



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105796764 B

(45)授权公告日 2019.12.10

(21)申请号 201610274653.8

A61P 19/02(2006.01)

(22)申请日 2016.04.28

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A23L 33/105(2016.01)

申请公布号 CN 105796764 A

A61K 31/11(2006.01)

A61K 31/403(2006.01)

(43)申请公布日 2016.07.27

(73)专利权人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 郑承剑 秦路平 王亮 蒲江

韩婷 辛海量 张巧艳 蒋益萍

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(56)对比文件

CN 103860528 A,2014.06.18,

CN 102258633 A,2011.11.30,

CN 102349886 A,2012.02.15,

赵湘湘.黄荆子活性化合物抗类风湿性关节炎作用机制研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2013,(第12期), E057-54.

审查员 廖慨

(51)Int.Cl.

A61K 36/85(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

黄荆子总木脂素制备方法及其用途

(57)摘要

本发明涉及医药技术领域,本发明涉及黄荆子总木脂素及其在制备抗类风湿性关节炎、抗前列腺癌药物中的应用。本发明通过II型胶原诱导的大鼠类风湿性关节炎模型证实了黄荆子总木脂素可显著改善类风湿性关节炎大鼠症状,具有良好的抗类风湿性关节炎作用;采用荷瘤小鼠模型证实了黄荆子总木脂素可显著抑制前列腺癌肿瘤生长,具有良好的抗前列腺癌作用。本发明涉及黄荆子总木脂素可用于制备抗类风湿性关节炎、抗前列腺癌药物,为寻求安全有效的抗类风湿性关节炎和抗前列腺癌药物提供了一种新的来源。

1. 黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用；

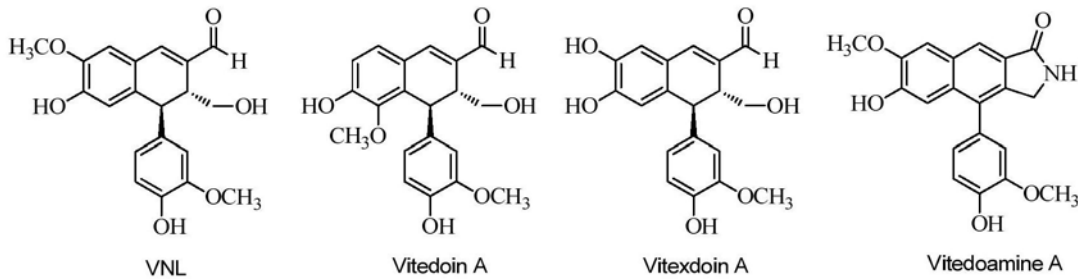
所述的黄荆子总木脂素的制备方法如下：

A、制备提取液：将黄荆果实粉碎后，用50~80%的乙醇热提2~3次，提取温度为50~80℃，每次溶媒用量为生药量的8~10倍，每次提取时间为1~2小时，合并提取液；

B、精制浓缩干燥：将上述提取液进行减压浓缩，回收溶剂，浓缩液经石油醚1:1v/v脱脂后，用70%乙醇稀释至含浸膏量为0.1g/mL的溶液；

C、分离纯化：将上述含浸膏量为0.1g/mL的溶液，与聚酰胺吸附树脂1.5:1w/w拌样后，上样于聚酰胺吸附树脂柱2:1w/w，水洗后，收集35%乙醇洗脱部位；35%乙醇洗脱液经减压浓缩，回收溶剂后用水溶解，将上述溶液上样于D-101大孔吸附树脂，水洗脱后，收集35%乙醇洗脱部位，回收溶剂后与水混悬，用乙酸乙酯萃取，将乙酸乙酯萃取液减压浓缩，得到黄荆子总木脂素；

所述的黄荆子总木脂素至少含有结构式如下所示的四种苯代萘型木脂素类化合物VNL、Vitedoin A、Vitedoamine A和Vitexdoin A：



且四种苯代萘型木脂素类化合物VNL、Vitedoin A、Vitedoamine A和Vitexdoin A的重量之和占黄荆子总木脂素的总重量的40%以上；

所述的黄荆子总木脂素黄荆子总木脂中，VNL含量为20%以上、Vitedoin A含量为20%以上、Vitedoamine A含量为0.1%以上、Vitexdoin A含量为4%以上。

2. 根据权利要求1所述的黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用，其特征在于，所述的药物以黄荆子总木脂素作为唯一活性组分，或包含黄荆子总木脂素的药物组合物。

3. 根据权利要求1所述的黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用，其特征在于，所述药物中黄荆子总木脂素的含量为1~99wt%。

4. 根据权利要求1所述的黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用，其特征在于，所述药物中黄荆子总木脂素的含量为1~90wt%。

5. 根据权利要求2所述的黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用，其特征在于，所述的药物组合物和药剂学上的常规药用辅料制成药物制剂。

