

[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 200810121523.6

[51] Int. Cl.

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101380318A

[22] 申请日 2008.10.16

[21] 申请号 200810121523.6

[71] 申请人 伍义行

地址 310018 浙江省杭州市下沙高新园区学
源街258号中国计量学院

[72] 发明人 伍义行 郝冰洁 张晓梦

[74] 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公司
代理人 王洪新

权利要求书2页 说明书12页

[54] 发明名称

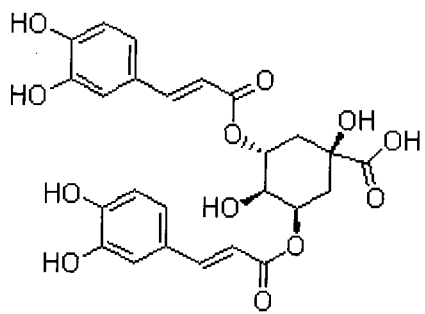
异绿原酸类化合物及不同组合在肝炎治疗上的应用

[57] 摘要

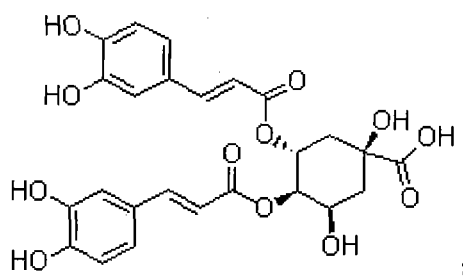
本发明涉及一种化合物在肝炎治疗上的应用。目的是提供的提供一种异绿原酸类化合物应具有较强的抗乙肝病毒和抗炎保肝作用，并且来源广泛、资源丰富，提取工艺简便。技术方案是：包括异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C中的一种或一种以上按任意配比组合的异绿原酸类化合物，以及该组合物在制备抗乙肝病毒、抗炎保肝的药物中应用。

1、以下一种或一种以上按任意配比组合的异绿原酸类化合物在制备抗乙肝病毒、抗炎保肝的药物中应用：

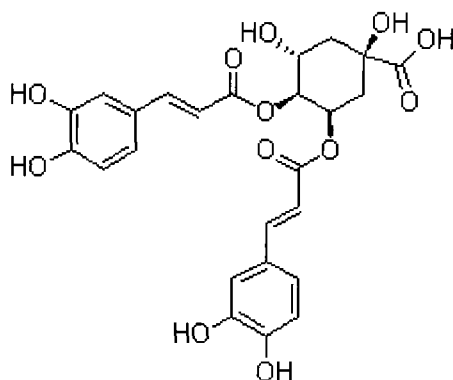
1) 异绿原酸 A (Isochlorogenic acid A)：即 3, 5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-Dicaffeoylquinic acid)，分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$ ，分子量 516.45，



2) 异绿原酸 B (Isochlorogenic acid B)：即 3, 4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-Dicaffeoylquinic acid)，分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$ ，分子量 516.45，



3) 异绿原酸 C (Isochlorogenic acid C)：即 4, 5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-Dicaffeoylquinic acid)。分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$ ，分子量 516.45，



2、权利要求 1 所述的一种异绿原酸类化合物的提取方法，其特征在于所述的异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 之间的比例为 26 : 19 : 31。

3、权利要求 1 所述的一种异绿原酸类化合物的提取方法，其特征在于该

异绿原酸类化合物从六棱菊、金银花、旋覆花、苍耳中的任一种中药材中提取。

4、根据权利要求 2 所述的一种异绿原酸类化合物的提取方法，其特征在于该异绿原酸类化合物按照如下步骤制备：

1) 取干燥药材，经乙醇常压回流提取三次，经提取液合并后，减压浓缩回收乙醇，制得黑绿色浸膏；

2) 将制得的黑绿色浸膏用水溶解后，用乙酸乙酯反复萃取，直到除去亲脂性成分；

3) 将除去亲脂性成分的水溶液经稀盐酸酸化后用正丁醇分割，在将反应后的正丁醇部分水洗至中性，减压浓缩得提取物。

4) 提取物溶解在蒸馏水里，通过 Sephadex LH-20 柱层析，用 30% 甲醇洗脱产生爬坡梯度不同的 8 个部位。

5) 对爬坡梯度在第 6 位上的溶液在经过 Sephadex LH-20 柱反复层析后，用 30% 甲醇洗脱，分离出 3 个化合物，即：3, 4-二咖啡酰奎尼酸(26 mg)、3, 5-二咖啡酰奎尼酸(19 mg) 和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸(31 mg)。

