

新型苯并咪唑类人顶体酶抑制剂的设计、合成及活性研究

樊永正, 陈倩倩, 刘伯石, 赵军涛, 田巍, 周有骏, 吕加国, 朱 驹 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 基于人精子顶体酶活性位点的三维结构设计并合成新型苯并咪唑类衍生物。方法 计算机模拟设计及化学合成。结果 设计并合成了10个苯并咪唑类化合物,进行了抑酶活性测试。结论 所有合成的化合物具有较好的抑酶活性,其中化合物8a是对照物N α -对甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)的1426倍。

[关键词] 精子顶体酶;抑制剂;设计;合成;抑酶活性;苯并咪唑

[中图分类号] O621.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0203-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.012

Synthesis and effect of novel 1-(1*H*-benzimidazole-2-yl)-urea derivatives as human acrosin inhibitors

FAN Yong-zheng, CHEN Qian-qian, LIU Bo-shi, ZHAO Jun-tao, TIAN Wei, ZHOU You-jun, LV Jia-guo, ZHU Ju (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To design and synthesize novel 1-(1*H*-benzimidazole-2-yl)urea compounds on the basis of the active site of human acrosin. **Methods** The compounds were designed by computer modeling and synthesized. **Results** Ten 1-(1*H*-benzimidazole-2-yl)urea compounds were designed and synthesized, *in vitro* anti-acrosin activity were tested. **Conclusions** The results of *in vitro* anti-acrosin test showed that all the compounds had better acrosin inhibitory activity than that of the control compound TLCK. Among them compound 8a was the most potent one, with IC₅₀ 0.098 9 mmol/L.

[Key words] acrosin inhibitor; design; synthesis; acrosin inhibitory activity; benzimidazole

精子顶体酶是位于精子顶体内层浆膜上的膜结合性酶,是一种类似于胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白水解酶,以酶原形式储存在顶体内。发生顶体反应时,顶体酶原自动激活成 β -顶体酶(β -acrosin)。 β -顶体酶是一种多功能的蛋白质,它可以分散顶体基质,也能作为次级配位分子维持精子结合在卵子透明带(ZP)上进行顶体反应^[3]。顶体酶释放后能将卵细胞的透明带水解出一条通道,便于精子穿过透明带与卵细胞融合。抑制顶体酶的活性便可以阻止受精,从而避孕^[1-4]。因此人精子顶体酶是公认的避孕药物新作用靶点之一^[5]。吕加国等^[6,7]构建了人精子顶体酶活性位点的三维结构,并分析了活性位点重要氨基酸残基性质。人精子顶体酶活性位点大体分为三个区域:P1, P2, G。P1区口袋深但开口小,是配体结合最重要的极性区域;P2区口袋浅但开口较大;G槽是腔右侧一个狭长的浅凹槽。P1含有T216、C217、Q218、S221、W243等关键残基;P2中有R252、R199、Y196、G198等关键残基;而G槽分

布有E120、H69、W243关键残基。上述关键残基在顶体酶的活性中发挥重要作用,基于上述关键残基的分布、活性腔极性与立体结构大小及计算机辅助模拟发现,苯并咪唑类母核可通过氢键或疏水作用与顶体酶结合,从而可能起到抑酶活性,本研究设计了苯并咪唑类化合物,并考察不同取代基的化合物对人精子顶体酶活性的影响。

笔者在苯并咪唑母核的2位和5位上分别引入长链和短链的取代基团,同时根据P1腔关键残基的分布,探讨2位取代基中不同取代长度的取代基与P1腔中重要残基的结合情况,以及5位取代的不同长度的取代基与P2或G的相互作用情况。基于此种想法,在苯并咪唑的5位分别引入硝基和磺酰胺基,在其2位引入不同长度的醇酰胺的基团,设计并合成了10个苯并咪唑类新型人精子顶体酶抑制剂化合物,并进行活性测试。合成路线详见图1。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验采用的人精子顶体酶三维分子模型及活性腔性质取自笔者前期研究^[8],分子模拟采用InsightII和SYBYL软件包,

[作者简介] 樊永正(1989-),男,本科。E-mail:FYZLML@163.com.

