

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710101969.8

[51] Int. Cl.

*C07C 69/675 (2006.01)*

*C07C 59/01 (2006.01)*

*A61K 31/19 (2006.01)*

*A61K 31/215 (2006.01)*

*A61P 9/04 (2006.01)*

*A61P 25/28 (2006.01)*

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101293831A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 3/10 (2006.01)*

[22] 申请日 2007.4.27

[21] 申请号 200710101969.8

[71] 申请人 汕头大学

地址 广东省汕头市金平区大学路 243 号

[72] 发明人 陈国强 肖小强

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 黄可峻

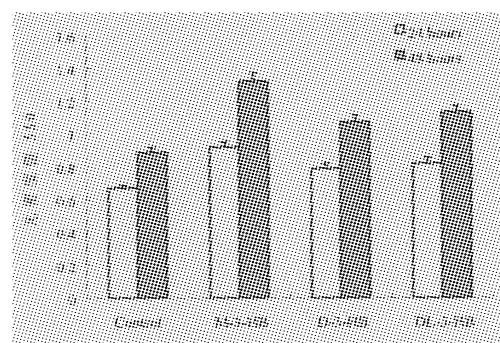
权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 4 页

[54] 发明名称

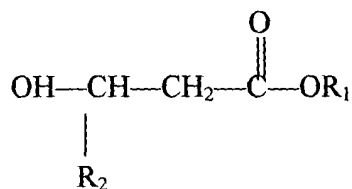
3-羟基脂肪酸及其衍生物在制备钙离子通道调节剂中的用途

[57] 摘要

本发明提供了 3-羟基脂肪酸及其衍生物在制备钙离子通道调节剂中的用途。体外试验结果表明,本发明的钙离子通道调节剂可以促进神经胶质细胞生长并活化细胞的钙离子通道,可以用于治疗与钙离子通道激活不足有关的疾病和体外培养细胞,特别是神经胶质细胞。



## 1. 式(I)化合物



(I)

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、对映异构体、或前体药物在制备钙离子通道调节剂中的用途，其中，

$\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_9$  的烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_9$  的环烷基、芳基和无毒金属离子构成的组；

$\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_9$  的烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_9$  的环烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_9$  的烷氧基和芳基构成的组。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中  $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_7$  的烷基和无毒金属离子构成的组。

3. 根据权利要求 2 的用途，其中  $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_5$  的烷基和无毒金属离子构成的组。

4. 根据权利要求 3 的用途，其中  $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_3$  的烷基和无毒金属离子构成的组。

5. 根据权利要求 4 的用途，其中所述无毒金属离子为  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ 。

6. 根据权利要求 1-5 之任一项的用途，其中  $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_7$  的烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_7$  的烷氧基和芳基构成的组。

7. 根据权利要求 6 的用途，其中  $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_5$  的烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_5$  的烷氧基构成的组。

8. 根据权利要求 7 的用途，其中  $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_3$  的烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$  的烷氧基构成的组。

9. 根据权利要求 1 的用途，其中  $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1\text{-C}_2$  的烷基、 $\text{Na}^+$

和  $K^+$  构成的组, 并且  $R_2$  选自由  $C_1-C_2$  的烷基构成的组。

10. 根据权利要求 1 的用途, 其中式(I)化合物选自由以下成员构成的组:

3-羟基丁酸甲酯;

3-羟基丁酸;

D-3-羟基丁酸;

DL-3-羟基丁酸。

11. 根据权利要求 1-10 之任一项的用途, 其中所述钙离子通道调节剂用于治疗受试者中与钙离子通道激活不足有关的疾病。

12. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述疾病选自由心脏起搏无力、二型糖尿病和神经退行性疾病构成的组。

13. 根据权利要求 1-10 之任一项的用途, 其中所述钙离子通道调节剂用于体外培养细胞。

14. 根据权利要求 13 的用途, 其中所述细胞为神经胶质细胞。

15. 根据权利要求 1-10 之任一项的用途, 其中所述钙离子通道调节剂用于处理动物。

### 3-羟基脂肪酸及其衍生物在制备钙离子通道调节剂中的用途

#### 技术领域

本发明涉及生物制药领域，更具体地说，涉及 3-羟基脂肪酸及其衍生物在制备钙离子通道调节剂中的用途。

#### 背景技术

##### 细胞内钙离子介绍

细胞内游离钙离子浓度的改变是动物细胞把信息从细胞外传到细胞内相关位点的主要方式。同时， $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化、位置、持续的时间均代表细胞内钙离子的信号传递过程。细胞内一定区域钙离子浓度的升高通常是由细胞外的信号分子(例如拮抗剂)结合到细胞膜的受体上从而引起信号传递的。细胞质内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高可由钙离子从细胞外通过细胞膜进入胞质，也可由  $\text{Ca}^{2+}$ 从内质网中释放到细胞质中。细胞外钙离子的跨膜进入，可通过电压操纵的  $\text{Ca}^{2+}$ 通道(voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, VOCCs)，配体门控的非特异性离子通道(ligand-gated non-specific cation channels, LGCCs)和受体激活的  $\text{Ca}^{2+}$ 通道(receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, RACCs)(Berridge. Biochem J, (1995) 312:1; Clapham. Calcium signaling. Cell, (1995) 80, 259)。由于 RACCs 分型多，每一种细胞又包含有许多种的 RACCs，且每一种 RACCs 的生理功能、电生理特性、结构和激活机制上又都各自不同，因此，目前对 RACCs 的了解还不是很透彻(Barritt. Biochem J, (1999) 337, 153)。池操纵的  $\text{Ca}^{2+}$ 通道 (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, SOCs)是至今研究最多、最热门、也最受重视的一个 RACCs 亚群。这种钙离子通道位于细胞膜上，在细胞的生理条件下， $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的降低可以导致肌醇三磷酸与肌醇三磷酸受体与  $\text{Ca}^{2+}$ 通道结合，从而启动细胞膜上钙离子通道的打开；而这些钙离子通道的打开以及内质网膜上肌醇三磷酸受体与肌醇三磷酸的结合，均与钙调蛋白的作用有一定的关系(Cao & Chatton. FEBS Letters, (1998) 424,33)。

目前能影响细胞钙离子内流的物质有:

1)西药:磺脲类降糖药物(杨文英和杨兆军 国外医学(内分泌学分册)6(2003));非磺酰脲类促胰岛素分泌剂(张石革和宋菲 中国医院用药评价与分析 1(2005));磷酸二酯酶抑制剂类(氨力农、米力农等);阿片类(刘志民 中国药物滥用防治杂志 4(2000)145-152)。

2)激素和多肽类: $\alpha$ -肾上腺素能神经递质;心肌肽素(小分子多肽),血管紧张素(周玲善等. 中国体外循环杂志, 3(2005) 143-145. 贾永平等 心血管病学进展. 20(1999) 146-147)等。

3)生长因子, 细胞内因子: N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-Aspartic acid)(NMDA);脑源性神经营养因子 BDNF(brain-derived neurotrophic factor)(Li 等. Nature 434 (2005) 894-898) ; IIP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3, 三磷酸肌醇)(杨永健等 第三军医大学学报 23(2001)1170-1172), 环磷酸腺苷 (cAMP) ; Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)(徐艳春 新药研究论坛专栏 9(2006))等。

4)中药:黄连素(中药提取物生物碱);山柰酚(陈文梅 金鸣等 药学报 36(2001)881-885);白芍总苷等(杨煜等 中草药 37(2006) 1066-1068)。

### 神经胶质细胞内钙信号

神经胶质细胞之间的通讯对于局部刺激可以通过增加细胞内的钙离子浓度来实现 (Araque 等. *Annu.Rev.Physiol* 63(2001)795-813)。神经胶质细胞尤其星形胶质细胞通过突触与神经元紧密连接,感知和影响神经元活性并对神经元的活动做出反应。通过观察神经递质受体(比如, GABA, 乙酰胆碱)引起的细胞内钙离子浓度的变化,以及一氧化氮介导的神经元-胶质信号通路,可以检测到星形胶质细胞对神经元活动的反应(Matyash 等. *Mol. Cell Neurosci.*18 (2001), 664-670)。细胞内钙离子增加也可以是细胞内钙库所释放的,如通过激活大脑海马中的神经元-胶质信号通路而引起胞内钙库释放钙离子,该通路是由 GABA 受体介导的(Kang 等. *Nat. Neurosci.* 1(1998) 683-692)。事实上,星形胶质细胞表达了各种受体用于调遣细胞内钙库的钙离子(Verkhratsky 等. *Physiol. Rev.* 78 (1998) 99-141),一些胞内第二信使则通过钙离子产生

