



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102389420 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 28

(21) 申请号 201110341882. 4

(22) 申请日 2011. 11. 03

(71) 申请人 合肥博太医药生物技术发展有限公
司

地址 230088 安徽省合肥市高新区潜水东路
26 号

(72) 发明人 董磊

(74) 专利代理机构 合肥天明专利事务所 34115
代理人 金凯

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006. 01)

A61P 11/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

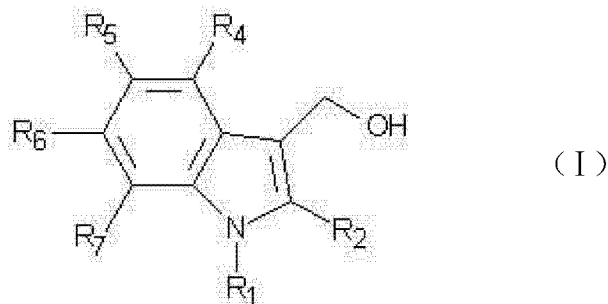
(54) 发明名称

吡啶-3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用

(57) 摘要

本发明提出了吡啶-3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的新应用。吡啶-3- 甲醇(I3C)、二吡啶甲烷(DIM) 及其衍生物通过抑制肺部成纤维细胞的活化, 可以用于肺纤维化的预防和治疗。DIM 和 I3C 及其衍生物可有效降低肺纤维化动物模型的发病症状, 可以成为防治肺纤维化的候选药物分子。同时, 本发明所使用的小分子药物易于获取, 价格低廉, 性质稳定, 便于保存和运输, 具有广阔的应用前景。

1. 具有下述结构式(I)的吡啶-3-甲醇及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用,



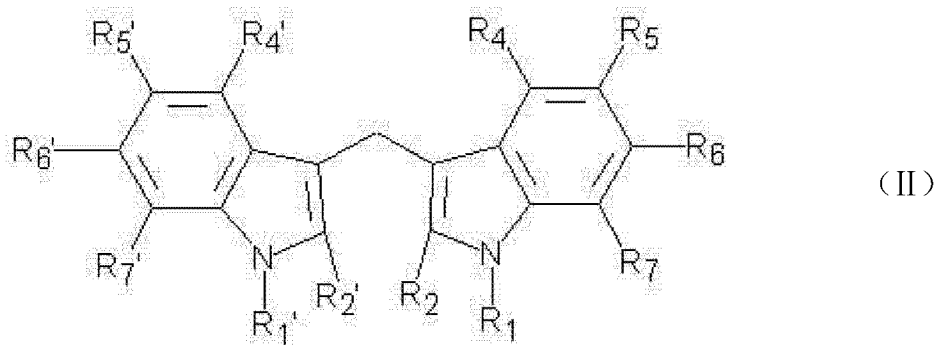
其中, R₁、R₂、R₄、R₅、R₆、R₇ 各自为 H 或卤素取代基或硝基或 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述结构式(I)中, R₅ 为卤素取代基或硝基或 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₁、R₂、R₄、R₆、R₇ 均为氢。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述结构式(I)中, R₁ 为 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₂、R₄、R₅、R₆、R₇ 均为氢。

4. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述结构式(I)中, R₂ 为 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₁、R₄、R₅、R₆、R₇ 均为氢。

5. 具有下述结构式(II)的二吡啶甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用,



其中, R₁、R₂、R₄、R₅、R₆、R₇、R₁'、R₂'、R₄'、R₅'、R₆'、R₇' 各自为氢或卤素取代基或硝基或 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基。

6. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在於:所述结构式(II)中, R₅ 和 R₅' 同时为卤素取代基或硝基或 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₁、R₂、R₄、R₆、R₇、R₁'、R₂'、R₄'、R₆'、R₇' 均为氢。

7. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在於:所述结构式(II)中, R₁ 和 R₁' 同时为 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₂、R₄、R₅、R₆、R₇、R₂'、R₄'、R₅'、R₆'、R₇' 均为氢。

8. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在於:所述结构式(II)中, R₂ 和 R₂' 同时为 C₁-C₁₀ 烷基或 C₁-C₁₀ 烷氧基, R₁、R₄、R₅、R₆、R₇、R₁'、R₄'、R₅'、R₆'、R₇' 均为氢。

吲哚-3-甲醇、二吲哚甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用

[0001]

技术领域

[0002] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及吲哚-3-甲醇、二吲哚甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化的药物中的应用。

[0003]