[通讯作者] 吕加国。E-mail:ljj20060508@yahoo.com.cn.

AutoDock3.05完成;所有计算机工作都在SGI服务器(Origin300)上完成。所有参数除特别指明外均为默认值。

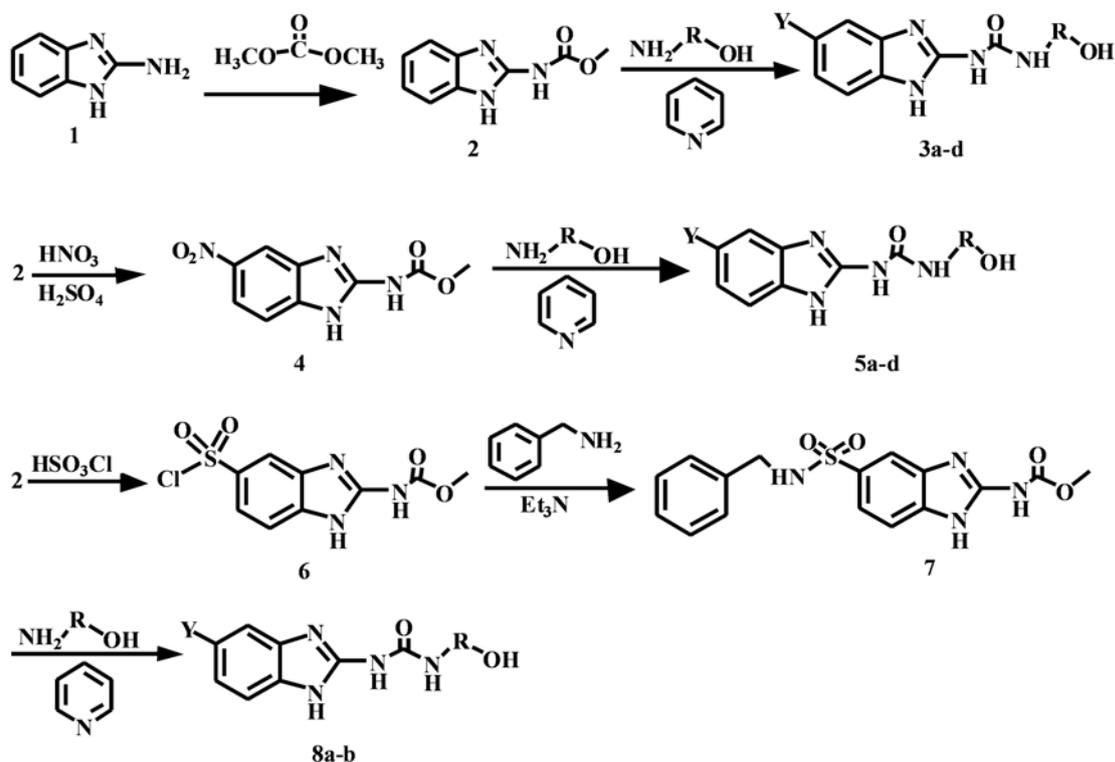


图1 化合物的合成路线

1.2 化合物设计 在 Sybyl6.9 中构建抑制剂分子结构,进行分子力学优化和模拟退火计算,选取代表性低,能构象用于进一步的分子对接研究。分子对接采用 AutoDock3.05。对接过程采用 Lamarckian 遗传算法,将局部能量搜索与遗传算法相结合,以半经验势函数作为能量打分函数,对小分子构象和位置进行全局搜索。每个分子根据柔性键的多少进行 30~50 次独立的对接计算,对结果进行成簇分析,最后依据结合自由能和成簇分析的情况来选取合理的结合模式。