不同的细胞内信号途径, 如 IP3(inositol 1,4,5-trisphosphate), cyclic ADPribose(cADPR)(Guse. *Curr. Mol. Med.* 4(2004) 239-248), sphingosine 1-phosphate (Spiegel & Milstien. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (2003) 397-407), sphingosylphosphorylcholine(Meyer 等. *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 178-189), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) (Lee & Aarhus. *Biol. Chem.* 270 (1995) 2152-2157; Cancela 等. *Arch. Eur. J. Physiol.* 446 (2003) 322-327)。

### 3-羟基丁酸及其衍生物介绍

3-羟基丁酸(3-hydroxybutyrate 或 3-HB), 是哺乳动物体内由肝脏内的长链脂肪酸代谢而产生的, 作为主要的酮体大量存在于血浆和外周组织中。人体血浆和组织内的 3-HB 水平正常情况下保持在 0.1 mM 左右(Robinson & Williamson. *Physiol Rev* 60 (1980) 143-187)。很长时间内 3-HB 被公认为体内重要的能量代谢和利用的中间产物之一(Mackey. *J Clin Endocrinol* 3(1943) 101-110)。后来 3-HB 就被发现与体内能量代谢紊乱、糖尿病等重大疾病密切相关(Manfred 等. *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 249-261; Barbara 等. *Pediatric Research* 52 (2002) 301-306)。因为 3-HB 具有很好的穿透性并且能快速扩散到外周组织, 已有文献报道使用外源的 3-HB(口服或者注射)来治疗一些疾病及损伤, 如出血性休克(Katayama 等. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18 (1994) 442-446; Hiraide 等. *Eur Surg Res* 23 (1991) 250-255), 心肌损伤(Zhitian Zou, et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002) H1968-H1974), 大面积烧伤(Mizobata, Y, Hiraide, A, Katayama, M, Sugimoto, H, Yoshioka, T, Sugimoto, T. *Surg Today* 26 (1996) 173-178)和脑供氧不足、缺氧症以及缺血症(Suzuki, M, Suzuki, M, Sato, K, et al. *Jpn J Pharmacol* 87 (2001) 143-150)。在这些情况下, 3-HB 改善了组织损伤、蛋白代谢以及代谢紊乱。另有报道说 3-HB 可以校正线粒体能量产生的缺陷, 并且估计 3-HB 不是通过减轻线粒体复合物 I 的抑制, 而是通过加强线粒体复合物 II(琥珀酸-泛醌氧化还原酶)对其底物的氧化磷酸化来实现的(Kim T. et al. *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 892-901)。这些证据都表明 3-HB 对于压力诱导的不同疾病的可能的治疗功效(Veech, RL, Chance, B, Kashiwaya, Y, Lardy, HA, Cahill, GF, Jr. *IUBMB Life* 51 (2001) 241-

247)。而且,已有实验表明 3-HB 可以减少人类阿尔兹默症和帕金森症模式的神经细胞系的细胞死亡(Kashiwaya, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 5440-5444)。体内血浆中 3-HB 水平的提高可以改善患有记忆紊乱相关疾病(如阿尔兹默症和帕金森症)老年人的认知功能(Mark 等. *Neurobiology of Aging* 25 (2004) 311-314)。另外, 3-HB 还被发现可以通过抑制细胞凋亡来改善角膜上皮的损伤(Shigeru 等. *IOVS* 44 (2003) 4682-4688)。近期的一篇专利(专利号 WO2004/108740)描述了 3-HB 除了具有营养功能之外,还具有治疗许多疾病的作用。该专利将 3-HB 的作用概括如下:

- 1、可以治疗许多得益于酮体水平提高的疾病(如包括癫痫和肌阵挛的神经紊乱疾病以及包括阿尔兹默症和痴呆等的神经退化性疾病);
- 2、通过氧化辅酶 Q 来减少自由基伤害(如缺血症);
- 3、加强代谢效率(提高训练效率以及运动成绩,治疗供养不足、心绞痛、心肌梗塞等);
- 4、治疗脑癌(如星细胞瘤)等相关疾病;
- 5、对于糖代谢紊乱(如 I 型糖尿病、II 型糖尿病、低血糖低酮体症等)具有很好的疗效。

研究结果显示 3-HB 对成纤维细胞、成骨细胞等哺乳动物细胞均具有促进细胞增殖的作用,推测单体 3-HB 可能对多种细胞具有广谱的促生长的作用(陈国强等,中国专利申请号 200410006163.7)。同时研究结果也显示 3-HB 能够诱导细胞外的钙离子内流,引起细胞内钙离子浓度的升高,而钙离子作为胞内的第二信使与细胞的增殖、分化、凋亡、迁移等多种细胞生理功能密切相关(Cheng 等. *Biomacromolecules* 6 (2005) 593-597)。

近期的关于 3-HB 对细胞作用的研究中发现, 3-HB 不仅能够促进成骨细胞的增殖,而且对成骨细胞的分化(如碱性磷酸酶活性、钙化结节的形成等等成骨细胞的分化指标)均有一定的刺激作用。同时 3-HB 还能对血清饥饿培养诱导的成骨细胞的程序性死亡有一定的抑制作用。这些证据充分表明了 3-HB 具有促进骨形成的作用,并且提示我们 3-HB 可能具有骨修复和治疗骨质疏松的潜在应用价值(陈国强等,中国专利申请号 200510088781.5)。

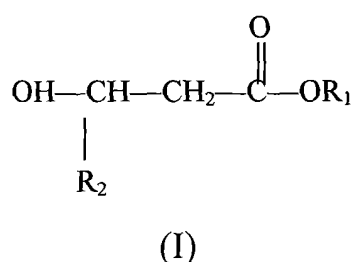
许多疾病的发生和发展与钙离子通道激活不足有关,例如心脏起搏

无力、二型糖尿病、神经退行性疾病等。因此，需要一种可以调节钙离子通道活性的试剂来帮助治疗这类疾病。

### 发明内容

本发明部分地基于如下发现：3-羟基脂肪酸，特别是3-羟基丁酸，及其衍生物能够促进神经胶质细胞的生长，并且能够活化细胞的钙离子通道，引起神经胶质细胞内钙离子浓度的变化。

因此，本发明一方面提供了式(I)化合物



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、对映异构体、或前体药物在制备钙离子通道调节剂中的用途，其中，

$\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_9$  的烷基或环烷基、芳基和无毒金属离子构成的组；

$\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_9$  的烷基或环烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_9$  的烷氧基和芳基构成的组。

不受任何特定理论的约束，认为当本发明化合物为两亲性分子时，对于跨越血脑屏障有利。当本发明化合物为盐或酸时，跨越血脑屏障的效果可能略差，但仍然有良好的效果。

因此，本发明化合物中的取代基  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  所包含的碳原子数一般不超过 9 个。在本发明的一个优选实施方案中， $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_7$  的烷基和无毒金属离子构成的组；更优选地， $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_5$  的烷基和无毒金属离子构成的组；更进一步优选地， $\text{R}_1$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  的烷基和无毒金属离子构成的组。

在本发明的另一个优选实施方案中， $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_7$  的烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_7$  的烷氧基和芳基构成的组；更优选地， $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_5$  的烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_5$  的烷氧基构成的组；更进一步优选地， $\text{R}_2$  选自由 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$



的烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>的烷氧基构成的组。

本发明化合物中，优选的无毒金属离子为 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>。

特别优选的具体的本发明化合物为：3-羟基丁酸甲酯、3-羟基丁酸、D-3-羟基丁酸和 DL-3-羟基丁酸。

根据本发明的一个优选实施方式，所述钙离子通道调节剂作为药物用于治疗各种与钙离子通道激活不足有关的疾病，例如用于治疗心脏起搏无力、二型糖尿病、神经退行性疾病等。

根据本发明的另一个优选实施方式，所述钙离子通道调节剂用于体外培养细胞，特别是神经胶质细胞。

根据本发明的再一个优选实施方式，所述钙离子通道调节剂用于处理动物，例如用于动物试验。

本发明另一方面提供了一种用于调节受试者的钙离子通道的方法，包括对所述受试者施用有效量的上述化合物。优选地，所述调节可以帮助治疗受试者的疾病。

本发明再一方面提供了一种用于调节受试者的钙离子通道的药物组合物，其包含作为活性成分的上述化合物以及药学上可接受的载体。

发明人在体外跟踪 3-羟基丁酸（包括 D-型和 DL-型）和 3-羟基丁酸甲酯对培养的神经胶质细胞内钙离子浓度的影响时，发现其具有促进神经胶质细胞增殖的作用，并且能够刺激细胞内钙离子浓度的升高。同时观察到上述物质在活化神经胶质细胞钙离子通道方面的作用可以被 L-型钙离子通道抑制剂 Nitrendipine（尼群地平）所部分抑制。

#### 附图说明

图 1 显示了神经胶质细胞的免疫鉴定，其中 A 为神经胶质细胞（Cy3 荧光染色），B 为神经胶质细胞核（DAPI 染色）。

图 2 显示了 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯对神经胶质细胞活性的影响。其中 D-3-HB 为 D-3-羟基丁酸，DL-3-HB 为 DL-3-羟基丁酸，M-3-HB 为 3-羟基丁酸甲酯。Control 为对照。Hours 表示小时。

图 3 显示了 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯对神经胶质细胞钙离子的影响。其中 D-3-HB 为 D-3-羟基丁酸、DL-3-HB 为

DL-3-羟基丁酸、M-3-HB 为 3-羟基丁酸甲酯。Control 为对照。其中 \*\*代表与对照相比存在显著差异。

图 4A 和图 4B 显示了 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯对神经胶质细胞内外钙离子通道的影响。图 4A 为对细胞膜上钙离子通道的活化，图 4B 为对细胞内通道的活化。其中 D-3-HB 为 D-3-羟基丁酸，DL-3-HB 为 DL-3-羟基丁酸，M-3-HB 为 3-羟基丁酸甲酯。Control 为对照。Second 表示秒。

图 5 显示了 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯对神经胶质细胞钙离子通道的活化可被阻断剂 Nitredipine 所抑制。其中 D-3-HB 为 D-3-羟基丁酸，DL-3-HB 为 DL-3-羟基丁酸，M-3-HB 为 3-羟基丁酸甲酯。Control 为对照。N 代表 Nitredipine。3-HB 表示 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸或者 3-羟基丁酸甲酯。\*\*代表显著差异，# 代表较大差异。注：加入 Nitredipine 的实验组与对照组（未加入 Nitredipine）比较 #  $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ 。

### 具体实施方式

本文所用的术语“钙离子通道调节剂”是指可以调节钙离子通道活性的试剂，例如活化、抑制或者阻断钙离子通道，或者使钙离子通道打开或关闭等。例如 nitredipine 就是一种钙离子通道调节剂。

本发明的钙离子通道调节剂可以用于体外培养细胞，例如神经胶质细胞(包括各种神经胶质细胞系以及各种来源的原代神经胶质细胞)、心肌细胞、胰腺细胞等。

本文所用的术语“3-羟基脂肪酸及其衍生物”具有式(I)的结构通式，包括 3-羟基脂肪酸及其酯、盐等。除非另有陈述或明显与上下文不符，本文所用的术语“3-羟基脂肪酸及其衍生物”通常可以与术语“式(I)化合物”或“本发明化合物”互换使用。

除非另有陈述或明显与上下文不符，本文所用的术语“3-羟基丁酸及其衍生物”具有式(I)的结构通式并且  $R_2$  为甲基，包括：3-羟基丁酸及其酯、盐、对映异构体等。在本发明的某些具体实施方式中，“3-羟基丁酸及其衍生物”可以具体指 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯。

本发明化合物可以通过各类聚羟基脂肪酸酯的水解和醇解等多种

方法得到 (Chen and Wu, 2005), 经过蒸馏纯化, 通过FTIR和GC-MS分析确认纯度极高, 没有双键等危害细胞生长的副产物。

本文中使用的术语“受试者”, 指任意哺乳动物, 例如, 小鼠、大鼠、兔子、狗、牛, 以及灵长类动物, 如猴和人。“受试者”可以指患病的哺乳动物, 例如患有糖尿病的哺乳动物, 特别是人; 也可以指未患病的健康的哺乳动物。

除非另有陈述, 本文中使用的术语“药学上可接受的盐”包括化合物的无毒的酸和碱加成盐。可接受的无毒的酸加成盐包括那些衍生自本领域已知的有机和无机酸或碱的盐。酸包括: 例如, 盐酸、磷酸、硫酸、乙酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸等。本质上是酸性的化合物能够与各种药学上可接受的碱形成盐。可用于制备药学上可接受的碱加成盐的碱, 是那些形成无毒的碱加成盐的碱, 即, 所述的盐含有药理学可接受的阳离子, 例如但不限于, 碱金属或碱土金属盐, 尤其是钙、镁、钠或钾盐。合适的有机碱包括, 但不限于, N,N-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、赖氨酸和普鲁卡因。

除非另有陈述, 本文中使用的术语“水合物”是指本发明化合物进一步通过非共价的分子间作用力与一定量的水相结合。

除非另有陈述, 本文中使用的术语“前体药物”是指: 可以在生物学条件(体外或体内)下通过水解、氧化或其他反应提供本发明的化合物的衍生物。前体药物的例子包括, 但不限于, 本发明化合物的衍生物, 该衍生物包括生物可水解的部分, 例如生物可水解的酰胺、生物可水解的酯或生物可水解的氨基甲酸酯部分。前体药物的其它的例子包括: 包含-NO、-NO<sub>2</sub>、-ONO 或-ONO<sub>2</sub> 部分的本发明的式(I)化合物的衍生物。前体药物典型地可以使用熟知的方法制备, 例如在 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 172-178, 949-982(Manfred E. Wolff 主编, 第五版, 1995)和 *Design of Prodrugs* (H. Bundgaard 主编, Elsevier, New York 1985)中所描述的。

除非另有陈述, 本文中使用的术语“生物可水解的酰胺”、“生物可水解的酯”、“生物可水解的氨基甲酸酯”分别指化合物的酰胺、酯或氨基甲酸酯可以: 1)不妨碍化合物的生物活性, 但可以给予化合物有益的体内性质, 例如摄取、作用时间或作用开始; 或 2)是生物学非

活性的，但可以体内转化为生物学活性化合物。生物可水解的酯的例子包括，但不局限于，低级烷基酯，低级酰氧基烷基酯(例如乙酰氧基甲基、乙酰氧基乙基、氨基羰基氧基甲基、戊酰氧基甲基和戊酰氧基乙酯)，胆碱酯，和酰胺基烷基酯(例如乙酰胺基甲基酯)。生物可水解的酰胺的例子包括，但不局限于，低级烷基酰胺， $\alpha$ -氨基酸酰胺，烷氧基酰胺，和烷基氨基烷基羰基酰胺。生物可水解的氨基甲酸酯的例子包括，但不局限于，低级烷基胺，取代的乙二胺，氨基酸，羟基烷基胺，和聚醚胺。

本发明化合物的“对映异构体”包括外消旋的、对映异构富集的或对映异构纯的化合物。本文中所使用的术语“对映异构纯的”，除非另有陈述，是指包括化合物的一种对映异构体，且基本上不含该化合物的其它对映异构体。典型的对映异构纯的化合物包括按重量大于约 95% 的该化合物的一种对映异构体，例如 D-型或 L-型对映异构体。本文中所使用的术语“对映异构富集的”，除非另有陈述，是指包括按重量大于约 50%，优选大于约 70%，更优选大于约 80% 的该化合物的一种对映异构体。本文中所使用的术语“外消旋的”或“外消旋体”，除非另有陈述，是指由等量的左旋体和右旋体组成的没有旋光性的混合物。例如，3-羟基丁酸的外消旋体可以表示为 DL-3-羟基丁酸。