背景技术

[0004] 肺纤维化是严重威胁患者生命健康的疾病。肺纤维化通常由病毒,细菌,药物,空气污染物等造成的肺组织损伤修复过程中产生的病理性变化。发病过程中,正常的肺组织被大量胶原蛋白等纤维环细胞外基质替代,肺功能进行性丧失,最终导致病人呼吸衰竭而死亡。目前肺纤维化没有具有针对性的,疗效可靠的药物。临床上主要依靠支持治疗和激素治疗为主,疗效有限且具有较大的副作用,因此继续具有明确治疗基质的特效药物。

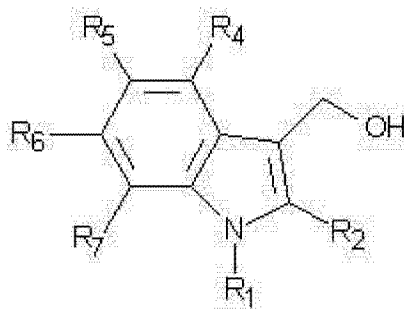
[0005] 3,3'-二吲哚甲烷(DIM)及其前体分子吲哚-3-甲醇(I3C)是发现于云苔属,十字花科类植物中的一中有明确生理活性的小分子化合物。申请人在前期研究中发现,DIM可以通过诱导细胞产生大量主动清除自由基的基因的表达,提高细胞抗氧化和抗自由基伤害的能力。自由基是促进肺纤维化过程中成纤维细胞活化大量表达纤维化物质的一个重要因素,因此,DIM可以通过该基质抑制成纤维细胞的活化程度,减缓和抑制肺纤维化的发生和发展,可以用作防治肺纤维化的一类特效药物进行开发。

[0006]

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种能够有效抑制肺纤维化动物模型的发病症状,可作为治疗原发性肺纤维化的候选药物分子即吲哚-3-甲醇、二吲哚甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化的药物中的应用。

[0008] 本发明的具有结构式(I)的吲哚-3-甲醇及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用,结构式(I)中,R₁、R₂、R₄、R₅、R₆、R₇各自为H或卤素取代基或硝基或C₁-C₁₀烷基或C₁-C₁₀烷氧基。



[0009] (I)

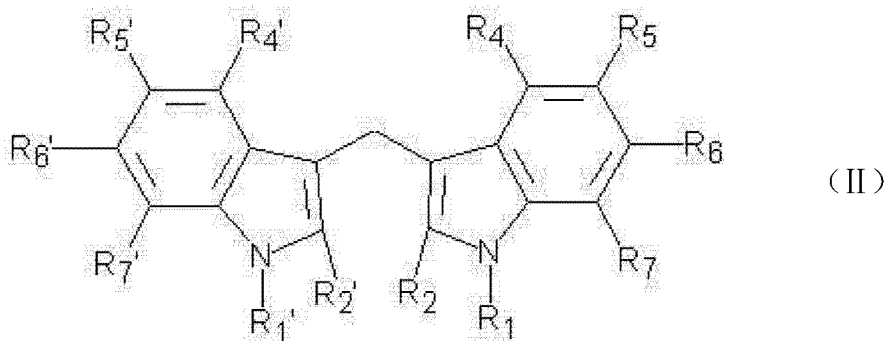
优选的,所述结构式(I)中,当R1、R2、R4、R5、R6、R7均为氢时,该结构式所示的化合物即为吡啶-3-甲醇;

当R5为卤素取代基或硝基或C1-C10烷基或C1-C10烷氧基,R1、R2、R4、R6、R7均为氢,此时,该结构式(I)所示的化合物包括:5-氯-吡啶-3-甲醇,5-溴-吡啶-3-甲醇、5-氟-吡啶-3-甲醇;5-硝基-吡啶-3-甲醇;5-甲基-吡啶-3-甲醇,5-乙基-吡啶-3-甲醇,5-丙基-吡啶-3-甲醇,5-丁基-吡啶-3-甲醇,5-戊基-吡啶-3-甲醇、5-甲氧基-吡啶-3-甲醇、5-乙氧基-吡啶-3-甲醇、5-丙氧基-吡啶-3-甲醇、5-丁氧基-吡啶-3-甲醇、5-戊氧基-吡啶-3-甲醇等;

当R1为C1-C10烷基或C1-C10烷氧基,R2、R4、R5、R6、R7均为氢,此时,该结构式(I)所示的化合物包括:N-甲基-吡啶-3-甲醇、N-乙基-吡啶-3-甲醇、N-丙基-吡啶-3-甲醇、N-丁基-吡啶-3-甲醇、N-戊基-吡啶-3-甲醇、N-甲氧基-吡啶-3-甲醇、N-乙氧基-吡啶-3-甲醇、N-丙氧基-吡啶-3-甲醇、N-丁氧基-吡啶-3-甲醇、N-戊氧基-吡啶-3-甲醇等;

