



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103505731 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210198012. 0

(22) 申请日 2012. 06. 15

(71) 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眼大道
639 号

(72) 发明人 洪浩 唐苏苏

(51) Int. Cl.

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 31/41(2006. 01)

A61K 31/404(2006. 01)

A61K 31/47(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

1 型半胱氨酰白三烯受体拮抗剂在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途

(57) 摘要

本发明涉及 1 型半胱氨酰白三烯受体 (CysLT₁R) 拮抗剂在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。研究发现, 脑内 CysLT₁R 介导 A β 聚集及记忆障碍; 口服给予 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特钠可改善 A β 所致的小鼠记忆损害。CysLT₁R 拮抗剂: 普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特及其类似物: 伊拉司特、阿鲁司特、咪曲司特、泊比司特、西那司特、维鲁司特、吡嘧司特和异丁司特对 A β 所致的原代培养的小鼠神经元损伤有显著的保护作用。CysLT₁R 拮抗剂: 普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特及其类似物: 伊拉司特、阿鲁司特、咪曲司特、泊比司特、西那司特、维鲁司特、吡嘧司特和异丁司特可用于制备抗 AD 药物。

1. 1 型半胱氨酰白三烯受体拮抗剂在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 的用途,其特征在于包括该类化合物所有药物剂型如消化道给药、静脉给药剂型。
3. 如权利要求 1 和 2 的用途,其特征在于包括 1 型半胱氨酰白三烯受体拮抗剂普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特及其类似物伊拉司特、阿鲁司特、咪曲司特、泊比司特、西那司特、维鲁司特、吡嘧司特和异丁司特。
4. 如权利要求 1、2 和 3 的用途,其特征在于人用有效日剂量分别是:普仑司特为 0.01-1.0mg/kg 体重、扎鲁司特为 0.01-0.4mg/kg 体重、孟鲁司特为 0.01-0.2mg/kg 体重。

1 型半胱氨酰白三烯受体拮抗剂在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域,具体涉及 1 型半胱氨酰白三烯受体拮抗剂在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又名老年痴呆症是以脑内 β 淀粉样蛋白 (β amyloid protein, $A\beta$) 斑块为主要病理特征、以认知记忆功能进行性减退为主要临床表现的一种致死性神经退行性疾病。其发病率随着人类现代化和老年化进程的加速而逐年攀升,预计到 2050 年全球 AD 病人将突破 1 亿。这一广泛存在的神经性疾病不仅给患者及其家属带来巨大痛苦,而且成为老年人群致死的第四大病因。但至今还未有有效的医疗方法可以治愈这一疾病。目前美国 FDA 已批准治疗 AD 的药物有 5 种,它们分别是:胆碱酯酶抑制药:他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏和 N-甲基-D-门冬氨酸受体 (NMDA) 拮抗剂如美金刚,这些药物可部分改善 AD 临床症状,且不良反应较大。因此,人们正努力寻找疗效高、不良反应小的新型治疗 AD 药物。

[0003] 人类 1 型半胱氨酰白三烯受体 ($CysLT_1R$) 基因位于 X 染色体 (Xq13-Xq21) 上,至少由 3 个外显子组成,开放读码框编码产物由 337 个氨基酸残基组成,理论分子量为 38KD。人类 $CysLT_1R$ 与小鼠 $CysLT_1R$ 氨基酸序列非常相似,同源性达 87.3%。 $CysLT_1R$ 是由 6 个亲水环和 7 个跨膜疏水区组成,为典型的 G 蛋白偶联受体 (J Immunol, 2004, 173 (3): 1503-1510)。 $CysLT_1R$ 在脾脏和外周血白细胞中表达水平最高,其次是肺、小肠、胰腺和胎盘,在肝脏、肾脏、心脏和脑组织中不表达。 $CysLT_1R$ 内源性配体是半胱氨酰白三烯 ($CysLTs$)。 $CysLTs$ 是由 5-脂氧酶催化花生四烯酸产生的, $CysLTs$ 主要有 LTC_4 、 LTD_4 、 LTE_4 , 其中 LTD_4 内在活性最大。目前关于 $CysLT_1R$ 生理功能尚不清楚,但它的病理作用逐渐被揭示。业已证实, $CysLTs$ 通过激动 $CysLT_1R$ 引起气道平滑肌收缩、血管通透性增加、炎症反应增强,参与哮喘的发生发展过程 (Pharmacology, 2010; 85 (6): 336-49)。 $CysLT_1R$ 拮抗剂普仑司特 (pranlukast)、扎鲁司特 (zafirlukast)、孟鲁司特 (montelukast) 通过阻断 $CysLT_1R$ 发挥抗哮喘作用,是目前临床上一类治疗哮喘病的药物。普仑司特、扎鲁司特和孟鲁司特剂型主要有胶囊剂和片剂,普仑司特成人每天常用量为 450mg,扎鲁司特成人每天常用量为 20mg,孟鲁司特钠成人每天常用量为 10mg。近年来,人们开始关注 $CysLT_1R$ 及其拮抗剂在中枢神经系统疾病中的作用。魏尔清课题组研究发现, $CysLT_1R$ 调节脑缺血后血管性脑水肿,介导星形胶质细胞增殖及炎症反应,参与整体动物脑缺血及脑外伤后神经损伤 (Neuroscience, 2006, 140 (3): 969-979; Neurosci Lett, 2004, 363 (3): 247-251; Acta Pharmacol Sin, 2007, 26 (12): 1526-1536); $CysLT_1R$ 拮抗剂普仑司特可抑制脑缺血动物胶质疤痕形成,促进神经功能恢复 (Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (4): 435-440; Brain Res, 2005, 1053 (1-2): 116-125; Acta Pharmacol Sin, 2006, 27 (3): 282-288)。这些研究采用的动物是大鼠或小鼠,普仑司特给药途径是腹腔注射,且有效剂量范围是 0.03-0.6mg/kg 体重。Wang 等人报道,腹腔注射扎

鲁司特或孟鲁司特 (10-30mg/kg 体重) 可通过阻断实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠中枢神经系统内 CysLT₁R 减轻炎症细胞浸润、降低血脑屏障的通透性,对多发性硬化症有效 (J Immunol, 2011 ;187 (5) :2336-45)。但迄今尚无任何关于 CysLT₁R 及其拮抗剂与 AD 相关性阐述。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种治疗 AD 新方法,具体涉及采用 CysLT₁R 拮抗剂治疗 AD。本发明还提供了用于治疗 AD 的 CysLT₁R 拮抗剂的有效剂量范围。