异绿原酸类化合物及不同组合在肝炎治疗上的应用

技术领域

本发明涉及一种化合物在肝炎治疗上的应用，尤其是异绿原酸类化合物及不同组合在肝炎治疗上的应用。

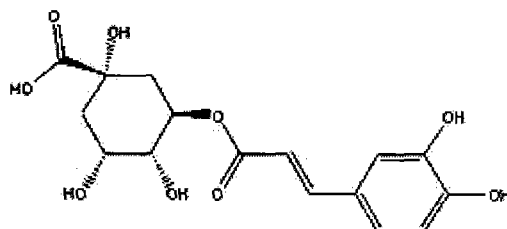
背景技术

肝炎是肝脏发生炎性病变的总称，根据病因可分为病毒性、酒精性、药源性和自身免疫性肝炎等，以病毒性肝炎为多见，其中以乙型肝炎为主，丙型肝炎次之。据统计，目前全世界约有 3 亿乙肝病毒携带者，丙型肝炎在某些特殊的人群中的感染率高达 70%。中国是肝病发生率较高的国家之一，每年约有 30 万人死于肝病。目前我国乙肝感染者约 1 亿人，病毒携带者高达 1.3 亿，占总人口的 10%。乙肝传播途径复杂，发病率高，病程长，易反复，有相当一部分向慢性化发展，严重者发展为肝硬化，甚则肝癌，严重危害人民健康。

目前对肝炎的发生机制和病理过程仍缺乏足够认识，这给肝炎治疗和新药研制带来了困难，因此抗肝炎药物大多数仅起辅助或对症治疗作用，至今尚无特效治疗药物问世。目前临床常用的抗肝炎药物大体分为三类：（1）抗病毒药，如干扰素（IFN）、拉米夫定（Lamivudine, 3TC）、泛昔洛韦（famciclovir）、阿德福韦（adefovir）、恩他卡韦（entacavir, BMS-200475）等可抑制乙肝病毒复制，用于治疗慢性乙肝；（2）免疫调节剂，如胸腺肽、左旋咪唑和免疫核糖核酸可提高机体免疫，肾上腺皮质激素具有非特异抗炎作用和免疫抑制作用，可用于治疗自身免疫性活动性肝炎；（3）保肝药，即保护肝细胞功能（或抗肝细胞损伤）的药物，如水飞蓟素、甘草甜素、马洛替酯等。肝细胞损伤是各型肝炎共同的病理基础，治疗与纠正肝细胞损伤是各型肝炎治疗的主要措施之一，因此保肝药是治疗各种肝炎最常用的药物。

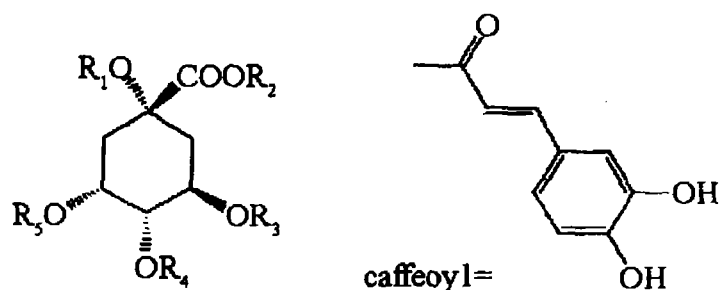
乙型肝炎是由乙型肝炎病毒（HBV）引起的一种危害极大的世界性流行的传染病，据统计目前全世界约有 3.5 亿 HBV 携带者，而中国是 HBV 高感染地区，HBV 携带者占总人口比例高达 10%~15%，其中慢性乙肝患者约 3000 万例，每年约有 35 万人死于慢性乙肝相关疾病。从卫生部公布的数据来看，目前乙肝发病率仍旧保持居高和增长势头。HBV 主要通过血液和性接触传播，母婴垂直传播也很常见。成人感染 HBV 多表现为无症状感染或急性肝炎，约有 15%~20% 患者转为慢性携带者和慢性患者，部分慢性乙肝患者进一步转化为肝硬化和原发性肝细胞性肝癌。虽然目前 HBV 基因工程亚单位疫苗可控制感染的流行，但大量已感染 HBV 的携带者和慢性患者依然存在。尽管国内外科学家研制了一些新的抗乙肝药物可一定程度控制病情发展，但其疗效距离清除病毒感染、治愈绝大多数乙肝患者及病毒携带者的目标尚有很长的距离。因此，继续研制高效低毒的抗乙肝药物仍是当务之急。