当R2为C1-C10烷基或C1-C10烷氧基,R1、R4、R5、R6、R7均为氢,此时,该结构式(I)所示的化合物包括:2-甲基-吡啶-3-甲醇、2-乙基-吡啶-3-甲醇、2-丙基-吡啶-3-甲醇、2-丁基-吡啶-3-甲醇、2-戊基-吡啶-3-甲醇、2-甲氧基-吡啶-3-甲醇、2-乙氧基-吡啶-3-甲醇、2-丙氧基-吡啶-3-甲醇、2-丁氧基-吡啶-3-甲醇、2-戊氧基-吡啶-3-甲醇等;

本发明的具有结构式(II)的二吡啶甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用,



其中,R1、R2、R4、R5、R6、R7、R1'、R2'、R4'、R5'、R6'、R7'各自为氢或卤素取代基或硝基或C1-C10烷基或C1-C10烷氧基。

[0010] 优选的,所述结构式(II)中,当R1、R2、R4、R5、R6、R7、R1'、R2'、R4'、R5'、R6'、R7'均为氢时,此时该结构式所示的化合物即为二吡啶甲烷;

当R5和R5'同时为卤素取代基或硝基或C1-C10烷基或C1-C10烷氧基,R1、R2、R4、R6、R7、R1'、R2'、R4'、R6'、R7'均为氢,此时,结构式(II)所示化合物包括:5,5'-二氯-二吡啶甲烷、5,5'-二溴-二吡啶甲烷或5,5'-二氟-二吡啶甲烷;5,5'-二硝基-二吡啶甲烷;5,5'-二甲基-二吡啶甲烷、5,5'-二乙基-二吡啶甲烷、5,5'-二丙基-二吡啶甲烷、5,5'-二丁基-二吡啶甲烷、5,5'-二戊基-二吡啶甲烷、5,5'-二甲氧基-二吡啶甲烷、5,5'-二乙氧基-二吡啶甲烷、5,5'-二丙氧基-二吡啶甲烷、5,5'-二丁氧基-二吡啶甲烷或5,5'-二戊氧基-二吡啶甲烷等。

[0011] 当 R1 和 R1' 同时为 C1-C10 烷基或 C1-C10 烷氧基, R2、R4、R5、R6、R7、R2'、R4'、R5'、R6'、R7' 均为氢, 此时, 结构式(II) 所示化合物包括: N, N' - 二甲基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二乙基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二丙基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二丁基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二戊基 - 二吡啶甲烷。N, N' - 二甲氧基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二乙氧基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二丙氧基 - 二吡啶甲烷、N, N' - 二丁氧基 - 二吡啶甲烷或 N, N' - 二戊氧基 - 二吡啶甲烷等。

[0012] 当 R2 和 R2' 同时为 C1-C10 烷基或 C1-C10 烷氧基, R1、R4、R5、R6、R7、R1'、R4'、R5'、R6'、R7' 均为氢, 此时, 结构式(II) 所示化合物包括: 2, 2' - 二甲基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二乙基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二丙基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二丁基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二戊基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二甲氧基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二乙氧基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二丙氧基 - 二吡啶甲烷、2, 2' - 二丁氧基 - 二吡啶甲烷或 2, 2' - 二戊氧基 - 二吡啶甲烷等。

[0013] 本发明的吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物在制备防治肺纤维化药物中的应用, 单一的化合物吡啶 -3- 甲醇或二吡啶甲烷或其衍生物的一种的使用能够防治肺纤维化, 那么显然, 上述化合物的各种形式的混配亦能够达到一定的治疗效果。

[0014] 使用商业上可得的吡啶取代物来合成 I3C 的取代衍生物可能是获得这些化合物最便捷的方法。DIM 的衍生物同样可以通过甲醛缩合吡啶取代物的方法制备。然而, 后者的劣势在于副产物的形成使得分离纯化所需要的 DIM 衍生物更为复杂。

