



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103356617 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201310300166. 0

(22) 申请日 2013. 07. 17

(71) 申请人 上海交通大学医学院附属瑞金医院
地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 197 号

(72) 发明人 宁光 建方方 王晓 周丽斌

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

(51) Int. Cl.

A61K 31/455(2006. 01)

A61K 31/165(2006. 01)

A61P 5/50(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

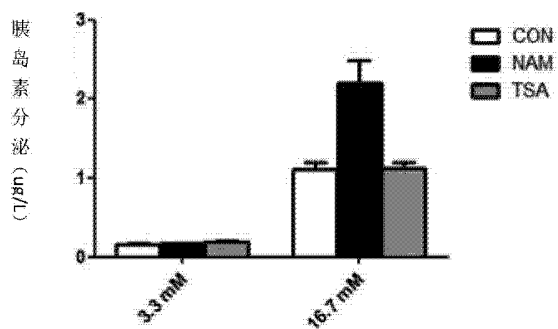
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及医药技术领域,特别涉及去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用,所述去乙酰化酶抑制剂为尼克酰胺或尼曲古菌素 A。所述去乙酰化酶抑制剂 NAM 与大鼠胰岛共孵育胰岛 1h,能使葡萄糖刺激的胰岛素分泌升高 50% 左右;在葡萄糖浓度为 3.3mmol/L,去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理胰岛 12h 时能促进胰岛素分泌,16 后对胰岛素分泌的促进作用明显;NAM 处理 16h 以上能够轻度上调胰岛素分泌。所以,将该抑制剂 NAM 和 TSA 应用在制备促进胰岛素分泌药物中,并将该药物用于治疗糖尿病治疗中,将会起到很好的治疗效果。同时,也为临床上更合理的使用去乙酰化酶抑制剂 NAM 和 TSA 提供更多的科学依据。



1. 去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用。
2. 权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述去乙酰化酶抑制剂为抑制 HDAC I、HDAC II 或 HDAC III 类去乙酰化酶的抑制剂。
3. 权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于:所述去乙酰化酶抑制剂为尼克酰胺。
4. 权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于:所述去乙酰化酶抑制剂为尼曲古抑菌素 A。

去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,特别涉及去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用。

背景技术

[0002] 蛋白乙酰化是重要的翻译后修饰手段,分别由乙酰基转移酶(HATs)和去乙酰化酶(HDACs)催化乙酰辅酶A来源的乙酰基与蛋白质肽链中赖氨酸残基的结合及解离过程。最初发现组蛋白和某些核转录因子的乙酰化修饰参与调控基因的转录表达,随着蛋白质组学新方法的出现,越来越多存在乙酰化修饰的蛋白质被发现,几乎涉及所有细胞功能相关生物学过程的调节。研究发现除了通过组蛋白和转录因子调节基因转录之外,蛋白乙酰化修饰还可以通过广泛影响酶蛋白功能状态而对多条代谢通路实现快速调节,对细胞代谢及生长的影响广泛而深刻,开拓了细胞代谢调节领域新的研究模式和研究方向。

[0003] 糖尿病是严重危害人类健康的主要慢性疾病之一,目前全球糖尿病患者的数量约为2亿4千万,且患病率仍在增加,其中2型糖尿病患者占90%-95%。2型糖尿病患者如果血糖情况控制不理想,比较容易受到糖尿病多种并发症的骚扰,患者会出现双目失明、尿毒症、肢体残疾及心脑血管疾病。所以2型糖尿病及其并发症严重危害人类健康,给社会带来了巨大的经济负担。2型糖尿病严重危害人类健康,胰岛功能紊乱是其发生和发展过程中的重要环节,因此对胰岛功能调节机制的研究及保护因子的寻找不仅对深入了解2型糖尿病的发病过程有重要意义,而且对于该疾病的预防和治疗也具有实际意义。乙酰化广泛参与调节细胞代谢和生长等一系列研究成果的发表,为胰岛功能的研究提供了新的科研思路,在对代谢变化非常敏感的 β 细胞中,蛋白乙酰化是否参与调节胰岛素分泌还知之甚少。

