



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103819483 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410052946. 2

A61P 11/00(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 02. 18

(71) 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路 169 号

(72) 发明人 王剑波 王平安 冯力 王雷琛

张迪

(74) 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任

公司 61202

代理人 谢钢

(51) Int. Cl.

C07D 493/04(2006. 01)

A61K 31/34(2006. 01)

A61P 9/12(2006. 01)

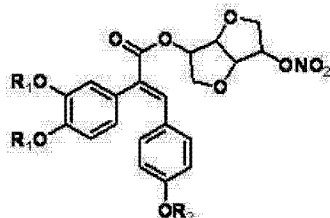
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

防治肺动脉高压的药物及其合成和应用

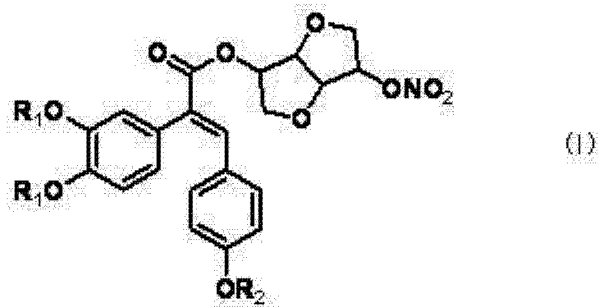
(57) 摘要

防治肺动脉高压的药物及其合成和应用。本发明公开了结构通式(I)所示化合物,其中R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>独立地选自-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。该化合物是将苯乙酸衍生物与苯甲醛衍生物在醋酸酐与碱性催化剂的作用下进行Perkin反应得到中间体,中间体与单硝酸异山梨酯进行缩合反应得到结构通式(I)所示化合物。本发明通过对先导物异白藜芦醇的结构修饰,能增强稳定性,增大其生物利用度,并促使药物长效化,改善了羟基结构的白藜芦醇易氧化,不易保存的缺点。



(I)

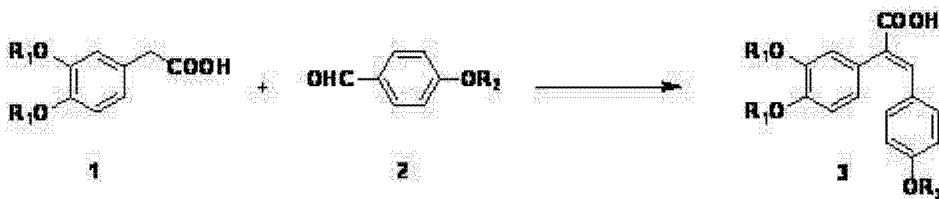
1. 结构通式(I)所示化合物,



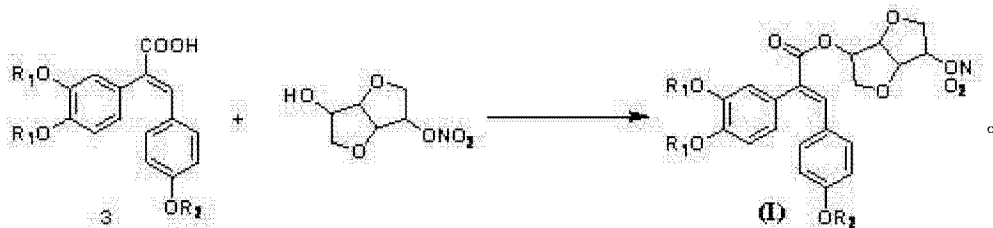
其中,  $R_1, R_2$  独立地选自  $-CH_3, -CH_2CH_3$ 。

2. 权利要求 1 所示化合物的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 苯乙酸衍生物 1 与苯甲醛衍生物 2 在醋酸酐与碱性催化剂的作用下进行 Perkin 反应得到中间体 3;



将中间体 3 与单硝酸异山梨酯进行缩合反应得到结构通式(I)所示化合物



3. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(1)中, 所述碱性催化剂选自三乙胺、吡啶、碳酸钾、碳酸钠。

4. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(2)中, 中间体 3 与单硝酸异山梨酯在二氯亚砷存在下进行缩合反应。

5. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(2)中, 中间体 3 与单硝酸异山梨酯在氯甲酸异丁酯存在下进行缩合反应。

6. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(2)中, 中间体 3 与单硝酸异山梨酯在缩合剂和催化剂存在下进行缩合反应, 所述缩合剂选自 1, 3- 二环己基碳二亚胺、1, 3- 二异丙基碳二亚胺、1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺; 所述催化剂选自 4- 二甲氨基吡啶、1- 羟基苯并三唑、1- 羟基-7- 偶氮苯并三氮唑。

7. 一种药物组合物, 其含有权利要求 1 所述的化合物和药物上可接受的载体或者赋形剂, 所述药物组合物为吸入粉雾剂、片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、颗粒剂或乳剂。

8. 权利要求 1 所述化合物在制备治疗肺动脉高压疾病药物中的应用。

9. 根据权利要求 8 所述应用, 其特征在于: 所述肺动脉高压疾病为慢性阻塞性肺疾病或高原肺水肿。

## 防治肺动脉高压的药物及其合成和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种烷基化异白藜芦醇苄位硝酸酯一氧化氮供体型化合物, 该类化合物可作为预防或治疗肺动脉高压相关疾病药物, 如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)等, 属于药物化学领域。