绿原酸（Chlorogenic acid，简称 CA），是由咖啡酸（Caffeic acid）与奎尼酸（Quinic acid，1-羟基六氢没食子酸）生成的缩酚酸，是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物。其中的 3-咖啡酰奎尼酸结构式如下式表示：



根据咖啡酰在奎尼酸上的结合部位和数目不同，目前已从植物中分离鉴定了 4 种单咖啡酰奎尼酸：1-咖啡酰奎尼酸、3-咖啡酰奎尼酸、4-咖啡酰奎尼酸和 5-咖啡酰奎尼酸；6 种二咖啡酰奎尼酸：1, 3-二咖啡酰奎尼酸、1, 4-二咖啡酰奎尼酸、1, 5-二咖啡酰奎尼酸、3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-

二咖啡酰奎尼酸；3种三咖啡酰奎尼酸：1,3,5-三咖啡酰奎尼酸、1,4,5-三咖啡酰奎尼酸和3,4,5-三咖啡酰奎尼酸；以及1种四咖啡酰奎尼酸：1,3,4,5-四咖啡酰奎尼酸。研究表明在绿原酸的各种异构体中，以二咖啡酰奎尼酸类化合物的药理活性最为显著，具有抗氧化、抗炎、抗病毒（疱疹病毒和爱滋病毒）、抗纤维化、抑制平滑肌收缩、降血脂等多种药理作用，极具药物开发和临床应用价值。绿原酸类化合物广泛存在于植物界如金银花、旋覆花、苍耳等中药中，资源丰富。各类咖啡酰奎尼酸结构示意图如下：



异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）不仅存在于六棱菊中，还广泛存在于金银花、旋覆花、苍耳等中药中，资源丰富。文献检索表明，国内外尚无这3个酚类成分抗乙肝作用的研究报道。

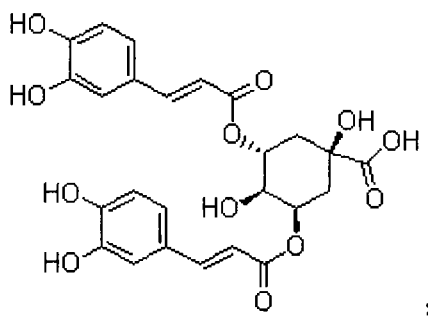
发明内容

本发明的目的是克服上述背景技术的不足，提供一种异绿原酸类化合物的应用，该化合物应具有较强的抗乙肝病毒和抗炎保肝作用，并且来源广泛、资源丰富，提取工艺简便。

本发明提供的技术方案是：以下一种或一种以上按任意配比组合的异绿原酸类化合物在制备抗乙肝病毒、抗炎保肝的药物中应用：

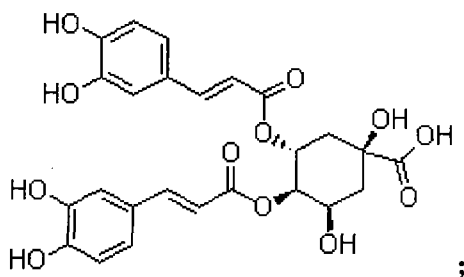
1) 异绿原酸 A (Isochlorogenic acid A)：即 3,5-二咖啡酰奎尼酸

(3,5-Dicaffeoylquinic acid), 分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 分子量 516.45,