[0005] 本发明人研究发现,将外源性 LTD4 定位注射至正常小鼠双侧脑室,海马 / 皮层区 CysLT₁R 表达及 A β 水平显著增加,动物记忆功能显著下降;双侧脑室注射 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特可以阻断 LTD4 诱导的 CysLT₁R 表达及 A β 水平增加,并改善记忆损害。进一步研究还发现,口服给予 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特钠可以显著改善 A β ₄₂ 所致的小鼠记忆损害。且小剂量比常规剂量更为有效。因此,CysLT₁R 可作为 AD 药物的作用靶点;CysLT₁R 拮抗剂普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特可用于制备抗 AD 药物。我们采用原代培养的小鼠神经元模型进一步研究表明, CysLT₁R 拮抗剂普仑司特、扎鲁司特以及孟鲁司特钠对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤有显著的保护作用。还发现它们的类似物伊拉司特、阿鲁司特、咪曲司特、泊比司特、西那司特、维鲁司特、吡嘧司特和异丁司特对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤也有显著的保护作用,也可用于制备抗 AD 药物。

附图说明

- [0006] 附图 1:Morris 水迷宫试验中可见平台训练结果
- [0007] 附图 2:Morris 水迷宫试验中隐藏平台训练结果
- [0008] 附图 3:Morris 水迷宫试验中空间搜索试验中小鼠游泳轨迹图
- [0009] 附图 4:Morris 水迷宫试验中空间搜索试验中小鼠在原平台所在象限停留的时间占总时间的百分比
- [0010] 附图 5:Morris 水迷宫试验中空间搜索试验中小鼠穿越原平台次数
- [0011] 附图 6:酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定动物脑内 A β ₄₀ 含量结果
- [0012] 附图 7:酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定动物脑内 A β ₄₂ 含量结果
- [0013] 附图 8:Western blot 测定动物脑内 A β ₄₂ 含量结果
- [0014] 附图 9:免疫组化检测动物脑内 A β ₄₂ 表达结果
- [0015] 附图 10:Western blot 测定动物脑内 CysLT₁R 蛋白表达水平结果
- [0016] 附图 11:RT-PCR 测定动物脑内 CysLT₁R 基因转录水平结果

具体实施方式

[0017] 为了进一步阐述本发明,以下给出一系列实施例。这些实施例完全是例证性的,它们仅用来对本发明进行具体描述,不应当理解为对本发明的限制。

[0018] 实施例 1

[0019] 脑内 CysLT₁R 活化导致 A β 聚集和记忆损害

[0020] 实验方法

[0021] 1、动物及分组

[0022] 取 8 周龄、体重为 22-25g 的清洁级 ICR 雄性小鼠 40 只（由扬州大学比较医学中心提供，SCXK（苏）2007-0001），分为 4 组，分别为正常对照组（PBS+PBS）、半胱氨酰白三烯 D4 组（LTD4+PBS）、普仑司特组（pranlukast+PBS）以及普仑司特加半胱氨酰白三烯 D4 组（pranlukast+LTD4），每组 10 只。双侧脑室注射给药，72 小时后用 Morris 水迷宫试验评价动物记忆功能，Morris 水迷宫试验结束处死动物，取脑，分离海马和皮层，分别采用 ELISA、Western blot 以及 RT-PCR 检测海马和皮层区 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 以及 CysLT₁R 水平。

[0023] 2、Morris 水迷宫试验

[0024] Morris 水迷宫试验共计六天。第 1、2 天为可见平台训练，第 3、4、5 天为隐藏平台训练，第 6 天为空间搜索试验。①可见平台训练：将插有旗子的平台（旗子高于平台 5cm）置于水迷宫第 4 象限，放入 25℃ 左右水至没过平台 5mm。每天从 1、2、3、4 四个象限（4 个入水点）分别将小鼠面向池壁放入水中，使其自由游泳 90s，90s 内小鼠找到平台并上台停留 10s 后将其从平台上取下休息，计算机监测并记录小鼠从入水开始至爬上平台所需的时间（潜伏期）。若 90s 内动物未找到平台，则将小鼠引到平台，并停留 30s，潜伏期记为 90s。②隐藏平台训练：将未插有旗子的平台置于水迷宫第 4 象限，放入 25℃ 左右水至没过平台 5mm。训练方法同可见平台训练。③空间搜索试验：试验第 6 天撤除平台，任选一象限将各组小鼠依次从该象限面向池壁放入水中，使其自由游泳 90s，记录小鼠在第 4 象限停留的时间 占总时间的百分比（测试过程中应保持光线柔和、房间安静、各参照物位置不变）。

[0025] 3、ELISA 检测

[0026] 将小鼠断头取脑，用预冷生理盐水冲洗表面血液，分离海马和皮层，分别以重量 / 体积比 1 : 5 加入 4℃ 生理盐水，制成约 20% 的匀浆，3500r/min 4℃ 离心 15min，取上清液，用考马斯亮蓝定量蛋白，按 ELISA 试剂盒说明规定的方法测定 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 含量，以 $\mu\text{g/g protein}$ 表示其含量。

[0027] 4、Western blot 检测

[0028] 取海马以及皮层组织，以重量 / 体积比 1 : 9 加入含有 10% PMSF 的单去污裂解液研磨匀浆，4℃ 下以 12000r/min 离心 10min，上清液沸水中变性 10min，冷却后取 40 μg 总蛋白上样，SDS-PAGE 凝胶电泳分离，电转移至硝酸纤维素膜上，用 5% 脱脂奶粉封闭， $A\beta_{42}$ 兔多克隆抗体（1 : 500）、CysLT₁R 兔多克隆抗（1 : 500）孵育 1h 后，4℃ 过夜，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗（1 : 1000），37℃ 下孵育 2h，ECL 法显色。Gel Catcher2850 蛋白凝胶系统成像，以 $\beta\text{-actin}$ 为内参照，蛋白条带积分光密度值用 Gel-Pro 软件扫描分析。