式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、对映异构体、或前体药物(活性成分)可以以其自身形式被使用，但是通常将以药物组合物的形式给药，在所说的组合物中，将活性成分与可药用的载体相结合。根据给药方式，所说的药物组合物将优选地包含 0.05 至 99 wt % (重量百分比)，更优选 0.05 至 80 wt %，更优选 0.10 至 70 wt %，并且更优选 0.10 至 50 wt % 的活性成分，所有的重量百分比都是以总组合物的重量为基础的。

本文所用的术语“烷基”是指带有给定数量的碳原子的支链和直链的饱和脂族烃基。例如，“C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> 的烷基”定义为直链或支链的带有 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳的基团。例如，“C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> 的烷基”特别包括甲基、乙基、正-丙基、异-丙基、正-丁基、叔-丁基、异-丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基等。

本文所用的术语“环烷基”指的是带有给定数量碳原子的单环饱和脂族烃基。例如，“C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub> 的环烷基”包括环丙基、甲基-环丙基、2,2-二

甲基-环丁基、2-乙基-环戊基、环己基等。

本文所用的术语“烷氧基”表示通过氧桥连接的指明碳原子数的烷基或环烷基。“烷氧基”由此包括上述烷基和环烷基的定义。

本文所用的术语“芳基”是指包含 5 到 10 个环原子的碳环芳基。代表性的例子包括但不限于苯基、甲苯基、蒽基、茚基、茚基、吡啶基和萘基、以及包括 5, 6, 7, 8-四氢化萘的苯并稠合碳环部分。碳环芳基可为未被取代的或被取代的。在一个实施方案中，碳环芳基为苯基。

本文所用的术语“无毒金属离子”指对于受试者没有明显毒性的金属离子，例如但不限于  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等。

本文所用的术语“有效量”指的是足以在动物或人体内引起兽医或临床医师所寻找的生物或医学反应的活性化合物的量。本发明化合物的“有效量”可由本领域技术人员根据给药途径、受试者的体重、年龄、病情等因素而确定。

本发明还提供了制备本发明药物组合物的方法，其包括将上文所定义的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、对映异构体、或前体药物与可药用的载体进行混合。

该药物组合物可以以例如乳膏、溶液、混悬液、气雾剂和干粉制剂的形式局部给药(例如给药于皮肤或肺和/或气道);或者例如可以通过以片剂、胶囊、糖浆剂、粉末或颗粒的形式口服而全身给药;或者可以以溶液或混悬液的形式胃肠外给药;或者可以皮下给药。

本发明的组合物可以用现有技术中众所周知的常规载体通过常规方法获得。因此，用于口服应用的组合物可包含例如一种或多种着色剂、甜味剂、矫味剂和/或防腐剂。

用于片剂的适宜的可药用载体包括：例如，惰性稀释剂如乳糖、碳酸钠、磷酸钙或碳酸钙；制粒剂和崩解剂如玉米淀粉或藻酸；粘合剂如淀粉；润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉；防腐剂如对-羟基苯甲酸乙酯或丙酯；和抗氧化剂，如抗坏血酸。片剂可不包衣或包衣以改变其崩解和随后活性成分在胃肠道内的吸收，或者改善其稳定性和/或外观，在任何一种情况中，都使用常规包衣剂和现有技术中众所周知的方法。

用于口服应用的组合物可以为硬明胶胶囊或软明胶胶囊形式。在

硬明胶胶囊中，将活性成分与惰性固体稀释剂，例如，碳酸钙、磷酸钙或高岭土进行混合；在软明胶胶囊中，将活性成分与水或油如花生油、液体石蜡、或橄榄油进行混合。

水性混悬液通常包含细粉形式的活性成分和一种或多种混悬剂，如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶；分散剂或润湿剂如卵磷脂或氧化烯与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧化乙烯硬脂酸酯)。所说的水性混悬液还可包含一种或多种防腐剂(如对-羟基苯甲酸乙酯或丙酯)、抗氧化剂(如抗坏血酸)、着色剂、矫味剂、和/或甜味剂(如蔗糖、糖精或阿司帕坦)。

油性混悬液可以通过将活性成分混悬于植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(如液体石蜡)中进行制备。该油性混悬液还可包含增稠剂如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂如上述这些物质、以及矫味剂来提供一种适口的口服制剂。可以通过加入抗氧化剂如抗坏血酸来对这些组合物进行防腐处理。

适用于通过加入水来制备水性混悬液的可分散的粉末和颗粒通常包含活性成分和分散剂或润湿剂、混悬剂和一种或多种防腐剂。用上述的这些物质对适宜的分散剂或润湿剂和混悬剂如上文所述。还可以存在另外的赋形剂如甜味剂、矫味剂和着色剂。

本发明的药物组合物还可以为水包油乳剂的形式。其油相可以是植物油如橄榄油或花生油，或矿物油例如液体石蜡，或这些物质中任何物质的混合物。适宜的乳化剂可以是例如天然存在的树胶如阿拉伯胶或黄蓍胶、天然存在的磷脂如大豆磷脂、卵磷脂、得自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯(例如脱水山梨聚糖单油酸酯)和所说偏酯与氧化乙烯的缩合产物如聚氧化乙烯脱水山梨聚糖单油酸酯。该乳剂还可包含甜味剂、矫味剂和防腐剂。

糖浆剂和酏剂可以用甜味剂如甘油、丙二醇、山梨醇、阿司帕坦或蔗糖来进行制备，并且还可以包含缓和剂、防腐剂、矫味剂和/或着色剂。

该药物组合物还可以为可注射的无菌水性或油性混悬液形式，且可以根据已知的方法用一种或多种上面已经提及的适宜的分散剂或润湿剂和混悬剂来进行制备。可注射的无菌制剂还可以是位于胃肠外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的可注射的无菌溶液或混悬液，例如位于

1,3-丁二醇中的溶液。

局部制剂，如乳膏、软膏、凝胶和水性或油性溶液或混悬液通常可以通过用本领域众所周知的常规方法，用常规的可局部施用的赋形剂或稀释剂对活性成分进行配制来进行制备。

通过吹入法给药的组合物可以为包含平均直径为例如 30  $\mu\text{m}$  或更低的颗粒的分割得很细的粉末形式，该粉末本身仅包含活性成分或者还具有一种或多种生理学可接受的载体如乳糖。然后，用于吹入法的粉末可方便地被保持在包含例如 1 至 50 mg 活性成分的胶囊中，用涡轮吸入器(turbo-inhaler)装置来使用该胶囊。

用于通过吸入给药的组合物可以为常规的加压气雾剂形式，所说的气雾剂被安排用来将活性成分以包含分割得很细的固体或液体小滴的气雾剂的形式进行分配。可以使用常规气雾剂推进剂如挥发性氟化烃或烃类并且可以方便地安排用该气雾剂装置来分配所计量数量的活性成分。

应当意识到给药剂量将随着所用的化合物、给药方式、所需的治疗和病情而变化。有待治疗的哺乳动物接受的典型的日剂量范围可以为每 kg 体重 0.01 mg 至 100 mg 活性成分。如果需要的话，该日剂量可以以分割剂量的形式给药。根据本领域众所周知的原则，所给予的活性成分的精确数量和给药途径取决于被治疗受试者的体重、年龄、性别以及被治疗的特定状况。