[0004] 随着乙酰化调节代谢的机制研究日益受到关注,多种去乙酰化酶抑制剂相继问世,在蛋白乙酰化研究中应用广泛,为深入了解蛋白乙酰化对细胞代谢和相关功能的影响及其调节机制提供了研究工具。

[0005] 去乙酰化酶可分为四大类:HDAC I、HDAC II、HDAC III和HDAC IV。HDAC I、HDAC II和HDAC IV类去乙酰化酶以 Zn^{2+} 为辅基,HDAC III又称sirtuin,以 NAD^+ 为辅酶。尼克酰胺(Nicotinamide, NAM)是sirtuin家族的抑制剂,曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)是HDAC I、II的抑制剂,关于去乙酰化酶抑制剂与胰岛素分泌关系的研究目前尚没有文献报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供去乙酰化酶抑制剂在制备促进胰岛素分泌药物中的应用。

[0007] 所述去乙酰化酶抑制剂为抑制HDAC I、HDAC II或HDAC III类的去乙酰化酶的抑制剂。

[0008] 所述去乙酰化酶抑制剂为尼克酰胺。

[0009] 所述去乙酰化酶抑制剂为尼曲古抑菌素A。

[0010] 蛋白乙酰化是蛋白翻译后修饰的主要方式之一,对蛋白功能有重要的调节作用。近几年的蛋白质组研究表明,在哺乳动物细胞中有大约 2200 个蛋白质受乙酰化修饰,这些受乙酰化调节的蛋白质除了组蛋白,还包括转录因子、激酶、泛素连接酶、核糖体蛋白质、代谢酶等,广泛参与调节基因转录,细胞周期, DNA 损伤修复,细胞骨架重塑,细胞自噬及代谢等,足见乙酰化修饰对细胞生命活动的重要性。在受乙酰化调节的蛋白质中,代谢通路的催化酶占相当大的比例,在肝脏,参与糖酵解,糖异生,三羧酸循环,脂肪酸合成,尿素循环及糖原代谢的几乎所有酶都受乙酰化调节,氧化磷酸化及氨基酸代谢的许多酶也受乙酰化调节。酶蛋白的乙酰化修饰可改变酶活性或稳定性,广泛参与调节细胞代谢,可见乙酰化修饰在代谢调节中有重要的作用。

[0011] 组蛋白是最早发现的受乙酰化调节的蛋白质,其乙酰化修饰参与调控基因的转录,组蛋白的乙酰化修饰是在乙酰基转移酶和去乙酰化酶催化下进行的。哺乳动物的去乙酰化酶根据与酵母去乙酰化酶的同源性分为四种类型,即 HDAC I、HDAC II、HDAC III 和 HDAC IV。I、II、IV 类 HDAC 以 Zn^{2+} 为辅助因子,HDAC III 又称为 Sirtuins,以 NAD^+ 为辅基。

[0012] 本发明通过去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA)、尼克酰胺 (Nicotinamide, NAM) 处理大鼠胰岛,观察该胰岛素分泌的影响。去乙酰化酶抑制剂 NAM 和 TSA 孵育胰岛 1h,在基础糖浓度下(葡萄糖浓度为 :3.3mmol/L),对胰岛素分泌均没有影响,而去乙酰化酶抑制剂 NAM 能使葡萄糖(葡萄糖浓度为 :16.7mmol/L)刺激的胰岛素分泌(GSIS)升高 50% 左右, TSA 对 GSIS 没有显著作用。在基础糖浓度下(葡萄糖浓度为 :3.3mmol/L),TSA 处理胰岛 12h 时能够促进胰岛素分泌,16、24h 时对胰岛素分泌的促进作用更加明显;而 NAM 处理 16h 以上能够轻度上调胰岛素分泌,提示乙酰化修饰参与调控胰岛素分泌。而且 NAM 对急性分泌的促进作用更明显。TSA 对急性 GSIS 没有影响,其长期作用较明显,说明 TSA 可能主要通过影响相关基因表达起作用。

