



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108653296 B

(45)授权公告日 2019.10.25

(21)申请号 201810665146.6

A61P 1/18(2006.01)

(22)申请日 2018.06.25

A61P 29/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108653296 A

(56)对比文件

CN 106279329 A,2017.01.04,说明书第5-40段.

(43)申请公布日 2018.10.16

Norihiro Banno et al.Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of Boswellia carteri.《Journal of Ethnopharmacology》.2006,第107卷第249页、第250页右栏第1段、第252页、表2.

(73)专利权人 天津中医药大学

地址 300000 天津市南开区鞍山西道312号

(72)发明人 周昆 白茹玉 孙力康 毕亚男

邓雁茹 张玥 宋蕾 黄菊阳

于英莉 李琳

常允平等.乳香的化学成分和药理活性研究进展.《现代药物与临床》.2012,第27卷(第1期),第“2.1抗炎、抗菌”部分.

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

代理人 李青

审查员 童欣

(51)Int.Cl.

A61K 31/575(2006.01)

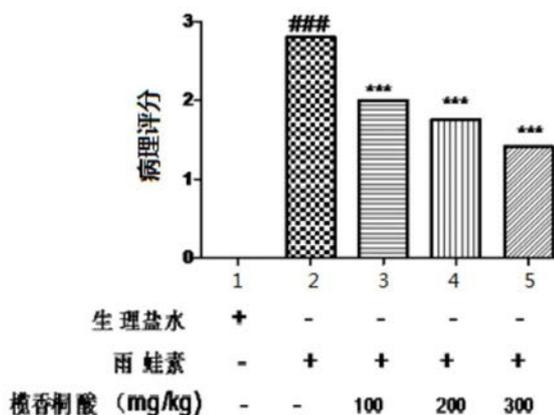
权利要求书1页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

榄香桐酸的应用及治疗胰腺炎的药物

(57)摘要

本发明提供了一种榄香桐酸的应用及治疗胰腺炎的... 能够有效抑制胰腺炎症,对胰腺炎起到明显的预防和/或治疗作用,同时安全无毒,副作用小。



1. 榄香桐酸作为唯一活性成分在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物还包括药学上可接受的辅料。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物的剂型包括口服制剂或注射制剂。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,所述口服制剂包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂或口服乳剂。
5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,所述注射制剂包括注射液或粉针剂。
6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物的有效给药剂量为50-500mg/kg/天。
7. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物的有效给药剂量为100-400mg/kg/天。
8. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物的有效给药剂量为150-300mg/kg/天。
9. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述胰腺炎包括急性胰腺炎和/或慢性胰腺炎。

榄香桐酸的应用及治疗胰腺炎的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,尤其是涉及一种榄香桐酸的应用及治疗胰腺炎的药物。

背景技术

[0002] 胰腺器官的重要作用一方面表现为外分泌功能,分泌食物消化和吸收所需的消化酶,另一方面表现为内分泌功能,调节体内代谢的激素分泌,如胰岛素和胰高血糖素。胰液中含有消化酶,诸如淀粉酶(水解碳水化合物)、胰蛋白酶(水解蛋白质)和脂肪酶(水解脂肪),由于酗酒、胆结石等原因导致胰液流动不畅,在上述酶诱导下胰腺可能自溶发展成为胰腺炎。胰腺炎分两种:轻型胰腺炎,伴有间质性水肿和胰腺周围的胰周脂肪坏死;重型胰腺炎,伴有大面积胰周和胰内脂肪坏死、胰腺实质坏死以及出血。

[0003] 从胰腺炎早期病理、生理机制中了解到,当胰腺腺泡细胞受损后巨噬细胞进入胰腺内部时会导致组织损伤,会诱导分泌细胞因子IL-1 β (白介素-1 β)、IL-6和TNF- α (肿瘤坏死因子- α)表达显著升高,所述细胞因子在炎性细胞循环、胰腺水肿和实际胰腺破坏方面起着重要作用。在急性胰腺炎患者的血清中,可以观察到所述细胞因子增加,伴随并发症诸如胰腺坏死、全身炎症反应、多器官衰竭等的情况下。预防和治疗胰腺炎的有效方式是设法降低所述细胞因子表达,降低胰腺腺泡细胞受损,恢复胰腺功能和减少并发症。

[0004] 目前已有若干通过体内实验和体外实验,证实某些药物具有降低所述细胞因子的表达,达到减轻胰腺炎受损程度的功效。然而将这些实验治疗方法应用于临床患者时,效果无法达到预期效果,导致目前治疗胰腺炎的药物不是很多,见效也不显著。

[0005] 因此,开发一种有效的药物或单体进行胰腺炎治疗尤为重要。

[0006] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的第一个目的在于提供榄香桐酸在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中的应用。

[0008] 本发明的第二个目的在于提供一种用于预防和/或治疗胰腺炎的药物,以缓解现有技术中存在的治疗胰腺炎的药物匮乏,且治疗效果较差的技术问题。

[0009] 本发明提供了榄香桐酸在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中的应用。

[0010] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗胰腺炎的药物,所述药物包括榄香桐酸。

[0011] 进一步地,所述药物还包括药学上可接受的辅料。

[0012] 进一步地,所述药物的剂型包括口服制剂或注射制剂。

[0013] 进一步地,所述口服制剂包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂或口服乳剂。

[0014] 进一步地,所述注射制剂包括注射液或粉针剂。

[0015] 进一步地,所述药物的有效给药剂量为50-500mg/kg/天。

[0016] 进一步地,所述药物的有效给药剂量为100-400mg/kg/天。

[0017] 进一步地,所述药物的有效给药剂量为150-300mg/kg/天。

[0018] 进一步地,所述胰腺炎包括急性胰腺炎和/或慢性胰腺炎。

[0019] 本发明通过大量的体内外实验证实,榄香酮酸可以显著降低因胰腺炎症升高的淀粉酶活性、NO和细胞因子IL-6、TNF- α 表达,说明榄香酮酸对炎症具有抑制作用。并且,榄香酮酸还能够减少或抑制胰腺组织发炎、水肿和坏死,说明榄香酮酸单体对胰腺炎有一定的治疗作用。本发明通过将榄香酮酸应用在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中,能够有效抑制胰腺炎症,从而大大提高胰腺炎的治疗效果,为临床实验提供依据,也为新药的研发提供新途径。

[0020] 本发明提供的用于预防和/或治疗胰腺炎的药物,该药物的活性成分为榄香酮酸,因此,能够有效抑制胰腺炎症,对胰腺炎起到明显的预防和/或治疗作用,同时安全无毒,副作用小。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0022] 图1为本发明实施例1提供的对照组胰腺组织HE染色切片放大100倍图像;

[0023] 图2为本发明实施例1提供的对照组胰腺组织HE染色切片放大400倍图像;

[0024] 图3为本发明实施例1提供的实验组胰腺组织HE染色切片放大100倍图像;

[0025] 图4为本发明实施例1提供的实验组胰腺组织HE染色切片放大400倍图像;

[0026] 图5为本发明实施例1提供的榄香酮酸低剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大100倍图像;

[0027] 图6为本发明实施例1提供的榄香酮酸低剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大400倍图像;