1.3 化学合成

1.3.1 仪器及试剂 熔点采用上海精密科学仪器有限公司(SGW)X-2 熔点仪测定;核磁共振氢谱采用 Bruker AC-300P 型仪器测定(溶剂为 DMSO,300 MHz)。MS(ESI)采用 DECA XPMAXLCQ 型质谱仪;其它试剂均为市售分析纯。硅胶薄层板采用烟台江友硅胶开发有限公司产品(HSGF254)。

1.3.2 中间体 2(1H-苯并咪唑-2-氨基甲酸酯)的制备 于圆底烧瓶中加入含氯化钙 11.1 g(0.1 mol)的水溶液 70 ml,再缓慢加入 2-氨基苯并咪唑 13.2 g(0.1 mol),搅拌加热使之溶解,随后加入四丁基溴化铵 0.1 g(0.3 mmol),再加入碳酸二甲酯

25 ml(0.3 mol)。于 90~100 °C 加热回流反应 7 h,反应完毕后趁热过滤,滤液静置结晶,析出粗品白色固体,过滤,己烷重结晶得中间体 2,文献值: mp. 305.7~306.5 °C^[9]。

1.3.3 目标化合物 3(1H-苯并咪唑-2-脒类)的制备

于圆底烧瓶中加入 1 g 中间体 2(5.2 mmol),加入 20 ml 的吡啶溶液,然后再加入 5 ml 的各种醇胺溶液,于油浴 85 °C 下回流 5~7 h 后,TLC 检测反应完全后,旋干有机溶剂,加入 20 ml 水,常温搅拌下,析出粗品白色固体,用甲醇重结晶得到目标化合物 3。

1.3.4 中间体 4(5-硝基-1H-苯并咪唑-2-氨基甲酸酯)的制备

在干燥的 250 ml 三颈烧瓶中加入 3.8 g 中间体 2(0.019 9 mol),量取 4 ml 的浓硫酸缓慢加入,放置于预设定的 -3 °C 的低温恒温反应浴中,静置 20 min 后,量取 4 ml 的发烟硝酸缓慢滴入溶液中,边滴边搅拌,滴加完毕后,迅速升温至 5 °C,反应 3 h 后,TLC 检测反应完毕,将反应液倒入冰水中,析出粗品黄色固体,抽滤烘干后,用甲醇重结晶后得目标化合物 4(3.08 g,产率 81%)。

1.3.5 目标化合物 5(5-硝基-1H-苯并咪唑-2-脒类)的制备

于圆底烧瓶中加入 1 g 中间体 4(5.2 mmol),加入 20 ml 的吡啶溶液,然后再加入 5 ml 的

各种醇胺溶液,于油浴 85 °C 下回流 5 ~ 7 h 后, TLC 检测反应完全后,旋干有机溶剂,加入 20 ml 水,常温搅拌下,析出粗品白色固体,用甲醇重结晶得到目标化合物 5。

1.3.6 中间体 6(5-氯磺酸基-1*H*-苯并咪唑-2-氨基甲酸甲酯)的制备 在干燥的 250 ml 三颈烧瓶中加入氯磺酸 50 ml,冰浴控制反应温度保持 20 °C 以下缓慢加入 19.1 g(0.1 mol) 中间体 2,加毕待固体全溶后将油浴锅升温至 40 ~ 45 °C 反应 3 h, TLC 检测反应,待反应完全后,将反应液于机械搅拌下缓慢滴入约 750 g 碎冰中,析出粉红色固体。悬浊液用干燥的乙酸乙酯分次萃取,分出乙酸乙酯层,旋干得粉红色固体 6。