6. 根据权利要求5所述的黄荆子总木脂素在制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物或食品中的应用，其特征在于，所述的药物制剂是片剂、颗粒剂、胶囊剂、滴丸、注射剂或气雾剂。

黄荆子总木脂素制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及是黄荆子总木脂素及其制备方法,与用于制备预防或治疗类风湿性关节炎和前列腺癌药物中的用途。

背景技术

[0002] 类风湿性关节炎(RA)是当前危害人类健康的最重要疾病之一,被称为“不死的癌症”。RA是一种以多关节受累、滑膜炎、骨与软骨破坏等为主要特征的慢性全身性自身免疫炎性疾病,其发病机理至今尚未完全阐明,普遍认为与遗传、感染和免疫调节等因素紊乱密切相关(Imboden JB.The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.*Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009,4:417-434.)。我国RA的患病率约0.3%-0.4%,约有400万患者,病程5-10年致残率为60%,晚期90%患者丧失社会劳动力和生活自理能力,是成人劳动力丧失的主要原因之一(Dai SM,Han XH,Zhao DB,Shi YQ,Liu Y,Meng JM.Prevalence of rheumatic symptoms,rheumatoid arthritis,ankylosing spondylitis,and gout in Shanghai,China:a COPCORD study.*J Rheumatol* 2003,30:2245-2251.)。因此造成了很多家庭问题以及巨大的社会负担。现行治疗类风湿性关节炎的方法主要有手术治疗、化学药物治疗和细胞因子类生物制剂的治疗。一般认为外科手术只适用于晚期畸形病例,且费用昂贵,对机体创伤较大;化学药物如非甾体抗炎药、抗风湿药和糖皮质激素等的长期应用会引起胃肠道不适、骨髓抑制、肝损伤、高血压等严重的不良反应;生物制剂在干预病变细胞的同时,对正常细胞也同样会产生一定的作用,干扰机体的固有免疫和适应性免疫,从而产生较大的毒性和破坏机体防御作用的风险(1.张义浜,刘志敏,熊凌霜.类风湿关节炎发病机制及其治疗方法研究进展.*细胞与分子免疫学杂志*,2005,21(增刊):88-94.2.Doan T,Massarotti E.Rheumatoid Arthritis:An Overview of New and Emerging Therapies.*J Clin Pharmacol* 2005,45:751-762.)。因此,寻求高效低毒的防治RA的药物仍是世界医学界面临的一项艰巨任务和难题。

[0003] 前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率高,严重危害人类健康(Ahmedin Jemal,Rebecca Siegel,Jiaquan Xu and Elizabeth Ward.Cancer statistics,2010.*CA Cancer J Clin* 2010,60:277-300.)。我国男性前列腺癌的发病率在近年来呈现持续快速增长趋势,发病率年均增加比例约为12%,中国男性前列腺癌发病率已经超过11.00/10万,前列腺癌正成为严重影响我国男性健康的泌尿系恶性肿瘤(韩苏军,张思维,陈万青,李长岭.中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析.*临床肿瘤学杂志*,2013,8(4):330-334.)。抗雄激素治疗是晚期前列腺癌的有效治疗方法之一,但经过一段时间后几乎所有患者病变将持续进展,转变为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer,CRPC),预后欠佳,CRPC患者生存质量差,中位生存期12~20个月(Thompson I,Thrasher JB,Aus G,et al.Guideline for the management of clinically localized prostate cancer:2007update.*Urology*2007,177(6):2106-2131.)。目前,CRPC的发生机制尚不完全清楚,临床仍缺乏有效的治疗药物。因此,寻求高效