### [0002] 背景技术

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是临床众多心肺血管疾病发生发展中重要的病理生理环节, 以肺动脉压力和肺血管阻力进行性升高为特征的疾病表现, 它的病理改变包括肺血管内皮细胞损伤, 中膜增生以及外膜的肥厚, 最终导致肺小动脉管腔的阻塞。临床表现为右心功能不全、进行性呼吸困难、胸痛、晕厥、疲劳和周围性水肿等, 是一种治疗难度大, 预后差、患者病死率高的疾病。右心衰竭是所有类型PAH患者致残、致死的共同途径, 而PAH也是右心衰竭的最主要原因。在西方国家, 肺动脉高压已成为逐渐得到重视的一大类心血管疾病。尽管目前已有前列环素(PGI<sub>2</sub>)及其类似物、内皮素(ET)受体拮抗剂、磷酸二酯酶-5(PDE-5)抑制剂等用于PAH的临床治疗, 但PAH患者的1年病死率仍高达15%。其发病机制目前尚未全部阐明, 可能涉及到细胞、体液介质和分子遗传等多个途径及层次, 治疗也无特效的方法。PAH既是慢性阻塞性肺疾病(COPD)引起慢性肺源性心脏病的中心环节, 也是低氧所致高原肺水肿(HAPE)的主要发病机制, 阐明PAH的形成机制以及寻求理想的防治PAH药物一直是COPD、HAPE等疾病防治研究中的热点。

[0003] 现有研究认为: 引起PAH的病理因素很多, 但各类PAH有着共同的病理生理特征, 即血管收缩、原位血栓及肺血管壁重构, 其中肺血管过度收缩是PAH的一个重要特点。这种过度的血管收缩与内皮组织功能失常有关。传统的PAH治疗药物包括抗凝剂、利尿剂、钙通道阻滞剂等。这些治疗药物虽然可以改善PAH患者的症状, 却不能延缓PAH的发展进程。近20年来, 新治疗药物不断出现, 使PAH患者的预后有了明显改善, 存活率也有了较大提高, 1、3、5年存活率分别从68%、48%、34%提高至86%、69%、61%。这些新药物包括前列环素及其类似物、ET-1受体拮抗剂、磷酸二酯酶-5(PDE-5)抑制剂。近年来, 还涌现出大量新颖的靶向治疗药物, 如激酶抑制剂、可溶性鸟苷酸环化酶激活剂等, 逐渐成为PAH领域的研究热点。然而, 在上述新药中, 临床应用存在很多弊端, 如患者需植入中心静脉导管, 并使用便携式输液泵等。此外, 昂贵的价格、严重的不良反应及复杂的给药方式都大大限制了它们的应用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种具有双重协同降低肺动脉高压、改善血液流变学, 抗慢性阻塞性肺疾病、高原肺水肿的烷基化异白藜芦醇苄位硝酸酯一氧化氮供体型化合物;

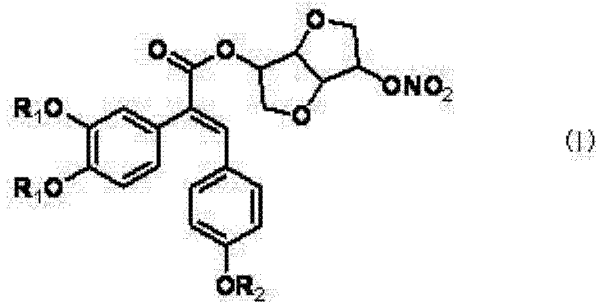
本发明的另一目的在于提供上述烷基化异白藜芦醇苄位硝酸酯一氧化氮供体型化合物的制备方法;

本发明还有一个目的在于提供上述烷基化异白藜芦醇苄位硝酸酯一氧化氮供体型化

化合物的医药用途。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现：

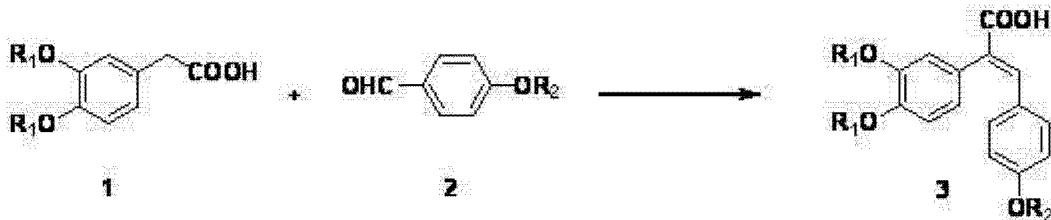
结构通式(I)所示化合物，



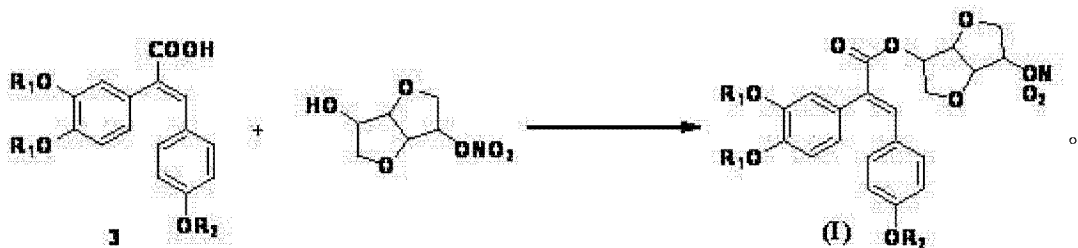
其中,  $R_1, R_2$  独立地选自  $-CH_3, -CH_2CH_3$ 。