1.3.7 中间体 7(5-磺酰苄胺-1*H*-苯并咪唑-2-氨基甲酸甲酯)的制备 于 100 ml 圆底烧瓶中加入 0.5

g(1.73 mmol) 中间体 6,取干燥的四氢呋喃(THF) 40 ml 溶解后加入三乙胺(TEA) 1 ml(7.19 mmol),加入苄胺(2.08 mmol),常温反应过夜。点板检测反应完全后过滤得类白色固体,将固体以 2% 的盐酸溶液洗涤,再以 5% 碳酸氢钠溶液洗涤,最后清水洗涤得粗品白色固体产物 7,用甲醇重结晶得到目标化合物 7。

1.3.8 目标化合物 8[5-(*N*-苄基氨基磺酰基取代)-1*H*-苯并咪唑-2-脒类]的制备 于圆底烧瓶中加入 1 g 中间体 7(5.2 mmol) 和 20 ml 的吡啶溶解完全,然后再加入 5 ml 的各种醇胺溶液,于油浴 85 °C 下回流 5 ~ 7 h 后, TLC 检测反应完全后,旋干有机溶剂,加入 20 ml 水,常温搅拌下,析出粗品白色固体析出,用甲醇重结晶得到目标化合物 8。目标化合物结构表征详见表 1 和表 2。

表 1 目标化合物的氢谱数据

Compound	¹ H NMR (300 MHz, DMSO)
3a	δ 11.48 (s, 1H, OH), 9.85 (s, 1H, imidazol-NH), 7.34 (s, 3H, Ph-4,5,7H), 7.01 (s, 2H, Ph-6H, Ph-NH), 4.81 (t, <i>J</i> =4.8 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.48 (q, <i>J</i> =5.4 Hz, 2H, O-CH ₂), 3.24 (dd, <i>J</i> =11.1, 5.3 Hz, 2H, N-CH ₂)
3b	δ 11.48 (s, 1H, OH), 9.85 (s, 1H, imidazol-NH), 7.33 (d, <i>J</i> =3.9 Hz, 3H, Ph-4H,5H,7H), 7.17-6.84 (m, 2H, Ph-6H, Ph-NH), 4.56 (d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.59-3.39 (m, 2H, O-CH ₂), 3.31-3.09 (m, 2H, N-CH ₂), 1.63 (dd, <i>J</i> =12.7, 6.4 Hz, 2H, C-CH ₂ -C)
3c	δ: 11.45 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, imidazol-NH), 7.51 - 7.20 (m, 3H, Ph-4H,5H,7H), 7.14-6.88 (m, 2H, Ph-6H, Ph-NH), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.72-3.12 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 2H, O-CH ₂), 3.13 - 2.92 (m, 1H, CH), 1.06 (d, <i>J</i> =6.2 Hz, 3H, CH ₃)
3d	δ: 11.45 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, imidazol-NH), 7.50 - 7.18 (m, 3H, Ph-4H,5H,7H), 7.14-6.88 (m, 2H, Ph-6H, Ph-NH), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.89-3.99 (m, 2H, CH ₂ -O-CH ₂), 3.71-3.79 (m, 2H, N-CH ₂), 3.60-3.65 (m, 2H, CH ₂ -O-CH ₂), 3.51-3.59 (m, 2H, O-CH ₂)
5a	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.85 (s, 1H, imidazol-NH), 7.33 (m, 3H, Ph-H), 4.57 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.74 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, CH), 3.55-3.36 (m, 2H, N-CH ₂), 3.30-3.29 (m, 2H-O)
5b	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.85 (s, 1H, imidazol-NH), 7.33 (m, 3H, Ph-H), 4.56 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.72 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, CH), 3.59-3.39 (m, 2H, N-CH ₂), 3.31-3.09 (m, 2H-O), 1.63 (dd, <i>J</i> =12.7, 6.4 Hz, 2H)
5c	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, imidazol-NH), 7.51-7.20 (m, 3H, Ph-H), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.72 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, CH), 3.28-2.92 (m, 2H, CH ₂), 1.06 (d, <i>J</i> =6.2 Hz, 3H, CH ₃)
5d	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.85 (s, 1H, imidazol-NH), 7.33 (m, 3H, Ph-H), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H, C-NH-C-C), 3.89-3.99 (m, 2H, CH ₂ -O-CH ₂), 3.71-3.79 (m, 2H, N-CH ₂), 3.60-3.65 (m, 2H, CH ₂ -O-CH ₂), 3.51-3.59 (m, 2H, O-CH ₂)
8a	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, imidazol-NH), 7.51-7.20 (m, 3H, imidazol-Ph-h), 7.14-6.88 (m, 2H, Ph-CH ₂), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H), 3.59-3.39 (m, 2H, N-CH ₂), 3.31-3.09 (m, 2H-O), 1.63 (dd, <i>J</i> =12.7, 6.4 Hz, 2H)
8b	δ 11.45 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, imidazol-NH), 7.51-7.20 (m, 3H, imidazol-Ph-h), 7.14-6.88 (m, 2H, Ph-CH ₂), 4.85 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H), 3.72 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H), 3.28-2.92 (d, 2H, CH ₂), 1.06 (d, <i>J</i> =6.2 Hz, 3H, CH ₃)