低毒的药物治疗CRPC是前列腺癌研究的主攻方向之一。

[0004] 黄荆子为马鞭草科牡荆属植物黄荆*Vitex negundo* L.的干燥成熟果实,产于我国20余省市,资源极为丰富。性温,味辛、苦;归肺、胃、肝经;具有祛风除湿和行气止痛的功效,用于治疗风痹、哮喘等(江苏新医学院.中药大辞典.上海科学技术出版社,1986:2057.)。目前,有关黄荆子的药理活性研究主要集中在抗炎镇痛、抗肿瘤以及抗氧化等方面,从中报导的化学成分主要类型有木脂素类、萜类(环烯醚萜、倍半萜、二萜和三萜)、黄酮类、植物甾类等(李春正,苏艳芳,靳先军.牡荆属植物化学成分及生物活性研究进展.中草药[J],2005,36(6):930-938)。其中,芳基萜型木脂素类成分为黄荆子中的主要特征性成分之一,包括6-羟基-4 β -(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3 α -羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萜醛、Vitedoin A、Vitedoamine A、Vitrofolals E-F、去四氢刺柏木脂体(detetrahydroconidendrin)、Vitedoamine B、和Vitexdoins A-I等(Ono M,Nishida Y,Masuoka C,Li JC,Okawa M,Ikeda T,Nohara T.Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo*.J.Nat.Prod.,2004,67(12):2073-2075;Zheng CJ,Huang BK,Han T,Zhang QY,Zhang H,Rahman K,Qin LP.Nitric oxide scavenging lignans from *Vitex negundo* seeds.J.Nat.Prod.,2009,72(9):1627-1630;Zheng CJ,Zhang XW,Han T,Jiang YP,Tang JY,Brömme D,Qin LP.Anti-inflammatory and anti-osteoporotic lignans from *Vitex negundo* seeds.Fitoterapia 2014,10.1016/j.fitote.2013.12.006.)。现代药理试验表明,黄荆子中的芳基萜型木脂素类化合物具有多种生物活性,其中6-羟基-4 β -(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3 α -羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萜醛具有镇痛活性(Zheng CJ,Tang WZ,Huang BK,Han T,Zhang QY,Zhang H,Qin LP.Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L.seeds.Phytochemistry.2009,16:560-567);6-羟基-4 β -(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3 α -羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萜醛和Vitexdoins A-E具有抗炎活性(Zheng CJ,Huang BK,Han T,Zhang QY,Zhang H,Rahman K,Qin LP.Nitric oxide scavenging lignans from *Vitex negundo* seeds.J.Nat.Prod.,2009,72(9):1627-1630;Chawla AS,Sharma AK,Handa SS.A lignan from *Vitex negundo* seeds.Phytochemistry,1992,31(12):4378-4379);6-羟基-4 β -(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3 α -羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萜醛、Vitedoin A、Vitedoamine A、Vitrofolals E-F、去四氢刺柏木脂体(detetrahydroconidendrin)具有抗氧化活性(Ono M,Nishida Y,Masuoka C,Li JC,Okawa M,Ikeda T,Nohara T.Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo*.J.Nat.Prod.,2004,67(12):2073-2075)等。

[0005] 本发明人一直致力于黄荆子提取物,包括单体化合物的研究。

[0006] 本发明人已就黄荆子提取物及其在预防或治疗类风湿性关节炎药物或食品中的应用申请了中国发明专利,并获得专利权,专利号为CN201110186425.2,发明名称为“黄荆子提取物及其用途”,授权公告号为CN102258633B。

[0007] 本发明人已就苯代萜型木脂素类化合物(包括VNL、Vitedoin A、Vitedoamine A或Vitrofolal F)在制备抗辐射药物中的应用申请了中国发明专利,并获得专利权,专利号为CN201110186436.0,发明名称为“苯代萜型木脂素类化合物在制备抗辐射药物中的应用”,授权公告号CN 102349886 B。

[0008] 本发明人已就苯代萘型木脂素类化合物黄荆子素VNL在制备抗前列腺癌药物中的应用申请了中国发明专利,申请号为CN201410025746.8,发明名称为“一种芳基萘型木脂素在制备抗前列腺癌药物中的应用”,申请公布号为CN103860528A。

[0009] 本发明人已就苯代萘型木脂素类化合物黄荆子素VNL在制备抗类风湿性关节炎药物中的应用申请了中国发明专利,申请号为CN201510278639.0,发明名称为“一种苯代萘型木脂素在制备抗类风湿性关节炎药物中的应用”,申请公布号为CN105030740A。

[0010] 中药现代化研究中,中药作用特色优势之一就是中药由活性物质群组成,活性物质群通过多靶点、多环节、多途径发挥整合作用(曹俊岭,李祖伦,付强,肖小河.中药及复方整合作用的研究.中草药,2007,38(1):I0002-I0004)。每味中药就相当于一个小复方,含有多种化学成分,每个有效成分又分别具有多方面的生物活性,它们之间可以相互协同、整合起效。

[0011] 至今未见黄荆子总木脂素用于治疗类风湿性关节炎和前列腺癌方面的报道。

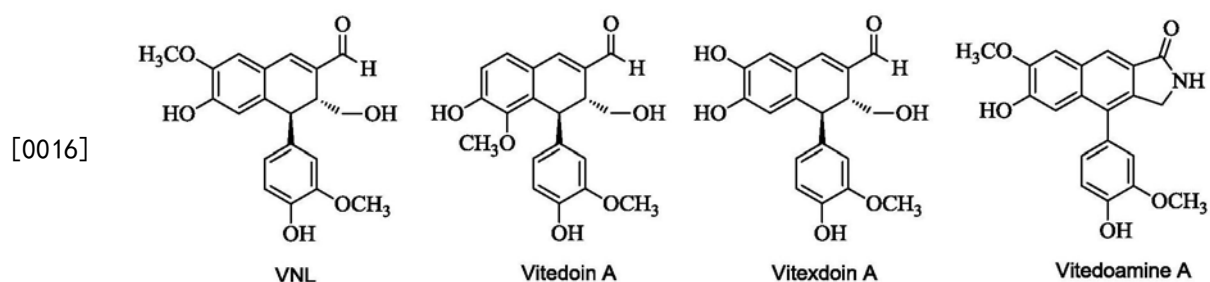
发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种黄荆子总木脂素及其新的医药用途。