为了更加详细地解释本发明，下面将结合附图给出本发明的实施例。这些实施例仅仅是出于解释和说明的目的，不应该被理解为是对本发明范围的限制。

### 实施例 1、3-羟基丁酸及其衍生物的获得

通过基因工程微生物发酵方法获得 3-羟基丁酸的聚合物聚 3-羟基丁酸酯(PHB)。聚合物水解、酶解或醇解获得 3-羟基丁酸及其衍生物。3-羟基丁酸也可通过购买或化学合成的方法获得。所述 3-羟基丁酸及其衍生物可以是单一立体结构的化合物，如 D 型，或 L 型，甚至可以是 D 和 L 型的混合物，也可为外消旋结构的化合物(席建忠.微生物方法合成手性羟基脂肪酸.清华大学硕士学位论文 (2000);Gao HJ, Wu Q,

Chen GQ. *FEMS Microbiol Lett* 213 (2002) 59-65; Zhao K, Tian G, Zheng Z, Chen JC, Chen GQ. *FEMS Microbiol Lett* 218 (2003) 59-64; Zheng Z, Zhang MJ, Zhang G and Chen GQ. *Antonie van Leeuwenhoek* 2 (2004) 93-101). 3-羟基丁酸的纯度可通过液相色谱检测。

### 实施例 2、鼠脑神经胶质细胞原代培养及免疫鉴定

取新生 1 天的 BALB/c 小鼠,使用乙醚麻醉并在无菌条件下斩首处死。取完整鼠脑部并在冷冻条件下保存于无菌 D-Hanks 液中(含 50 U/mL 青霉素+50 mg/L 链霉素)。在解剖镜下用无菌剪刀仔细剥除脑膜和血管等纤维成分,将脑组织转移至无菌塑料培养皿中,加入 6 ml 经 37℃预热的含有 20% 胎牛血清 (FBS)的 DMEM 培养液。用无菌手术刀将脑组织切碎为 15 mm<sup>3</sup> 左右的小块并通过 0.05 mm 孔径的滤膜过滤。过滤得到的细胞在 1200 rpm 下离心 10 分钟。弃上清后加入含有 20% FBS 的 DMEM 培养液重悬。重复上述离心步骤,将最终收集到的细胞悬浮于含有 20% FBS 的 DMEM 培养液中,细胞计数并调整好细胞浓度,接种入培养瓶中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养;待细胞生长汇合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代处理。取上述细胞,接种于含有 20% FBS 的 DMEM 培养液 24 孔的细胞培养板,37℃,5% CO<sub>2</sub> 细胞贴壁培养 24 小时后更换培养液,继续培养 48 小时。吸除培养液后,用 0.1 M PBS(磷酸缓冲液 pH 7.2)清洗培养板 2 遍,4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 分钟。移除固定液,用 0.1 M PBS 溶液清洗培养板 2 遍。

通过检测细胞是否含有胶质纤维酸性蛋白(GFAP)进行神经胶质细胞的免疫细胞化学鉴定。一级抗体为兔抗小鼠 GFAP,以 1:100 比例稀释于含有 0.3% Triton X-100 和 5% 羊血清的 PBS 溶液中。二级抗体为羊抗兔 Cy3-IgG,以 1:30 比例稀释于含有 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液中。一级抗体在 4℃ 条件下过夜反应,反应后用 0.1 M PBS 清洗;二级抗体在室温下反应 2 小时,反应后用 0.1 M PBS 清洗。使用 DAPI 复染细胞核,室温下染色 30 分钟;PBS 清洗三次。荧光倒置显微镜下(NIKON Elipse TE2000)观察免疫细胞化学检测结果。随机选取的荧光显微照片结果显示,一级抗体与 GFAP 结合,带有 Cy3 荧光发光基团的二级抗体与一级抗体结合,荧光倒置显微镜下可观测到红色荧光(Cy3 发出荧光),细胞核被 DAPI 染色,发出黄色荧光(图 1)。免疫细胞



化学结果证明, 分离的细胞为鼠脑神经胶质细胞。

### 实施例 3、利用 MTT 法检测 3-羟基丁酸及其衍生物 对神经胶质细胞活性的影响

**MTT** [ 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ] 法测定神经胶质细胞存活和增殖具有简便、迅速、准确等优点。MTT 是一种淡黄色唑氮盐, 是线粒体脱氢酶的作用底物, 与活细胞作用后还原为不溶于水的蓝紫色 formazan 结晶, 溶解后在 550 ~ 610nm 有一个较宽的最大吸收峰, 用分光光度仪可测定其含量。

**细胞:** 实施例 2 中分离得到的神经胶质细胞。

**无血清 (FBS) 培养基:** DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(GIBCO), 216 mg/L L-谷氨酰胺, 36 mg/L L-天冬酰胺, 4.766 g/L Hepes(二羟乙基哌嗪乙烷磺酸), 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 100 mg/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素。

**消化液:** DMEM(GIBCO), 216 mg/L L-谷氨酰胺, 36 mg/L L-天冬酰胺, 4.766 g/L Hepes, 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 100 mg/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 0.2 % 胰蛋白酶, 0.02 % EDTA。

**冲洗液:** PBS 缓冲液( 8.0 g/L 氯化钠、0.20 g/L 氯化钾、1.44 g/L 磷酸氢二钠、0.24 g/L 磷酸二氢钾), 100 mg/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, pH 7.2。

**MTT 染液:** 5 mg/ml (5 mg MTT 溶于 1 ml PBS)。

**裂解液:** DMSO(二甲基亚砷),胎牛血清(FBS)。

**细胞培养:** 神经胶质细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接入到 96 孔板细胞培养板上(培养基为:无血清(FBS)培养基 +20%FBS)培养 24 小时(37℃, 5 % CO<sub>2</sub> 恒温培养箱)。吸出上清加入新鲜培养基(无血清(FBS)培养基 +5%FBS), 再加入 DL-3-羟基丁酸(DL-3-HB)、D-3-羟基丁酸(D-3-HB)、3-羟基丁酸甲酯(M-3-HB), 其终浓度均分别为: 10mM。继续培养 24 和 48 小时。

**用 MTT 法测定细胞的数量:**

a)染色: 细胞在 96 孔板中培养 24 和 48 小时后, 吸去培养液, 加入无菌的 PBS (PH =7.4)荡洗 3 次。再加入 0.05 ml MTT 染液(5 mg/ml)

和 0.45 ml 不含血清的无血清(FBS)培养基,置于培养箱中保存 4 小时。

b)吸去上清,加入 0.5 ml DMSO,室温下放置 30 分钟,使颜色颗粒充分溶解。

c)取 0.2 ml 待测液加入到 96 孔酶标板中,酶标仪 550 nm 下测定吸光度值。

结果如图 2 所示。结果表明,加有 3-羟基丁酸及其衍生物的试验对象的 OD 值与没有加以上单体的阴性对照 OD 值相比有所增大,因为 OD 值反映了细胞的数量多少,OD 值越大也即细胞数量越多。所以可以推出,在添加了 3-羟基丁酸及其衍生物后,神经胶质细胞的活性均有一定的提高的作用,其中 3-羟基丁酸甲酯的作用效果最佳。

#### 实施例 4、3-羟基丁酸及其衍生物对神经胶质细胞钙离子的诱导作用

生长状况良好的细胞(实施例 2 中制备)经过胰酶消化液处理 1 分钟,吸除消化液,加入新鲜培养液制成单细胞悬液;血球计数板检测细胞数量;将经过多聚赖氨酸(poly-L-lysine)包被的 0.13-0.17 mm 盖玻片置于 6 孔板中,向培养板中加入  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液和 DMEM+20%FBS 培养液,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  细胞贴壁培养 24 小时。移除培养液后,加入 2 mM 钙离子特异性染料 Fluo-4/AM,  $37^\circ\text{C}$  条件下染色 20 分钟;普通生理溶液(NPM, pH=7.4)(145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glucose, 以及 10 mM Hepes, pH 7.4)清洗;用 NPM 制备 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯溶液;在用 NPM 灌流一段时间后,三种溶液分别以 2 ml/min 的速度扩散通过细胞,并通过控制溶液流速控制溶液浓度(10 mM D-3-羟基丁酸、10 mM DL-3-羟基丁酸和 10 mM 3-羟基丁酸甲酯)。使用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510)记录荧光强度变化,由于荧光强度越强钙离子浓度越大,所以可以实时记录胞内钙成像结果。阴性对照的细胞样品制备跟试验组一样,在用共聚焦检测胞内钙离子浓度变化时,直接用细胞外液(NPM)连续灌流。