1.4 抗生育活性实验 本实验以 Nα-苄甲酰-DL-精氨酸-ρ-硝酰基苯胺(BAPNA)为底物,与精子释放的顶体酶反应,采用改良 Kennedy 法测定所合成的化合物对人精子顶体酶的抑制能力。

试剂盒购自江苏省南京欣迪生物药业工程有限公司,试剂盒包括:分离剂、顶体酶激活剂、抑制剂、反应底物剂。方法参见文献^[10]。抑酶活性结果见表 3。

表2 目标化合物的其它理化数据

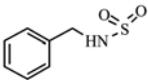
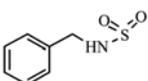
Compound	Y	R	Formula	Yield (%)	mp(°C)	ESI-MS(m/z)
3a	H	(CH ₂) ₂	C ₁₀ H ₁₂ O ₂ N ₄	72.5	211.3 ~ 212.8	219.61[M-H] ⁺ 221.66[M-H] ⁺
3b	H	(CH ₂) ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₂ N ₄	76.7	216.7 ~ 217.8	235.08[M-H] ⁺ 236.78[M-H] ⁺
3c	H	CH(CH ₃) ₂	C ₁₁ H ₁₄ O ₂ N ₄	79.2	211.7 ~ 213.2	236.02[M-H] ⁺
3d	H	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂	C ₁₂ H ₁₆ O ₃ N ₄	70.2	217.5 ~ 218.3	262.98[M-H] ⁺
5a	NO ₂	(CH ₂) ₂	C ₁₀ H ₁₁ O ₄ N ₅	81.4	216.7 ~ 217.7	265.10[M-H] ⁺ 278.01[M-H] ⁺
5b	NO ₂	(CH ₂) ₃	C ₁₁ H ₁₃ O ₄ N ₅	80.1	235.6 ~ 237.1	280.21[M-H] ⁺
5c	NO ₂	CH(CH ₃) ₂	C ₁₁ H ₁₃ O ₄ N ₅	79.8	234.5 ~ 235.2	277.97[M-H] ⁺
5d	NO ₂	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂	C ₁₂ H ₁₅ O ₅ N ₅	83.1	231.5 ~ 232.3	308.03[M-H] ⁺ 310.12[M-H] ⁺
8a		(CH ₂) ₃	C ₁₈ H ₂₁ O ₄ N ₅ S	82.4	197.1 ~ 198.9	402.10[M-H] ⁺ 404.30[M-H] ⁺
8b		CH(CH ₃) ₂	C ₁₈ H ₂₁ O ₄ N ₅ S	86.5	195.6 ~ 196.5	402.11[M-H] ⁺ 404.17[M-H] ⁺

表3 目标化合物的抑酶活性(IC₅₀ mmol/L)

