



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104906086 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510353309. 3

(22) 申请日 2015. 06. 24

(71) 申请人 安徽四正医药科技有限公司

地址 230000 安徽省合肥市高新区潜水东路
26 号合肥宏飞机械设备租赁有限公司
厂房 2 层

(72) 发明人 张勇

(74) 专利代理机构 重庆创新专利商标代理有限
公司 50125

代理人 付继德

(51) Int. Cl.

A61K 31/404(2006. 01)

A61P 13/12(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

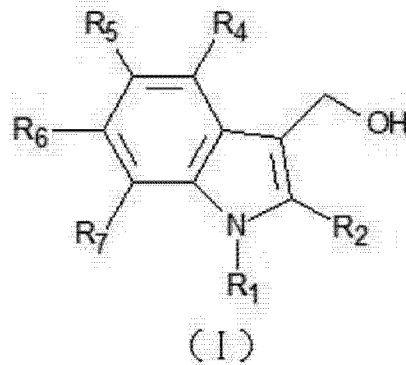
(54) 发明名称

吡啶-3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物用于
治疗肾小球肾炎药物的应用

(57) 摘要

本发明提出了吡啶-3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物用于治疗肾小球肾炎药物的应用, 吡啶-3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生化合物通过抑制基底细胞有丝分裂, 可以用于肾小球肾炎的治疗。DIM 和 I3C 及其衍生化合物可有效降低肾小球肾炎的发病症状并逐渐治愈, 可以成为治疗肾小球肾炎的候选药物分子。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) 的用于吡啶 -3- 甲醇在治疗肾小球肾炎药物的应用,



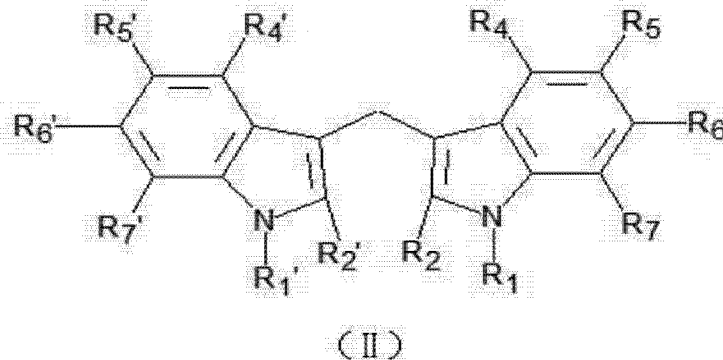
其中, R1 为氢或 C1-C10 烷基或 C1-C10 烷氧基 ;R2 为氢或 C1-C10 烷基或 C1-C10 烷氧基 ;R5 为氢或卤素取代基或硝基 ;R4、R6、R7 均为氢。

2. 根据权利要求 1 所述的吡啶 -3- 甲醇在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 所述结构式 (I) 中, R5 为卤素取代基或硝基, R1、R2、R4、R6、R7 均为氢。

3. 根据权利要求 1 所述的吡啶 -3- 甲醇在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 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 所述的吡啶 -3- 甲醇在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 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) 的二吡啶甲烷在治疗肾小球肾炎药物的应用,



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

6. 根据权利要求 5 所述的二吡啶甲烷在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 所述结构式 (II) 中, R5 和 R5' 同时为卤素取代基或硝基, R1、R2、R4、R6、R7、R1'、R2'、R4'、R6'、R7' 均为氢。

7. 根据权利要求 5 所述的二吡啶甲烷在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 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 所述的二吡啶甲烷在治疗肾小球肾炎药物的应用, 其特征在于 : 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用于治疗肾小球肾炎药物的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,更具体地说涉及吲哚-3-甲醇、二吲哚甲烷及其衍生物用于治疗肾小球肾炎药物的应用。