[0028] 图7为本发明实施例1提供的榄香酮酸中剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大100倍图像;

[0029] 图8为本发明实施例1提供的榄香酮酸中剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大400倍图像;

[0030] 图9为本发明实施例1提供的榄香酮酸高剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大100倍图像;

[0031] 图10为本发明实施例1提供的榄香酮酸高剂量治疗组胰腺组织HE染色切片放大400倍图像;

[0032] 图11为本发明实施例1提供的使用榄香酮酸对胰腺炎体内实验的病理切片评分图;

[0033] 图12为本发明实施例2提供的使用榄香酮酸对胰腺炎体内实验的淀粉酶浓度分析图;

[0034] 图13A为本发明实施例3提供的使用榄香酮酸对胰腺炎体内实验的组织均浆白介

素-6分析图；

[0035] 图13B为本发明实施例3提供的使用榄香桐酸对胰腺炎体内实验的血清白介素-6分析图；

[0036] 图14为本发明实施例3提供的使用榄香桐酸对胰腺炎体内实验的组织均浆TNF- α 分析图；

[0037] 图15为本发明实施例4提供的使用榄香桐酸对胰腺炎体内实验的血清中一氧化氮分析图；

[0038] 图16为本发明实施例5提供的使用榄香桐酸对小鼠巨噬细胞RAW264.7活力的影响分析图；

[0039] 图17为本发明实施例6提供的使用榄香桐酸、脂多糖刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7所造成的炎性环境中一氧化氮含量影响分析图；

[0040] 图18为本发明实施例7提供的使用榄香桐酸、脂多糖刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7所造成的炎性环境中白介素-6含量影响分析图；

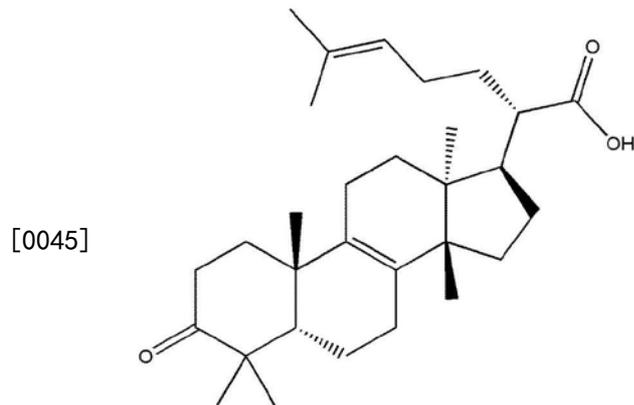
[0041] 图19为本发明实施例7提供的使用榄香桐酸、脂多糖刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7所造成的炎性环境中TNF- α 含量影响分析图。

具体实施方式

[0042] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0043] 本发明提供了榄香桐酸在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中的应用。

[0044] 其中,榄香桐酸的化学结构式如式(I)所示:



式(I)

[0046] 本发明通过雨蛙肽诱导小鼠胰腺炎病症,辅以不同剂量的榄香桐酸进行治疗实验,通过胰腺组织切片、血清淀粉酶、NO、TNF- α 、白介素-6测定,表明榄香桐酸对胰腺炎有抑制作用。通过多次实验具有可重复性。细胞体外实验采用脂多糖诱导RAW264.7细胞建立的炎症模型,以榄香桐酸单体为治疗药物,通过NO、TNF- α 、白介素-6含量的测量,验证榄香桐酸单体对炎症的抑制作用。本发明通过将榄香桐酸应用在制备预防和/或治疗胰腺炎的药物中,能够有效抑制胰腺炎症,从而大大提高胰腺炎的治疗效果,为临床实验提供依据,也

为新药的研发提供新途径。

[0047] 需要注意的是,本发明所述的榄香桐酸,既可以为实验室制备得到的,也可以是市售直接购得的,只要满足式(I)的化学结构式即可。

[0048] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗胰腺炎的药物,包括榄香桐酸。

[0049] 本发明提供的药物的活性成分为榄香桐酸,由于榄香桐酸对炎症的抑制作用,该药物能够有效抑制胰腺炎症,对胰腺炎起到明显的预防和/或治疗作用,同时安全无毒,副作用小。

[0050] 在一个优选的实施方式中,药物还包括药学上可接受的辅料。

[0051] 药学上可接受的辅料是指生产药品和调配处方时,使用的的赋形剂和附加剂,是指除活性成分外,在安全性方面已进行了合理的评估,并且包含在药物制剂中的物质。同一药用辅料可用于不同给药途径的药物制剂,且有不同的作用和用途。在本发明提供的药物中添加的药学上可接受的辅料,能够起到赋型、充当载体或提高稳定性的作用,此外,还具有增溶、助溶或缓控释等重要功能。

[0052] 典型但非限制性的药学上可接受的辅料包括:溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、湿润剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏着剂、抗氧剂、螯合剂、渗透促进剂、pH调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂与反絮凝剂、助滤剂或释放阻滞剂中的一种或多种。

[0053] 在一个优选的实施方式中,药物的剂型包括口服制剂或注射制剂。

[0054] 当口服用药时,上述药物可制成任意口服可接受的制剂形式,例如可以为,但不限于片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂或口服乳剂。

[0055] 其中,片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉,另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。口服混悬剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。

[0056] 任选地,以上口服制剂形式中还可加入一些甜味剂、芳香剂或着色剂。

[0057] 当以注射的形式给药时,上述药物可制成任意注射可接受的制剂形式,例如可以为,但不限于注射液或粉针剂。

[0058] 其中,可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质,如单甘油酯或二甘油酯。

[0059] 在一个优选的实施方式中,药物的有效给药剂量为50-500mg/kg/天,例如可以为,但不限于50mg/kg/天、100mg/kg/天、150mg/kg/天、200mg/kg/天、250mg/kg/天、300mg/kg/天、350mg/kg/天、400mg/kg/天、450mg/kg/天或500mg/kg/天。

[0060] 在一个优选的实施方式中,给药频率例如可以为,但不限于每天两次、每天一次、每两天一次、每周一次或每月一次给药。或者,可以以缓释制剂的形式给予本发明提供的药物,在这种情况下,需要较少的给药频率。

[0061] 给药剂量和频率根据制剂在用药者体内的半衰期而不同,此外,也可以根据是预防性处理还是治疗性处理而不同。在预防性应用中,以相对低频率的间隔长期给予相对低的剂量。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔给予相对高的剂量,直至疾病的进展被延缓或停止,并优选地直至个体表现出疾病症状的部分或完全改善,在此之后,可以给予患

者预防方案。

[0062] 优选为100-400mg/kg/天,更优选为150-300mg/kg/天。

[0063] 当给药的有效剂量在优选范围内时,对胰腺炎的预防和/或治疗作用更明显,见效更快。

[0064] 在一个优选的实施方式中,胰腺炎包括急性胰腺炎和/或慢性胰腺炎。

[0065] 为了有助于更清楚的理解本发明的内容,现结合具体的实施例详细介绍如下。

[0066] 如无特别说明,本发明实施例中使用的细胞、药品及试剂均来源为正规而易购渠道:

[0067] 细胞:RAW264.7为中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心提供。

[0068] 药品及试剂:

[0069] 榄香酮酸为天津中医药大学实验室提供,白色晶体。

[0070] 其制备方法具体为:

[0071] (a) 称取3公斤乳香药材,粉碎,以料液比1:8用95%乙醇回流提取3次,每次均回流2小时。合并提取液,减压浓缩,回收溶剂得95%乙醇浸膏,因此将浸膏合并,共2034.8g。

[0072] 浸膏先溶于石油醚中,用水萃取,得到石油醚层浸膏(983g)。

[0073] (b) 将600g石油醚层浸膏用石油醚溶解后,用硅胶(100~200目)拌样,称取1200g柱层析硅胶(100~200目)湿法装柱,以石油醚-乙酸乙酯(100:0,80:1,60:1,40:1,20:1,15:1,10:1,8:1,6:1,4:1,2:1,1:1,0:100)为洗脱剂进行梯度洗脱。

[0074] (c) 每400ml洗脱液为一馏分,共收集馏分25份,采用二氯甲烷溶解;以石油醚-乙酸乙酯(3:1)为展开剂,在UV(254nm,365nm)和10%硫酸显色,根据TLC显色情况,合并馏分。结果:Fr.125-149,其中只析出一个结晶,经波谱鉴定为榄香酮酸(21.5g)。

[0075] DMEM基础培养基(高糖,含酚红),Corning公司,货号:R10-017-CV;特级胎牛血清(Fetal Bovine Serum Sterile),Ausbian公司,货号:VS500T;青霉素链霉素双抗(Penicillin-Streptomycin Solution),Corning公司,货号:30-002-CI;脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS),sigma公司,货号:L6529;噻唑蓝(MTT),索莱宝公司,货号:M1025;PBS缓冲液,碧云天生物,货号:C0021A;小鼠TNF- α 试剂盒,eBioscience生物公司,货号:88-7324-77;小鼠IL-6试剂盒,eBioscience生物公司,货号88-7064-77;一氧化氮检测试剂盒,碧云天生物,货号:S0021。

[0076] 仪器:显微镜,徕卡公司,型号:DM4000;离心机,Thermo Fisher Scientific,型号:Micro 17;多功能读板机,美国PerkinElmer,型号:Enspire;细胞孵育箱,Thermo Fisher Scientific,型号:3111。柜式摇床,上海世平实验设备有限公司,型号:SPH-2102C。

[0077] 实施例1

[0078] 正常的胰腺组织染色切片在光镜下应该是结构清晰,腺泡小叶完整,介质无渗出,无病理学改变。当发生胰腺炎时,胰腺组织中腺泡细胞会形成空泡、发生水肿、细胞间距变大,炎细胞开始浸润,并偶见腺泡细胞坏死。通过这一受损特征可以判断出胰腺炎发展和治疗的程度。本实验例通过对照组1、模型组2、榄香酮酸低剂量治疗组3、榄香酮酸中剂量治疗组4、榄香酮酸高剂量治疗组5进行动物体内实验,每组10只,通过染色切片的光镜显示比较和胰腺组织病理评分,以此来研究榄香酮酸对胰腺炎治疗作用。

[0079] 具体为,使用体重约 20 ± 2 g的C57BL/6小鼠进行胰腺炎动物模型制备和榄香酮酸

治疗实验,实验小鼠均在恒温(22-26℃)、湿度(55-60%)的无菌动物实验室中饲养,用正常固体饲料和水饲养小鼠,使其适应1周,所有体内实验均按照规定的动物护理和使用指南进行,采用再现性极好的雨蛙肽诱导小鼠胰腺炎病症。

[0080] 实验前16小时停止向所有小鼠供应饲料,从实验开始,对照组以1小时的间隔经腹腔内施用5次生理盐水,每次0.2mL。除对照外,其余小鼠以1小时的间隔经腹腔内施用5次雨蛙肽,每次70 μ g/kg,以诱导胰腺炎病症。施用雨蛙肽的1小时后,对治疗组口服低(100mg/kg)、中(200mg/kg)、高(300mg/kg)剂量的榄香酮酸,以研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗效果。

[0081] 实验结束后让小鼠生存24小时后对胰腺组织进行取材,放入福尔马林溶液进行固定。3天后进行切片制作、HE切片染色和病理切片评分。

[0082] 实验结果如图所示,其中图1-10是通过上述实验获得的小鼠胰腺组织HE染色在光镜下100*、400*的切片图片。图1-2为对照组1的100*、400*照片,从图中可以看出对照组胰腺组织结构清晰,腺泡小叶完整,介质无渗出未见病理学改变;图3-4为模型组2的100*、400*照片,从图中可以看出模型组胰腺组织中腺泡细胞有大片空泡形成,水肿且细胞间距变大,炎细胞浸润明显,偶见腺泡细胞坏死;图5-10为(低、中、高)治疗组100*、400*照片,从图中可以看出榄香酮酸治疗组中胰腺组织可见有极少空泡形成,与模型组相比水肿较轻、细胞间距明显减小,且均未见炎细胞浸润及坏死现象;胰腺组织损伤明显改善,模型组的HE染色切片中胰腺损伤明显高于对照组和榄香酮酸治疗组。

[0083] 由此通过切片光镜显示比较,判断出榄香酮酸对胰腺炎病症有一定的抑制作用。

[0084] 另外采用Rongione方法在双盲状态下对小鼠胰腺组织进行病理学评分,每张切片随机检测4个视野,平均分数就是该张切片的病理损伤评分。通过对各实验组病理切片进行观察、汇总,利用表1病理评分标准制作了图11的病理评分柱状图。

[0085] 表1 Rongione胰腺组织病理评分标准

[0086]

评分	水肿	坏死/高倍视野	出血 (出血点)	炎细胞浸润
0	无	无	无	无
1	小叶间隔扩张	1-4个坏死细胞	1-2个	围绕腺管周围
2	小叶间隔弥漫性扩张	5-10个坏死细胞	3-5个	浸润实质面积 <50%
3	腺泡间隙扩大	11-15个坏死细胞	6-7个	浸润实质面积 50%-75%
4	细胞间隙扩大	>15个坏死细胞	>7个	浸润实质面积 >75%

[0087] 在图11中,模型组2的胰腺病理(评分在3以下)明显高于对照组1(评分为0),通过计算 $p < 0.01$,具有显著差异。对照组1和榄香酮酸治疗组3、4、5(评分2以下),通过计算 $p < 0.01$,也具有显著差异。

[0088] 由此根据胰腺组织病理评分揭示出榄香酮酸对胰腺炎具有良好的治疗作用。

[0089] 实施例2

[0090] 本实验例通过对对照组1、模型组2、榄香酮酸低剂量治疗组3、榄香酮酸中剂量治疗组4、榄香酮酸高剂量治疗组5进行动物体内实验,检测实验后血清中淀粉酶的活性情况,以此来研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗作用。

[0091] 在本实验例中,使用体重约 20 ± 2 g的C57BL/6小鼠进行胰腺炎动物模型制备和榄香酮酸治疗实验,实验小鼠均在恒温(22-26℃)、湿度(55-60%)的无菌动物实验室中饲养,用正常固体饲料和水饲养小鼠,使其适应1周,所有体内实验均按照规定的动物护理和使用指南进行,采用再现性极好的雨蛙肽诱导小鼠胰腺炎病症。