编号	IC ₅₀ (mmol/L)	编号	IC ₅₀ (mmol/L)
3a	10.789 0	5b	0.440 9
3b	8.970 0	5c	0.103 0
3c	3.322 0	5d	0.428 2
3d	5.546 0	8a	0.098 9
5a	0.336 3	8b	0.183 6
TLCK	142.600 0		

2 结果与讨论

2.1 笔者采用分子对接方法研究了化合物 8a 与人顶体酶之间的相互作用模式见图 2。结果显示:化合物 8a 的母核在 G 槽内,其 2 位和 5 位侧链分别延伸到 P1 腔和 P2 腔,在 P1 腔内,丝氨酸(Ser242)作为氢键受体,苏氨酸(Thr216)作为氢键供体分别与 2 位侧链的酰胺氢和羟基氧形成氢键作用,同时 2 位侧链与 P1 腔的 Ser221、Trp243 等重要残基有较强疏水作用。母核与 G 槽中的 His69、Glu120、Arg199 等重要残基有较强疏水的作用,5 位侧链末端苯环伸入 P2 腔与 Gly244、Val245、Arg252 等重要残基有较强疏水作用。故化合物 8a 的体外抑酶活性远高于阳性对照品 TLCK。

2.2 笔者考察了上述苯并咪唑类先导化合物的体外抑酶作用。结果显示所有测试化合物均具有抑酶活性;尤其是化合物 8a,活性远远高于阳性对照品 TLCK。化合物与靶酶作用模式及抑酶实验结果显示,化合物 3a-5d 由于 5 位取代基较短,其活性远不及化合物 8a,这提示了化合物 5 位侧链的长短对抑

酶活性有较大的影响;5 位侧链短,在 P2 腔内的疏水作用较小,则抑酶活性相对较弱;5 位侧链长,则与活性腔氨基酸残基有较强的疏水作用,即结合力增强,活性也大大增强。化合物 8a 的 2 位侧链与靶酶通过氢键、疏水等作用相互结合,提示在 2 位侧链引入能够形成氢键的基团,如羟基、氨基等及脂肪链等疏水基团也能够提高分子与靶酶的亲和力,从而有利于提高抑酶活性。在本研究中,基于人精子顶体酶三维结构设计了苯并咪唑类化合物,该类化合物主要与靶酶活性腔氨基酸残基以氢键、疏水作用相结合从而产生抑酶活性。进一步对该类化合物结构进行优化,有利于发现高效、低毒的新型人精子顶体酶活性抑制剂。本研究为男性抗生育研究提供了新的结构类型。

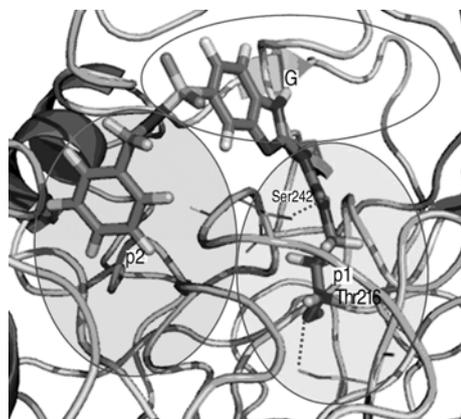


图2 化合物 8a 与顶体酶对接

佳时间点。

3.3 样品前处理方法优化 本研究分别考察了不同前处理方法对入血成分的影响,经比较,乙醚溶液比正己烷/氯仿(10:1)混合溶液提取效率要高,正己烷/氯仿(10:1)混合溶液对麝香酮提取效果较差,所以最终选择乙醚萃取法作为处理血样方法。

综上所述,本研究建立了一种快速筛选中药复方麝香保心丸中挥发性入血成分的方法,麝香保心丸药效物质得以最大程度阐释,这些化合物在机体的作用靶点和信息调控机制将是今后深入研究的重点。通过学科间的交叉融合,尤其是生物信息学和生物色谱技术等现代科学技术的的应用有利于揭示中药药效物质对机体的调控机理,展现中药复方多成分、多靶点协同作用的特点,为中药复方现代化研究提供可靠技术手段。