[0013] 虽然,我们发现了黄荆子提取物具有抗类风湿性关节炎的活性;也发现了黄荆子中提取获得的单体化合物—黄荆子素VNL具有抗前列腺癌和抗类风湿性关节炎的活性。但是,黄荆子素VNL的分离提纯非常困难,而且10公斤的黄荆子药材中仅能提取得到约2克的黄荆子素VNL,极大地浪费了原料药材;而黄荆子总提取物目前未报道抗前列腺癌的活性,另外,黄荆子中提取的另外一些苯代萘型木脂素类单体化合物如Vitedoin A、Vitedoamine A、Vitexdoin A、Vitrofolal F、Vitrofolal E等均未报道是否具有良好的抗前列腺癌和抗类风湿性关节炎的活性。本发明人设想是否能获得黄荆子总木脂素,也能够具有良好的抗前列腺癌和抗类风湿性关节炎的活性。

[0014] 鉴于此,我们对黄荆子中的木脂素类成分进行了富集,获得了黄荆子总木脂素。

[0015] 黄荆子总木脂素主要含有以下四种苯代萘型木脂素类化合物,包括VNL、Vitedoin A、Vitedoamine A和Vitexdoin A,各自的结构式如下:



[0017] 本发明提供了黄荆子总木脂素在预防或治疗类风湿性关节炎和/或前列腺癌药物中的应用。

[0018] 本发明还提供了黄荆子总木脂素的制备方法。

[0019] 黄荆子总木脂素为从马鞭草科牡荆属植物黄荆的果实中提取分离得到,具体制备方法如下:

[0020] 1) 制备提取液:将黄荆果实粉碎后,用50~80%的乙醇热提2~3次,提取温度为50~80℃,每次溶媒用量为生药量的8~10倍,每次提取时间为1~2小时,合并提取液;

[0021] 2) 精制浓缩干燥:将上述提取液进行减压浓缩,回收溶剂,浓缩液(0.15g/mL)经石油醚(1:1,v/v)脱脂后,用70%乙醇稀释至含浸膏量为0.1g/mL的溶液;3) 分离纯化:将上述含浸膏量为0.1g/mL的溶液,与聚酰胺吸附树脂1.5:1w/w拌样后,上样于聚酰胺吸附树脂柱2:1w/w,水洗后,收集35%乙醇洗脱部位;35%乙醇洗脱液经减压浓缩,回收溶剂后用水溶解,将上述溶液上样于D-101大孔吸附树脂,水洗脱后,收集35%乙醇洗脱部位,回收溶剂后与水混悬,用乙酸乙酯萃取,将乙酸乙酯萃取液减压浓缩,得到黄荆子总木脂素。

[0022] 优选的,本发明的黄荆子总木脂素中,VNL、Vitedoin A、Vitedoamine A和Vitexdoin A的总和占黄荆子总木脂素的40%以上。

[0023] 更优的,其中VNL含量为20%以上、Vitedoin A含量为20%以上、Vitedoamine A含量为0.1%以上、Vitexdoin A含量为4%以上。

[0024] 最优的,其中VNL含量为23%以上、Vitedoin A含量为25%以上、Vitedoamine A含量为0.2%以上、Vitexdoin A含量为4%以上。(上述比例均为W/W)

[0025] 所述的药物为:黄荆子总木脂素,或包含黄荆子总木脂素的药物组合物。

[0026] 所述药物中,黄荆子总木脂素的含量为1-99wt%,优选含量为40-90wt%。

[0027] 所述的药物组合物可以和药剂学上的常规药用辅料制成药物制剂。

[0028] 所述的药物制剂可以是片剂、颗粒剂、分散片、胶囊剂、软胶囊剂、滴丸、注射剂、粉针剂,或气雾剂等。

[0029] 本发明采用类风湿性关节炎动物模型(Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med 1977, 146:857-868; Viji V, Kavitha SK, Helen A. Bacopa monniera (L.) Wettst inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. Phytother Res 2010, 24: 1377-1383), 观察本发明提供的黄荆子总木脂素灌胃给药的治疗作用。

[0030] 实验结果显示,黄荆子总木脂素(40mg/kg)灌胃给药后,可显著降低RA大鼠关节炎指数,抑制踝关节肿胀程度。上述研究表明,黄荆子总木脂素具有良好的抗RA活性。

[0031] 本发明采用前列腺癌荷瘤小鼠模型(Zhan Y, Cao B, Qi YF, Liu S, Zhang Q, Zhou WD, Xu D, Lu H, Sartor O, Kong W, Zhang HT, Dong Y. Methylselenol prodrug enhances MDV3100 efficacy for treatment of castration-resistant prostate cancer. Int J Cancer. 2013 November; 133 (9) :2225-2233.), 观察本发明提供的黄荆子总木脂素灌胃给药对前列腺癌肿瘤生长的抑制作用。