[0015] 本发明所提供的化合物是通过使用二甲基甲酰胺缩合吡啶取代物来合成制备取代的吡啶 -3- 乙醛, 被取代的吡啶 -3- 乙醛产物通过使用甲醇以及硼氢化钠处理还原其醛基从而得到 I3C 的取代衍生物。吡啶 -3- 甲醇(I3C) 在体内胃酸环境中很不稳定, 可发生缩合反应形成低聚物 3, 3' - 二吡啶甲烷。本发明的二吡啶甲烷(DIM) 的取代衍生物是通过缩合吡啶 -3- 甲醇(I3C) 的取代产物加以合成, 这可以通过采取例如 PH 值 5.5 左右的磷酸盐缓冲液处理等方法实现(I3C 及 DIM 的衍生物制备参考美国专利 US 5948808)。

[0016] 采用本发明的吡啶 -3- 甲醇(I3C)、二吡啶甲烷(DIM) 及其衍生物, 与多种药理学上可以接受的载体相结合, 通过如口腔、静脉、鼻腔、直肠或其他任何可以输送有效剂量的活性物质的给药方式, 可以制备成各种液体制剂如注射剂、口服液制剂等, 也可以制备成各种有效且易于给药的固体制剂如胶囊剂、栓剂等。其中, 用于注射或口服用的液体制剂, 其所需的载体可以为无菌水、无菌盐水或者水溶性有机载体如环糊精、玉米油、橄榄油、油酸乙酯、二醇类等医学上可接受的载体; 固体给药制剂在制备中可加入固体制剂常用的辅料如赋形剂葡萄糖、乳糖、纤维素等, 还可加入润滑剂聚乙二醇、硬脂酸镁等, 以及粘结剂、矫味剂等固体制剂所需的辅料成分, 再通过混合、制粒等工序成型。上述这些制剂中的活性物质的有效量是能使肺纤维化症状明显降低的量, 具有常规技术的研究人员将能够确定本发明所提供的试剂的最有效的给药剂量和时间考虑给药方式, 药物代谢, 以及其他一些药代动力学参数例如药物分布, 清除率等。

[0017] 本发明通过肺纤维化模型进行例证。此处的动物包括但是不限于: 小鼠, 大鼠, 驯养动物包括但是不限于猫, 狗, 以及其它一些动物例如但是不限于牛, 羊, 猪, 马, 灵长类动物例如但是不限于猴子和人。

[0018] 本发明提出了吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物化合物制备防治肺纤维化药物

中的新的应用。

[0019] 在动物试验中发现, DIM 和 I3C 及其衍生化合物可有效降低肺纤维化动物模型的发病症状, 可以成为防治肺纤维化的候选药物分子。同时, 本发明所使用的小分子药物易于获取, 价格低廉, 性质稳定, 便于保存和运输, 具有广阔的应用前景。

具体实施方式

[0020] 下面的实验例用以解释本发明, 但是并非对本发明实质内容的限制。

[0021] 【化合物制备】

实施例 1

(5- 氯吡啶 -3- 甲醇及 5,5' - 二氯二吡啶甲烷的制备)

将 0.86ml 磷酰氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0°C 的二甲基甲酰胺中。将 8.6mmol 5- 氯吡啶(购于南京锐马精细化工有限公司)溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中, 然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中, 所形成的悬浮液在 37°C 加热 60 分钟, 直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水, 再缓慢加入 10ml 含有 3.75 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却, 过滤, 水洗, 空气中干燥即可获得 5- 氯吡啶 -3- 乙醛。

[0022] 将 1.0 克 5- 氯吡啶 -3- 乙醛溶于 5.0ml 甲醇, 持续加入固体硼氢化钠, 直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水, 冷却至 0°C, 过滤, 避光真空干燥获得 5- 氯吡啶 -3- 甲醇, 得率约 90%。

[0023] 将 1.0 克 5- 氯吡啶 -3- 甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中, 室温搅拌 6 小时, 反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤, 避光真空干燥即获得 5,5' - 二氯二吡啶甲烷, 得率约 85%。

[0024] 实施例 2

(5- 硝基吡啶 -3- 甲醇及 5,5' - 二硝基二吡啶甲烷的制备)

5- 硝基吡啶可以通过商业购买获得(南京锐马精细化工有限公司)。将 0.92ml 磷酰氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0°C 的二甲基甲酰胺中。将 8.2mmol 5- 硝基吡啶溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中, 然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中, 所形成的悬浮液在 42°C 加热 90 分钟, 直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水, 再缓慢加入 10ml 含有 3.75 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却, 过滤, 水洗, 空气中干燥即可获得 5- 硝基吡啶 -3- 乙醛。

[0025] 将 1.0 克 5- 硝基吡啶 -3- 乙醛溶于 5.0ml 甲醇, 持续加入固体硼氢化钠, 直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水, 冷却至 0°C, 过滤, 避光真空干燥获得 5- 硝基吡啶 -3- 甲醇, 得率约 87%。