[0092] 实验前16小时停止向所有小鼠供应饲料,从实验开始,对照组以1小时的间隔经腹腔内施用5次生理盐水,每次0.2mL。除对照外,其余小鼠以1小时的间隔经腹腔内施用5次雨蛙肽,每次70 μ g/kg,以诱导胰腺炎病症。施用雨蛙肽的1小时后,对治疗组口服低(100mg/kg)、中(200mg/kg)、高(300mg/kg)剂量的榄香酮酸,以研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗效果。

[0093] 实验结束后让所述小鼠生存24小时后摘取所述小鼠眼球,分别对各实验组取血清存于-80℃冰箱中备用。

[0094] 血清中淀粉酶的检测:血清从-80℃冰箱取出,室温融化,根据试剂盒说明进行操作:

[0095] 1.对照组血清样本稀释50倍,模型组血清样本稀释100倍,榄香酮酸治疗组血清样本稀释300倍。

[0096] 2.取600 μ L炮弹管16个,加入50 μ L的底物缓冲液(使用前37℃预温5min),将各组血清样本10 μ L加入相应的炮弹管中,空白管不加试剂,混匀,在37℃恒温孵箱反应7.5分钟。

[0097] 3.孵箱取出后,向各个炮弹管中加入50 μ L碘应用液。

[0098] 4.对照组、模型组和榄香酮酸治疗组分别加入300 μ L双蒸水,空白管中加入310 μ L双蒸水。

[0099] 5.各个炮弹管混匀,并各取100 μ L加入96孔板中,波长660nm,读取吸光度值。

[0100] 6.根据各实验组吸光度值绘制淀粉酶活性箱型图。

[0101] 图12示出了本实验例血清中淀粉酶活性的箱型图,示出不同实验组检测到的淀粉酶活性表达程度。从图中可以看出,对照组1与模型组2相比具有显著差异###, $p < 0.01$,说明雨蛙肽模型组中的淀粉酶活性显著增加,意味诱发了胰腺炎;榄香酮酸低剂量治疗组3、榄香酮酸中剂量治疗组4、榄香酮酸高剂量治疗组5与对照组相比具有显著差异***, $p < 0.01$,榄香酮酸治疗组中淀粉酶活性显著降低。

[0102] 通过淀粉酶活性表达程度对比,说明榄香酮酸对胰腺炎具有抑制作用。

[0103] 实施例3

[0104] 胰腺炎诱导免疫细胞活化,加剧胰腺损伤,进而通过炎性细胞因子在内的各种体液因子诱导全身器官损伤。在胰腺中激活免疫细胞引起炎症反应所涉及的最具代表性的因子是TNF- α 、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)。在胰腺炎发生的情况下,血清IL-6和TNF- α 被上调了。本实验例通过对对照组1、模型组2、榄香酮酸低剂量治疗组3、榄香酮酸中剂量治疗组4、榄香酮酸高剂量治疗组5进行动物体内实验,检测胰腺组织中TNF- α 、白介素-6(IL-6)的含量,以此研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗作用。

[0105] 在本实验例中,使用体重约 20 ± 2 g的C57BL/6小鼠进行胰腺炎动物模型制备和榄香酮酸治疗实验,实验小鼠均在恒温(22-26℃)、湿度(55-60%)的无菌动物实验室中饲养,

用正常固体饲料和水饲养小鼠,使其适应1周,所有体内实验均按照规定的动物护理和使用指南进行,采用再现性极好的雨蛙肽诱导小鼠胰腺炎病症。

[0106] 实验前16小时停止向所有小鼠供应饲料,从实验开始,对照组以1小时的间隔经腹腔内施用5次生理盐水,每次0.2mL。除对照外,其余小鼠以1小时的间隔经腹腔内施用5次雨蛙肽,每次70 μ g/kg,以诱导胰腺炎病症。施用雨蛙肽的1小时后,对治疗组口服低(100mg/kg)、中(200mg/kg)、高(300mg/kg)剂量的榄香桐酸,以研究榄香桐酸对胰腺炎的治疗效果。

[0107] 实验结束后让所述小鼠生存24小时后对胰腺组织进行取材,存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0108] 将胰腺组织用液氮研磨粉碎,加蛋白裂解液于冰上放置30min,4 $^{\circ}$ C 12000rpm/min 15min取上清。采用BCA法进行蛋白定量,使其组织蛋白浓度一致,置于4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0109] 通过ELISA法测定胰腺组织匀浆中TNF- α 、IL-6含量具体操作步骤:

[0110] 1、实验准备工作:提前将试剂盒中的包被抗体、包被抗体稀释液和标准品从冰箱中取出,平衡至室温(18-25 $^{\circ}$ C),不能直接在37 $^{\circ}$ C溶解。

[0111] (1) 配制包被抗体:取出包被抗体(250 \times),用包被抗体稀释液稀释到1 \times ,现用相配。

[0112] (2) 配制洗涤液:用475mL纯水将25mL,20 \times PBS稀释至500mL,并加入20%Tween 1.25mL,现用现配。

[0113] (3) 配制检测抗体:取出检测抗体(250 \times),用ELISA稀释液稀释到1 \times ,现用相配。

[0114] (4) 配制Avidin-HRP酶:取出Avidin-HRP酶(250 \times),用ELISA稀释液稀释到1 \times ,现用相配。

[0115] (5) 配制标准品:取出1支标准品冻干粉,室温用1mL注射器加入1mL去离子水,轻微摇晃,室温15min,混匀。现用现配。

[0116] (6) 配制标准品溶液:

[0117] ①TNF- α 标准品:依次倍比用ELISA稀释液将稀释分别得到1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、0pg/mL八个浓度。

[0118] ②IL-6标准品:依次倍比用ELISA稀释液将稀释分别得到500、250、125、62.5、31.2、15.6、8.3、0pg/mL八个浓度。

[0119] 2、具体操作步骤:

[0120] (1) 加包被抗体:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0121] (2) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干。

[0122] (3) 加ELISA稀释液:200 μ L/孔,酶标板上加覆膜,室温,1小时

[0123] (4) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复2次。

[0124] (5) 加样:依次加入100 μ L各浓度标准品,余孔加入100 μ L待测样本,酶标板上加覆膜,室温,2小时。

[0125] (6) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复3次。

[0126] (7) 加检测抗体:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,室温,1小时。

[0127] (8) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复5次。

[0128] (9) 加Avidin-HRP酶:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,室温,30min。

[0129] (10) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复7次。

[0130] (11) 加显色剂与终止液:100 μ L/孔,室温,5-10min。标准品前四个呈蓝色梯度时,马上加终止液50 μ L/孔,蓝色由蓝色转为黄色。

[0131] (12) 酶标仪检测450nm波长处每孔的光密度(O.D值)。

[0132] 3、结果判定

[0133] 根据标准品绘制标准曲线,以标准品浓度为横坐标,0.D值为纵坐标,以平滑连线连接各坐标点。通过样本的0.D值在标准曲线上经计算得到其浓度。

[0134] 图14示出本实验例TNF- α 含量表达,横坐标分别为对照组1、模型组2、榄香酮酸治疗组低剂量组3、榄香酮酸治疗组中剂量组4、榄香酮酸治疗组高剂量组5,纵坐标为TNF- α 浓度值。#代表正常组与模型组比具有统计学意义, $p < 0.5$ 。*代表正常组与榄香酮酸治疗组比具有统计学意义, $p < 0.5$ 。

