia-reperfusion injury²¹⁻²³風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)²⁴⁻²⁵及腸炎(inflammatory bowel disease)²⁶⁻²⁷；同時當嗜中性白血球被活化時，也會釋放大量的lysosomal enzymes，這些酵素會對組織進行蛋白質分解²⁸，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²⁹⁻³¹。

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。

本論文即利用此模武篩選抗過敏及抗發炎物質，以 compound 48/80(a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl)methylamine with formaldehyde)誘發肥胖細胞釋放 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定分別作用在細胞膜之接受體及細胞內之 protein kinase C (PKC)上。

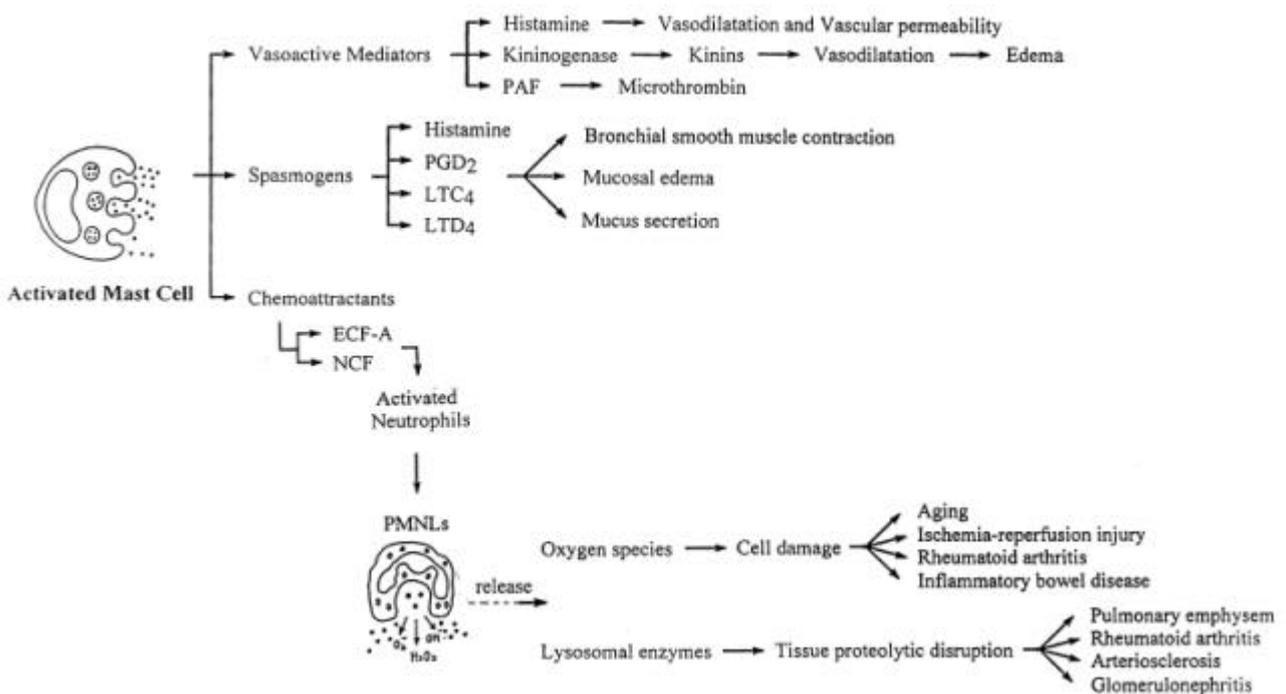


Fig. 3 The physiologic reactions of mast cells and neutrophils

第三節 小神經膠質細胞(Microglial cells)之生理功能

小神經膠質細胞是腦中的巨噬細胞(macrophage),它對周圍的細胞有益處也有害處,主要與大部分的發炎、感染及中樞神經系統的退化性疾病有關^{32,33},其中,中樞神經系統疾病會造成多發性硬化症(multiple sclerosis)³⁴、阿茲海默症(Alzheimer's disease)³⁵、巴金森氏症(Parkinson's disease)³⁶及愛滋病所引起的痴呆症(AIDS dementia)³⁷。

當小神經膠質細胞被細菌性內毒素脂多醣(lipopolysaccharide ; LPS)活化時,就會釋放出一氧化氮(nitric oxide; NO)及腫瘤壞死因子(tumor-necrosis factor ; TNF)等物質^{38,39},而這些物質在中樞神經系統中,可能對於小神經膠質細胞與其他細胞之間的交互作用扮演著決定性的角色。

小神經膠質細胞產生的 NO,在缺血性及神經退化性疾病中會造成神經元細胞的死亡⁴⁰,也會產生多發性硬化症(multiple sclerosis)⁴¹。腫瘤壞死因子- α ,會造成老化及阿茲海默症⁴²。

綜合前述可知,抑制小神經膠質細胞產生 NO 及 TNF- α ,可當作治療各種中樞神經系統疾病的藥物。

第四節 巨噬細胞(macrophages)之生理功能

巨噬細胞在非專一性寄主對抗病毒及微生物致病原(microbial pathogens)中扮演著重要的角色，它也是專一性免疫反應中的重要調節者⁴³。

巨噬細胞也會與免疫系統中的其他細胞產生反應，當巨噬細胞受到細菌性內毒素脂多醣活化時，就會產生腫瘤壞死因子、一氧化氮及前列腺素(prostaglandins ; PGs) 等發炎物質⁴⁴⁻⁴⁶。

腫瘤壞死因子- (TNF-)會引發致死性休克(lethal shock)、組織損傷(tissue injury)、急性發炎、慢性發炎等病理症狀⁴⁵⁻⁴⁷。

在巨噬細胞中，藉由誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthetase ; iNOS)可將 L-阿金胺基酸(L-arginine)轉換成一氧化氮及瓜胺酸(citrulline)；一氧化氮能夠抑制細菌、病毒、真菌、原生動物和癌細胞的生長，是重要的病原菌毒殺者，同時調節前列腺素的合成；在癒傷過程中，適量的一氧化氮會促進傷口的癒合，然而，過量一氧化氮的產生則會引發敗血性休克(septic shock)⁴⁸，並且會造成正常組織的傷害。

PGE2 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⁴⁹。

第五節 研究動機與目的

近年來，本所發現合成isoflavanquinone之起始物質 2-benzyloxybenzaldehyde⁵⁰ (Fig. 4)對於fMLP所誘導之嗜中性白血球產生超氧自由基以及脫顆粒反應，展現非常明顯之抑制作用，具有抗過敏、抗發炎等生物活性，其抗下痢活性並不明顯，因此本研究即是以2-benzyloxybenzaldehyde (A)為先導化合物(lead compound)，著手進行一系列 2-substituted benzyloxy benzoic acid derivatives之合成，即以各種不同的基團，包括-CN, -CH₃, -CH₂OH, -COOR, -CONH₂及-COOH等，將lead compound (A)的-CHO置換，並以氟原子、氯原子、甲氧基在苯環上做不同位置的取代，將其光譜數據做充分的解析，以探討不同的取代基以及不同位置的取代對於抗發炎、抗過敏及抗下痢活性的影響。

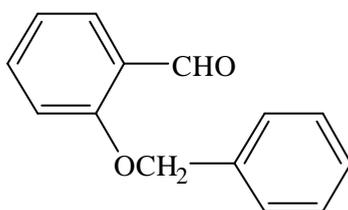


Fig. 4 2-benzyloxybenzaldehyde