[0006] 上述化合物的制备方法,包括以下步骤：

(1) 苯乙酸衍生物 1 与苯甲醛衍生物 2 在醋酸酐与碱性催化剂的作用下进行 Perkin 反应得到中间体 3；



(2) 将中间体 3 与单硝酸异山梨酯进行缩合反应得到结构通式(I)所示化合物



[0007] 上述步骤(1)中,所述碱性催化剂选自三乙胺、吡啶、碳酸钾、碳酸钠。

[0008] 上述步骤(2)中,中间体 3 与单硝酸异山梨酯在二氯亚砷存在下进行缩合反应。

[0009] 上述步骤(2)中,中间体 3 与单硝酸异山梨酯在氯甲酸异丁酯存在下进行缩合反应。

[0010] 上述步骤(2)中,中间体 3 与单硝酸异山梨酯在缩合剂和催化剂存在下进行缩合反应,所述缩合剂选自 1,3-二环己基碳二亚胺、1,3-二异丙基碳二亚胺、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺;所述催化剂选自 4-二甲氨基吡啶、1-羟基苯并三唑、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑。

[0011] 一种药物组合物,其含有上述化合物和药物上可接受的载体或者赋形剂,所述药物组合物为吸入粉雾剂、片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、颗粒剂或乳剂。

[0012] 上述化合物可用于制备治疗肺动脉高压疾病药物,所述肺动脉高压疾病为慢性阻塞性肺疾病或高原肺水肿。

[0013] 本发明的优点:(1)基于 NO 供体研究策略,通过不同连接方法将硝酸酯类 NO 供体与先导物偶合,设计并合成新的 NO 供体型衍生物;(2)通过对先导物异白藜芦醇的结构修

饰,能增强稳定性,增大其生物利用度,并促使药物长效化,改善了羟基结构的白藜芦醇易氧化,不易保存的缺点;(3)通过先导物与 NO 供体药物的结合,有可能在发挥各自药效的同时减少副作用的产生;(4)针对肺血管内皮细胞为 NO 敏感的靶位点,结合先导化合物的药理作用,有望发挥双重协同药效,从而成为防治 PAH 所致的 COPD、HAPE 等疾病的理想药物;(5)本发明合成工艺简单,原料廉价易得。

#### [0014] 说明书附图

图 1 为 BZ-1 在大鼠肺脏组织匀浆液中 NO 释放量;

图 2 为正常组 SD 大鼠肺组织切片;

图 3 为模型组 SD 大鼠肺组织切片;

图 4 为 BZ-1 低剂量组 SD 大鼠肺组织切片;

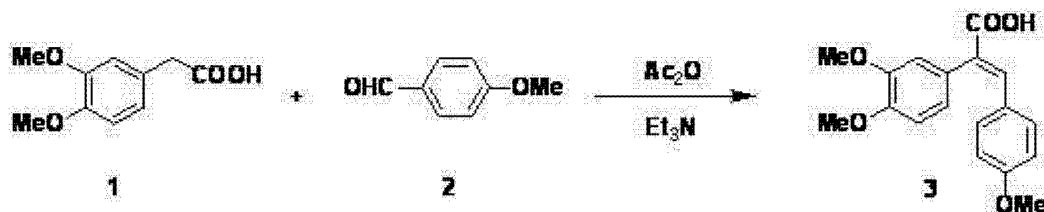
图 5 BZ-1 中剂量组 SD 大鼠肺组织切片;

图 6 BZ-1 高剂量组 SD 大鼠肺组织切片。

### 具体实施方案

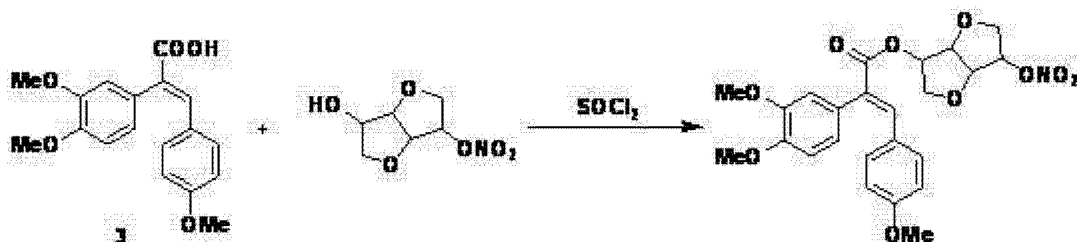
#### [0015] 实施例 1

##### 中间体 3 的制备



取 8.00g 3,4-二甲氧基苯乙酸(1),6.00g 对甲氧基苯甲醛(2),15mL 醋酸酐和 6mL 无水三乙胺,搅拌并加热至 130℃,回流 6h。静置室温后,加入 22.00g 碳酸钾与 90mL 蒸馏水,搅拌均匀后再加热至 130℃回流 0.5h。静置室温后,用浓盐酸调 pH 至 4.0,将固体滤出,固体用甲醇重结晶,收率为 46.65%。