[0135] 由此可见,榄香酮酸对炎性介质TNF- α 的表达有抑制作用。

[0136] 图13A和图13B分别示出本实验例组织和血清白介素-6含量表达,横坐标分别为对照组1、模型组2、榄香酮酸治疗组低剂量组3、榄香酮酸治疗组中剂量组4、榄香酮酸治疗组高剂量组5,纵坐标为白介素-6浓度值。

[0137] 由此可见,榄香酮酸对炎性介质白介素-6的表达有抑制作用。

[0138] 实施例4

[0139] NO作为一种血管活性物质,主要作用是传递信息、舒张血管和细胞毒作用,在胰腺微循环障碍局部和全身性炎症反应中起重要作用。对于NO在胰腺炎的作用,一方面认为NO有改善胰腺微循环,对胰腺有保护作用。然而,更多的研究却认为NO在胰腺炎发病过程中参与引发胰腺组织的破坏和导致胰腺微循环缺陷。实验证实,大鼠急性胰腺炎组织中血管内皮细胞和腹腔巨噬细胞诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达增强,血清NO含量升高参与胰腺组织的损害过程。而高浓度的NO对胰腺微循环造成损伤,引起胰腺间质水肿,中性粒细胞浸润,分泌大量胰液,腺泡溶酶体膜破坏,引起胰酶细胞内激活,胰腺组织损伤。本实验例通过对对照组1、模型组2、榄香酮酸低剂量治疗组3、榄香酮酸中剂量治疗组4、榄香酮酸高剂量治疗组5进行动物体内实验,检测实验后血清中NO含量,以此来研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗作用。

[0140] 具体为,使用体重约 20 ± 2 g的C57BL/6小鼠进行胰腺炎动物模型制备和榄香酮酸治疗实验,实验小鼠均在恒温(22-26 $^{\circ}$ C)、湿度(55-60%)的无菌动物实验室中饲养,用正常固体饲料和水饲养小鼠,使其适应1周,所有体内实验均按照规定的动物护理和使用指南进行,采用再现性极好的雨蛙肽诱导小鼠胰腺炎病症。

[0141] 实验前16小时停止向所有小鼠供应饲料,从实验开始,对照组以1小时的间隔经腹腔内施用5次生理盐水,每次0.2mL。除对照外,其余小鼠以1小时的间隔经腹腔内施用5次雨蛙肽,每次70 μ g/kg,以诱导胰腺炎病症。施用雨蛙肽的1小时后,对治疗组口服低(100mg/kg)、中(200mg/kg)、高(300mg/kg)剂量的榄香酮酸,以研究榄香酮酸对胰腺炎的治疗效果。

[0142] 实验结束后让所述小鼠生存24小时后摘取所述小鼠眼球,分别对各实验组取血清存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0143] 血清中NO含量的检测:血清从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出,室温融化,根据试剂盒说明进行操作:

[0144] 用Griess法测定NO浓度,取Griess试剂标准品(1mol)用生理盐水稀释配制成终浓

度为100 μ M、80 μ M、60 μ M、40 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、2 μ M、1 μ M。按50 μ L/孔将不同浓度标准品及血清加入96孔板,然后在分别加入Griess I、Griess II,每孔50 μ L,在酶标仪波长540nm处检测吸光度,并计算样本血清中NO浓度。

[0145] 图15示出本实验例一氧化氮检测箱型结果图,横坐标分别为对照组1、模型组2、榄香酮酸治疗组低剂量组3、榄香酮酸治疗组中剂量组4、榄香酮酸治疗组高剂量组5,纵坐标为浓度值。#代表正常组与模型组比具有统计学意义, $p < 0.5$ 。**代表正常组与榄香酮酸治疗组比具有差异, $p < 0.05$ 。***代表正常组与榄香酮酸治疗组比具有显著差异, $p < 0.01$ 。

[0146] 结果,模型组NO浓度含量明显高于正常组和榄香酮酸治疗组,说明榄香酮酸对一氧化氮有抑制作用。

[0147] 实施例5

[0148] MTT法是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在490nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT结晶形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。它的特点是灵敏度高、经济。

[0149] 将RAW264.7细胞按常规方法传代培养,收集对数生长期细胞,调整细胞悬液的密度为 1×10^5 个/mL左右,将细胞置于加样槽中,使用八通道移液枪,将细胞接种于96孔板中,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中培养。

[0150] 培养24h后,细胞贴壁生长至80%-90%,弃去上清,加入DMEM基础培养基溶解的药物:榄香酮酸(100 μ M、80 μ M、60 μ M、40 μ M、20 μ M),每组设5个平行复孔,并设空白组100 μ L/孔DMEM高糖基础培养基以调零。置于培养箱内继续培养24h后,弃去上清,每孔加入100 μ L 0.5mg/mLMTT的DMEM高糖基础培养基。

[0151] 在孵箱中培养4h后,弃去上清,尽量避免孔底甲瓚损失。每孔加入150 μ L DMSO,37 $^{\circ}$ C摇床55rpm震荡10min,溶解孔内甲瓚。在波长490nm处检测吸光度,并记录结果(加入MTT之后的操作流程均应避光),利用记录制成箱型图。

[0152] 图16示出本实验例榄香酮酸各浓度与吸光度值的关系,***代表空白组与给予榄香酮酸比具有显著差异, $p < 0.01$ 。

[0153] 从图16中可以看出,榄香酮酸在大于8 μ M时对细胞活力产生明显影响,小于8 μ M时对细胞活力没有影响,为下一步实验提供了实验基础。

[0154] 实施例6

[0155] 脂多糖可以诱导RAW264.7细胞建立的炎症模型,炎症中NO含量会上升,本实验例试图使用榄香酮酸做为治疗炎症药物,检测榄香酮酸对炎症模型中NO的抑制作用。

[0156] 将RAW264.7细胞按常规方法传代培养,收集对数生长期细胞,调整密度至 3×10^5 个/mL,将细胞接种于24孔板中,每孔1mL,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养48h后,细胞贴壁生长至90%以上,弃去上清。

[0157] 分别设置空白组1、模型组(LPS)2、药物干预低浓度组3、药物干预中浓度组4、药物干预高浓度组5、和单独给予药物组6,每组4个孔($n=4$)。

[0158] 空白组1中只加入DMEM高糖基础培养基;模型组2在DMEM高糖基础培养基中加入

0.5 μ g/mL LPS; 药物干预低浓度组3, 在培养基中加入配置浓度为1 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 药物干预中浓度组4, 在培养基中加入配置浓度为2 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 药物干预高浓度组5, 在培养基中加入配置浓度为4 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 单独给予药物组6只加入DMEM高糖基础培养基4 μ M的榄香桐酸。

[0159] 培养24h后收集各组细胞上清。用Griess法测定NO浓度。

[0160] 取Griess试剂标准品(1mol)用DMEM高糖基础培养基稀释配制成终浓度为100 μ M、80 μ M、60 μ M、40 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、2 μ M、1 μ M。按50 μ L/孔将不同浓度标准品及细胞上清加入96孔板, 然后在分别加入Griess I、Griess II, 每孔50 μ L, 在酶标仪波长540nm处检测吸光度, 并计算样本中NO浓度。