[0026] 将 1.0 克 5- 硝基吡啶 -3- 甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中, 室温搅拌 6 小时, 反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤, 避光真空干燥即获得 5,5' - 二硝基双吡啶甲烷, 得率约 80%。

[0027] 实施例 3

(5- 戊基吡啶 -3- 甲醇及 5,5' - 二戊基 - 二吡啶甲烷的制备)

5- 戊基吡啶可以通过商业购买获得(南京锐马精细化工有限公司)。将 0.82ml 磷酰

氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0℃ 的二甲基甲酰胺中。将 9.2mmol 5-戊基吡啶溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中,然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中,所形成的悬浮液在 37℃ 加热 40-60 分钟,直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水,再缓慢加入 10ml 含有 3.75 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却,过滤,水洗,空气中干燥即可获得 5-戊基吡啶-3-乙醛。

[0028] 将 1.0 克 5-戊基吡啶-3-乙醛溶于 5.0ml 甲醇,持续加入固体硼氢化钠,直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水,冷却至 0℃,过滤,避光真空干燥获得 5-戊基吡啶-3-甲醇,得率约 85%。

[0029] 将 1.0 克 5-戊基吡啶-3-甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中,室温搅拌 10 小时,反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤,避光真空干燥即获得 5,5'-二戊基双吡啶甲烷,得率约 70%。

[0030] 实施例 4

(N-甲氧基吡啶-3-甲醇及 N,N'-二甲氧基-二吡啶甲烷的制备)

N-甲氧基吡啶可以通过商业购买获得(南京锐马精细化工有限公司)。将 0.86ml 磷酰氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0℃ 的二甲基甲酰胺中。将 8.9mmol N-甲氧基吡啶溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中,然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中,所形成的悬浮液在 40℃ 加热 60-90 分钟,直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水,再缓慢加入 10ml 含有 3.75 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却,过滤,水洗,空气中干燥即可获得 N-甲氧基吡啶-3-乙醛。

[0031] 将 1.0 克 N-甲氧基吡啶-3-乙醛溶于 5.0ml 甲醇,持续加入固体硼氢化钠,直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水,冷却至 0℃,过滤,避光真空干燥获得 N-甲氧基吡啶-3-甲醇,得率约 80%。

[0032] 将 1.0 克 N-甲氧基吡啶-3-甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中,室温搅拌 12 小时,反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤,避光真空干燥即获得 N,N'-二甲氧基双吡啶甲烷,得率约 70%。

[0033] 实施例 5

(1-丁基-2-甲基吡啶-3-甲醇及 1,1'-二丁基-2,2'-二甲基二吡啶甲烷的制备)

1-丁基-2-甲基吡啶可以通过商业购买获得(南京锐马精细化工有限公司)。将 0.82ml 磷酰氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0℃ 的二甲基甲酰胺中。将 8.2mmol 1-丁基-2-甲基吡啶溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中,然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中,所形成的悬浮液在 42℃ 加热 90 分钟,直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水,再缓慢加入 10ml 含有 3.8 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却,过滤,水洗,空气中干燥即可获得 1-丁基-2-甲基吡啶-3-乙醛。

[0034] 将 1.0 克 1-丁基-2-甲基吡啶-3-乙醛溶于 5.0ml 甲醇,持续加入固体硼氢化钠,直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水,冷却至 0℃,过滤,避光真空干燥获得 1-丁基-2-甲基吡啶-3-甲醇,得率约 85%。

[0035] 将 1.0 克 1-丁基-2-甲基吡啶-3-甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中,室温搅拌 6 小时,反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤,避光真空干燥即获得 1,1'-二丁基-2,2'-二甲基双吡啶甲烷,得率约 80%。

[0036] 实施例 6

(4- 溴吡啶 -3- 甲醇及 4, 4' - 二溴二吡啶甲烷的制备)

将 0.86ml 磷酰氯缓慢加入到 2.9ml 预先冷却至 0°C 的二甲基甲酰胺中。将 8.6mmol 4- 溴吡啶(购于南京锐马精细化工有限公司)溶解于 1.0ml 的二甲基甲酰胺中,然后缓慢加入前述预冷的磷酰氯溶液中,所形成的悬浮液在 37°C 加热 60 分钟,直至澄清的黄色溶液变成淡黄色的糊状物质。然后向此糊状物质中加入 1ml 的冰水,再缓慢加入 10ml 含有 3.75 克 KOH 的水溶液。将此混合物加热至煮沸后冷却,过滤,水洗,空气中干燥即可获得 4- 溴吡啶 -3- 乙醛。