背景技术

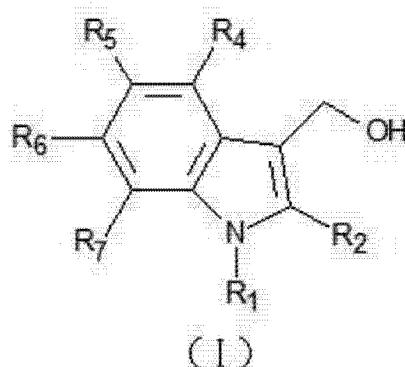
[0002] 肾小球肾炎是我国最常见的肾小球疾病,约占原发性肾小球疾病的50%,其病理改变为系膜细胞增生,继发系膜区细胞外基质聚积和扩增,特别是增生性肾小球肾炎常有系膜细胞的增殖,系膜基质的增多,而系膜细胞多为分子量6~60KD的多肽或糖蛋白,具有高度生物活性,在病理状态下这些细胞因子刺激系膜细胞增殖和蛋白质的合成,导致炎症加剧。同时尿蛋白,对于肾小球系膜细胞,肾小管细胞等具有直接毒性作用,可以引起局部脂质代谢紊乱,免疫系统激动,生长因子及其他细胞因子表达增高,促进细胞外基质聚集,加重肾小球硬化,同时还间接引起肾小球间质内单核巨噬细胞浸润,产生大量趋化因子,促进细胞间黏附因子的表达及单细胞向系膜区迁移,引起迟发型超敏反应,导致肾小球系膜细胞及基质增殖,促进肾病发生。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种能够有效治疗肾小球肾炎动物模型的发病症状,可作为治疗肾小球肾炎的候选药物分子即吲哚-3-甲醇、二吲哚甲烷及其衍生物在治疗肾小球肾炎的药物的应用。

[0004] 本发明的具有结构式(I)的吲哚-3-甲醇及其衍生物在制备治疗肾小球肾炎药物中的应用,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。

[0005]



[0006] 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吲哚-3-甲醇;

[0007] 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-吲哚-3-甲醇,5-溴-吲哚-3-甲

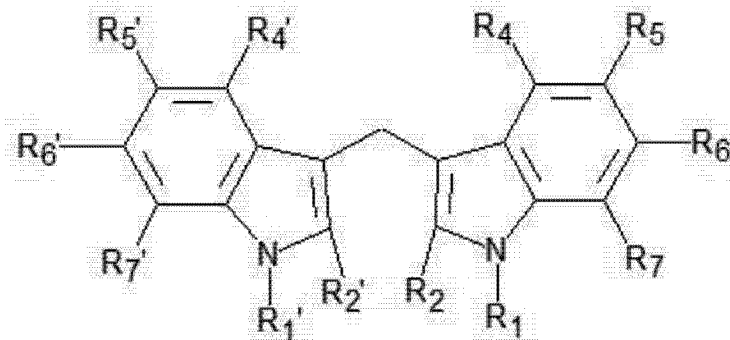
醇、5-氟-吡啶-3-甲醇;5-硝基-吡啶-3-甲醇;5-甲基-吡啶-3-甲醇,5-乙基-吡啶-3-甲醇,5-丙基-吡啶-3-甲醇,5-丁基-吡啶-3-甲醇,5-戊基-吡啶-3-甲醇、5-甲氧基-吡啶-3-甲醇、5-乙氧基-吡啶-3-甲醇、5-丙氧基-吡啶-3-甲醇、5-丁氧基-吡啶-3-甲醇、5-戊氧基-吡啶-3-甲醇等;

[0008] 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;

[0009] 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;

[0010] 本发明的具有结构式(II)的二吡啶甲烷及其衍生物在制备治疗肾小球肾炎药物中的应用,

[0011]



(II)

[0012] 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。

[0013] 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;

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 本发明的吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物在治疗肾小球肾炎药物的应用, 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治疗肾小球肾炎, 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。

[0018] 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。

[0019] 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)。

[0020] 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肾小球肾炎症状明显降低的量, 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。

[0021] 本发明通过肾小球肾炎模型进行例证。此处的动物包括但不限于: 小鼠, 大鼠, 驯养动物包括但不限于猫, 狗, 以及其它一些动物例如但不限于牛, 羊, 猪, 马, 灵长类动物例如但不限于猴子和人。

[0022] 本发明提出了吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物在治疗肾小球肾炎药物的应用。

[0023] 在动物试验中发现, 吡啶 -3- 甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物可以保护大鼠的肾功

能,改善肾脏的病理学损害,可以降低尿蛋白,调节脂代谢,抑制系膜细胞增殖和系膜基质集聚,从而达到治疗肾小球肾炎的目的。

[0024] 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

[0025] 下面将结合本发明实施例对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 【化合物制备】

[0027] 实施例 1

[0028] (5-氯吡啶-3-甲醇及 5,5'-二氯二吡啶甲烷的制备)