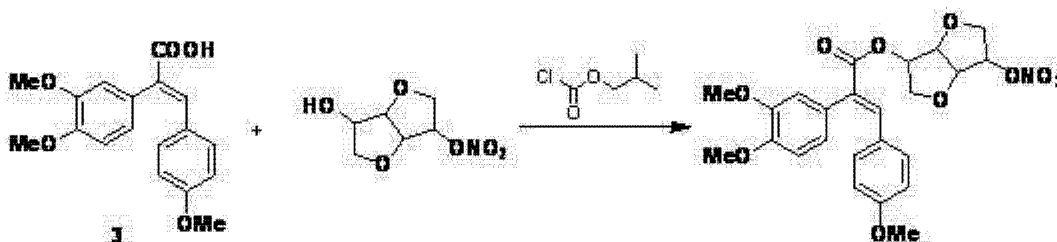
#### [0016] 酰氯法合成目标化合物



取 6.28g 中间体 3 于干净 100mL 单口瓶,冷却至 0℃,在氮气氛围下加入 6mL  $\text{SOCl}_2$ ,搅拌 15min,撤去氮气,于 79℃ 加热回流 2~3h 后,制得中间体 3 的酰氯溶液。晾置室温后,将溶液在 40℃ 旋干备用。同时称取 3.82g 单硝酸异山梨醇酯溶于 20mL 干燥二氯甲烷,冷却至 0℃ 并在氮气氛围下缓慢滴加制好的中间体 3 的酰氯溶液,滴加完毕,冰浴反应 6h。旋干溶剂后,所得样品进行硅胶柱层析,收集洗脱液,纯化后得淡黄色晶体 5.99g,收率为 61.5%。<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$ : 7.75 (s, H, C=C-H), 6.07~7.06 (m, 7H, Ar-H), 5.34~5.36 (br s, 2H, Cy-H), 4.95 (br s, H, Cy-H), 4.52 (br s, H, Cy-H), 3.92~4.14 (m, 7H,  $\text{OCH}_3$ , Cy-H), 3.78~3.91 (m, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 745, 1017, 1021, 1016, 1202, 1229, 1247, 1288, 1346, 1423, 1459, 1469,

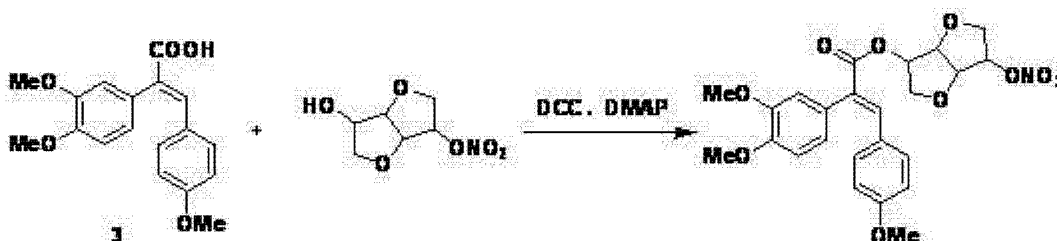
1482, 1545, 1577, 1636, 1790 ;HRMS ( $[M+H]^+$ ): 488. 20。

[0017] 混合酸酐法合成目标化合物



取 6.28g 中间体 3 于干净 100mL 单口瓶,冷却至 0℃,在氮气氛围下加入 2.54mL 氯甲酸异丁酯,搅拌 15min。称取 3.82g 单硝酸异山梨醇酯溶于 20mL 干燥二氯甲烷,在氮气氛围下缓慢滴加至反应液,滴加完毕后继续反应 12h。旋干溶剂,所得样品进行硅胶柱层析,收集洗脱液,纯化后得淡黄色晶体 6.15g,收率为 63.2%。

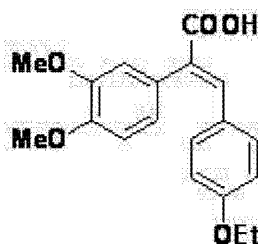
[0018] 缩合法合成目标化合物



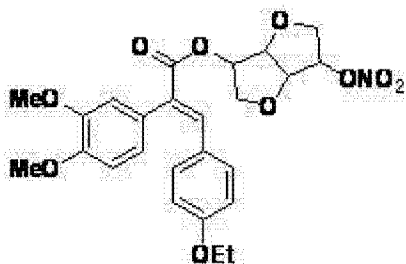
取 6.28g 中间体 3 溶于 20 mL 干燥的二氯甲烷中,冷却至 0℃。在氮气氛围下,加入 4.96g 缩合剂 DCC (N, N-二环己基亚胺)和 0.24g 催化剂 DMAP (4-N, N-二甲基吡啶),此温度下搅拌 15 min,再取 3.82g 单硝酸异山梨醇酯,室温搅拌 24h,抽滤,所得滤液减压蒸干,所得样品进行硅胶柱层析,收集洗脱液,纯化后得淡黄色晶体 6.14g,收率为 63.0%。

[0019] 实施例 2

取 8.00g 3,4-二甲氧基苯乙酸(1),6.00g 对甲氧基苯乙醛(2),15mL 醋酸酐和 6mL 无水吡啶,搅拌并加热至 130℃,回流 6h。静置室温后,加入 22.00g 碳酸钾与 90mL 蒸馏水,搅拌均匀后再加热至 130℃回流 0.5h。静置室温后,用浓盐酸调 pH 至 4.0,将固体滤出,固体用甲醇重结晶,得到如下化合物,收率为 46.65%。



[0020] 上述化合物进一步采取与实施例 1 类似的缩合方法可以制备得到如下化合物,



**[0021] 实施例 3: 实施例 1 制备得到目标化合物的药理实验及结果**

1. 体外一氧化氮释放量测定: 硝酸酯类化合物在酸性环境和有过量的巯基化合物存在的条件下, 能够释放出 NO。NO 经氧化生成的亚硝酸根离子  $\text{NO}_2^-$ , 通过 Griess 法测定其浓度, 间接反映了化合物的一氧化氮释放能力, 此方法简便、快速、重现性好。本实验采用此法测定目标化合物 BZ-1 体外 NO 释放量, 以考察其释放 NO 的效果, 对照药物为单硝酸异山梨酯、硝普钠。利用亚硝酸根离子  $\text{NO}_2^-$  能够与 Griess 试剂发生重氮化、偶合反应, 生成紫红色产物, 在 540nm 波长处测其吸收度值, 间接测定 NO 释放量, NO 释放环境为大鼠肺组织匀浆液环境。