[0037] 将 1.0 克 4- 溴吡啶 -3- 乙醛溶于 5.0ml 甲醇,持续加入固体硼氢化钠,直至过量。然后向反应物中加入 50ml 水,冷却至 0°C,过滤,避光真空干燥获得 4- 溴吡啶 -3- 甲醇,得率约 90%。

[0038] 将 1.0 克 4- 溴吡啶 -3- 甲醇加入到 pH 为 5.5 的磷酸缓冲液中,室温搅拌 6 小时,反应过程通过薄层层析(TLC)加以监测。反应产物过滤,避光真空干燥即获得 4, 4' - 二溴二吡啶甲烷,得率约 85%。

[0039] 【动物实验例】

本发明动物药理实验表明,吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物有较好的抗肺纤维化的药理作用,能减轻博来霉素 A₅(Bleomycin A₅, BLMA₅)诱导的肺纤维化,降低肺纤维化程度,对于治疗肺间质纤维化将是可选用的药物,为临床防治肺纤维化提供科学的实验依据。

[0040] 经喉管灌注小鼠肺部博来霉素可引发肺组织内的自身免疫反应,导致肺组织内的 T 淋巴细胞数量增多。同时博来霉素在氧分子和二价铁离子的共同作用下可产生大量的活性氧自由基,诱发肺组织产生脂质过氧化,导致生物膜功能损伤,并可提高磷脂酶 A₂ 的活性,增加花生四烯酸代谢产物的合成,扩大炎症反应,刺激成纤维细胞增殖,引起组织纤维化。给药 1 周后动物开始出现一些列肺纤维化的渐进性病理改变。早期病变主要表现为肺间质及肺泡腔内不同程度的炎症细胞浸润,并可见 II 型肺上皮细胞增生及少量巨噬细胞、单核细胞;随着炎性渗出逐渐吸收,部分肺泡机化,肺泡间隔成纤维细胞增生,至给药 4 周时,组织间质及胸膜层胶原纤维明显增多。

[0041] 实验材料:

分别将 I3C、DIM、5- 氯 - 吡啶 -3- 甲醇(5-Cl-I3C)、5, 5' - 二氯 - 二吡啶甲烷(5, 5' -Cl-DIM)、5- 戊基 - 吡啶 -3- 甲醇(5-C5-I3C)、5, 5' - 二戊基 - 二吡啶甲烷(5, 5' -C5-DIM)、5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 甲醇(5-MOE-I3C)、5, 5' - 二甲氧基 - 二吡啶甲烷(5, 5' -MOE-DIM)、5- 硝基 - 吡啶 -3- 甲醇(5-NO-I3C)、5, 5' - 二硝基 - 二吡啶甲烷(5, 5' -NO-DIM)、N- 甲基 - 吡啶 -3- 甲醇(N-Me-I3C)、N, N' - 二甲基 - 二吡啶甲烷(N, N' -Me-DIM)、N- 甲氧基 - 吡啶 -3- 甲醇(N-MOE-I3C)、N, N' - 二甲氧基 - 二吡啶甲烷(N, N' -MOE-DIM)、2- 戊基 - 吡啶 -3- 甲醇(2-C5-I3C)、2, 2' - 二戊基 - 二吡啶甲烷(2, 2' -C5-DIM)、2- 甲氧基 - 吡啶 -3- 甲醇(2-MOE-I3C)、2, 2' - 二甲氧基 - 二吡啶甲烷(2, 2' -MOE-DIM)、1- 丁基 -2- 甲基 - 吡啶 -3- 甲醇(1Bu-2Me-I3C)、1, 1' - 二丁基 -2, 2' - 二甲基 - 二吡啶甲烷(1, 1' Bu-2, 2' Me-DIM)、4- 溴 - 吡啶 -3- 甲醇(4-Br-I3C)及 4, 4' - 二溴 - 二吡啶甲烷(4, 4' -Br-DIM)用玉米油溶解配成 2.0mg/ml 口服储液备用。口服溶液通过灌胃针灌胃给药。

[0042] 羟脯氨酸(HYP)试剂盒;实验动物健康昆明 SD 大鼠,体重 180-200g。

[0043] 1、吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物抗 BLMA₅ 致肺纤维化大鼠作用

博来霉素 A₅ 致肺纤维化动物模型的肺组织病理学和生理学改变与人肺纤维化相似。当成纤维细胞增多时, I 型胶原产物显著增加,使 I 型与 III 型胶原比例失调,导致胶原沉淀,形成肺纤维化。