[0029] 5、RT-PCR 检测

[0030] 取小鼠脑海马和皮层加入 1ml Trizol 溶液，充分振荡混匀。室温孵育 10min 后，4℃ 条件下，12000r/min 离心 10min，弃去沉淀。按 1ml Trizol 加入 200 μl 氯仿的比例加入氯仿，剧烈振荡 15s，冰浴静置 20min，然后 4℃ 条件下 12000r/min 离心 20min。取上清加入 450 μl 异丙醇，混匀，-20℃ 孵育 40min，4℃ 条件下 12000r/min 离心 20min。弃去上清，向管中加入 1ml 冰浴的 75% 乙醇洗涤沉淀，尽可能使沉淀悬浮，4℃ 条件下 7500r/min 离心 10min，弃去上清。RNA 适度干燥后，用 20 μl 无 RNA 酶水溶解，测定 RNA 定量。用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，cDNA 可直接用于 PCR 扩增。应用 Premier Premier5.0 软件，设计引物。CysLT₁R：上游 5' -ATTCCTGGAGAACATGAATGG-3，下游 5' -CATTGTTCTGCACTG

TAGATGAG-3' (1062bp, nucleotides 419-1480 in NM_021476.4, GeneBank) β -actin:上游 5'-TCTTGGGTATGGAATCCTGTG-3',下游 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCA-3' (154bp, nucleotides 876-1029 in NM_007393.3, GeneBank)。PCR反应体系为:1 μ l RT-cDNA用含1 \times PCR buffer、200 μ mol/L dNTP、1.5mmol/L $MgCl_2$ 、20pmol引物和0.5U Taq DNA聚合酶溶解。反应程序如下:94 $^{\circ}C$ 预变性1min,94 $^{\circ}C$ 变性30s,63 $^{\circ}C$ 退火30s,72 $^{\circ}C$ 延伸1min(循环数33),72 $^{\circ}C$ 最后延伸7min,4 $^{\circ}C$ 保存。取PCR扩增产物20 μ l与5 μ l 6 \times Loading Buffer混匀,吸取5 μ l于5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测,采用凝胶成像系统拍照,

[0031] 6、统计学处理:所有数据均用 $\bar{x} \pm sem$ 表示,采用SPSS11.5软件进行分析,数据比较采用方差分析。

[0032] 实验结果

[0033] 1、脑内 CysLT₁R 活化导致小鼠记忆损害

[0034] Morris 水迷宫可见平台试验显示各组小鼠的潜伏期无显著差异 ($F(3,287) = 0.168, P = 0.918$;附图1),说明各组小鼠之间的视力及对目标的识别能力无差异。隐藏平台试验显示 LTD4 组小鼠潜伏期较正常对照组显著增加 ($P < 0.001$;附图2),而 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特能改善 LTD4 引起记忆损害,使潜伏期缩短 ($P < 0.001$;附图2)。在空间探索试验中,除了 LTD4 组小鼠,其他各组小鼠都表现出对原平台区域的喜好(附图3);LTD4 组小鼠在原平台区域的时间及穿越原平台的次数都较正常对照组显著减少,而 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特显著增加小鼠在原平台区域的时间及穿越原平台的次数 ($P < 0.001$;附图4、5)。

[0035] 2、脑内 CysLT₁R 活化导致小鼠 A β 生成增加

[0036] 我们用 ELISA 法检测小鼠脑海马和皮层区 A β_{40} 和 A β_{42} 水平,结果显示 LTD4 组小鼠脑海马和皮层区 A β_{40} 和 A β_{42} 水平较正常对照组显著升高,而 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特能显著减少 LTD4 引起的 A β 产生 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;附图6、7)。Western blot 和免疫组化检测也显示相同的结果(附图8、9)。

[0037] 3、CysLTD4 诱导小鼠脑内 CysLT₁R 表达

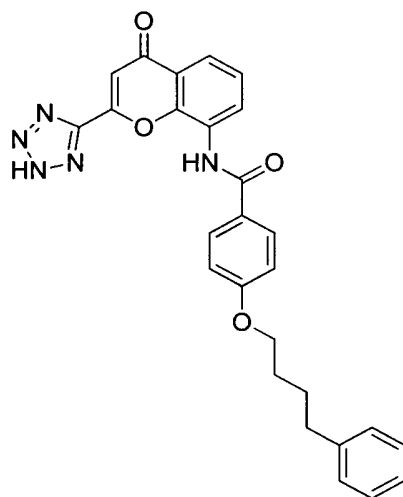
[0038] Western blot 和 RT-PCR 检测 CysLT₁R 显示,LTD4 组脑海马和皮层区 CysLT₁R 表达水平较正常对照组显著增加,而 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特能显著抑制 LTD4 诱导的 CysLT₁R 表达 ($P < 0.001$,附图10、11)。

[0039] 实施例 2

[0040] CysLT₁R 拮抗剂对侧脑室注射 A β_{42} 致痴呆模型小鼠学习记忆障碍的改善作用药物来源与结构

[0041] 普仑司特、扎鲁司特、孟鲁司特钠均为制药公司生产的原料药,它们结构如下:

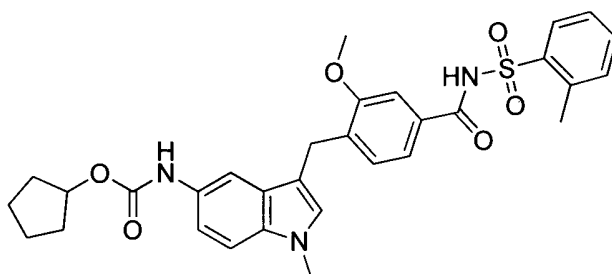
[0042]



[0043] 普仑司特 (pranlukast)

[0044] (分子式 : $C_{27}H_{23}N_5O_4$ 分子量 :481.50)

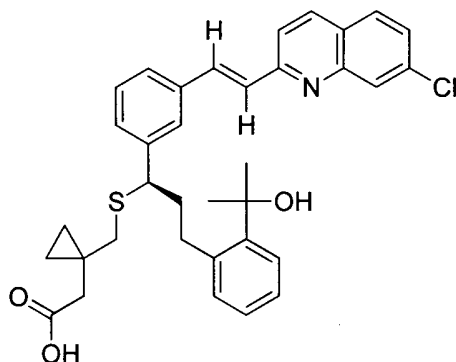
[0045]



[0046] 扎鲁司特 (zafirlukast)

[0047] (分子式 : $C_{31}H_{33}N_3O_6S$ 分子量 :575.68)

[0048]



[0049] 孟鲁司特 (montelukast)

[0050] (分子式 : $C_{35}H_{36}ClNO_3S$ 分子量 :586.18)