**[0022] 实验方法:**

Griess 试剂的配制: 称取 1.0014g 对氨基苯磺酸, 用 5% (体积比) 的磷酸溶液定容至 100mL, 配制成为 1% 的对氨基苯磺酸溶液; 称取 0.1046g N-(1-萘基)-乙二胺, 用蒸馏水定容至 100mL, 配制成为 0.1% 的 N-(1-萘基)-乙二胺溶液。两个显色剂使用前配制, 并避光放置。

**[0023]** 大鼠肺脏匀浆液的制备: 取出大鼠组织样品(肺脏), 迅速称重, 按照 1:10 重量体积比(g/mL), 加入 PBS (1mol/L, pH=4), 微型匀浆器研磨成匀浆, 3000r/min 离心 25min, 取上清液 -28℃ 保存。

**[0024]** 体外 NO 释放标准曲线的绘制: 精密称取 345mg 干燥的亚硝酸钠(5mmol), 用蒸馏水定容至 50mL, 稀释配制成浓度为  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 亚硝酸钠储备液。精密量取标准储备液, 配制成浓度为 0.02, 0.025, 0.032, 0.05, 0.1mmol/L 的亚硝酸钠标准工作液。分别吸 2mL 每个浓度的标准工作液, 与 2mL Griess 试剂(1% 的对氨基苯磺酸溶液 1.0mL, 0.1% 的 N-(1-萘基)-乙二胺溶液 1.0 mL) 混合均匀, 放置 15min 后于 540nm 下测定其吸光度值。经线性回归, 得到标准曲线方程:  $A = 7.0021C - 0.0089$ ,  $R^2 = 0.9819$ 。A 为吸光度, C 为 NO 浓度, 结果表明亚硝酸钠浓度在 0.02-0.10 mmol/L 范围内浓度与吸光度之间有良好的线性关系。

**[0025]** 称取 0.5mg 目标化合物 BZ-1, 其化学名称为 (E)-6-(硝基氧基)六氢 [3,2-b] 呋喃-3-基-2-(3,4-二甲氧基苯基)-3-(4-甲氧基苯基)丙烯酸酯, 用少量 DMSO 溶解, 用 PBS (1mol/L, pH=4) 定容于 100ml 容量瓶中, 移取 5mL 上述溶液置于 100mL 的容量瓶中, 作为待测溶液, 浓度为 0.25mg/L。硝普钠与单硝酸异山梨酯同法处理, 配成 0.25mg/L 的待测对照品溶液。分别吸取上述样品液各 1.0mL 至密封瓶中, 另取 PBS 溶液 1.0mL 至密封瓶作为空白对照, 分别加入大鼠肺脏匀浆液 0.1mL, PBS (1mol/L, pH=4) 8.9 mL, 涡旋混合均匀, 于 37℃ 水浴中孵育, 分别在 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 180, 240, 250min 用注射器取反应液 1mL, 加入 1mL 的 Griess 试剂(1% 对氨基苯磺酸 0.5mL, 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺 0.5mL), 混合均匀, 放置 10min, 以试剂空白调节零点, 于 540nm 处测各样品溶液的吸光度, 计算吸收度  $A = A_{\text{样}} - A_{\text{空}}$ , 由标准曲线方程得出对应  $\text{NO}_2^-$  浓度, 即为样品释放 NO 的浓度, 结果见说明书图 1 所示。从图中可以看出目标化合物 BZ-1 随孵育时间延长, NO 释放增加, 至 180min 释放量达到最高, 其中对照品硝普钠 NO 释放量在 250min 达最高, BZ-1 释放量高于单硝酸异山梨酯, 但弱于硝普钠。

**[0026] 2. 体内实验, 药理活性测定**

健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重(220±30)g, 由第四军医大学实验动物中心提供, 生产合格证号: SCXK (陕) 字第 2008-002 号。分笼饲养, 保证 12-12 小时昼夜循环, 自由摄食

摄水。室温 26℃~28℃,湿度 60%~70%,保证通风。

[0027] 仪器试药:大鼠 IVC (独立换气笼盒) 饲养系统(上海绍丰实验动物设备有限公司);LG-R-80A 血液粘度仪(北京中勤世帝科学仪器有限公司);右颈外静脉插管导管(PE10, Becton Dickinson, USA); Axioskop-40 蔡司图像采集处理系统(德国, MIC00152);压力传感器(GEFRAN-KS, Italy);RM-6280 型智能八道生理记录及分析处理系统(成都仪器厂);Sartorius 电子天平(德国,感量 0.1mg), ka T10-Basic 匀浆器(德国);

野百合碱(monocrotaline, MCT, Sigma 公司);一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(南京建成公司);其他化学试剂(天津化学试剂一厂)。

[0028] 动物分组:大鼠置于 IVC (独立换气笼盒) 饲养系统,人工控制昼夜时间 12h,温度 20.3~23.1℃,压差 20Pa (进风 180,出风 160),相对湿度 40~50%,预适应一周后开始实验。将 SD 大鼠 50 只,随机均分为正常对照组、肺动脉高压模型组(PAH)、BZ-1 低、中、高剂量组。正常对照组一次性 ip 等体积生理盐水,其他各组一次性 ip 野百合碱(MCT) 60 mg/kg (Hanhua Gao, Can Chen, Shi'an Huang, Bo Li. Quercetin attenuates the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Journal of Biomedical Research. 2012, 26(2): 98-102.)。次日干预组分别 ip BZ-1 5、15、25mg/kg,正常对照组及 PAH 组 ip 等体积生理盐水,每天一次,持续 4 周。