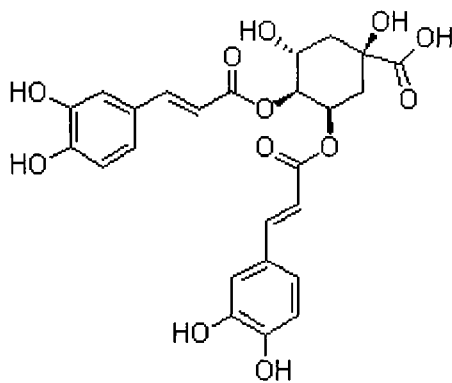
2) 异绿原酸 B (Isochlorogenic acid B): 即 3, 4-二咖啡酰奎宁酸

(3,4-Dicaffeoylquinic acid), 分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 分子量 516.45,



3) 异绿原酸 C (Isochlorogenic acid C): 即 4, 5-二咖啡酰奎宁酸

(4,5-Dicaffeoylquinic acid)。分子式 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 分子量 516.45,



所述的异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 之间的比例为 26 : 19 : 31。

所述的异绿原酸类化合物的提取方法, 该异绿原酸类化合物可从外购获得的六棱菊、金银花、旋覆花、苍耳中的任一种中药材中提取。

所述的异绿原酸类化合物的提取方法, 该异绿原酸类化合物按照如下步骤制备 (以六棱菊干燥药材为例):

1) 取六棱菊干燥药材 20 kg, 经浓度为 95%乙醇常压回流提取三次, 经提取液合并后, 减压浓缩回收乙醇, 制得黑绿色浸膏;

2) 将制得的黑绿色浸膏称量为 915 克后, 用水溶解后, 用乙酸乙酯反复萃取, 直到除去亲脂性成分;

3) 将除去亲脂性成分的水溶液经稀盐酸酸化后用正丁醇分割, 在将反应后的正丁醇部分水洗至中性, 减压浓缩得棕黑色粉末 320 g, 即为六棱菊提取物。

4) 取 2.0 g 冻干的六棱菊提取物, 溶解在蒸馏水里, 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 用 30%甲醇洗脱产生爬坡梯度不同的 8 个部位。

5) 对爬坡梯度在第 6 位上的溶液在经过 Sephadex LH-20 柱反复层析后, 用 30%甲醇洗脱, 分离出 3 个化合物, 即: 3, 4-二咖啡酰奎尼酸(26 mg)、3, 5-二咖啡酰奎尼酸(19 mg) 和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸(31 mg)。

所述的金银花、旋覆花、苍耳的提取方法与六棱菊的提取方法相同。

药理实验证明: 异绿原酸类化合物单一成分及其不同组合物具有显著的抗乙肝作用(抑制 HBV-DNA 复制, 尤其是抑制 HBV-cccDNA 的复制, 改善 HBV 引起的病理性损伤)、保肝作用(包括改善 D-GalN, CCl₄ 和醋氨酚等引起的肝损伤)和免疫调节作用(包括改善 BCG-LPS 诱导的免疫性肝损伤等)。

本发明提供的异绿原酸类化合物具有相当强的抗乙肝病毒和抗炎保肝作用, 尤其是在治疗肝炎上的应用, 包括保肝、抗炎和免疫调节作用, 特别是在体内外能显著抑制乙型肝炎病毒的复制, 并显著改善乙肝病毒、毒物和药物引起的肝脏病理性损伤; 可用于治疗肝炎(包括抗乙肝药物或保肝药物)药物开发利用。而且, 异绿原酸类化合物广泛地存在于六棱菊、金银花、旋覆花、苍耳等植物类中药中, 资源丰富; 并且提取工艺简便易行。

具体实施方式

本发明发现异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）单一成分、不同组合物和作为主要药效成分的植物提取物，均具有抗乙肝活性（包括抑制HBV DNA复制，降低乙肝表面抗原等）和保肝活性，显示该类化合物具有使乙肝表面抗原转阴、抑制乙肝病毒复制的功能，从而能够开发出治疗乙型肝炎的药物，其中异绿原酸最优组合物药效最强（抗HBV作用优于拉米夫定，保肝作用优于水飞蓟宾）。

