

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/7032

A61P 25/14

A61P 25/16

A61P 25/28



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410088514.3

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1634090A

[22] 申请日 2004.11.3

[21] 申请号 200410088514.3

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 戚 智 陈雪松 池少鹏 杨 微
刘明娜 卫涛涛 杨福愉

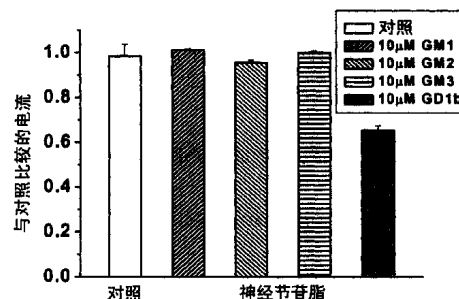
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称 神经节苷脂 GD1b 的抗神经细胞凋亡作用及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种人体内源性化合物的抗神经细胞凋亡作用，更具体地，涉及调节钾离子通道活性的神经节苷脂 GD1b 的抗神经细胞凋亡作用。另外，本发明还涉及神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗神经退行性疾病的抗神经细胞凋亡药物中的应用，以及在制备预防和治疗钾离子通道病的药物中的重要应用。



1. 神经节苷脂 GD1b 在抗神经细胞调亡中的应用。
2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述神经节苷脂 GD1b 通过抑制神
- 5 经细胞钾离子通道活性来抗神经细胞调亡。
3. 神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗神经退行性疾病的抗神经细
胞调亡药物中的应用。
4. 根据权利要求 3 的应用，其中所述神经节苷脂 GD1b 通过抑制神
经细胞钾离子通道活性来抗神经细胞调亡。
- 10 5. 根据权利要求 3 或 4 的应用，其中所述神经退行性疾病包括帕金
森氏病、老年痴呆、亨廷顿氏病。
6. 神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗钾离子通道病的药物中的应
用。

神经节苷脂 GD1b 的抗神经细胞凋亡作用及其应用

5 技术领域

本发明涉及一种人体内源性化合物的抗神经细胞凋亡作用，更具体地，涉及神经节苷脂 GD1b 的抗神经细胞凋亡作用。另外，本发明还涉及神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗神经退行性疾病的抗神经细胞凋亡药物中的应用，以及在制备预防和治疗钾离子通道病的药物中的应用。

10

背景技术

神经退行性疾病是指人体的神经元发生退行性变化而引起的一系列病症，多发生在老年人群中，包括帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD)、老年痴呆 (Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿氏病 (Huntington disease, HD) 等疾病。现有的神经退行性疾病机制研究主要集中于胆碱能系统的功能损害，但这种损害很可能是神经元损伤或死亡的结果，而不是起因，现有的治疗方法也均仅为对症治疗。

神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 是维持和促进神经细胞正常生存、生长和分化，在神经损伤情况下促进其再生的一类特定多肽或蛋白质。包括神经生长因子、脑源性神经生长因子等分子成为当前预防和治疗一些神经退行性疾病的一个热点。然而这类分子均为大分子蛋白，不能通过血脑屏障，不宜外周给药。当然也有一些专利介绍一些有机小分子用来治疗这类疾病，例如：雷公腾属提取物 (中国专利申请号 0010779.1)、麦芽酚 (中国专利申请号 02118497.6) 和吡唑并蒽酮类化合物 (中国专利申请号 02114748.5) 等。但是这些化合物是植物提取物或经过化学合成而得到的，均会对人体有不良的毒副作用。

愈来愈多的证据表明：神经细胞凋亡在许多病理性神经细胞死亡引起的 Alzheimer's、Parkinson's、Huntington's 等神经退化性疾病的进展中发挥重要作用 (Pettmann 1998, *Neuron* 20, 633-47; Mattson 2000, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 120-9)。在很多类型的细胞中，细胞凋亡