[0161] 图17示出本实验例中各实验组中NO浓度检测, 从图中可以看出, 空白组1与模型组(LPS) 2相比, 具有显著差异; $p < 0.01$ 。药物干预低浓度组3与空白组1相比, 具有差异, $p < 0.05$; 药物干预中浓度组4、药物干预高浓度组5与空白组1相比, 具有显著差异; $p < 0.01$; 单独给予药物组6与空白组1相比没有差异。

[0162] 由此说明, 脂多糖可以促使细胞NO含量显著上升, 榄香桐酸单独给药不会影响细胞NO含量, 在脂多糖和榄香桐酸混合给药中, 榄香桐酸可以显著抑制细胞NO含量的上升。亦可理解为香桐酸可以抑制炎症的发展, 包括胰腺炎的抑制。

[0163] 实施例7

[0164] 脂多糖可以诱导RAW264.7细胞建立的炎症模型, 炎症中IL-6, TNF- α 含量会上升, 本实验例试图使用榄香桐酸做为治疗炎症药物, 检测榄香桐酸对炎症模型中IL-6, TNF- α 的抑制作用。

[0165] 将RAW264.7细胞按常规方法传代培养, 收集对数生长期细胞, 调整密度至 3×10^5 个/mL, 将细胞接种于24孔板中, 每孔1mL, 置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养48h后, 细胞贴壁生长至90%以上, 弃去上清。

[0166] 分别设置空白组1、模型组(LPS) 2、药物干预低浓度组3、药物干预中浓度组4、药物干预高浓度组5、和单独给予药物组6, 每组4个孔($n=4$)。

[0167] 空白组1中只加入DMEM高糖基础培养基; 模型组2在DMEM高糖基础培养基中加入0.5 μ g/mL LPS; 药物干预低浓度组3, 在培养基中加入配置浓度为1 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 药物干预中浓度组4, 在培养基中加入配置浓度为2 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 药物干预高浓度组5, 在培养基中加入配置浓度为4 μ M的榄香桐酸和0.5 μ g/mL LPS, 单独给予药物组6只加入DMEM高糖基础培养基4 μ M的榄香桐酸。

[0168] 培养24h后收集各组细胞上清。用Elisa法测定IL-6, TNF- α 浓度。

[0169] 1、实验准备工作: 提前将试剂盒中的包被抗体、包被抗体稀释液和标准品从冰箱中取出, 平衡至室温(18-25 $^{\circ}$ C), 不能直接在37 $^{\circ}$ C溶解。

[0170] (1) 配制包被抗体: 取出包被抗体(250 \times), 用包被抗体稀释液稀释到1 \times , 现用相配。

[0171] (2) 配制洗涤液: 用475mL纯水将25mL, 20 \times PBS稀释至500mL, 并加入20%Tween 1.25mL, 现用现配。

[0172] (3) 配制检测抗体: 取出检测抗体(250 \times), 用ELISA稀释液稀释到1 \times , 现用相配。

[0173] (4) 配制Avidin-HRP酶: 取出Avidin-HRP酶(250 \times), 用ELISA稀释液稀释到1 \times , 现

用相配。

[0174] (5) 配制标准品:取出1支标准品冻干粉,室温用1mL注射器加入1mL去离子水,轻微摇晃,室温15min,混匀。现用现配。

[0175] (6) 配制标准品溶液:

[0176] ①TNF- α 标准品:依次倍比用ELISA稀释液将稀释分别得到1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、0pg/mL八个浓度。

[0177] ②IL-6标准品:依次倍比用ELISA稀释液将稀释分别得到500、250、125、62.5、31.2、15.6、8.3、0pg/mL八个浓度。

[0178] 2、具体操作步骤:

[0179] (1) 加包被抗体:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0180] (2) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干。

[0181] (3) 加ELISA稀释液:200 μ L/孔,酶标板上加覆膜,室温,1h。

[0182] (4) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复2次。

[0183] (5) 加样:依次加入100 μ L各浓度标准品,余孔加入100 μ L待测样本,酶标板上加覆膜,室温,2h。

[0184] (6) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复3次。

[0185] (7) 加检测抗体:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,室温,1h。

[0186] (8) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复5次。

[0187] (9) 加Avidin-HRP酶:96孔酶标板中加入100 μ L,酶标板加覆膜,室温,30min。

[0188] (10) 洗板:弃液,300 μ L/孔洗涤液,浸泡1min,弃去孔内液体,甩干,重复7次。

[0189] (11) 加显色剂与终止液:100 μ L/孔,室温,5-10min。标准品前四个呈蓝色梯度时,马上加终止液50 μ L/孔,蓝色由蓝色转为黄色。

[0190] (12) 酶标仪检测450nm波长处每孔的光密度(O.D值)。

[0191] 3、结果判定

[0192] 根据标准品绘制标准曲线,以标准品浓度为横坐标,0.D值为纵坐标,以平滑连线连接各坐标点。通过样本的0.D值在标准曲线上经计算得到其浓度。

[0193] 图18示出本实验例中各实验组中IL-6浓度检测,从图中可以看出,空白组1与模型组(LPS)2相比,具有显著差异; $p < 0.01$ 。药物干预低浓度组3、药物干预中浓度组4、药物干预高浓度组5与空白组1相比,具有显著差异; $p < 0.01$;单独给予药物组6与空白组1相比没有差异。

[0194] 由此说明,脂多糖可以促使细胞IL-6含量显著上升,榄香酮酸单独给药不会影响细胞IL-6含量,在脂多糖和榄香酮酸混合给药中,榄香酮酸可以显著抑制细胞IL-6含量的上升。亦可理解为香桐酸可以抑制炎症的发展,包括胰腺炎的抑制。

[0195] 图19示出本实验例中各实验组中TNF- α 浓度检测,从图中可以看出,空白组1与模型组(LPS)2相比,具有显著差异; $p < 0.01$ 。药物干预低浓度组3、药物干预中浓度组4、药物干预高浓度组5与空白组1相比,具有显著差异; $p < 0.01$;单独给予药物组6与空白组1相比没有差异。

[0196] 由此说明,脂多糖可以促使细胞TNF- α 含量显著上升,榄香酮酸单独给药不会影响细胞TNF- α 含量,在脂多糖和榄香酮酸混合给药中,榄香酮酸可以显著抑制细胞TNF- α 含量