[0029] 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 8.6mmol 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℃ 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。

[0030] 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℃,过滤,避光真空干燥获得 5-氯吡啶-3-甲醇,得率约 90%。

[0031] 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%。

[0032] 实施例 2

[0033] (5-硝基吡啶-3-甲醇及 5,5'-二硝基二吡啶甲烷的制备)

[0034] 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℃ 的二甲基甲酰胺中。将 8.2mmol 5-硝基吡啶溶于 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 3.75 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。

[0035] 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℃,过滤,避光真空干燥获得 5-硝基吡啶-3-甲醇,得率约 87%。

[0036] 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'-二硝基二吡啶甲烷,得率约 80%。

[0037] 实施例 3

[0038] (5-戊基吡啶-3-甲醇及 5,5'-二戊基-二吡啶甲烷的制备)

[0039] 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°C 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°C 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。

[0040] 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°C,过滤,避光真空干燥获得 5-戊基吡啶-3-甲醇,得率约 85%。

[0041] 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%。

[0042] 实施例 4

[0043] (N-甲氧基吡啶-3-甲醇及 N,N'-二甲氧基-二吡啶甲烷的制备)

[0044] 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°C 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°C 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。

[0045] 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°C,过滤,避光真空干燥获得 N-甲氧基吡啶-3-甲醇,得率约 80%。

[0046] 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%。

[0047] 实施例 5

[0048] (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)

[0049] 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°C 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°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 3.8 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。

[0050] 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°C,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%。

[0051] 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%。

[0052] 实施例6

[0053] (4-溴吡啶-3-甲醇及4,4'-二溴二吡啶甲烷的制备)

[0054] 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8.6mmol 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℃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。

[0055] 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℃,过滤,避光真空干燥获得4-溴吡啶-3-甲醇,得率约90%。

[0056] 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%。

[0057] 【动物实验】

[0058] 材料

[0059] 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3.0mg/ml口服储液备用。

[0060] 实验方法

[0061] 将大鼠适应性喂养1周,检测尿蛋白尿检结果为阴性的大鼠240只,分成24组每组10只,随机分为正常对照组、模型对照组及分别用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。

[0062] 除正常组外,其他组大鼠采用 10%水合氯醛麻醉后,经背部切除左侧肾脏,修养一周后,进行预免疫。在每只大鼠背部皮下分点注射完全弗氏佐剂 0.1ml 加 BSA3mg,于 1 周末、2 周末背部皮下注射不完全弗氏佐剂 0.1ml 加 BSA3mg,3 周后,腹腔注射 BSA 连续 4 次,每次间隔 1h,注射剂量每只分别 0.5、1、1.5、3mg,次日每只腹腔注射 BSA2mg。正式免疫完成后第一天起,尾静脉腹腔注射隔日进行,每只大鼠静脉注射 BSA 剂量从 0.5mg 开始,每次增加 0.5mg,至 2.5mg 为止,继续每周加量 0.5mg,至每日用量 5mg 为止,腹腔注射量是尾静脉注射量的 1 倍,至每日用量 10mg 为止,免疫 2 周后尾静脉注射大肠杆菌内毒素 100 μ g/只,正常组麻醉后切开背部暴露左肾并缝合,之后用与造模大鼠相同,从尾静脉、腹腔、皮下分点注射相应量的生理盐水,并给与生理盐水灌胃对照,全部大鼠于正视免疫 8 周后处死取肾组织。其中于治疗组于第 6 周开始灌胃给药,每日 1 此,服用量为 30mg/Kg. d, 其余组灌等量自来水,各组灌胃 7 周。

[0063] 检测方法

[0064] 1、于第 2、4、6、8、12 周末将大鼠置于清洁代谢笼中,取 24h 尿液,用三氯乙酸法进行 24h 尿蛋白定量测定,取其均值如下表 1;

[0065] 表 1:

[0066]