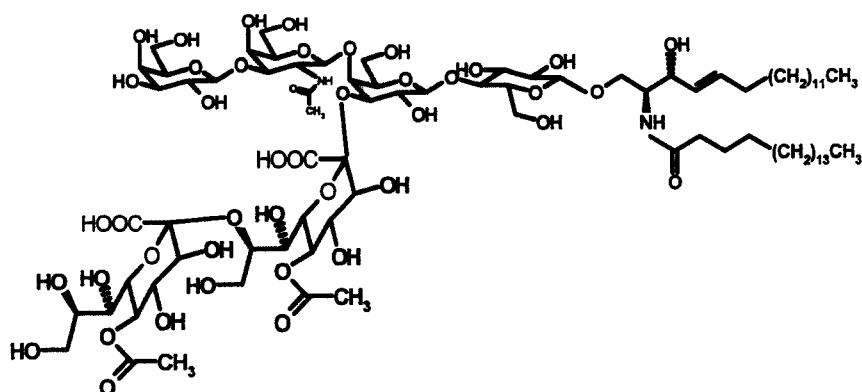
30

时在细胞形态发生很多变化，如：细胞体积缩小、核的浓缩以及细胞膜连接的碎片。其中细胞体积缩小是其凋亡的一个早期现象。大量研究已证明细胞体积缩小是由胞内钾离子通过钾离子通道的外流引起的，提高细胞外的钾离子浓度可以阻止这种离子的外流导致细胞死亡而引起的凋
5 亡(Hughes 和 Cidlowski, 1999, *Adv Enzyme Regul* **39**, 157-171)。虽然钾通道异常活性带来的损害发现时间不长，但已经逐渐被越来越多的人认识，并且逐渐有更多的研究显示它与神经元的损伤、凋亡甚至脑萎缩相关。钾离子通道病(ion channel disease)是因钾离子通道功能异常而引起的一组疾病，主要侵及神经和肌肉系统，心脏和肾脏等器官也可受
10 累。

神经节苷脂是存在人体内的鞘脂类化合物家族中含有唾液酸基的一类膜质分子。它们可以形成一种特殊的结构，介导细胞与细胞，细胞与下游效应器之间的相互作用，调节细胞内的蛋白和受体的行为，参与信号传导的过程(Hakomori (2003) *Curr Opin Hematol.* 10, 16-24; Miljan
15 和 Bremer (2002) *Sci STKE.* **160**, RE15)。对于神经系统来说，这类分子的功能包括：神经元的生长，细胞营养和保护作用；也就是说神经节苷脂对中枢和外周神经系统的受体的功能，支持系统以及信号传递机制均产生影响(Ledeen 和 Wu (1992) *Trends Glycosci. Glycotech.* **4**.
174-187; Misasi 等人(1997) *Diabetes Metab Rev.* **13**, 163-79)。神
20 经节苷脂类分子包括结构类似的 GM1, GM2, GM3, GD1b (双唾液酰神经节苷脂-GM1, 单唾液酰神经节苷脂-GM2, 单唾液酰神经节苷脂-GM3 和单唾液酰神经节苷脂-GD1b) 等。

发明内容

25 为了解决上述问题，本发明人通过深入的研究发现人体内源性物质-神经节苷脂 GD1b (式 1) 可以通过抑制神经细胞钾离子通道活性抗神经细胞凋亡。



式 1

因此，本发明的目的是提供神经节苷脂 GD1b 在抗神经细胞凋亡中的应用。

5 本发明另一目的是提供神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗神经退行性疾病的抗神经细胞凋亡药物中的应用。所述神经退行性疾病包括帕金森氏病、老年痴呆、亨廷顿氏病等。

本发明还有一个目的是提供神经节苷脂 GD1b 在制备预防和治疗钾离子通道病的药物中的应用。

10 实验证明，与现有的抗凋亡剂相比神经节苷脂 GD1b 能够以明显较小的量达到相当的抗凋亡效果。因此神经节苷脂 GD1b 是一种新的更有效的凋亡抑制剂，并且在制备预防或治疗神经退行性疾病和钾离子通道病的药物中具有潜在应用。由于神经节苷脂是人体内存在的膜脂类分子的一种，因此用这类分子作为药物的毒副作用无疑将会很小。