钙成像检测结果显示(图 3), D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯均能引起细胞胞内荧光强度突然增高,而荧光强度增高与胞内钙离子数量成正相关。故因此可以看出钙离子浓度的突然升

高,与阴性对照组相比具有统计学显著性差异( $P<0.05$ ), DL-3-羟基丁酸处理组提高 120 单位, D-3-羟基丁酸处理组提高 60 单位, 3-羟基丁酸甲酯处理组提高 200 单位。

结果如图 3 所示, 3-羟基丁酸及其衍生物对神经胶质细胞钙离子通道的活化均有诱导作用, 其中 3-羟基丁酸甲酯的作用更为明显。

#### 实施例 5、3-羟基丁酸及其衍生物可以活化细胞膜和胞内钙离子通道

为研究 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯引起胞内钙离子浓度升高的机理, 胞内增加的钙离子是否来源于胞外的 NPM 溶液, 或源于胞内钙库的释放, 实验中使用含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 以及无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 制备 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯溶液; 在用 NPM 灌流一段时间后, 三种溶液分别以 2 ml/min 的速度扩散通过细胞, 并通过控制溶液和细胞灌流液的流速控制溶液浓度(10 mM 或者 5 mM D-3-羟基丁酸、10 mM 或者 5 mM DL-3-羟基丁酸和 10 mM 或者 5 mM 3-羟基丁酸甲酯)。使用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510)记录钙成像结果。阴性对照的细胞样品制备跟试验组一样, 在用共聚焦检测胞内钙离子浓度变化时, 直接用含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 以及无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的细胞外液(NPM)连续灌流。

结果显示(图 4A), 在使用含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 时, 5 mM、10 mM D-3-羟基丁酸, 5 mM、10 mM DL-3-羟基丁酸和 5 mM、10 mM 3-羟基丁酸甲酯均能引起胞内钙离子浓度突然升高: 与阴性对照相比, 5 mM D-3-羟基丁酸, 69.7 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 111 单位, 5 mM DL-3-羟基丁酸, 59.2 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 142.5 单位, 10 mM D-3-羟基丁酸, 57.4 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 96 单位, 10 mM DL-3-羟基丁酸, 61.5 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 153.4 单位。5 mM 3-羟基丁酸甲酯 157.9 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 214.2 单位; 10 mM 3-羟基丁酸甲酯 173.2 秒时, 钙离子浓度最大增加量为 257.1 单位。可以得出, DL-3-羟基丁酸的作用强于 D-3-羟基丁酸, 且具有统计学差异( $P<0.05$ ), 而同一物质的不同浓度, 其作用效果无明显差异( $P<0.05$ )。

在使用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 时, 5 mM、10 mM D-3-羟基丁酸,

5 mM、10 mM DL-3-羟基丁酸和 5 mM、10 mM 3-羟基丁酸甲酯同样均能引起胞内钙离子浓度突然升高,如图 4B 所示:与阴性对照相比,5 mM D-3-羟基丁酸,53.3 秒时,钙离子浓度最大增加量为 63.4 单位,5 mM DL-3-羟基丁酸,75 秒时,钙离子浓度最大增加量为 36.5 单位,10 mM D-3-羟基丁酸,73.8 秒时,钙离子浓度最大增加量为 91 单位,10 mM DL-3-羟基丁酸,75.9 秒时,钙离子浓度最大增加量为 54.1 单位,5 mM 3-羟基丁酸甲酯在 71.8 秒时,钙离子浓度最大增加量为 119.9 单位;10 mM 3-羟基丁酸甲酯在 186.7 秒时,钙离子浓度最大增加量为 134.3 单位。以上结果表明在使用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 时,3-羟基丁酸及其衍生物引起胞内钙离子浓度升高的作用均有所下降(图 4B)。

由于钙离子都得通过一定的通道即钙离子通道进出细胞膜,并需要激活相应的膜钙离子通道使之变成可以运输钙离子的状态,所以当胞内钙离子浓度变化时,意味着膜上某种通道被激活,从而使得胞外钙库和胞内钙库中的钙离子释放出来变成自由钙离子与钙离子指示剂 Fluo-4/AM 结合发出荧光。由此可以看出细胞膜上和胞内膜系统的某些钙离子通道都可以被 3-羟基丁酸及其衍生物(3-羟基丁酸甲酯)所活化,从而引起神经胶质细胞内钙离子浓度的变化,这种变化呈升高趋势,并且 3-羟基丁酸甲酯对胞内钙离子浓度的改变更为明显。另外从图 4A 和图 4B 可以看出,以上 3 种单体作用于细胞时,是有一定的剂量依赖性的。

#### 实施例 6、Nitredipine 抑制钙离子通道的活化

为进一步研究 3-HB 单体引起胞内钙离子浓度升高的机理,选用钙离子通道阻断试剂 Nitredipine 抑制钙离子通道。细胞样本的准备同实施例 2,用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 制备 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯溶液和 10  $\mu\text{M}$  nitredipine;在用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 灌流一段时间后,三种溶液分别以 2 ml/min 的速度扩散通过细胞,并通过控制溶液流速控制溶液浓度(3 mM D-3-羟基丁酸、3mM DL-3-羟基丁酸和 3 mM 3-羟基丁酸甲酯),接着迅速加入 10  $\mu\text{M}$  Nitredipine,使用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510)记录钙成像结果。阴性对照的细胞样品制备跟试验组一样,在用共聚焦检测胞内钙离子浓度变化

时,用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 NPM 制备的 D-3-羟基丁酸、DL-3-羟基丁酸和 3-羟基丁酸甲酯溶液连续灌流而不加入阻断剂 Nitredipine。结果显示(图 5),加入 10  $\mu\text{M}$  Nitredipine 后,3-羟基丁酸及其衍生物引起的胞内钙离子浓度升高均呈明显减弱趋势。3 mM 3-羟基丁酸甲酯引起的钙离子浓度升高最大值由 160 单位下降为 120 单位;3 mM D-3-羟基丁酸引起的钙离子浓度升高最大值由 70 单位下降为 42 单位;3 mM DL-3-羟基丁酸引起的钙离子浓度升高最大值由 90 单位下降为 45.2 单位。

通过上述实验结果的分析我们可以推论出:3-羟基丁酸及其衍生物引起神经胶质细胞内钙离子浓度升高的原因,可能是它们活化了细胞膜上 L-型电压门控型钙离子通道。Nitredipine 是一种 L-钙离子通道阻断试剂,当加入 Nitredipine 后,引起神经胶质细胞内荧光强度减弱,也即钙离子浓度变小。虽然以上三种单体均能引起胞外钙离子的内流,但是 3-羟基丁酸及其衍生物对钙离子通道的活化可以被钙离子通道阻断试剂 nitredipine 部分阻断(图 5)。

## 参考文献

张石革, 宋菲 非磺脲类降糖药的研究现状与临床评价 *中国医院用药评价与分析* 1(2005)

杨文英, 杨兆军 磺脲类药物的非胰岛素依赖性降糖作用 *国外医学(内分泌学分册)* 6(2003)

刘志民 阿片类物质对免疫系统的影响 *中国药物滥用防治杂志* 4(2000) 145-152

周玲善等 心肌肽素在体外循环中对心肌保护的临床研究 *中国体外循环杂志* 3 (2005)143-145

贾永平等。血管紧张素 II 受体基因表达及其调控与心血管疾病。*心血管病学进展*, 20(1999)146-148

杨永健等 三磷酸肌醇刺激心肌成纤维细胞的增殖 *第三军医大学学报* 23 (2001)1170-117

陈文梅 金鸣 等红花黄酮成分抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用 *药学学报* 36 (2001)881-885

杨煜等 白芍总苷抗血栓形成作用 *中草药* 37(2006) 1066-1068

Katayama M, Hiraide A, Sugimoto H, Yoshioka T, and Sugimoto T. Effect of ketone bodies on hyperglycemia and lactic acidemia in hemorrhagic stress *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 18 (1994), 442-446