[0032] 实验结果显示,黄荆子总木脂素(40mg/kg)灌胃给药后,可显著抑制非激素依赖的前列腺癌肿瘤生长。上述研究表明,黄荆子总木脂素具有良好的抗前列腺癌活性。

[0033] 进一步采用急性毒性试验初步评价其安全性,结果表明黄荆子总木脂素的最大耐受剂量为16.0g/kg(8000g生药量/kg,相当于人临床用量的6400倍),试验期间无动物死亡,对动物自发活动、体重均无明显影响,对小鼠主要脏器无明显毒性,表明黄荆子总木脂素具有较高的安全性。

[0034] 黄荆子总木脂素相比于黄荆子素VNL,其优势在于:

[0035] 1) 黄荆子素总木脂素提取、纯化工艺优于黄荆子素VNL,所用溶剂及色谱柱填料符合新药申报要求,更适于工业化生产;

[0036] 2) 黄荆子总木脂素得率约为0.2%,而黄荆子素VNL得率<0.02%,可更加充分利用

黄荆子药材资源;

[0037] 3) 黄荆子总木脂素最大耐受剂量为16.0g/kg (8000g生药量/kg, 相当于人临床用量的6400倍), 提示其安全性较高;

[0038] 4) 体内抗类风湿性关节炎实验中, 相同剂量30mg/kg的总木脂素与VNL效果相当, 但是动物对于总木脂素更为耐受, 动物体重较对模型对照组无明显下降, 而VNL在给药期间动物体重较对模型对照组明显下降。

[0039] 5) 体外抗炎实验中 (RAW264.7细胞), 总木脂素 (IC₅₀ 0.20μg/mL) 抑制NO生成效果优于VNL (IC₅₀ 0.80μg/mL)。

[0040] 6) 体外抗前列腺癌实验中 (DU145细胞), 总木脂素 (IC₅₀ 0.30μg/mL) 抑制细胞增殖效果优于VNL (IC₅₀ 3.0μg/mL)。

[0041] 本发明寻找到了安全有效的防治RA和CRPC药物。

附图说明

[0042] 图1: 黄荆子总木脂素及VNL对II型胶原诱导RA模型大鼠左后足关节炎指数的影响 (*vs模型组, p<0.05; **vs模型组, p<0.01);

[0043] 图2: 黄荆子总木脂素及VNL对II型胶原诱导RA模型大鼠左后足足肿胀的抑制作用 (mean±SD, n=10) (*vs模型组, p<0.05; **vs模型组, p<0.01); 图3: 黄荆子总木脂素及VNL对II型胶原诱导RA模型大鼠体重的影响 (mean±SD, n=10) (*vs模型组, p<0.05; **vs模型组, p<0.01);

[0044] 图4: 黄荆子总木脂素及VNL对前列腺癌裸鼠肿瘤重量的影响 (mean±SD, n=10) (*vs模型组, p<0.05; **vs模型组, p<0.01);

具体实施方式

[0045] 现结合实施例, 对本发明作详细描述, 但本发明的实施不仅限于此。

[0046] 实施例1: 黄荆子总木脂素的制备

[0047] 1) 制备提取液: 将黄荆果实粉碎后, 用50~80%的乙醇热提2~3次, 提取温度为50~80℃, 每次溶媒用量为生药量的8~10倍, 每次提取时间为1~2小时, 合并提取液;

[0048] 2) 精制浓缩干燥: 将上述提取液进行减压浓缩, 回收溶剂, 浓缩液 (0.15g/mL) 经石油醚 (1:1, v/v) 脱脂后, 用70%乙醇稀释至含浸膏量为0.1g/mL的溶液;

[0049] 3) 分离纯化: 将上述含浸膏量为0.1g/mL的溶液, 与聚酰胺吸附树脂拌样 (1.5:1, w/w) 后上样于聚酰胺吸附树脂柱 (2:1, w/w), 水洗后, 收集35%乙醇洗脱部位; 35%乙醇洗脱液经减压浓缩, 回收溶剂后与水混悬, 用乙酸乙酯萃取, 将乙酸乙酯萃取液减压浓缩, 回收溶剂后用水溶解 (1.5mg/mL), 将上述溶液上样于D-101大孔吸附树脂, 水洗脱后, 收集35%乙醇洗脱部位, 得到上述药物黄荆子总木脂素TOV, 经HPLC含量测定, VNL含量为23.14%、Vitedoin A含量为25.17%、Vitedoamine A含量为0.23%、Vitexdoin A含量为4.63%, 可测成分含量为53.17%。

[0050] 实施例2: 黄荆子总木脂素的抗类风湿性关节炎药效学实验

[0051] 2.1实验材料

[0052] 成年雄性180~220g SD大鼠 (第二军医大学实验动物中心提供) 40只。主要仪器:

足趾容积测量仪 (YLS-7A, 山东省医学科学院设备站)、酶标仪 (BIO-RAD 550)、离心机 (Labofuge 400R, Heraeus公司)、电子天平 (FA110A型, 上海精密科学仪器有限公司)。

[0053] 2.2实验造模及给药

[0054] 实验前将40只大鼠称重,按体质量随机分为4组,每组10只,自由饮食、进水。分为空白组、模型组、阳性药组和黄荆子总木脂素组。

[0055] 空白组:不予任何处理;

[0056] 模型组:将牛II型胶原蛋白醋酸溶液与等容量的弗氏不完全佐剂混合,充分乳化。第0天,SD大鼠尾根进行皮内注射(1mg/ml),每只0.1ml;7日后,加强免疫,大鼠尾根用0.1ml/只溶液注射作为激发注射,第15日左右造成RA动物模型;

[0057] 阳性药组:地塞米松,0.05mg/kg,灌胃给药,每日1次;

[0058] 黄荆子总木脂素组:自造模成功之日起,给予大鼠黄荆子总木脂素,灌胃给药,每日1次,剂量为30mg/kg,连续给药30d。

[0059] 2.3观察指标

[0060] (1) 对大鼠关节肿胀程度进行关节炎指数评分,每3天评分一次。

[0061] (2) 用足趾容积测量仪测量大鼠足趾肿胀程度,每3天测量一次。

[0062] (3) 实验结束当天称量大鼠体重。

[0063] 2.4实验结果

[0064] 采用SPSS14.0对实验数据进行t检验统计学分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

[0065] (1) 大鼠关节炎指数评分

[0066] 如图1所示,给药第30天,黄荆子总木脂素组左后足关节炎指数为 0.2 ± 0.4 ,模型组左后足关节炎指数为 2.6 ± 0.5 ,提示黄荆子总木脂素可显著降低II型胶原诱导的RA大鼠左后足关节炎指数,与模型组相比存在显著性差异,表明黄荆子总木脂素对大鼠类风湿性关节炎模型有较好的抗炎作用,效果与VNL相当。

[0067] (2) 大鼠足趾肿胀度

[0068] 如图2所示,空白组大鼠左后足趾无明显改变,模型组有明显的肿胀,与空白组存在显著性差异,提示造模成功;给药第30天,黄荆子总木脂素组左后足体积为 1357.0 ± 319.4 ,模型组左后足体积为 2297.1 ± 177.2 ,提示黄荆子总木脂素给药组大鼠左后足趾肿胀程度较轻,与模型组相比存在显著性差异,表明黄荆子提取物对大鼠类风湿性关节炎模型有较好的抗炎作用,效果与VNL相当。

[0069] (3) 大鼠体重

[0070] 如图3所示,给药第30天,与模型对照组相比,阳性药组与VNL组大鼠体重明显下降,而黄荆子总木脂素组大鼠体重无明显变化,提示动物对黄荆子总木脂素耐受较好。

[0071] 实施例3:黄荆子总木脂素的抗前列腺癌药效学实验

[0072] 3.1实验材料

[0073] SPF级雄性BALB/c裸鼠60只,由常州卡文斯实验动物有限公司提供(实验动物生产许可证:SCXK(苏)2011-0003);实验动物使用许可证:SCXK(苏)2011-0003),采购时4-6周,开始给药时9-10周,采购时体重16-18g,开始给药时体重19-20g。C4-2人前列腺癌细胞(激素非依赖),细胞于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。ChemBase CBS-CJ-1FD超净

工作台, MCO-15AC二氧化碳培养箱, 日本三洋SANYOXD-202荧光倒置生物显微镜显微镜(南京江南永新光学有限公司), 0-150型游标卡尺(台湾西南佳华精密量具有限公司)。

[0074] 3.2实验造模及给药

[0075] 人前列腺癌C4-2裸小鼠移植瘤, 由人前列腺癌C4-2裸细胞株接种于裸小鼠腋窝皮下而建立。接种形成移植瘤后再在裸鼠体内传3代后使用。

[0076] 取生长旺盛期的肿瘤细胞, 在无菌条件下, 接种60只裸小鼠右侧腋窝皮下, 细胞接种量为 1×10^6 。裸小鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径, 待肿瘤生长至 $70-100\text{mm}^3$ 左右时挑选生长状态良好且肿瘤大小均一性较好的荷瘤裸鼠40只, 随机分成4组, 每组10只, 即模型组、TOV组 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、VNL组 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、阳性药MDV3100组 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、TOV $20\text{mg}/\text{kg}$ 联合MDV3100 $10\text{mg}/\text{kg}$ 组。各组均灌胃给药, 每天给药一次, 给药体积为 $0.2\text{ml}/2\text{Lg}$ 体重。给药21次后脱颈处死裸鼠, 手术剥取瘤块称重。