[0029] 检测指标:实验终点,测定各组大鼠平均肺动脉压(mPAP)、右心室肥厚指数(RVHI)、血液流变学指标以及血清、肺组织匀浆中 NO 浓度和 NOS 活力;HE 染色计算肺小动脉血管厚度与血管外径之比(WT%)和管壁面积占血管总面积的百分比(WA%)。

[0030] 平均肺动脉压和右心肥大指数检测:

实验大鼠饲养至规定时间后,用 3% 戊巴比妥钠麻醉后,仰卧固定后做颈正中切口,分离右颈外静脉并做 V 型小切口,插入充盈 1% 肝素溶液 1mm 的聚乙烯导管,经右侧颈外静脉,缓慢推至右心室,然后进入肺动脉,导管外端连接压力传感器和生理记录仪,根据生理仪所显示的压力波型变化判断导管的位置。分别记录 10、30、60min 时的肺动脉压,取其平均值为 mPAP。测压完毕后,取心脏并去除心房,分离右心室(RV)和左心室+室间隔(LV+S),洗去血液,用滤纸吸干后分别称重,计算反应右心肥大程度的 RV/(LV+S)比值,结果如表 1 所示。

表 1 各组大鼠平均肺动脉压和右心肥大指数检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

| 分组情况      | 剂量<br>(mg/kg) | 平均肺动脉压<br>(mPAP,<br>mmHg) | 右心肥大指<br>数(RV/LV+S)     |
|-----------|---------------|---------------------------|-------------------------|
| 正常对照组     | —             | 20.42±1.92                | 0.24±0.03               |
| 模型组       | —             | 41.05±2.38 <sup>a</sup>   | 0.39±0.04 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 低剂量组 | 5             | 39.54±2.14 <sup>a</sup>   | 0.38±0.05 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 中剂量组 | 15            | 38.26±2.10 <sup>ab</sup>  | 0.36±0.05 <sup>ab</sup> |
| BZ-1 高剂量组 | 25            | 33.29±2.78 <sup>ac</sup>  | 0.33±0.05 <sup>ac</sup> |

注:与正常组比较, <sup>a</sup>P<0.05;与模型组比较, <sup>b</sup>P<0.05, <sup>c</sup>P<0.01。

[0031] 结果显示受试药物 BZ-1 的中、高剂量能显著降低模型大鼠的平均肺动脉压与右



心肥大指数( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与模型组相比,BZ-1 低剂量显示出降低平均肺动脉压和右心肥大指数的效果,但两者无显著性差异( $P>0.05$ )。

#### [0032] 大鼠血液流变学指标及红细胞聚集指数的检测

将测定肺动脉压后的大鼠,腹主动脉取血 2 mL 于加有 400  $\mu$ L1%肝素钠溶液的抗凝管中,混匀后取 1 mL 检测全血粘度及红细胞聚集指数,结果如表 2 所示。

表 2 各组大鼠全血粘度值红细胞聚集指数的检测结果 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 分组情况      | 剂量<br>(mg/kg) | 全血粘度值                         |                               |                                |                                | 红细胞聚集<br>指数                    |
|-----------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|           |               | 200mPas                       | 30mPas                        | 5mPas                          | 1mPas                          |                                |
| 正常对照组     | —             | 4.37 $\pm$ 0.61               | 6.64 $\pm$ 0.82               | 13.90 $\pm$ 1.52               | 37.60 $\pm$ 3.95               | 8.65 $\pm$ 0.95                |
| 模型组       | —             | 6.72 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>  | 9.28 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>  | 20.06 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>  | 54.53 $\pm$ 7.64 <sup>a</sup>  | 11.87 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 低剂量组 | 5             | 6.25 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>  | 9.19 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>  | 19.90 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup>  | 54.21 $\pm$ 5.01 <sup>a</sup>  | 10.98 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 中剂量组 | 15            | 5.92 $\pm$ 0.70 <sup>ab</sup> | 8.24 $\pm$ 0.98 <sup>ab</sup> | 17.46 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup> | 48.89 $\pm$ 3.36 <sup>ab</sup> | 10.11 $\pm$ 1.55 <sup>ab</sup> |
| BZ-1 高剂量组 | 25            | 5.59 $\pm$ 0.87 <sup>ac</sup> | 7.94 $\pm$ 0.78 <sup>ac</sup> | 16.80 $\pm$ 1.56 <sup>ac</sup> | 47.45 $\pm$ 4.62 <sup>ac</sup> | 9.34 $\pm$ 2.22 <sup>ac</sup>  |

注:与正常组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$ 。

[0033] 结果显示:在全血粘度值的不同切变率下,模型组正常对照组相比均有显著性差异( $P<0.05$ ); BZ-1 中、高剂量组与模型组相比各数值均有所降低,有显著性差异( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); BZ-1 低剂量组与模型组相比各数值有所降低,但无显著性差异( $P>0.05$ )。说明 BZ-1 中、高剂量可显著降低模型大鼠的全血粘度值和红细胞聚集指数。

#### [0034] 大鼠血清和肺组织匀浆中 NO 浓度、NOS 活力的测定

**NO 水平的检测** NO 遇氧及水生成硝酸盐及亚硝酸盐,后二者遇硝酸盐显色剂可生成淡红色偶氮化合物,通过比色可间接测知 NO 浓度。取大鼠血清及肺组织匀浆离心上清液,按照 NO 测试盒说明书的操作步骤进行测定,未检测的样本置于  $-4^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