异绿原酸化合物（包括3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）可以从六棱菊、金银花、旋覆花、苍耳等药用植物中提取分离，也可通过全合成或半合成等化学方法制备。

异绿原酸类化合物能够以下列剂型应用于肝炎治疗：

1. 异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）以单一成分制成胶囊、注射剂等剂型，作为治疗肝炎的药物（包括治疗乙肝和保肝等）。

2. 异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）不同组合物，制成胶囊、注射剂等剂型，作为治疗肝炎的药物（包括治疗乙肝和保肝等）。

3. 以异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）为主要药效成分植物提取物，制成胶囊、注射剂等剂型，作为治疗肝炎的药物（包括治疗乙肝和保肝等）。

异绿原酸类化合物（3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸）组合物最优比例（26：19：31）。

以下通过动物药效实验来进一步说明本发明的有益效果。

实施例1

异绿原酸组合物对转 HBV（乙肝病毒）基因 HepG2.2.15（转染有 HBV DNA 的细胞株）细胞分泌 HBsAg（乙肝病毒表面抗原），HBeAg（乙肝病毒 E 抗原）和 HBV-DNA（乙肝病毒的病毒复制数）的抑制作用。

测定样品对 HepG2.2.15 细胞生长的抑制作用：将细胞用胰蛋白酶-EDTA 消化并稀释成 1×10^5 / mL，加到 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μ L，置 CO₂ 培养箱中培养。接种 24 h 后，倾去培养基，加入用培养基稀释的样品，每孔 200 μ L，每个浓度加 3 孔，培养 72 h 后在细胞培养孔中加入 5 mg/ml 的 MTT，每孔 10 μ L，置 37°C 孵育 3 h，加入 DMSO 150 μ L，使甲臞完全溶解，用酶标仪在 570 nm 波长下比色。计算样品对 HepG2.2.15 细胞生长的半数中毒浓度。测定样品对 HBV 的抑制作用：每 4 天换含无毒浓度样品的培养基，将同一样品同一浓度的换出的培养基等体积混匀，作为待测样品。用 ELISA 试剂盒测定培养基中 HBsAg 和 HBeAg 浓度；用 HBV-DNA 定量 PCR 试剂盒测定培养基中 HBV-DNA 浓度。

抗 HBV 作用评价：以转染有 HBV DNA 细胞株（HepG2.2.15）为模型，通过被测样品对细胞培养上清中的 HBsAg，HBeAg，HBV-DNA 的影响情况，来评价样品的抗 HBV 的作用。

表 1 异绿原酸组合物对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg，HBeAg 和 HBV-DNA 抑制作用

| 化合物 | 浓度 (μ g/ml) | HBsAg (抑制 %) | HBeAg (抑制%) | HBV-DNA(抑制%) |
|------------------------------------------------|---------------------|-----------------|-------------|--------------|
| 异绿原酸 最优组合物 | 100 | 98.11 | 66.41 | 95.11 |
| (异绿原酸 A、 异绿原酸 B、异 绿原酸 C 的比 例为 26: 19: | 50 | 77.84 | 54.53 | 89.45 |
| 31) | 10 | 35.24 | 34.34 | 77.41 |
| | 1 | 16.25 | 20.15 | 48.42 |

| | | | | |
|------|-----|-------|-------|-------|
| | 100 | 62.88 | 40.74 | 71.56 |
| 拉米夫定 | 50 | 56.72 | 30.32 | 46.45 |
| | 10 | 31.02 | 21.03 | 40.84 |
| | 1 | 18.25 | 15.49 | 36.76 |

结果表明, 异绿原酸组合物对转 HBV 基因 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg , HBeAg 具有很强的抑制作用, 对 HBV-DNA 复制也具有很强的抑制作用, 其作用优于阳性对照药物拉米夫定。