[0044] 将实验用体重 180-200g 健康昆明 SD 大鼠,随机分为正常对照组、生理盐水组、BLMA₅ 组及分别用 I3C、DIM、5-氯-吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C)、5,5'-二氯-二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM)、5-戊基-吡啶-3-甲醇(5-C5-I3C)、5,5'-二戊基-二吡啶甲烷(5,5'-C5-DIM)、5-甲氧基-吡啶-3-甲醇(5-MOE-I3C)、5,5'-二甲氧基-二吡啶甲烷(5,5'-MOE-DIM)、5-硝基-吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C)、5,5'-二硝基-二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM)、N-甲基-吡啶-3-甲醇(N-Me-I3C)、N,N'-二甲基-二吡啶甲烷(N,N'-Me-DIM)、N-甲氧基-吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)、N,N'-二甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)、2-戊基-吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C)、2,2'-二戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM)、2-甲氧基-吡啶-3-甲醇(2-MOE-I3C)、2,2'-二甲氧基-二吡啶甲烷(2,2'-MOE-DIM)、1-丁基-2-甲基-吡啶-3-甲醇(1Bu-2Me-I3C)、1,1'-二丁基-2,2'-二甲基-二吡啶甲烷(1,1' Bu-2,2' Me-DIM)、4-溴-吡啶-3-甲醇(4-Br-I3C)及 4,4'-二溴-二吡啶甲烷(4,4'-Br-DIM)治疗的治疗组。其中, BLMA₅ 组用 20% 乌拉坦按 100mg/100g 体重腹腔注射麻醉后, 无菌条件下, 切开颈前正中皮肤长约 0.5cm, 用 1ml 无菌注射器刺入气管, 按 0.5ml/100g 体重缓慢滴注 5%BLMA₅; 注药后将大鼠直立旋转, 使 BLMA₅ 在肺内均匀分布; 缝合皮肤, 置于 SPF 动物室内饲养, 记录死亡率。治疗组用治疗药物给大鼠灌胃, 共 2.5 次。末次给治疗药物后 1 小时气管内缓慢滴入 BLMA₅, 按体重剂量每天分两次给予治疗药物, 连续给药。

[0045] 统计学分析: 不同实验动物死亡率比较, 采用 χ^2 检验, 结果以 $P < 0.05$ 判定有显著性差异, 见表 1 (平均值 \pm 标准偏差)。

[0046] 表 1: 吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物抗 BLMA₅ 致肺纤维化大鼠死亡率的作用

组别	例数(只)	死亡率(%)	
		14天	28天
正常对照组	10	0.0%	0.0%
生理盐水组	10	0.0%	0.0%
BLMA ₅ 组	10	50.0%	70.0%
I3C	10	0.0%	0.0%
DIM	10	0.0%	0.0%
5-CI-I3C	10	0.0%	0.0%
5,5'-CI-DIM	10	0.0%	0.0%
5-C5-I3C	10	0.0%	0.0%
5,5'-C5-DIM	10	0.0%	0.0%
5-MOE-I3C	10	0.0%	0.0%
5,5'-MOE-DIM	10	0.0%	0.0%
5-NO-I3C	10	0.0%	0.0%
5,5'-NO-DIM	10	0.0%	0.0%
N-Me-I3C	10	0.0%	0.0%
N,N'-Me-DIM	10	0.0%	0.0%
N-MOE-I3C	10	0.0%	0.0%
N,N'-MOE-DIM	10	0.0%	0.0%
2-C5-I3C	10	0.0%	0.0%
2,2'-C5-DIM	10	0.0%	0.0%
2-MOE-I3C	10	0.0%	0.0%
2,2'-MOE-DIM	10	0.0%	0.0%
1Bu-2Me-I3C	10	0.0%	0.0%
1,1'Bu-2,2'Me-DIM	10	0.0%	0.0%
4-Br-I3C	10	0.0%	0.0%
4,4'-Br-DIM	10	0.0%	0.0%