[0077] 3.3观察指标

[0078] (1) 给药处理对裸鼠肿瘤重量的影响

[0079] 3.4实验结果

[0080] 如图3所示, TOV组、VNL组、阳性药MDV3100组以及联合用药组均可显著抑制肿瘤生长, 减轻瘤重。TOV和VNL组药效相当, 且与阳性药MDV3100组相当, TOV与MDV3100两者联合用药效果最佳, 不仅可减少药物给药量, 且与两者单独给药相比, 效果显著提升。

[0081] 实施例4: 黄荆子总木脂素的急性毒性试验

[0082] 4.1实验动物

[0083] 18~22g ICR小鼠(第二军医大学实验动物中心提供) 50只, 雌雄各半。

[0084] 4.2最大耐受量(MTD)测定

[0085] 将小鼠按体重随机分为对照组和给药组。两组小鼠在灌胃给药前禁食不禁水12h, 给药组给与含总木脂素 $0.4\text{g}/\text{ml}$ 的最大能溶浓度的供试药液按照 $0.4\text{ml}/10\text{g}$ 体质量的灌胃体积在24h内灌胃给药2次, 对照组同法给予等量 0.5% CMC-Na灌胃2次。给药后立刻观察小鼠的状况并连续观察2周, 在给药后的1h、1d至14d详细记录两组小鼠在体质量、皮毛颜色、呼吸、眼粘膜及口腔处分泌物、大小便、活动、外界反应等方面的一般变化情况及死亡情况。若有小鼠死亡则解剖进行尸检, 对主要的脏器进行观察, 待实验结束后处死所有小鼠并脑、心、脾、肝、肾和肺等主要脏器的病变情况, 若肉眼观察有明显的病理的变化立刻送作组织切片的病理学检查。

[0086] 4.3观察指标

[0087] (1) 总木脂素TOV对小鼠一般状况的影响

[0088] (2) 总木脂素TOV对小鼠体重的影响

[0089] (3) 总木脂素TOV对小鼠主要脏器的影响

[0090] 4.4实验结果

[0091] 在最大耐受量的实验中, 总木脂素TOV以最大混悬质量浓度 $0.4\text{g}/\text{ml}$ 和小鼠可承受的最大体积 $0.4\text{ml}/10\text{g}$ 在1d内灌胃给药2次后, 大部分小鼠与对照组并无二致, 活动行为、反应均正常, 只有少部分的小鼠出现了活动及反应的轻微减弱, 实验过程中没有发生小鼠颤抖、倾倒等严重状况。在灌胃最大量后及观察期间并没有小鼠出现死亡的情况。

[0092] 由表1可知, 雌雄小鼠灌胃总木脂素TOV后, 实验组和对照组小鼠在体重增长方面

并没有显著性差异 ($P>0.05$)。

[0093] 观察2周后,将小鼠处死解剖肉眼观察各脏器的变化情况:肝脏表面光滑没有发生病灶、肿块等病理变化,其大小、形状均正常,将肝脏横切后,切面的色泽和质地均光泽、质密,无松散等异常;同法检查小鼠脾脏情况,脾脏表面没有出现结节、肿大等病理现象,脾脏的大小、形状、表面、切面和质地均正常;同法检查小鼠肾脏情况,肾脏各项均表现正常;心的大小和颜色经肉眼观察均没有异常;胃大小、形状正常,胃黏膜没有发生出血、坏死等情况,在胃壁上亦无出血点。小鼠的脏器占体重比的系数记录与表2中,主要脏器系数表明总木脂素TOV对小鼠的脏器并没有明显毒性。

[0094] 结果表明,黄荆子总木脂素最大耐受量为16.00g/kg (8000g生药量/kg,相当于人临床用量的6400倍)。各组剂量均无动物死亡,黄荆子总木脂素对动物自发活动、体重均无明显影响,对小鼠主要脏器无明显影响,提示黄荆子总木脂素具有较高的安全性。

[0095] 表1.总木脂素TOV对小鼠体重变化的影响 ($\bar{x}\pm S$, n=10)

[0096]

		实验各组不同性别小鼠在不同时间记录的体重/g					
性别	组别	1d	3d	5d	7d	10d	14d
♀	TOV 组	18.6±0.6	21.5±0.2	22.7±0.4	23.5±0.2	25.1±0.3	27.2±0.2
	0.5%CMC-Na 组	18.0±0.4	20.8±0.4	22.1±0.5	23.3±0.8	25.5±0.8	28.2±0.8
♂	TOV 组	19.2±0.3	22.2±0.7	23.4±0.2	24.6±0.2	26.2±0.5	28.7±0.5
	0.5%CMC-Na 组	18.6±0.3	21.6±0.5	23.1±0.5	24.5±0.3	26.5±0.5	28.5±0.4

[0097] 表2.总木脂素TOV对小鼠脏器系数的影响 ($\bar{x}\pm S$, n=10)