15 附图简述

图 1. 不同神经节苷脂类分子对海马神经细胞钾通道电流的影响。

图 2. 神经节苷脂 GD1b 的抗凋亡作用。(A) 神经细胞培养基中不加任何凋亡剂和保护剂时海马神经细胞的照片；(B) 神经细胞培养基中加入 0.3 μM STS 培养 24 小时时海马神经细胞的照片；(C) 神经细胞培养基中加入 TEA (四乙胺, 5.0 mM) 和 0.3 μM STS 培养 24 小时海马神经细胞的照片；(D) 神经细胞培养基中加入 10 μM GD1b 和 0.3 μM STS 培养 24 小时海马神经细胞的照片。

图 3. 神经节苷脂 GD1b 和 TEA 对海马神经细胞的抗凋亡作用的统计

学比较。

具体实施方式

下面结合实施例详细描述本发明。

5 1. 实验材料

1) 实验动物

24 小时以内的新生 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 由中国科学院遗传与发育研究所和北京维通利华实验动物技术有限公司提供;

2) 实验试剂

10 胎牛血清购自美国 HyClone 公司, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (高糖) 及胰蛋白酶, Neurobasal™-A 培养基、B-27 添加剂购自美国 Gibco 公司, 多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine)、L-谷氨酰胺以及 GM1、GM2、GM3 和 GD1b 等神经节苷脂均购自 Sigma 公司 (G7641, G8397, G5642, G8146), 其余试剂均为国产分析纯。

15 3) 实验仪器

Double patch clamp (双探头膜片钳): EPC10 HEKA 公司膜片钳

Cole Parmer CPX-600 超声仪, List medical electronic D-1600 Darmstadt-13,

L/M-3P-A 电极拉制仪;

20 List-medical electronic D-64242 ID03 L/M-CPZ101 ZEISS 电极抛光仪

Axiovert135 ZEISS (德国) 倒置荧光显微镜

VS-1300-U 洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

25 2. 实验方法

1) 海马神经细胞的培养

神经细胞的分离与培养是根据文献的无血清培养方法 (Brewer 等, 1993, *J Neurosci Res.* **35**, 567-76)。首先冰浴出生 24 小时内的 SD 大鼠 3 分钟, 75% 酒精浸泡 3 分钟后, 断头取脑, 随后反相铺置于冰盒的培养皿和滤纸上分离海马组织。用无血清的 DMEM 培养液浸泡分离出的组

30

织，将组织吸出，加入适量的 0.25%胰蛋白酶，37℃温浴 7 分钟，然后以冰冷的 DMEM 培养液（含 10%胎牛血清）终止消化作用，再加入 DMEM 培养液（含 10%胎牛血清），用吸管轻轻吹打使细胞分散，经 300 目筛网过滤。台盼蓝染色观察细胞存活率，并将细胞悬液调至 1×10^5 个细胞/mL。用吸管将含有细胞的培养基缓慢加入预先铺有多聚赖氨酸的（37℃过夜）玻璃片上，于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养，7 小时后换成 Neurobasal™-A 培养基、B-27 添加剂和 L-谷氨酰胺的培养液，隔日换成 Neurobasal™-A 培养基、B-27 添加剂，以后用 Neurobasal™-A 培养基、B-27 添加剂培养细胞，待 7 日后细胞长出轴突即可用于实验。

10 2) 膜片钳的实验操作

钾通道全细胞的膜片钳实验是根据文献 (Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981 Aug;391(2):85-100)，使用 EPC-10HEKA 公司的产品操作的。使用 List medical electronic D-1600 Darmstadt-13, L/M-3P-A 电极拉制仪将 K-Series Borosilicate Glass Capillaries (World Precision Instruments) 拉成两个电极，随后使用 List-medical electronic D-64242 电极抛光仪进行热抛光得到电极。电极内液为：KCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, Na₂ATP 2 mM, Hepes 10 mM, 用 KOH 调 pH 为 7.2-7.4, 电极外液为：NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM, 葡萄糖 10 mM, 用 NaOH 调 pH 为 7.2-7.4, 电极进入细胞外液时电阻约为 4-10 MΩ。在实验过程中，控制电压 [Holding potential (HP)] -120 mV, 扫描时间为 200 ms, 控制电压为从 -90~70 mV (每 20 mV 递增)，检测神经细胞的钾离子通道电流的 I-V 曲线。所有的实验是在室温下进行的。