组别	24h 尿蛋白定量 (mg/24h)				
	第 2 周末	第 4 周末	第 6 周末	第 8 周末	第 12 周末
正常对照组	3.34	3.44	3.38	3.48	3.40
模型对照组	3.43	3.61	6.39	9.14	12.22
I3C	3.47	3.57	6.28	8.78	8.73
DIM	3.50	3.55	6.38	8.66	8.54
5-C1-I3C	3.44	3.61	6.20	8.15	8.76
5,5'-C1-DIM	3.39	3.73	6.16	8.36	8.31
5-C5-I3C	3.41	3.60	6.14	8.47	8.24
5,5'-C5-DIM	3.36	3.59	6.10	8.19	8.07
5-MOE-I3C	3.31	3.58	6.24	8.64	8.55
5,5'-MOE-DIM	3.29	3.61	6.21	8.55	8.41
5-NO-I3C	3.45	3.69	6.13	8.70	8.68
5,5'-NO-DIM	3.38	3.62	6.22	8.33	8.33
N-Me-I3C	3.44	3.58	6.30	8.69	8.67
N,N'-Me-DIM	3.36	3.63	6.15	8.51	8.35
N-MOE-I3C	3.45	3.49	6.09	8.43	8.39
N,N'-MOE-DIM	3.51	3.50	6.15	8.60	8.59
2-C5-I3C	3.47	3.53	6.17	8.56	8.44
2,2'-C5-DIM	3.49	3.52	6.24	8.57	8.36
2-MOE-I3C	3.46	3.49	6.21	8.49	8.47
2,2'-MOE-DIM	3.46	3.45	6.20	8.36	8.33
1Bu-2Me-I3C	3.49	3.52	6.20	8.66	8.58
1,1'-Bu-2,2'-Me-DIM	3.38	3.41	6.29	8.70	8.60
4-Br-I3C	3.41	3.55	6.31	8.71	8.58
4,4'-Br-DIM	3.42	3.60	6.18	8.49	8.41

[0067] 从实验中观察大鼠尿蛋白变化,实验第 2、4 周末各组均未出现明显尿蛋白,第 6、8、12 周末除正常组外,其余组均出现尿蛋白增长,与正常组均有显著差异。模型组尿蛋白均出现上涨,而治疗组中虽然有上涨,但是明显低于模型对照组。因此可见模型组肾小球肾炎病症明显加重,而治疗组虽然有炎症,但是在吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物的作用下,抑制了尿蛋白的产生,而且量明显比模型组低,可以有效的缓解治愈的效果。

[0068] 2、取肾组织,用 10% 中兴福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,以 3 μ m 的石蜡切片,进行 HE、Masson、PAS 染色,在光学显微镜下观察拍片;取右上极皮质 1mm³经 3% 戊二醛和 1% 锇酸磷酸钠缓冲液双固定,丙酮梯度脱水,切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色电镜观察拍片,两组观察结果如表 2:

[0069] 表 2:

[0070]

组别	光学显微镜下观察	电镜下观察
正常组	肾小球结构正常，肾小球毛细血管腔开放，系膜区的宽度小于血管直径，肾小管、间质无异常	肾小球系膜细胞和系膜基质无增生，肾小球上皮细胞、内皮细胞、基底结构均正常，上皮细胞足突结构清晰，呈杵样并列排列于基底膜外侧；内皮细胞窗孔排列整齐；基底膜结构均匀完成，近曲小管刷状缘排列整齐
模型对照组	多数肾小球系膜区明显增宽，其中有系膜细胞增生，系膜基质增多；部分肾小球毛细血管腔受压变窄或闭塞，甚至个别肾小球萎缩纤维化	肾小球系膜细胞明显增生，系膜基质增多；内皮细胞结构不规则，基底膜呈节段性不规则增厚，上皮细胞足突肿胀，排列紊乱，出现节段性轻中度融合及绒毛变，近曲小管腔面可见大量微绒毛，微毛根部附近可见大量空泡变形，线粒体部分嵴融合消失
治疗组	肾小球系膜区的宽度明显小于模型对照组，宽度大于或小于毛细血管腔直径，肾小球毛细血管呈开放状态	肾小球系膜细胞和系膜基质增生不明显，肾小球上皮细胞足凸有部分融合；内皮细胞窗孔排列基本整齐，基底膜正常，近曲小管腔面微绒毛基本正常，根部少许空泡变性，线粒体基本正常

[0071] 光镜和电镜结果均显示，模型对照组大鼠多数肾小球系膜区明显增宽，系膜细胞增多，毛细血管受压变窄或闭塞，甚至个别肾小球萎缩，而治疗组中病理改变明显减轻，提示吡啶-3-甲醇、二吡啶甲烷及其衍生物可以有效地抑制大鼠肾小球系膜细胞的增生和系膜基质增多，改善或修复肾组织的病理损害。