Hirade A, Katayama M, Sugimoto H, et al. Effect of sodium D-3-hydroxybutyrate on amino acidemia in hemorrhagic hypotension. *Eur Surg Res.* 23 (1991)250-255

Zhitian Z, Sasaguri S, Rajesh K G; Suzuki R. dl-3-Hydroxybutyrate administration prevents myocardial damage after coronary occlusion in rat hearts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology (Am. j. physiol, Heart circ. physiol.)* 52 (2002), 1968-1974

Plecko B, Stoeckler IS, SchoberE, Harrer G, Mlynarik V, GruberS, Moser E, Moeslinger D, Silgoner H, Ipsiroglu O. Oral  $\beta$ -hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: Monitoring of  $\beta$ -hydroxybutyrate levels in blood and

cerebrospinal fluid, and in the brain by in vivo magnetic resonance spectroscopy *.Pediatric research (Pediatr. res.)* .52 (2002) 301-306

Mizobata Y, Hiraide A, Katayama M, Sugimoto H, Yoshioka T, Sugimoto T. Oxidation of D(-)3-Hydroxybutyrate administered to rats with extensive burns *Surgery today (Surg. today)*. 26 (1996) 173-178

Motohisa S, Mayumi S, Kazunori S, Sekiko D, Takashi S, Akihiro M and Atsushi H. Effect of  $\beta$ -Hydroxybutyrate, a Cerebral Function Improving Agent, on Cerebral Hypoxia, Anoxia and Ischemia in Mice and Rats *The Japanese Journal of Pharmacology* 87 (2002) 143-150

Yoshihiro K, Takao T, Nozomi M, Kenji N, Kieran C, and RL. Veech D--Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease *PNAS* .97 ( 2000) 5440-5444

Eger M A., Henderson ST, Hale C, Cholenon B, Baker LD, Watson GS, Hyde K, Chapman D, Craft S. Effects of  $\beta$ -hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults R . *Neurobiology of aging (Neurobiol. aging)* 25 (2004) 311-314

Shigeru N, Michiko S, Yasukazu So, Hideo N, Fumio S, Akihiro H, and Kazuo T .Protective Effect of D- $\beta$ -Hydroxybutyrate on Corneal Epithelia in Dry Eye Conditions through Suppression of Apoptosis *.Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 44 (2003) 4682-4688

Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J*, 312 (1995) 1-11  
Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*, 80 (1995) 259-268

Barritt GJ. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling requirements. *Biochem J*. 337 (1999) 153-169

Cao Y, Chatton JY. Involvement of calmodulin in the activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 424 (1998) 33-36

Verkhratsky A .Calcium signalling in glial cells. *Trends in Neurosciences*. 19 (1996 ) 346-352

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG..Dynamic signaling between

astrocyte and neurons.*Annu.Rev.Physiol.*63 (2001) 795-813..

Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H. Nitric oxide signals parallel fiber Activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci* 18 (2001) 664-670

Jian K, Li J, Steven A. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* .1(1998) 683 - 692

Alexej V, Richard K, Orkand K ,Helmut K .Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function .*Physiological Reviews.*78 (1998) 99-130

Guse A.H .Regulation of Calcium Signaling by the Second Messenger Cyclic Adenosine Diphosphoribose (cADPR) *Current Molecular Medicine.* 4 (2004), 239-248

Spiegel S, Milstien S .Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid..

*Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(2003) 397-407

Altmann C, Zu H, Dagmar M, Boyukbas D, Haude M, Jakobs KH.; Michel MC. Sphingosylphosphorylcholine, a naturally occurring lipid mediator, inhibits human platelet function.*British journal of pharmacology (Br. j. pharmacol.).*138 (2003) 435-444

Lee HC,Aarhus R. A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-ribose . *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.*270(1995) 2152-2157

Co-ordination of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in mammalian cells by the new  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messenger NAADP .*Archiv European Journal of Physiology* .446 ( 2003) 322-327

Li Y,Jia Y,Cui K.Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor.*Nature.* 434 (2005) 894-898