[0051] 实验方法

[0052] 1、建立模型与给药

[0053] 取 8 周龄、体重为 22-25g 的清洁级 ICR 小鼠 120 只,雌雄各半(由扬州大学比较医学中心提供,SCXK(苏)2007-0001),经 10%水合氯醛(350mg/kg)麻醉后,固定于小鼠立体定位仪上,常规消毒皮肤,正中矢状切口,分离骨膜,锥形器钻开颅骨,暴露硬脑膜。110 只动物每侧脑室注射 A β 溶液 2.5 μ l(含 A β_{42} 410pmol,以无菌生理盐水溶解,37℃ 120h 使其成凝聚态)。小鼠双侧脑室注射位置为:前囟后 0.5mm,矢状缝左右旁开 1.0mm,脑表面下

2.5mm。注射速度为 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ，注射结束留针 3min。术后正常饲养 2 天后按体重随机分为 11 组：阴性对照组、阳性对照组、普仑司特低、中、高剂量组（0.5mg/kg、1.0mg/kg 及 2.0mg/kg 体重）、扎鲁司特低、中、高剂量组（1.0mg/kg、2.0mg/kg 及 4.0mg/kg 体重）、孟鲁司特钠低、中、高剂量组（0.5mg/kg、1.0mg/kg 及 2.0mg/kg 体重），并设正常对照组（双侧脑室注射等体积生理盐水），用 0.5% CMC-Na 溶液将药物配置成混悬液，连续灌胃给药 2 周。阳性对照组灌胃给予盐酸多奈哌齐（2mg/kg 体重），正常对照组及阴性对照组分别给予等量的 0.5% CMC-Na 溶液。

[0054] 2、Morris 水迷宫试验

[0055] 给药至第 3 周开始水迷宫试验，第 1、2 天为可见平台训练，第 3、4、5 天为隐藏平台训练，第 6 天为空间搜索试验。水迷宫试验期间继续每天灌胃给药，给药后 1 小时开始试验。

①可见平台训练：将插有旗子的水迷宫平台（旗子高于平台 5cm）置于水迷宫第 4 象限，放入 25°C 左右水至没过平台 5mm。每天从 1、2、3、4 象限（4 个入水点）分别将小鼠面向池壁放入水中，使其自由游泳 90s，90s 内小鼠找到平台并上台停留 10s 后将其从平台上取下休息，计算机监测并记录小鼠从入水开始至爬上平台所需的时间（潜伏期）。若 90s 内动物未找到平台，则将小鼠引到平台，并停留 30s，潜伏期记为 90s。②隐藏平台训练：将未插有旗子的水迷宫平台置于水迷宫第 4 象限，放入 25°C 左右水至没过平台 5mm。训练方法同可见平台训练。③空间搜索试验：试验第 6 天撤除平台，任选一个象限将各组小鼠依次从该象限面向池壁放入水中，使其自由游泳 90s，记录小鼠在第 4 象限停留的时间占总时间的百分比（行为学测试过程中应保持光线柔和，房间安静，各参照物位置不变）。数据采集和处理均由有图像自动监视和处理系统完成。

[0056] 3、避暗试验

[0057] 水迷宫试验结束后开始避暗试验，为期 2 天。第 1 天进行学习记忆，第 2 天进行测试，避暗试验期间继续每天灌胃给药，给药后 1 小时开始试验。将小鼠面部背向洞口放入明室，待小鼠进入暗室时受到电击后，将小鼠取出，即为学习过程。24h 后进行测试，将小鼠面部背向洞口放入明室，同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室时受到电击，计时自动停止。取出小鼠，记录小鼠从放入明室进入暗室遇到电击所需的时间（潜伏期），如小鼠在 5min 内未进入暗室，其潜伏期以 300s 计，并记录 5min 内小鼠进入暗室的次数（错误次数）。

[0058] 4、统计学处理：所有数据均用 $\bar{x} \pm \text{sem}$ 表示采用 SPSS 11.5 软件进行分析，数据比较采用方差分析。

[0059] 实验结果

[0060] 1、Morris 水迷宫试验结果

[0061] 在空间探索试验中，与阴性对照组相比，普仑司特、扎鲁司特和孟鲁司特钠低、中、高剂量组小鼠在原平台所在象限停留时间和穿越原平台次数显著增加（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ），见表 1。

[0062] 2、避暗试验结果

[0063] 与阴性对照组相比，普仑司特、扎鲁司特和孟鲁司特钠低、中、高剂量组小鼠潜伏期显著增加，错误次数显著减少（ $P > 0.05$ 或 $P < 0.04$ ），见表 2。

[0064] 表 1. CysLT₁R 拮抗剂对侧脑室注射 A β ₄₂ 致痴呆模型小鼠 Morris 水迷宫试验的影

响

[0065] ($\bar{x} \pm \text{sem}$, n = 8-10)

[0066]

组别	剂量 (mg/kg)	第 4 象限停留时间 (s)	跨越原平台所在区域次数
正常对照组	-	34.48 ± 1.54**	3.38 ± 0.27*
阴性对照组	-	24.13 ± 1.36	1.00 ± 0.27
阳性对照组	2.0	32.10 ± 1.26**	3.13 ± 0.49**
普仑司特低剂量组	0.5	29.16 ± 1.36*	3.00 ± 0.27**
普仑司特中剂量组	1.0	31.71 ± 1.26**	2.75 ± 0.49**
普仑司特高剂量组	2.0	31.23 ± 2.11*	2.50 ± 0.46*
扎鲁司特低剂量组	1.0	29.27 ± 1.07*	2.88 ± 0.40**
扎鲁司特中剂量组	2.0	30.73 ± 2.05*	2.38 ± 0.36**
扎鲁司特高剂量组	4.0	30.57 ± 1.30**	2.63 ± 0.37**
孟鲁司特钠低剂量组	0.5	31.81 ± 1.53**	2.13 ± 0.30*
孟鲁司特钠中剂量组	1.0	32.21 ± 2.05**	2.25 ± 0.45*
孟鲁司特钠高剂量组	2.0	31.73 ± 1.82**	2.36 ± 0.32**

[0067] *P < 0.05, **P < 0.01, 与阴性对照组相比

[0068] 表 2. CysLT₁R 拮抗剂对侧脑室注射 Aβ₄₂ 致痴呆模型小鼠避暗试验的影响[0069] ($\bar{x} \pm \text{sem}$, n = 8-10)

[0070]