25 3) 神经细胞凋亡的检测方法

神经细胞的凋亡是用 Staurosporine (Sigma S4400, 在 DMSO 中 1 mM) 1 μM 溶于细胞培养基中来诱导，本文采用两种检测方法来观看神经细胞凋亡后细胞核的变化 (Platoshyn 等, (2002), *Am J Physiol Cell Physiol.* 30 283, C1298-305)。

A) DAPI 染色法

细胞用多聚赖氨酸固定于玻璃片上，用 PBS（磷酸盐缓冲液）洗一次，随后用 95%的乙醇固定 5 分钟，用一种能够穿透细胞膜的荧光试剂 DAPI（4',6-diamidinophenylindole）（美国 Roche 公司）（贮液 1 mM, H₂O）染色，DAPI（5 μM）溶于 PBS 中，三分钟后即可用荧光显微镜观看，用激发波长 340/380 nm 的光源，在显微镜下可以看到发射波长为 460 nm 的蓝色光。

B) TUNEL 方法

吸走培养基加入固定液（4%的多聚甲醛于 PBS 中，pH 7.4）于 15-25 °C 放置一小时，用 PBS 洗玻璃片上细胞，加入 0.1% Triton X-100（溶于 0.1%柠檬酸钠溶液）冰浴 2 分钟（2-8°C）穿破细胞膜，用 PBS 洗两次，吸走溶液，加入适量 TUNEL 反应液（Roche 公司产品）于样品上，盖上盖玻片，样品放入细胞培养箱孵育 60 分钟，37°C 避光，取出玻璃片，用 PBS 洗三次，放在荧光显微镜下察看，激发波长为 450-500 nm（例如 488 nm），检测波长为 515-565 nm（绿色）。

实施例 1 神经节苷脂类化合物对海马神经元细胞钾离子通道活性的影响

我们首先探索了一些神经节苷脂类化合物对海马神经元细胞钾离子通道电流的影响。本文通过全细胞的实验来研究了一些神经节苷脂类分子对钾通道的电流的影响；依据实验材料和方法所述获得海马神经细胞，我们采用的对海马神经元细胞的刺激电压是从 -90 到 +70 mV，待形成全细胞之后稳定电流 10-15 分钟，向细胞外液中分别加入神经节苷脂类分子 GM1、GM2、GM3，发现神经节苷脂 GM1、GM2、GM3 在相同的浓度时（10 μM）对神经细胞的钾离子通道电流的 I-V 曲线无明显的影响；在相同电压刺激情况下（最大电压刺激时，如图 1 所示），加药前后通道的最大电流也无明显变化。然而，尽管分子结构与神经节苷脂 GM1、GM2、GM3 类似，神经节苷脂 GD1b 却有明显的钾离子通道活性抑制作用。它对海马神经细胞钾离子通道电流的抑制作用具有一定的浓度依赖性（数据未显示），在 10 μM 时的抑制作用可以达到 30%左右。结果显示，本发明的神经节苷脂