的上升。亦可理解为香桐酸可以抑制炎症的发展,包括胰腺炎的抑制。

[0197] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

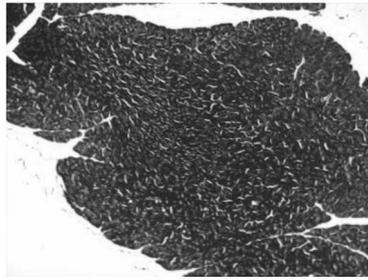


图1

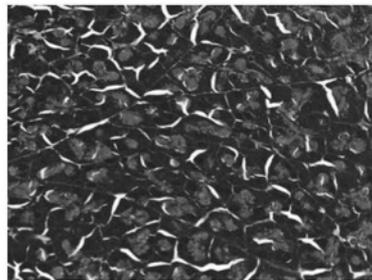


图2

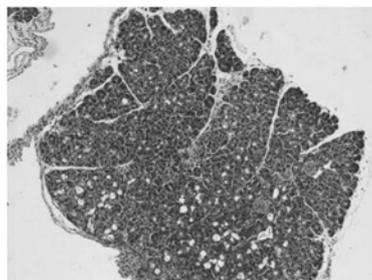


图3

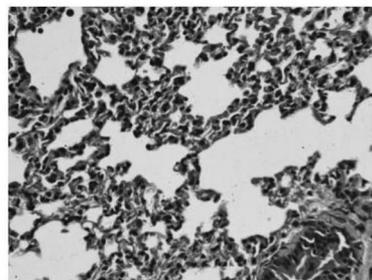


图4

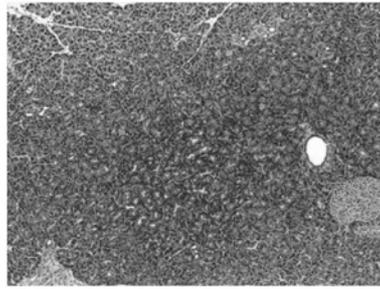


图5

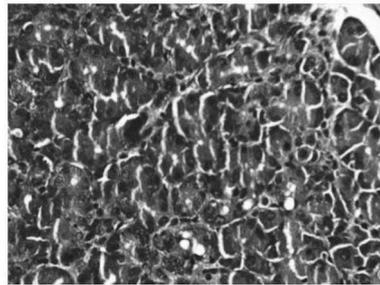


图6

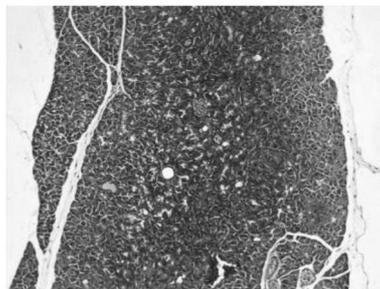


图7

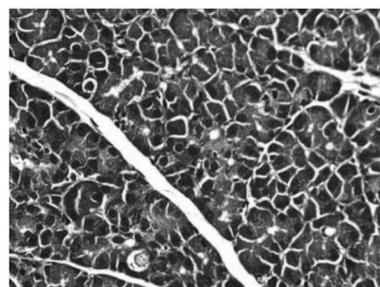


图8

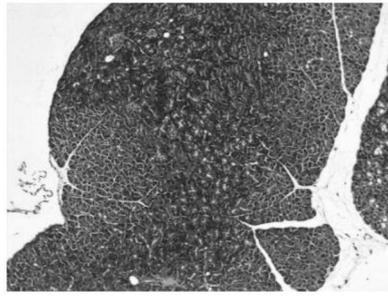


图9