组别	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (s)	错误次数
正常对照组	-	280.00 ± 13.63**	0.25 ± 0.16**
阴性对照组	-	148.25 ± 27.38	2.13 ± 0.48
阳性对照组	2.0	278.75 ± 13.68**	0.50 ± 0.27*
普仑司特低剂量组	0.5	247.00 ± 26.73*	0.63 ± 0.32*
普仑司特中剂量组	1.0	269.25 ± 17.58**	0.38 ± 0.18**
普仑司特高剂量组	2.0	258.50 ± 18.56**	0.75 ± 0.31*
扎鲁司特低剂量组	1.0	250.00 ± 24.62*	0.50 ± 0.27*
扎鲁司特中剂量组	2.0	276.75 ± 13.98**	0.37 ± 0.18**
扎鲁司特高剂量组	4.0	238.00 ± 23.70*	0.62 ± 0.26*
孟鲁司特钠低剂量组	0.5	239.50 ± 29.99*	0.63 ± 0.32*
孟鲁司特钠中剂量组	1.0	268.00 ± 18.41**	0.50 ± 0.27*
孟鲁司特钠高剂量组	2.0	253.50 ± 24.00*	0.75 ± 0.41*

[0071] *P < 0.05**P < 0.01, 与阴性对照组相比

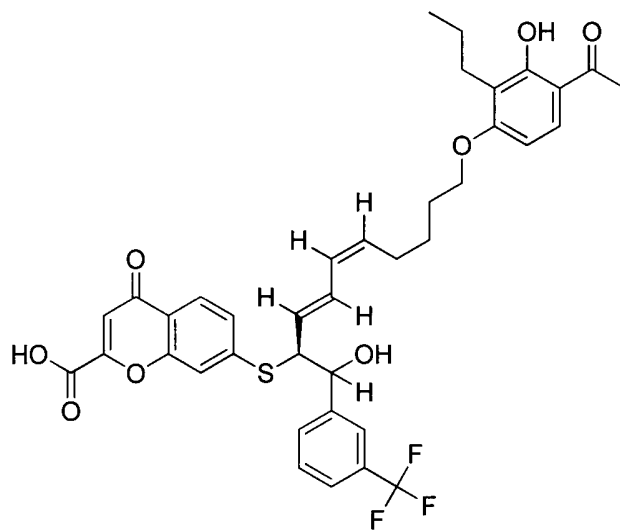
[0072] 实施例 3

[0073] CysLT₁R 拮抗剂及其类似物对 Aβ₄₂ 致原代培养的小鼠神经元损伤的保护作用药物来源与结构

[0074] 普仑司特、扎鲁司特和孟鲁司特三种药物结构同上。

[0075] 伊拉司特、阿鲁司特、咪曲司特、泊比司特、西那司特、维鲁司特、吡嘧司特、异丁司特八种药物购于不同的制药或化工公司, 它们的结构如下:

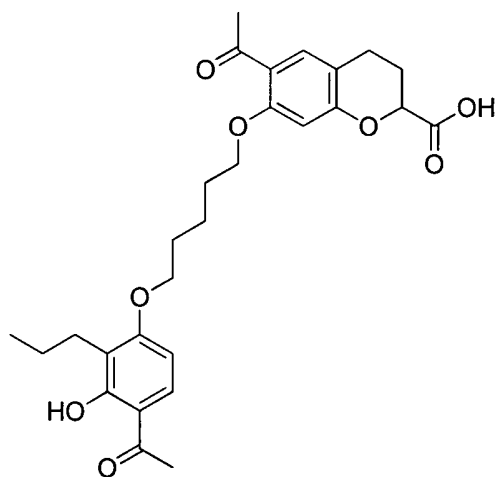
[0076]



[0077] 伊拉司特 (iralukast)

[0078] (分子式 : $C_{38}H_{37}F_3O_8S$ 分子量 :710. 76)

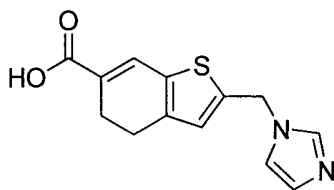
[0079]



[0080] 阿鲁司特 (ablukast)

[0081] (分子式 : $C_{26}H_{34}O_8$ 分子量 :498. 56)

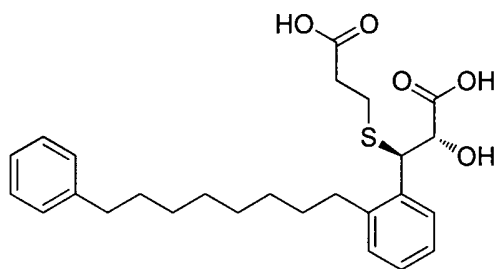
[0082]



[0083] 咪曲司特 (imitrodast)

[0084] (分子量 : $C_{13}H_{12}N_2O_2S$ 分子式 :260. 31)

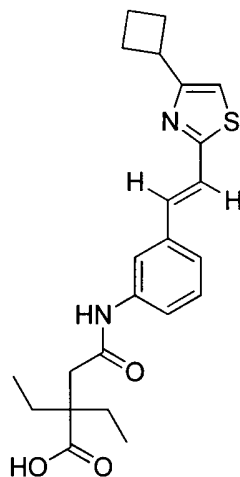
[0085]



[0086] 泊比司特 (pobilukast)

[0087] (分子量 : $C_{26}H_{34}O_5S$ 分子式 :458. 61)

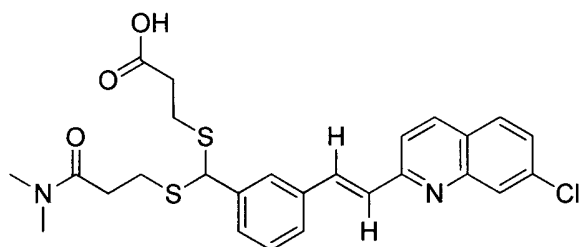
[0088]



[0089] 西那司特 (cinalukast)

[0090] (分子式 : $C_{23}H_{28}N_2O_3S$ 分子量 :412. 54)

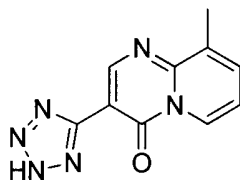
[0091]



[0092] 维鲁司特 (verlukast)

[0093] (分子式 : $C_{26}H_{27}ClN_2O_3S_2$ 分子量 :515. 09)

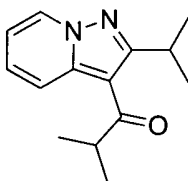
[0094]



[0095] 吡嘧司特 (pemirolast)

[0096] (分子式 : $C_{10}H_8N_6O$ 分子量 :228. 21)

[0097]



[0098] 异丁司特 (ibudilast)

[0099] (分子式: $C_{14}H_{18}N_2O$ 分子量: 230.31)