GD1b 能够有效调节细胞钾离子通道活性，在制备预防和治疗钾离子通道病的药物方面具有重要应用前景。

5 实施例 2 神经节苷脂 GD1b 对由 Staurosporine (STS) 引起神经细胞凋亡的保护作用

本实施例研究了神经节苷脂类化合物 GD1b 对神经细胞凋亡的保护作用。在本实验中，依据上述材料和方法所述获得海马神经细胞，以 0.3 μM STS 来诱导神经细胞凋亡，在加入凋亡剂之前 30 分钟先分别加入 10 μM GD1b 于细胞培养基中，同时分别以细胞培养基中没有加入相关神经节苷脂类化合物和加入 5 mM 的常规细胞凋亡抑制剂 TEA 分别作空白对照和阳性对照，通过使用 DAPI 染色方法的照片显示，我们发现加入 GD1b 一组的神经细胞核要明显比没有加入 GD1b 的一组的状态要好一些，凋亡小体的数目也要少一些(图 2)，表明神经节苷脂 GD1b 对 STS 诱导的神经细胞的凋亡具有明显的保护作用。对凋亡细胞作统计学计数分析，如图 3 所示，在 0.3 μM 的 STS 浓度诱导细胞凋亡下，10 μM 的微摩尔级 GD1b 即能达到与 5 mM 的毫摩尔级 TEA 接近的抗神经细胞凋亡效果，而在 1.0 μM 更高浓度的 STS 诱导神经细胞凋亡下，10 μM 的微摩尔级 GD1b 的抗凋亡效果更要优于 5 mM 的毫摩尔级 TEA。

综上所述，GD1b 是一种新的高效神经细胞凋亡抑制剂，其通过抑制钾离子通道活性来抗神经细胞凋亡，因此在制备预防或治疗神经退行性疾病的药物中具有潜在应用。另外，GD1b 可以调节细胞钾离子通道活性，由此在制备预防和治疗钾离子通道病的药物方面具有重要应用。由于 GD1b 本身是人体内源物质，因此其不会引起人体不良毒副作用。