**[0035] NOS 活力的测定** NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物,在 530nm 波长下测定吸光度,根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。取大鼠血清及肺组织匀浆离心上清液,按照 NOS 测定试剂盒说明书的操作步骤进行测定,未检测的样本置于  $-4^{\circ}\text{C}$  冷冻保存,结果如表 3 所示。

表 3 各组大鼠血清和肺组织匀浆中 NO 浓度、NOS 活力的测定 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 分组情况      | 剂量<br>(mg/kg) | 血清 NO 浓度<br>( $\mu\text{mmol/L}$ ) | 血清 NOS 活<br>力 (U/mL)           | 肺组织 NO 浓度<br>( $\mu\text{mmol/gprot}$ ) | 肺组织 NOS<br>活力<br>(U/mgprot)    |
|-----------|---------------|------------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|
| 正常对照组     | —             | 34.61 $\pm$ 2.20                   | 27.47 $\pm$ 2.90               | 32.40 $\pm$ 4.06                        | 23.86 $\pm$ 4.51               |
| 模型组       | —             | 18.68 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>      | 15.29 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>  | 18.73 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>           | 11.36 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 低剂量组 | 5             | 18.94 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>      | 16.15 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>  | 18.94 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>           | 12.53 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>  |
| BZ-1 中剂量组 | 15            | 22.32 $\pm$ 2.65 <sup>ab</sup>     | 18.04 $\pm$ 1.76 <sup>ab</sup> | 23.30 $\pm$ 4.38 <sup>ab</sup>          | 13.89 $\pm$ 1.32 <sup>ab</sup> |
| BZ-1 高剂量组 | 25            | 25.94 $\pm$ 5.31 <sup>ac</sup>     | 21.19 $\pm$ 1.93 <sup>ac</sup> | 25.75 $\pm$ 6.31 <sup>ac</sup>          | 17.78 $\pm$ 2.34 <sup>ac</sup> |

注:与正常组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$ 。

[0036] 结果显示 :BZ-1 中、高剂量组与模型组相比,显著提升 SD 大鼠的血清及肺组织匀浆的 NO 含量及 NOS 的活力 ( $P<0.05, P<0.01$ ); BZ-1 低剂量组与模型组相比的统计结果无显著性差异 ( $P>0.05$ ),但从对 NO 含量和 NOS 活力影响来看,BZ-1 低剂量组相比模型组有所提升。

[0037] 各组大鼠肺血管组织病理学检查

大鼠采血之后,取大鼠右肺用 10%中性福尔马林液(甲醛:生理盐水 = 1: 9)固定一周,沿肺门横断取材,石蜡包埋切片,HE 染色;显微镜下观察结合图像分析软件测定血管增厚情况,每组切片随机选择 5 张,测定肺细小动脉管壁厚度占血管外径的百分比(WT%) 和管壁面积与血管总面积的百分比(WA%),结果如表 4 所示。

表 4 各组大鼠肺血管组织 WT%、WA%测定结果 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

| 分组情况      | 剂量<br>(mg/kg) | 肺小动脉管壁厚度<br>与外径之比 (WT/<br>%) | 管壁面积与血管<br>总面积的百分比<br>(WA%) |
|-----------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
| 正常对照组     | —             | 31.04±1.50                   | 42.83±2.54                  |
| 模型组       | —             | 49.11±1.36 <sup>a</sup>      | 71.72±3.39 <sup>a</sup>     |
| BZ-1 低剂量组 | 5             | 48.50±1.54 <sup>a</sup>      | 70.38±3.42 <sup>a</sup>     |
| BZ-1 中剂量组 | 15            | 47.41±1.34 <sup>ab</sup>     | 68.66±3.28 <sup>ab</sup>    |
| BZ-1 高剂量组 | 25            | 45.57±1.65 <sup>ac</sup>     | 65.27±2.69 <sup>ac</sup>    |

注:与正常组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$ 。

[0038] 结果显示: WT/%、WA/% 值经统计学处理,BZ-1 中、高剂量组与模型组相比有显著性差异 ( $P<0.05, P<0.01$ ),说明 BZ-1 的中、高剂量可以有效地扩张模型大鼠的肺血管;BZ-1 低剂量组与模型组的统计结果显示相近,二者之间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

[0039] 各组大鼠肺血管组织病理学检查结果:形态学观察发现,肺组织病理切片中,正常组肺泡结构清晰,肺泡上皮完整,泡壁毛细血管无扩张充血,腔内无渗出物,间质少量炎症细胞浸润,肺小动脉血管壁无增厚,血管腔无狭窄,无小血管炎(图 2)。而模型组肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄甚至闭塞,部分肺组织炎性细胞浸润非常明显,并伴小血管炎,肺泡毛细血管扩张充血,腔内有水肿液,呈肺炎样改变(图 3)。BZ-1 中、高剂量组干预后肺小动脉及右心室壁增厚减轻,肺组织炎性细胞浸润减轻。腔内几乎无水肿液,仅呈轻度肺炎样改变(分别见说明书附图 5、6)。BZ-1 低剂量组与模型组相比,仍可见小动脉血管壁轻度增厚,血管腔略狭窄,伴小血管炎,部分肺组织有较多的炎症细胞浸润,肺泡毛细血管扩张充血,腔内有水肿液,呈轻度肺炎样改变(图 4),说明该剂量组不能有效的对抗 MCT 所致的肺损伤病理改变。