实施例 2 异绿原酸组合物对 D-GalN (氨基半乳糖) 致肝细胞损伤的影响

人正常肝细胞株 HL-7702, 置 37℃ 下 CO₂ 培养箱中培养; 待肝细胞贴壁后, 更换培养液, 加入 20 mmol/l 的 D-GalN, 作用 8 h; 然后弃去培养液, 分别加入不同浓度的试验药液各 200 μl, 每一浓度设 6 个复孔, 同时设溶剂和阳性对照; 继续培养 48 h, 每孔加入 10 μl MTT (5 mg/ml), 作用 4 h, 吸弃上清, 加入 150 μl DMSO, 振荡混匀; 在 570 nm 波长下, 用酶标仪测定 A 值。保护作用评价: 计算保护率 (%) 和增生指数。

$$\text{注 1: 保护率 (\%)} = \frac{\text{样品组 (A)} - \text{损伤组 (A)}}{\text{正常组 (A)} - \text{损伤组 (A)}} \times 100\%$$

$$\text{注 2: 增生指数} = \text{样品组 (A)} / \text{损伤组 (A)}$$

表 2 异绿原酸组合物对 D-GalN 致人正常肝细胞损伤的影响

| 组别 | 浓度 (μg/ml) | 保护率 (%) | 增生指数 |
|-----------|------------|---------|------|
| 溶剂对照 | - | - | - |
| D-GalN 对照 | - | - | - |
| | 100 | 28.1 | 3.74 |
| 水飞蓟素 | 50 | 16.4 | 2.66 |
| | 10 | 8.25 | 1.88 |
| | 1 | 2.2 | 1.38 |

| | | | |
|----------------------------------------------------|-----|------|------|
| 异绿原酸 | 100 | 52.3 | 6.21 |
| 最优组合物 (异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的比例为 26: 19: 31) | 50 | 30.6 | 4.13 |
| | 10 | 17.0 | 2.88 |
| | 1 | 6.4 | 1.87 |

结果表明，异绿原酸组合物对 D-GalN 诱导的肝细胞损伤具有明显的保护作用，其作用优于阳性对照药物水飞蓟素。

实施例 3 异绿原酸组合物对 D-GalN 致小鼠急性肝损伤模型的保护作用

取材：取 20-25g、雄性，ICR 小鼠，按体重随机分组，每组 10 只。设正常对照组、损伤对照组、阳性对照组和试药高、中、低剂量组。药物组动物预防给药，每天 1 次，连续 7 天。正常对照组及损伤对照组给予等体积的溶剂，阳性对照组给予水飞蓟素 50mg/kg。末次给药后 1h，除正常组外，各组动物腹腔注射 650mg/kg 氨基半乳糖 (D-GalN) 致毒。末次给药 24h 后，分离血清，测 AST 和 ALT。同时取肝组织用于制作病理切片。

疗效评价：比较治疗组与损伤对照组间 AST 和 ALT 差异的显著性，以及病理学变化的改善。

表 3 异绿原酸组合物对 D-GalN 诱发的小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) |
|-------------------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 溶剂对照 | - | 48.78 \pm 5.71 ^{***} | 28.44 \pm 3.44 ^{***} |
| 模型对照 | - | 126.22 \pm 10.11 | 77.14 \pm 5.44 |
| 水飞蓟素 | 50 | 84.55 \pm 5.33 [*] | 51.11 \pm 4.14 [*] |
| 异绿原酸 最优组合物 | 25 | 64.11 \pm 4.33 ^{**} | 44.72 \pm 5.14 [*] |
| (异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的比例为 26: 19: 31) | 50 | 60.11 \pm 4.66 ^{***} | 36.32 \pm 4.22 ^{***} |

| | | |
|-----|-----------------|-----------------|
| 100 | 55.27 ± 5.19*** | 34.44 ± 3.55*** |
|-----|-----------------|-----------------|

与模型对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和 *** $P < 0.001$, 即与模型对照组相比具有显著差异。