【参考文献】

[1] 罗心平. 麝香保心丸对大鼠心肌梗塞后左室胶原改建影响的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,1998,4(7):20.
 [2] 李勇,罗心平,范维琥,等. 麝香保心丸对兔动脉壁一氧化氮代谢的影响[J]. 中国急救医学,1999,19(8):451.
 [3] 王学忠,章萍,王岳松,等. 基质金属蛋白酶2在DHR心脏中的表达及麝香保心丸的影响[J]. 中国中医急症,2006,15(8):893.
 [4] 于榕,史念青,鲁映青. 麝香保心丸对家兔心肌梗死的作用及机制[J]. 中国药理学会,2000,17(3):1.
 [5] Lv YH,Zhang X,Liang X,et al. Characterization of the constituents in rat biological fluids after oral administration of Fufang Danshen tablets by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2010,52(11):155.

[6] Wang SP, Liu L, Wang LL,et al. Screening and analysis of the multiple absorbed bioactive components and metabolites in rat plasma after oral administration of Jitai tablets by high-performance liquid chromatography/diode-array detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010,24(16):1641.
 [7] Hu YM,Wang YT,Stephen CW,et al. Identification of the major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr,2010,24(22):479.
 [8] Jiang P,Liu RH,Dou SS,et al. Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin pill by HPLC-ESI-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr,2009,23(17):1333.
 [9] Liao BC,Hsieh CW,Liu YC,et al. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2008,229(2):161.
 [10] Huang JQ,Wang SW,Luo XX,et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents [J]. Thromb Res,2007,119(3):337.
 [11] 何秀娟,李萍,邱全球,等. 麝香酮抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其表面 ICAM-1、VCAM-1 和 CD44 表达[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(2):148.
 [12] 江文德,徐端正,胡国钧,等. 冠心苏合丸的药理研究及其简化制剂-苏冰滴丸的理论基础[J]. 药学报,1979,14(11):655.

[收稿日期]2012-04-16

[修回日期]2012-05-09

(上接第206页)

【参考文献】

[1] Sipila P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, et al. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception[J]. Reproduction, 2009, 137: 379.
 [2] Moreno RD, Alvarado CP. The Mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence [J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73(11): 1430.
 [3] Rawe VY, Diaz ES, Chemes HE, et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans[J]. Mol Human Reprod, 2008, 23(3): 573.
 [4] Mishra PK, Manivannan B, Pathak N, et al. Status of spermatogenesis and sperm parameters in langur monkeys following long-term vas occlusion with styrene maleic anhydride[J]. Androl, 2004, 24(4): 501.

[5] Jones R, Parry R, Leggio L, et al. Inhibition of sperm-zona binding by suramin, a potential 'lead' compound for design of new anti-fertility agents[J]. Mol. Human Reprod, 1996, 2: 597.
 [6] 吕加国,盛春泉,张珉,等. 人顶体酶三维结构的同源建模及其与KF950的分子对接研究[J]. 化学学报,2006, 64(10):1073.
 [7] 宁微微,吕加国,刘雪飞,等. 新型唑啉酮类先导物的设计、合成及抑制人顶体酶活性研究[J]. 药学实践杂志,2010, 28(4): 296.
 [8] 张珉,吕加国,朱驹,等. 人顶体酶活性腔性质及与抑制剂的结合模式[J]. 高等学校化学学报,2009,30(12): 2409.
 [9] Ono Y. Dimethyl carbonate for Environmentally benign reaction. Pure&Appl Chem. 1996, 68(2): 367.
 [10] 宋桂红,张珉,张晓梦,等. 南德士抑制人精子顶体酶活性的实验研究[J]. 中华男科学杂志,2009,15(8): 700.

[收稿日期]2012-02-13

[修回日期]2012-03-27