BLMA₅组与正常对照组和生理盐水组相比, $P < 0.05$; 治疗组与 BLMA₅ 相比, $P < 0.01$ 。

[0047] 结果表明, 与 BLMA₅ 组大鼠相比, 药物治疗组能明显降低其死亡率($P < 0.01$)。

[0048] 2、吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物对大鼠肺组织匀浆中 HYP 测定

羟脯氨酸(Hydroxyproline, HYP)为胶原纤维所特有, 其它蛋白中不存在或含量非常低。因此, 测定肺组织 HYP 的含量可评价肺纤维化的严重程度。

[0049] 将受试大鼠随机分为正常对照组、生理盐水组、BLMA₅组及分别用 I3C、DIM、

5-氯-吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C)、5,5'-二氯-二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM)、5-戊基-吡啶-3-甲醇(5-C5-I3C)、5,5'-二戊基-二吡啶甲烷(5,5'-C5-DIM)、5-甲氧基-吡啶-3-甲醇(5-MOE-I3C)、5,5'-二甲氧基-二吡啶甲烷(5,5'-MOE-DIM)、5-硝基-吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C)、5,5'-二硝基-二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM)、N-甲基-吡啶-3-甲醇(N-Me-I3C)、N,N'-二甲基-二吡啶甲烷(N,N'-Me-DIM)、N-甲氧基-吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)、N,N'-二甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)、2-戊基-吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C)、2,2'-二戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM)、2-甲氧基-吡啶-3-甲醇(2-MOE-I3C)、2,2'-二甲氧基-二吡啶甲烷(2,2'-MOE-DIM)、1-丁基-2-甲基-吡啶-3-甲醇(1Bu-2Me-I3C)、1,1'-二丁基-2,2'-二甲基-二吡啶甲烷(1,1' Bu-2,2' Me-DIM)、4-溴-吡啶-3-甲醇(4-Br-I3C)及4,4'-二溴-二吡啶甲烷(4,4'-Br-DIM)治疗的治疗组。在14天和第28天各组随机分取10只处死检测。

[0050] 统计学分析:数据用平均数±标准差表示,组间药物疗效的比较采用重复测量的方差分析,结果以 $P<0.05$ 判定有显著性差异。结果见表2。

[0051] 表2中,14天模型组大鼠肺匀浆中HYP含量显著升高,28天达高峰($P<0.05$),提示已经成功复制了肺纤维化模型。

[0052] 表2:吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物对大鼠肺组织匀浆中HYP含量的影响

组别	例数(只)	羟脯氨酸含量(mg/g)	
		14天	28天
正常对照组	10	0.036 ± 0.002	0.036 ± 0.002
生理盐水组	10	0.042 ± 0.0008	0.042 ± 0.0008
BLMA ₅ 组	10	0.698 ± 0.017	0.813 ± 0.015
I3C	10	0.281 ± 0.004	0.295 ± 0.017
DIM	10	0.193 ± 0.006	0.189 ± 0.018
5-Cl-I3C	10	0.274 ± 0.009	0.296 ± 0.015
5,5'-Cl-DIM	10	0.197 ± 0.006	0.187 ± 0.011
5-C5-I3C	10	0.285 ± 0.016	0.271 ± 0.003
5,5'-C5-DIM	10	0.189 ± 0.019	0.170 ± 0.013
5-MOE-I3C	10	0.286 ± 0.019	0.284 ± 0.002
5,5'-MOE-DIM	10	0.192 ± 0.013	0.181 ± 0.011
5-NO-I3C	10	0.285 ± 0.014	0.293 ± 0.007
5,5'-NO-DIM	10	0.183 ± 0.011	0.165 ± 0.010
N-Me-I3C	10	0.289 ± 0.002	0.293 ± 0.012
N,N'-Me-DIM	10	0.187 ± 0.012	0.192 ± 0.004
N-MOE-I3C	10	0.294 ± 0.005	0.271 ± 0.015
N,N'-MOE-DIM	10	0.188 ± 0.012	0.191 ± 0.004
2-C5-I3C	10	0.279 ± 0.015	0.284 ± 0.008
2,2'-C5-DIM	10	0.190 ± 0.019	0.195 ± 0.019
2-MOE-I3C	10	0.292 ± 0.008	0.297 ± 0.014
2,2'-MOE-DIM	10	0.196 ± 0.016	0.186 ± 0.006
1Bu-2Me-I3C	10	0.285 ± 0.009	0.299 ± 0.011
1,1'Bu-2,2'Me-DIM	10	0.182 ± 0.019	0.194 ± 0.002
4-Br-I3C	10	0.297 ± 0.007	0.278 ± 0.011
4,4'-Br-DIM	10	0.181 ± 0.004	0.194 ± 0.008

BLMA₅组与正常对照组和生理盐水组相比, $P < 0.01$; 治疗组与BLMA₅组相比, $P < 0.01$ 。

[0053] 实验结果表明, 与BLMA₅组大鼠相比, 治疗组大鼠肺组织匀浆中HYP含量明显降低($P < 0.01$)。