[0013] 本发明的有益效果为:

[0014] 1、通过去乙酰化酶抑制剂 NAM、TSA 对大鼠胰岛素分泌的急性测试和慢性测试,说明, NAM 对急性胰岛素分泌的促进作用明显,而 TSA 长期作用对胰岛素分泌影响更明显。所以,将去乙酰化酶抑制剂 NAM 和 TSA 可以应用在制备促进胰岛素分泌药物中,并将该药物用于治疗糖尿病,将会起到很好的治疗效果。

[0015] 2、为临床上更合理的使用去乙酰化酶抑制剂 NAM 和 TSA 提供更多的科学依据。并为去乙酰化酶抑制剂 NAM 和 TSA 提供了更多的医药用途。

附图说明

[0016] 图 1 是去乙酰化酶抑制剂 NAM 和去乙酰化酶抑制剂 TSA 对大鼠胰岛胰岛素分泌的急性作用对比图。

[0017] 图 2 是去乙酰化酶抑制剂 TSA 对大鼠胰岛胰岛素分泌的慢性作用对比图。

[0018] 图 3 是去乙酰化酶抑制剂 NAM 对大鼠胰岛胰岛素分泌的慢性作用对比图。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例,对本发明作进一步说明:

[0020] 实验所用到的大鼠模型为 SPF (Specific pathogen Free) 级 SD (Sprague-Dawley)

大鼠,雄性,8-10 周龄,体重 200-250g 购自上海中科院斯莱克实验动物中心。

[0021] 牛血清白蛋白(BSA) 购自 MP Biomedicals。

[0022] 实施例 1

[0023] 1、大鼠胰岛原代分离培养

[0024] 1)、取 SD 大鼠,10% 水合氯醛腹腔麻醉固定;

[0025] 2)、打开腹腔,找到十二指肠大乳头,用弯血管钳夹闭十二指肠大乳头;

[0026] 3)、找到胆总管,眼科剪剪开小口,将连接有注射器的细软管插入到胆总管朝向胰腺方向;

[0027] 4)、将注射器中浓度为 0.5mg/ml 的 XI 型胶原酶(溶于含 1% BSA 的 Hank's 液中)缓慢推注到胰腺中,直至整个胰腺完全充盈,沿盲肠至十二指肠壁分离下胰腺置于 50ml 离心管中;

[0028] 5)、于 37℃ 水浴锅温浴 17min 后用力将整个胰腺甩开;

[0029] 6)、用含 0.25%BSA 的冰 Hank's 液终止消化;

[0030] 7)、1000rpm,4℃ 离心 1min,弃上清液,加入冰 Hank's 液将块状物吹散后再次离心,重复上述步骤共三次;

[0031] 8)、洗完后,加入约 20ml 冰 Hank's 液,轻轻吹打,混匀,过筛(直径 850 μ m)以去除大块组织杂质,取滤出液,加冰 Hank's 液至 50ml,再次 1000rpm 离心 3min,去上清;

[0032] 9)、加入 25%BSA300 μ l 吹打均匀,依次加入密度为 1.094、1.061、1.041 的 histopaque(溶于 Hank's 液中)10ml、5ml、5ml、5ml,4℃,400rpm 离心 4min,接着 1700rpm 离心 17 分钟;

[0033] 10)、以吸管吸取界面细胞团,置于有 Hank's 液的 50ml 离心管中,1000rpm 离心 3min;

[0034] 11)、体视显微镜下手捡胰岛,备用。

[0035] 2、去乙酰化酶抑制剂 NAM、TSA 对大鼠胰岛素分泌的急性测试:

[0036] 将步骤(1)中得到的大鼠胰岛,在含 0.25%BSA、3.3mmol/L 葡萄糖的 KRB 缓冲液中孵育 30min 后,然后分别换入 3.3mmol/L 葡萄糖(CON 组)、3.3mmol/L 葡萄糖 +5mmol/L NAM(NAM 组)、3.3mmol/L 葡萄糖 +200nmol/L TSA(TSA 组)、16.7mmol/L 葡萄糖(对照组 CON)、16.7mmol/L 葡萄糖 +5mmol/L NAM(NAM 组)、16.7mmol/L 葡萄糖 +200nmol/L TSA(TSA 组)的 KRB 缓冲液,培养 1h,收集上清,测定胰岛素浓度。具体如图 1 所示,在基础葡萄糖(3.3mmol/L 葡萄糖)浓度下, NAM、TSA 对胰岛素分泌均没有影响,在 16.7mmol/L 葡萄糖刺激下,和对照组(CON 组)相比, NAM 组使 GSIS 升高 50% 左右,而 TSA 组对 GSIS 没有显著作用。

[0037] 3、去乙酰化酶抑制剂 NAM、TSA 对大鼠胰岛素分泌的慢性测试:

[0038] 将步骤(1)中得到的大鼠胰岛,分别用含 0.25%BSA 和 3.3mmol/L 葡萄糖(对照组 CON)、3.3mmol/L 葡萄糖 +200nmol/L TSA(TSA 组)的 1640 培养液孵育胰岛,分别在 1、2、4、8、12、16、24h,收集上清,测定胰岛素浓度。具体见图 2 所示,处理时间短于 12h, TSA 对胰岛素分泌没有影响,处理 12h 时, TSA 能够促进胰岛素分泌,16、24h 时 TSA 对胰岛素分泌的促进作用显著增加。

[0039] 将步骤(1)中得到的大鼠胰岛,分别用含 0.25%BSA 和 3.3mmol/L 葡萄糖(对照组 CON)、3.3mmol/L 葡萄糖 +5mmol/L NAM(NAM 组)的 1640 培养液孵育胰岛,分别在 1、2、4、8、

12、16、24h,收集上清,测定胰岛素浓度。结果如图3所示,处理时间短于16h,NAM对基础胰岛素分泌没有影响,处理16h以上,NAM能够促进胰岛素分泌。

[0040] 综上所述,两种不同的去乙酰化酶抑制剂NAM、TSA都能影响胰岛素分泌,支持蛋白乙酰化参与调节胰岛功能;NAM对急性胰岛素分泌的促进作用明显,而TSA长期作用对胰岛素分泌影响更明显,说明去乙酰化酶抑制剂对胰岛素分泌有调节作用,可用作制备促进胰岛素分泌的药物。所以,如果将以上两种不同的去乙酰化酶抑制剂NAM、TSA应用在制备促进胰岛素分泌的药物中,然后将该药物组合应用在治疗糖尿病的治疗中,将会有很好的疗效。