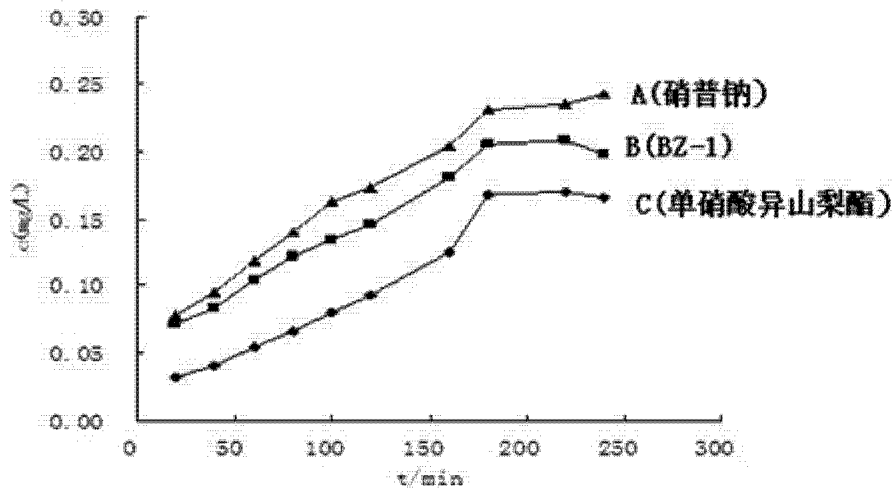


图 1

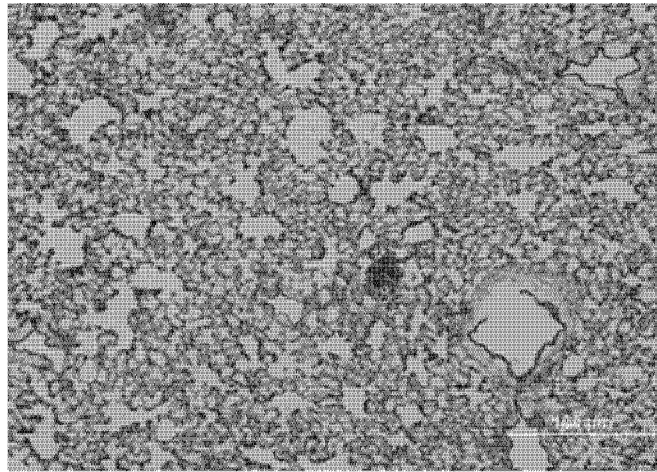


图 2

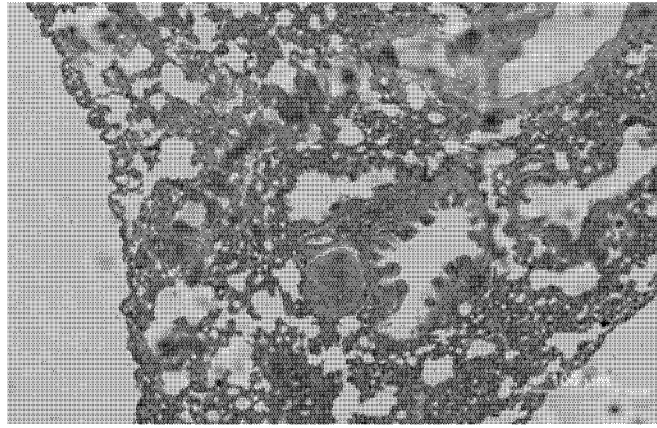


图 3



图 4

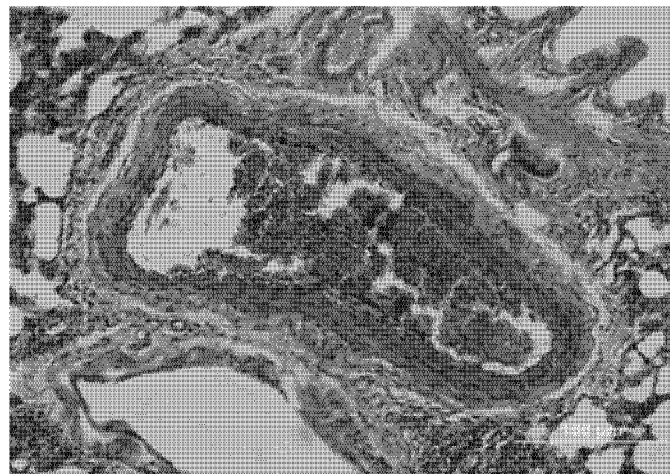


图 5

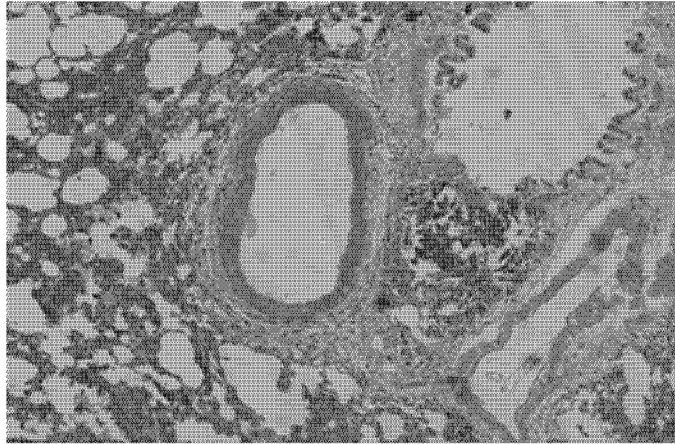


图 6