[0100] 实验方法

[0101] 1、小鼠原代神经元培养

[0102] 在无菌条件下取孕期为 14-18 天的胎鼠, 剥离出大脑半球, 在解剖显微镜下剥除软脑膜及血管, 分离出大脑皮层组织, 冷 PBS 漂洗 3 次, 然后用 2.5% 胰酶 37℃ 消化 20min, 用含 10% 血清的 DMEM/F12 培养液终止胰酶, 接着用 DNaseI 处理细胞 3min, 最后用吸管将组织吹打分离成为单细胞悬液, 以含有 10% B27、5% Pen/Strep、25 μ M Glutamat 的 Neurobasal Medium 将细胞接种于 24 孔培养皿中, 接种密度为 1×10^6 个/ml。次日, 以 10% B27、5% Pen/Strep、0.5mM Glutamine 的 Neurobasal Medium 全量换液, 继续培养 3 天后半量换液, 加入 10 μ M 阿糖胞苷抑制胶质细胞生长。每 3 天半量换液。取培养 9 天的细胞进行实验。

[0103] 2、CysLT₁R 拮抗剂对 A β ₄₂ 损伤神经元的保护作用

[0104] 实验分为正常对照组; 阴性对照组 (20 μ M A β ₄₂); 阳性对照组 (1 μ M 盐酸多奈哌齐); 普仑司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M) 及高浓度组 (10 μ M); 扎鲁司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 孟鲁司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 伊拉司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 阿鲁司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 咪曲司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 泊比司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 西那司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 维鲁司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 吡嘧司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M); 异丁司特低浓度组 (0.1 μ M)、中浓度组 (1 μ M)、高浓度组 (10 μ M), 用不同浓度药物预处理细胞 1 小时, 然后加入终浓度为 20 μ M A β ₄₂ 处理细胞 24 小时, 采用 MTT 法测定细胞存活率。药物配制采用 DMSO 和 PBS 缓冲液。

[0105] 3、统计学处理: 所有数据均用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 数据比较采用方差分析。

[0106] 实验结果

[0107] 表 1 结果显示, 0.1-10 μ M 普仑司特、0.1-10 μ M 扎鲁司特以及 0.1-10 μ M 孟鲁司特对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤有显著的保护作用 ($P < 0.05$, $n = 4$)。

[0108] 表 2 结果显示, 1-10 μ M 伊拉司特、0.1-10 μ M 阿鲁司特以及 1-10 μ M 咪曲司特对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤有显著的保护作用 ($P < 0.05$, $n = 4$)。

[0109] 表 3 结果显示, 1-10 μ M 泊比司特、0.1-10 μ M 西那司特以及 0.1-10 μ M 维鲁司特对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤有显著的保护作用 ($P < 0.05$, $n = 4$)。

[0110] 表 4 结果显示, 0.1-10 μ M 吡嘧司特、异丁司特对 A β ₄₂ 所致的神经元损伤有显著的保护作用 ($P < 0.05$, $n = 4$)。

[0111] 表1 普仑司特、扎鲁司特及孟鲁司特钠对 $A\beta_{42}$ 损伤神经元的保护作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 4$)

[0112]

组别	A_{540}	% of control
Control	$1.33 \pm 0.26^*$	$100.00 \pm 19.24^*$
$A\beta_{42}$ (20 μ M)	0.75 ± 0.20	56.25 ± 15.22
盐酸多奈哌齐 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.26 \pm 0.23^*$	$95.00 \pm 17.27^*$
普仑司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.17 \pm 0.17^*$	$88.25 \pm 12.82^*$
普仑司特 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.30 \pm 0.15^*$	$97.75 \pm 11.35^*$
普仑司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.29 \pm 0.21^*$	$96.75 \pm 15.80^*$
扎鲁司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.15 \pm 0.14^*$	$86.00 \pm 10.51^*$
扎鲁司特 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.26 \pm 0.23^*$	$94.75 \pm 17.89^*$
扎鲁司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.23 \pm 0.20^*$	$92.75 \pm 16.00^*$
孟鲁司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.23 \pm 0.21^*$	$92.50 \pm 16.13^*$
孟鲁司特 + (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.26 \pm 0.23^*$	$95.00 \pm 17.59^*$
孟鲁司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.16 \pm 0.19^*$	$98.75 \pm 20.54^*$

[0113] * $P < 0.05$, 与 $A\beta_{42}$ 组相比

[0114] 表2 伊拉司特、阿鲁司特及咪曲司特对 $A\beta_{42}$ 损伤神经元的保护作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 4$)

[0115]

组别	A_{540}	% of control
Control	$1.38 \pm 0.21^*$	$100.00 \pm 15.06^*$
$A\beta_{42}$ (20 μ M)	0.86 ± 0.19	61.93 ± 14.04
盐酸多奈哌齐 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.27 \pm 0.14^*$	$95.37 \pm 14.02^*$
伊拉司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	1.23 ± 0.16	89.39 ± 12.04
伊拉司特 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.27 \pm 0.13^*$	$92.05 \pm 9.71^*$
伊拉司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.33 \pm 0.22^*$	$96.63 \pm 15.93^*$
阿鲁司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.23 \pm 0.13^*$	$89.39 \pm 9.29^*$
阿鲁司特 (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.25 \pm 0.14^*$	$90.36 \pm 10.43^*$
阿鲁司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.32 \pm 0.15^*$	$95.18 \pm 11.04^*$
咪曲司特 (0.1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	1.18 ± 0.22	85.30 ± 16.34
咪曲司特 + (1 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.27 \pm 0.17^*$	$91.81 \pm 11.29^*$
咪曲司特 (10 μ M) + $A\beta_{42}$ (20 μ M)	$1.33 \pm 0.18^*$	$96.14 \pm 13.54^*$

[0116] * $P < 0.05$, 与 $A\beta_{42}$ 组相比

[0117] 表3 泊比司特、西那司特及维鲁司特对 $A\beta_{42}$ 损伤神经元的保护作用 ($\bar{x} \pm SD, n = 4$)

[0118]

组别	A ₅₄₀	% of control
Control	1.26±0.21*	100.00±16.55*
Aβ ₄₂ (20 μM)	0.80±0.18	63.39±14.35
盐酸多奈哌齐(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.17±0.15*	93.37±11.60*
泊比司特(0.1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.09±0.18	86.73±14.32
泊比司特(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.16±0.13*	92.30±10.16*
泊比司特(10 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.20±0.10*	95.76±8.17*
西那司特(0.1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.14±0.11*	90.45±8.77*
西那司特(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.15±0.12*	91.51±9.68*
西那司特(10 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.21±0.12*	96.81±9.19*
维鲁司特(0.1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.18±0.11*	93.90±8.38*
维鲁司特(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.19±0.16*	95.22±12.76*
维鲁司特(10 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.24±0.20*	98.67±15.89*