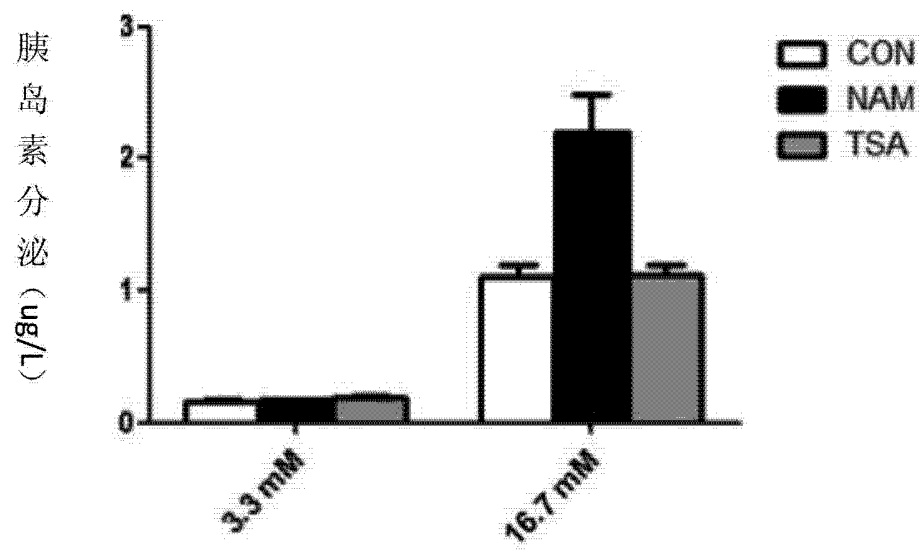


图 1

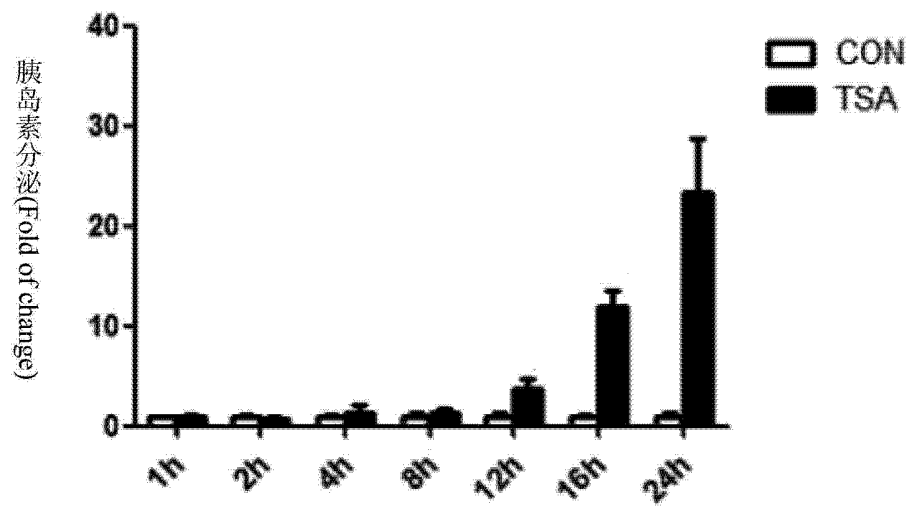


图 2

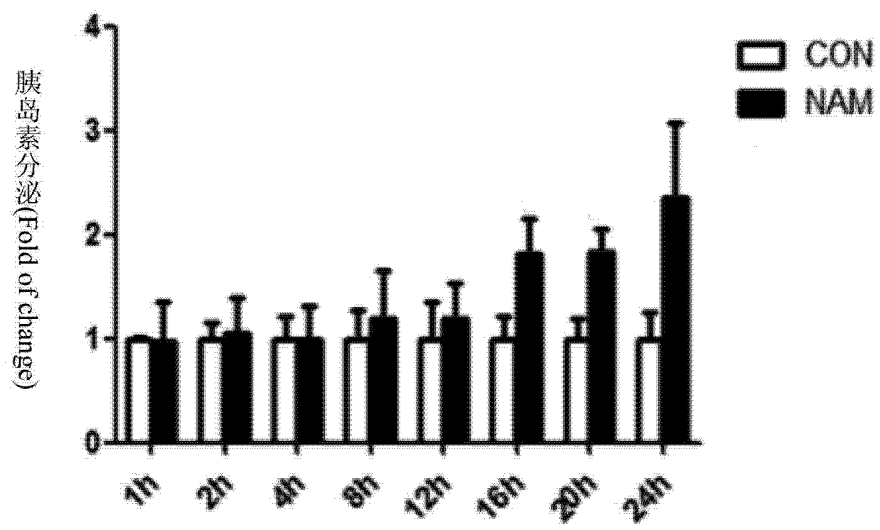


图 3