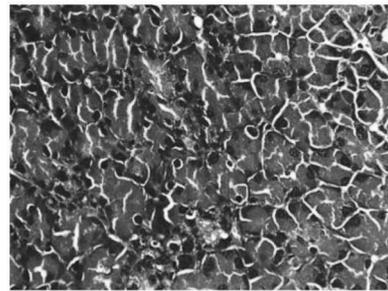


图10

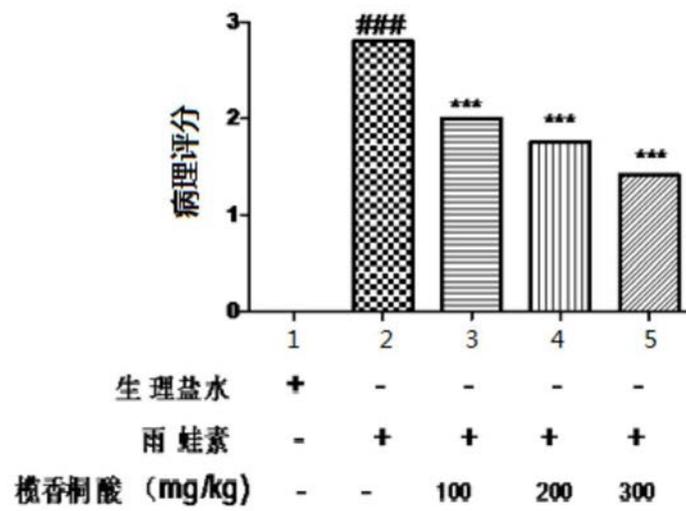


图11

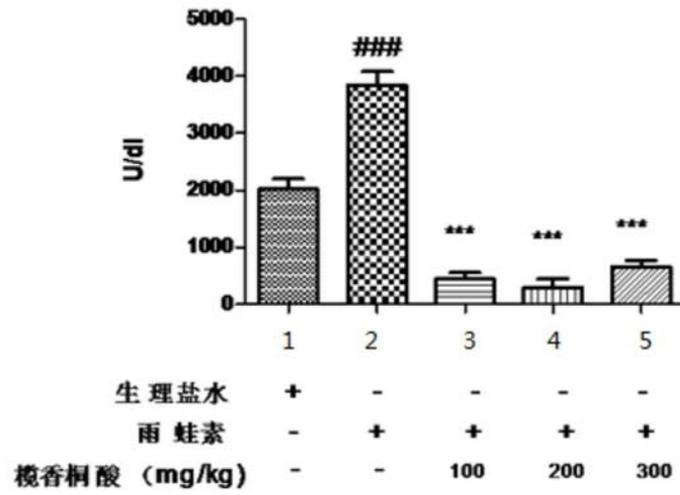


图12

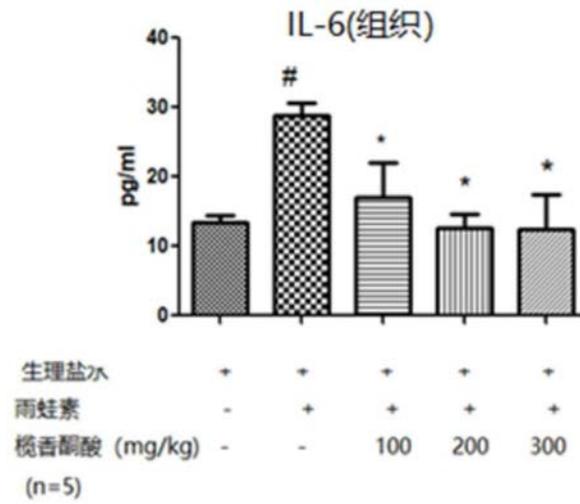


图13A

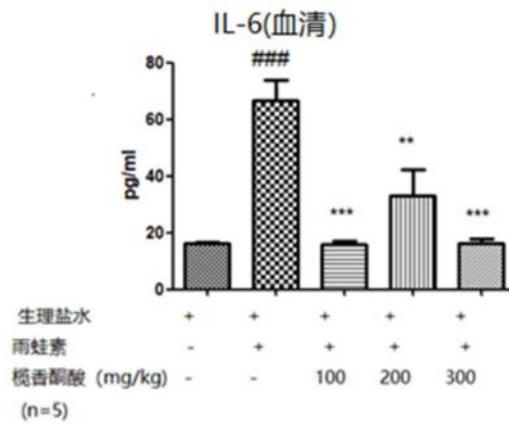


图13B

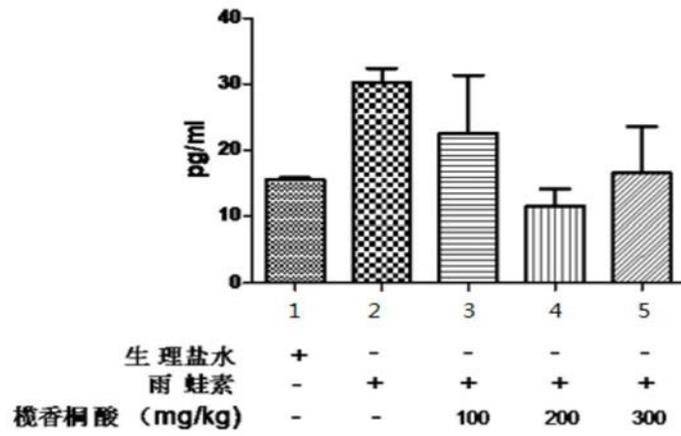


图14

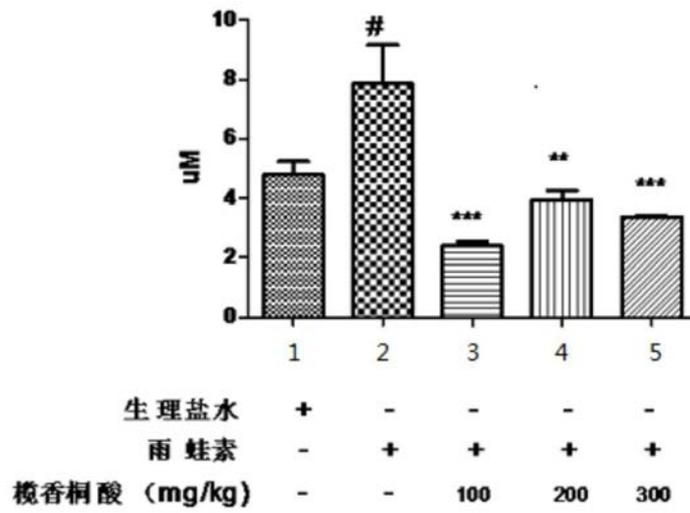


图15

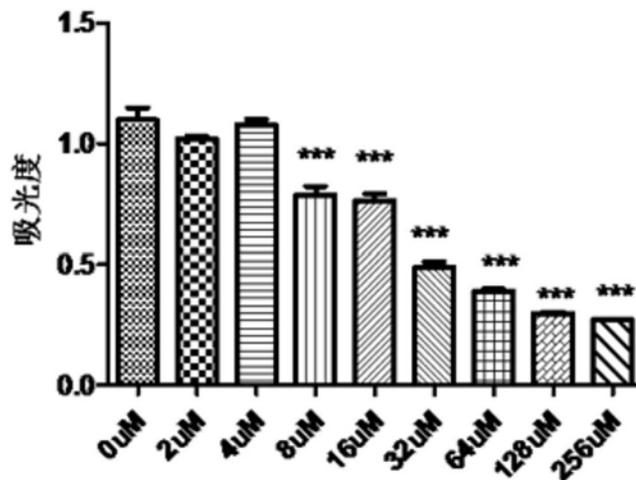


图16

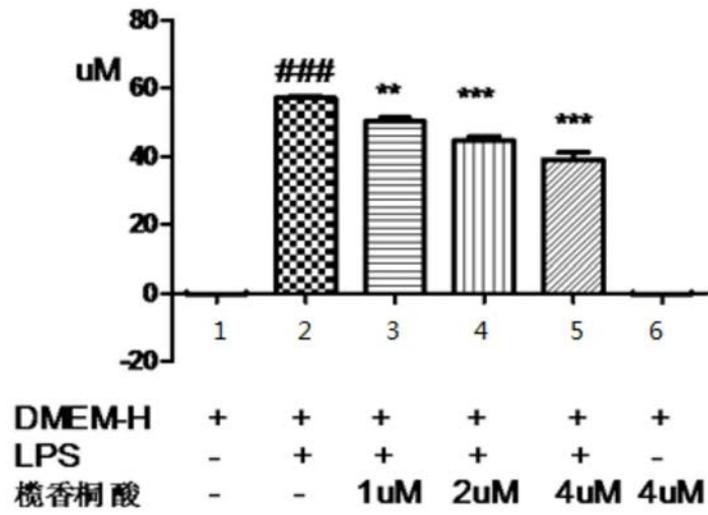


图17

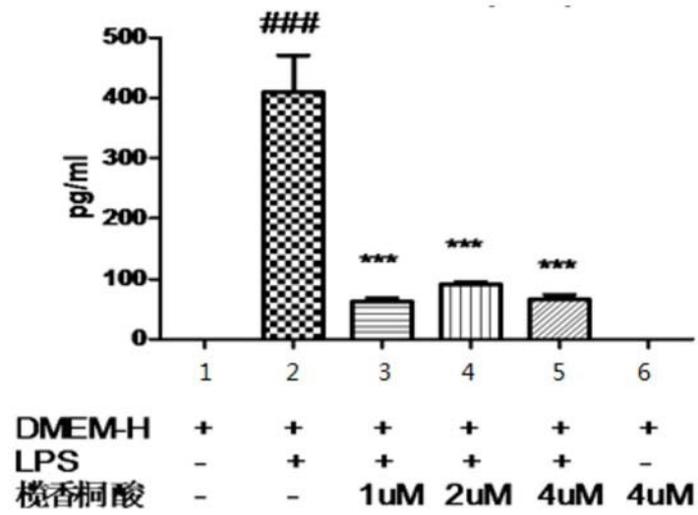


图18

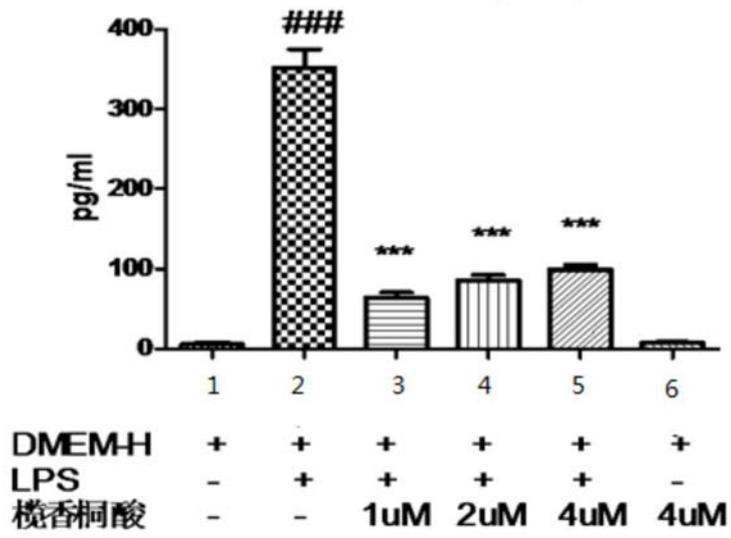


图19