结果表明, 异绿原酸组合物对 D-GalN 急性肝损伤小鼠的保护作用优于阳性对照药物水飞蓟素, 且能显著改善 D-GalN 急性肝损伤组织学病变。

实施例 4 异绿原酸组合物对 CCl_4 (四氯化碳) 致小鼠急性肝损伤模型的保护作用

取材: 取 20-25g、雄性, ICR 小鼠, 按体重随机分组, 每组 10 只。设正常对照组、损伤对照组、阳性对照组和试药高、中、低剂量组。药物组动物预防给药, 每天 1 次, 连续 7 天。正常对照组及损伤对照组给予等体积的溶剂, 阳性对照组给予水飞蓟素 50mg/kg。末次给药后 1h, 除正常组外, 各组动物腹腔注射 1% 的 CCl_4 橄榄油溶液 (10 ml/kg) 致毒。末次给药 24h 后, 分离血清, 测 AST 和 ALT。同时取肝组织用于制作病理切片。

疗效评价: 比较治疗组与损伤对照组间 AST 和 ALT 差异的显著性, 以及病理学变化的改善。

表 4 异绿原酸组合物对 CCl_4 诱发的小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) |
|----------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 溶剂对照 | - | 37.77 ± 5.11*** | 20.98 ± 3.77*** |
| 模型对照 | - | 88.11 ± 7.55 | 57.88 ± 5.11 |
| 水飞蓟素 | 50 | 52.21 ± 4.12** | 31.22 ± 6.27** |
| 异绿原酸 | | | 45.22 ± 6.26 |
| 最优组合物 | 25 | 65.44 ± 7.66 | |
| (异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的比例为 26: 19: 31) | 50 | 50.11 ± 5.81** | 30.21 ± 4.66** |
| | 100 | 45.31 ± 3.11*** | 27.44 ± 3.14*** |

与模型对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和 *** $P < 0.001$, 即与模型对照组

相比具有显著的差异。

结果表明，异绿原酸组合物对 CCl_4 急性肝损伤小鼠的保护作用优于阳性对照药物水飞蓟素，且能显著改善 CCl_4 急性肝损伤组织学病变。

实施例 5 异绿原酸类化合物及其不同组合物对 CCl_4 （四氯化碳）致大鼠慢性肝损伤模型的保护作用

取材：取 $160 \pm 20\text{g}$ 、雄性，SD 或 Wistar 大鼠，按体重随机分组，试验开始时每组 20 只，试验结束时，每组动物不得少于 8 只。设正常对照组、损伤对照组、阳性对照组和试药高、中、低剂量组。除正常组外，各组动物腹部或背部皮下注射 10% 的 CCl_4 橄榄油溶液 ($5\text{ml}/\text{kg}$) 致毒，每周注射 2 次，连续 3 个月。致毒 2 个月后，进行药物治疗，每天 1 次，每周 5 天，连续给药两个月。正常对照组及损伤对照组给予等体积的溶剂，阳性对照组给予水飞蓟素 $50\text{mg}/\text{kg}$ 。末次给药 24h 后，分离血清，检测 AST、ALT 水平。同时取肝组织用于制作病理切片。

疗效评价：比较治疗组与损伤对照组间各项指标差异的显著性，以及病理学变化的改善。

表 5 异绿原酸组合物对 CCl_4 慢性肝损伤大鼠 AST（谷草转氨酶）和 ALT（血清谷丙转氨酶）的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | AST (IU/l) | ALT (IU/l) |
|------|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| 溶剂对照 | - | $54.11 \pm 3.22^{***}$ | $35.11 \pm 3.33^{***}$ |
| 模型对照 | - | 215.88 ± 21.33 | 125.31 ± 10.33 |
| 水飞蓟素 | 50 | $92.14 \pm 7.25^{**}$ | $71.23 \pm 8.21^{**}$ |
| 异绿原酸 | 25 | $102.31 \pm 9.01^*$ | $84.22 \pm 5.33^*$ |

| | | |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|
| 50 | 86.55 ± 8.11 ^{***} | 66.77 ± 6.01 ^{***} |
| 100 | 77.44 ± 7.11 ^{***} | 60.11 ± 5.58 ^{***} |

与模型对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和 *** $P < 0.001$, 即与模型对照组相比具有显著的差异。

结果表明, 异绿原酸组合物对 CCl_4 慢性肝损伤大鼠的保护作用优于阳性对照药物水飞蓟素, 且能显著改善 CCl_4 慢性肝损伤组织学病变。

以上实施例中不同组合物之间的组合比例是重量比。