[0119] *P < 0.05, 与 Aβ₄₂ 组相比

[0120] 表4 吡嘧司特、异丁司特对 Aβ₄₂ 损伤神经元的保护作用 ($\bar{x} \pm SD$, n = 4)

[0121]

组别	A ₅₄₀	% of control
Control	1.17±0.23*	100.00±19.81*
Aβ ₄₂ (20 μM)	0.72±0.11	61.43±9.44
盐酸多奈哌齐(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.17±0.15*	95.43±12.13*
吡嘧司特(0.1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.02±0.10*	87.72±8.45*
吡嘧司特(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.08±0.14*	92.57±12.15*
吡嘧司特(10 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.11±0.17*	95.43±14.75*
异丁司特(0.1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.06±0.15*	91.14±12.87*
异丁司特(1 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.11±0.22*	95.71±18.81*
异丁司特(10 μM)+Aβ ₄₂ (20 μM)	1.10±0.20*	94.28±17.12*

[0122] *P < 0.05, 与 Aβ₄₂ 组相比。

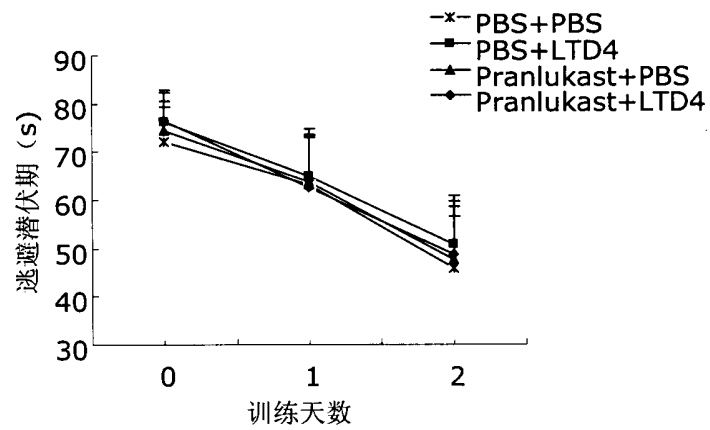


图 1

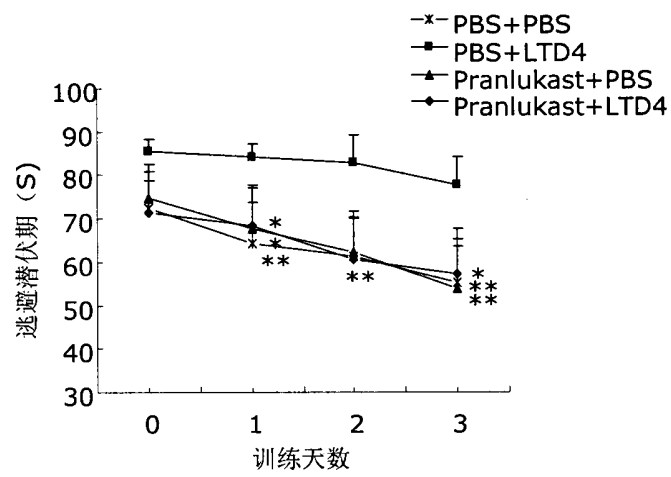


图 2

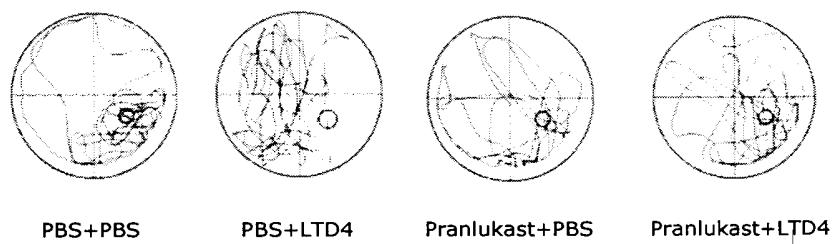


图 3

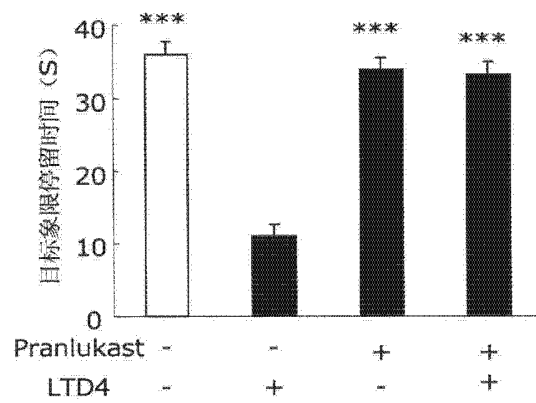


图 4

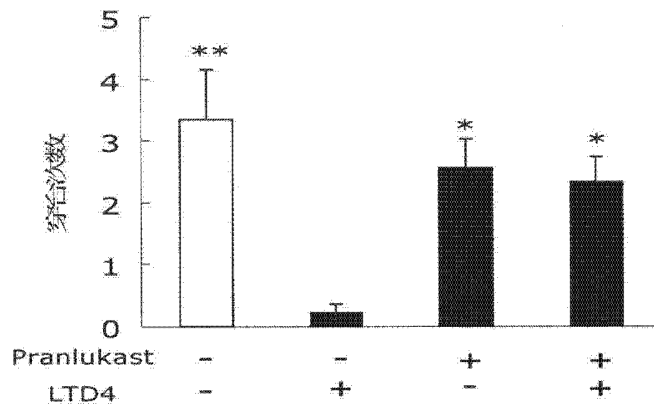


图 5

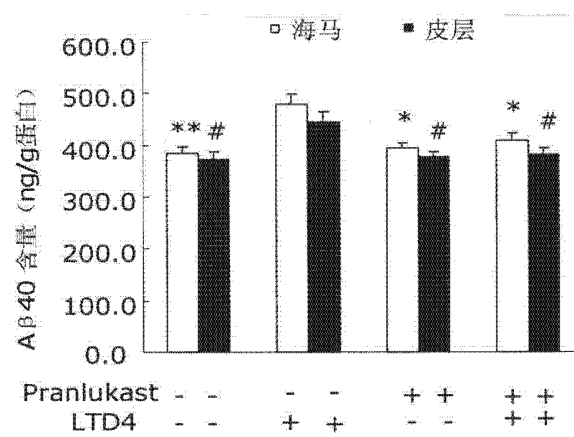


图 6

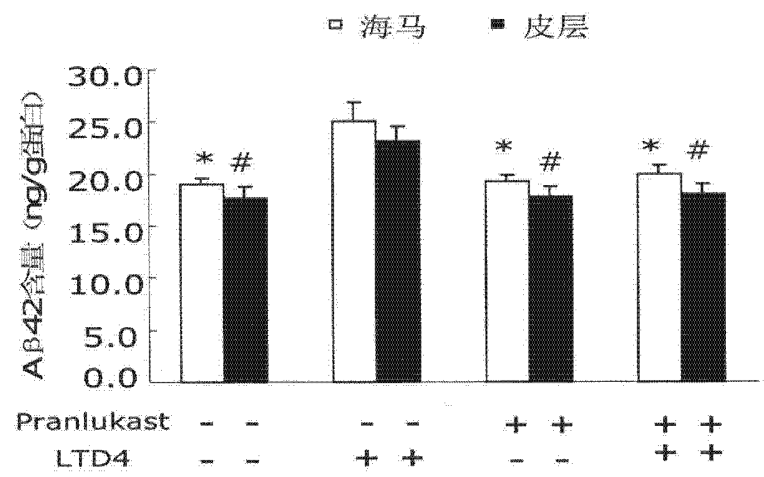


图 7

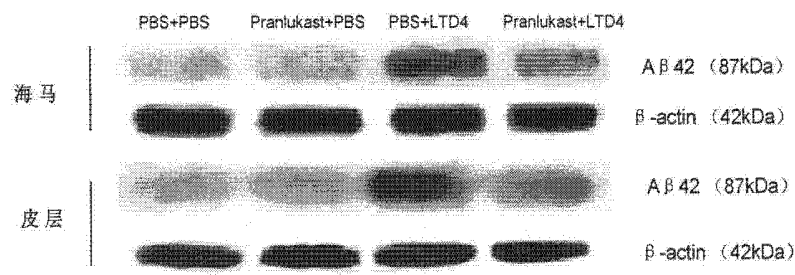


图 8

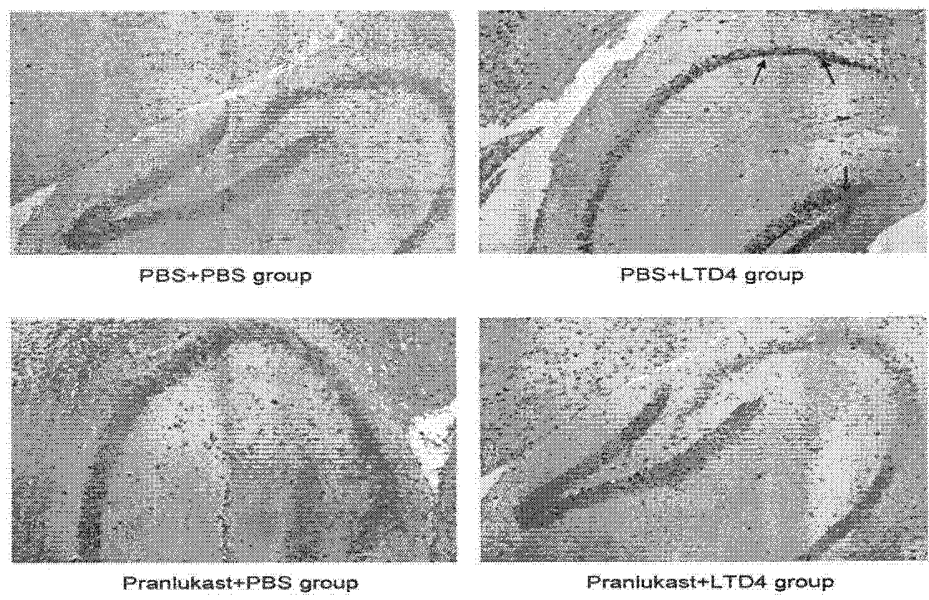


图 9

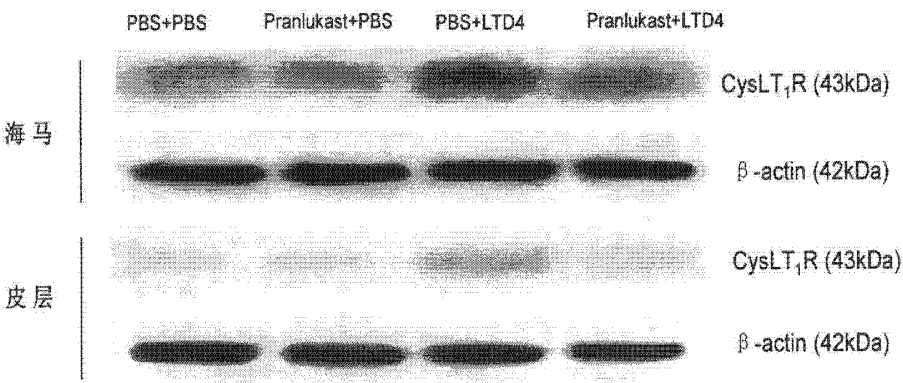


图 10

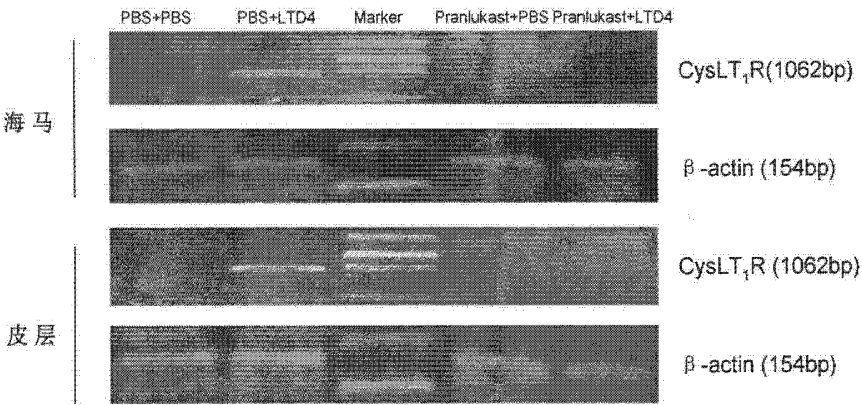


图 11