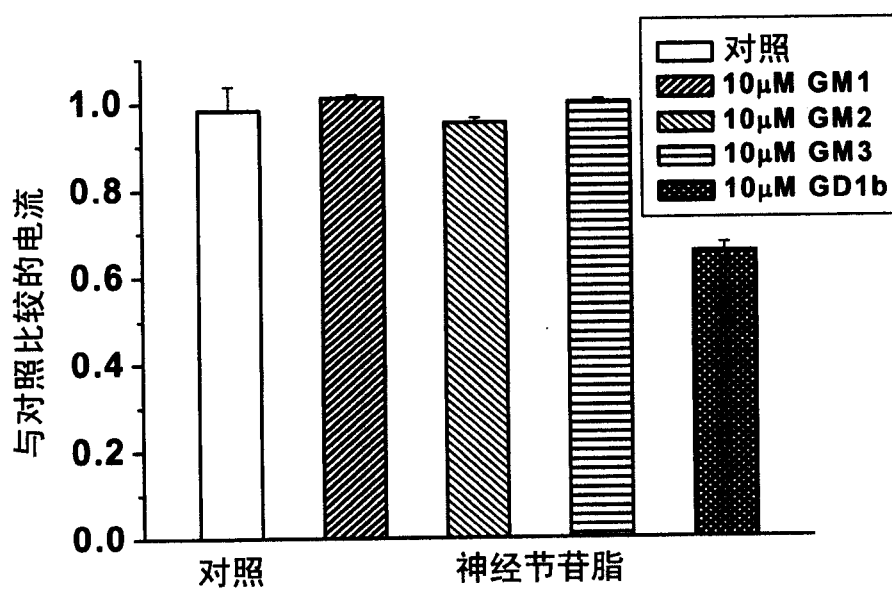


图 1

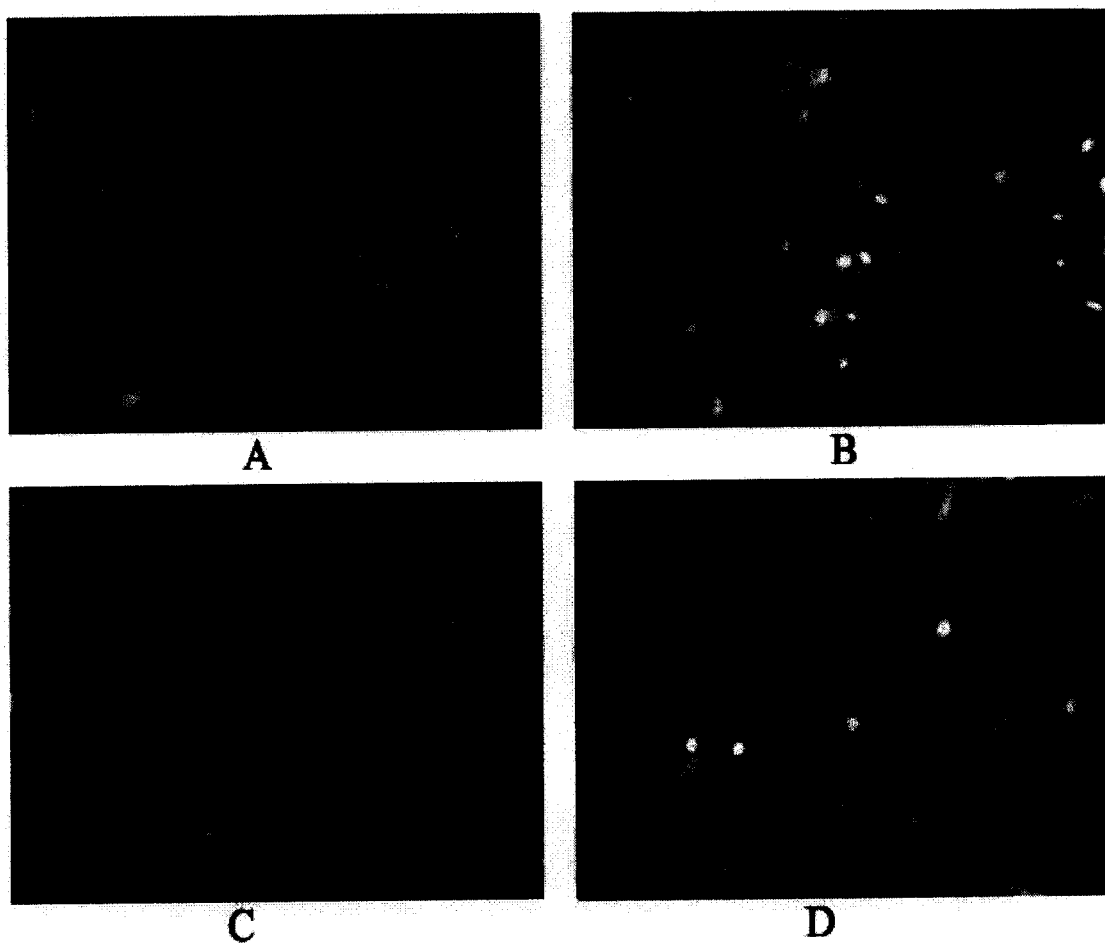


图 2

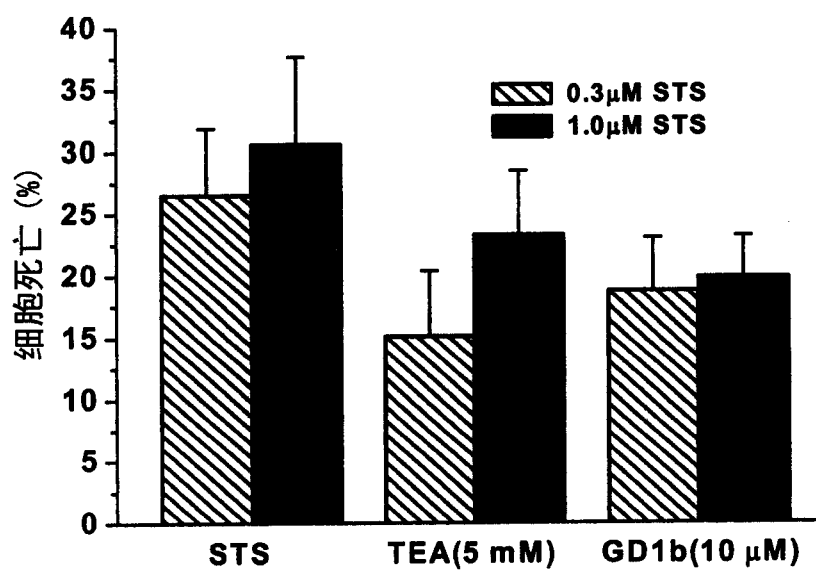


图 3