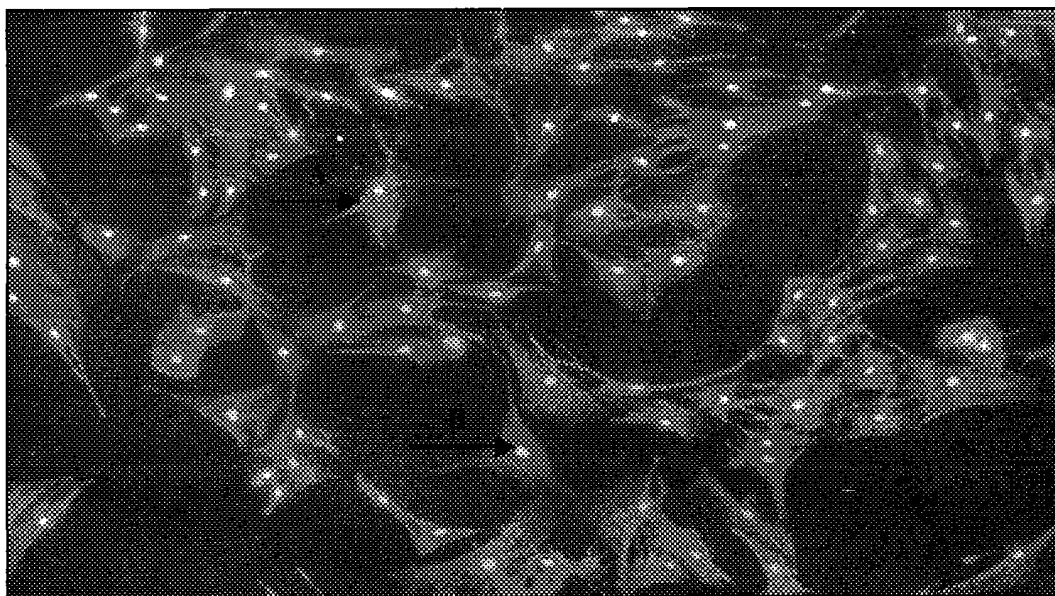


图 1

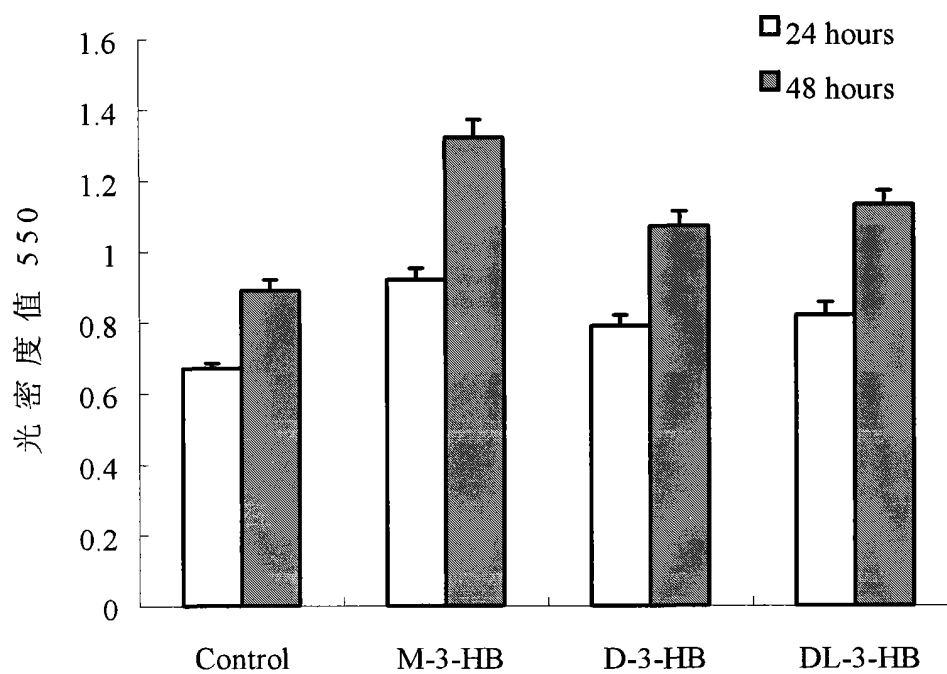


图 2

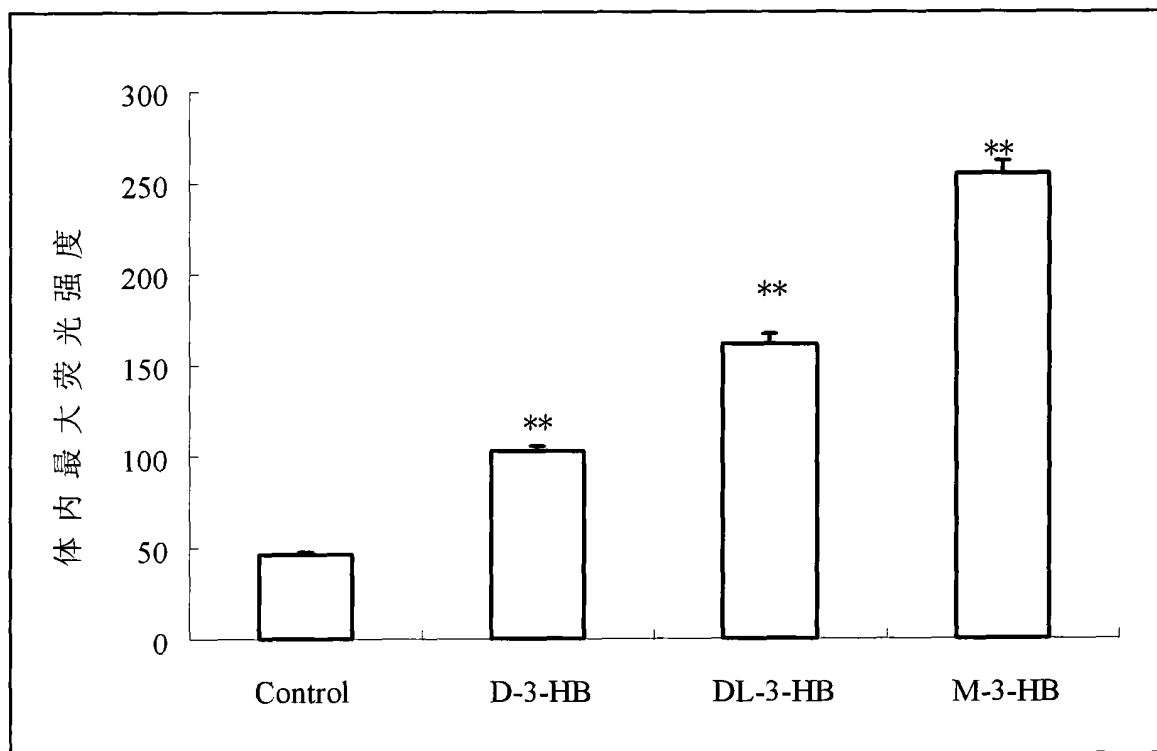


图 3

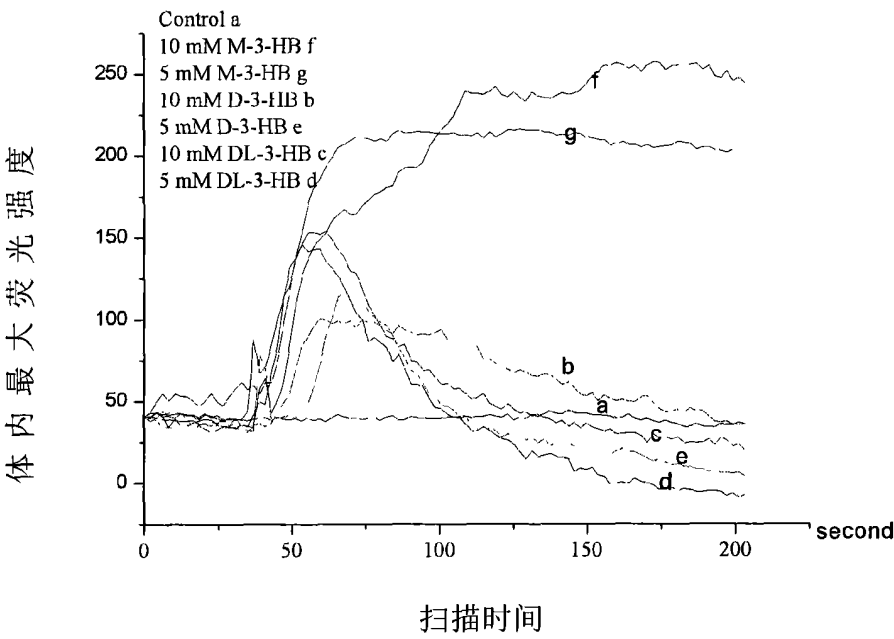


图 4A

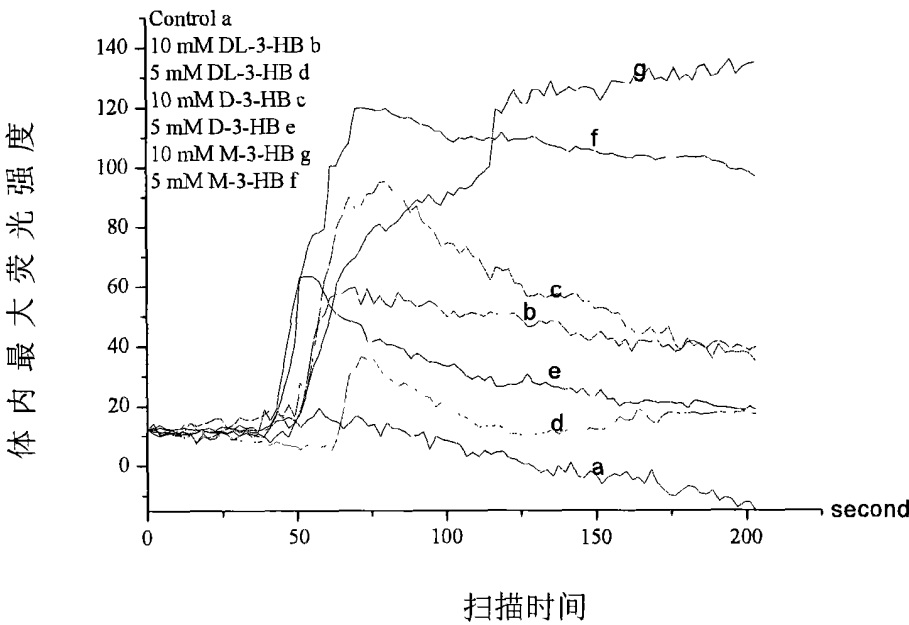


图 4B

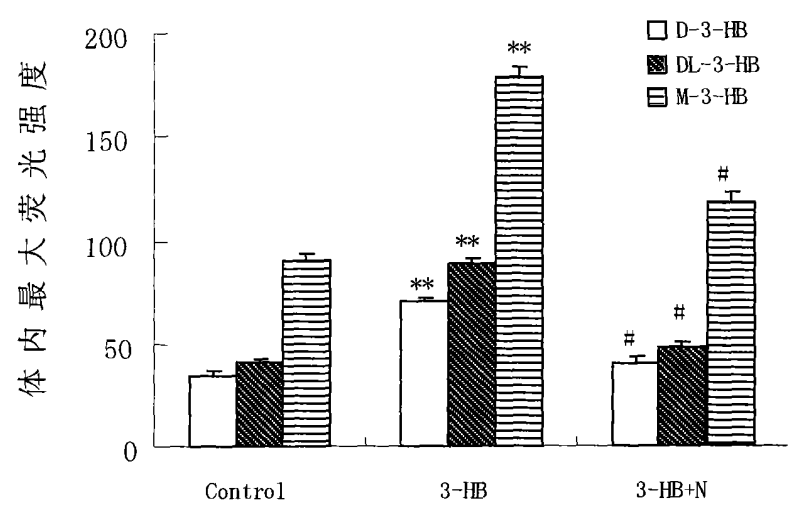


图 5