[0098]

性别	组别	肝体比	心体比	肾体比	脾体比
♀	0.5%CMC-Na 组	0.051±0.004	0.005±0.002	0.013±0.003	0.005±0.002
	TOV 组	0.048±0.003	0.004±0.001	0.012±0.002	0.004±0.002
♂	0.5%CMC-Na 组	0.053±0.004	0.004±0.002	0.013±0.002	0.006±0.002
	TOV 组	0.052±0.001	0.003±0.002	0.012±0.003	0.005±0.001

[0099] 实施例5:黄荆子总木脂素的体外抗炎活性:抑制LPS刺激的RAW264.7细胞中一氧化氮(NO)生成

[0100] 5.1细胞培养

[0101] RAW264.7细胞培养体系为DMDE培养基(HyClone),含10%胎牛血清(FBS, HyClone)、100U/ml青霉素、100U/ml链霉素于37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养。

[0102] 5.2NO释放量测试

[0103] RAW264.7细胞,以 1×10^5 个/孔接种于96孔板。放入培养箱中贴壁4h。加入不同浓度化合物,加入LPS(终浓度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$),另设相应的细胞对照及刺激对照(RAW264.7细胞加入上述浓度LPS)。 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养24小时。至培养结束,将上清液小心吸入1.5ml离心管中, 5000rpm , 10min ,再次吸入1.5ml离心管,冻存待检测。NO的释放量采用Griess法检测。

[0104] 5.3实验结果

[0105] 结果表明,黄荆子总木脂素TOV和VNL可显著抑制LPS刺激的RAW264.7细胞中一氧化氮(NO)的生成, IC_{50} 分别为 $0.20\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.80\mu\text{g}/\text{mL}$,显示了良好的体外抗炎作用,TOV效果优于VNL。

[0106] 实施例6:黄荆子总木脂素的体外抗前列腺癌活性:对人前列腺癌细胞(DU145)增殖的影响

[0107] 6.1细胞培养

[0108] DU145细胞培养体系为RPMI1640培养基(Gibco),含 10% 胎牛血清(hyclone)、 $100\text{U}/\text{ml}$ 青霉素、 $100\text{U}/\text{ml}$ 链霉素于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度条件下培养。

[0109] 6.2细胞增殖测试

[0110] 采用Cell Counting Kit-8试剂盒(CCK-8),取一定数量指数生长期的DU145细胞接种于96孔板,分空白对照组和给药组($0.1, 1$ 和 $10\mu\text{M}$) 每组设6个复孔。细胞给药后继续孵育48h,培养至规定时间后,加CCK-8 $10\mu\text{l}$,继续孵育2h,酶标仪检测450nm处光密度(OD)值(630nm 为参照波长),重复实验3次,计算药物 IC_{50} 值。

[0111] 6.3实验结果

[0112] 结果表明,黄荆子总木脂素TOV和VNL可显著抑制DU145细胞的增殖, IC_{50} 分别为 $0.30\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $3.00\mu\text{g}/\text{mL}$,显示了良好的体外抗前列腺癌作用,TOV效果优于VNL。

[0113] 鉴于上述药效实验及安全性评价结果,本发明的黄荆子总木脂素具有显著抗类风湿性关节炎及抗前列腺癌活性,且安全性较好,因此可用于制备抗类风湿性关节炎和抗前列腺癌药物或食品。

[0114] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

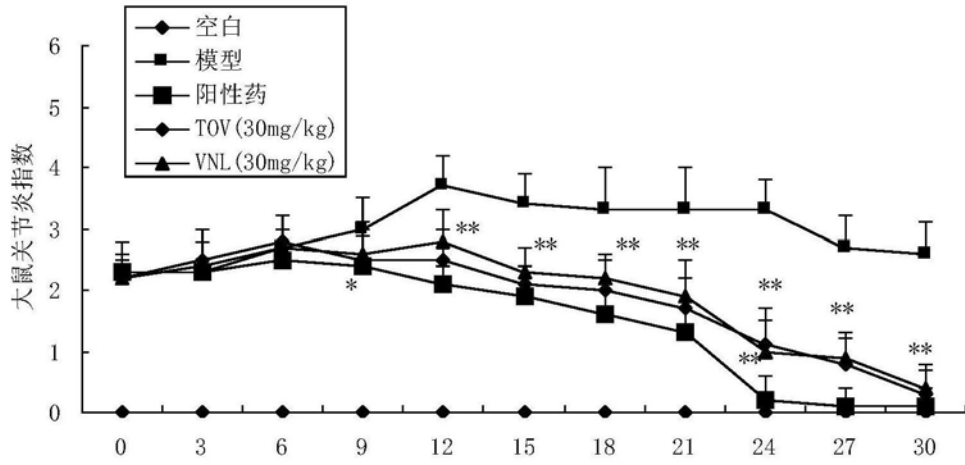


图1

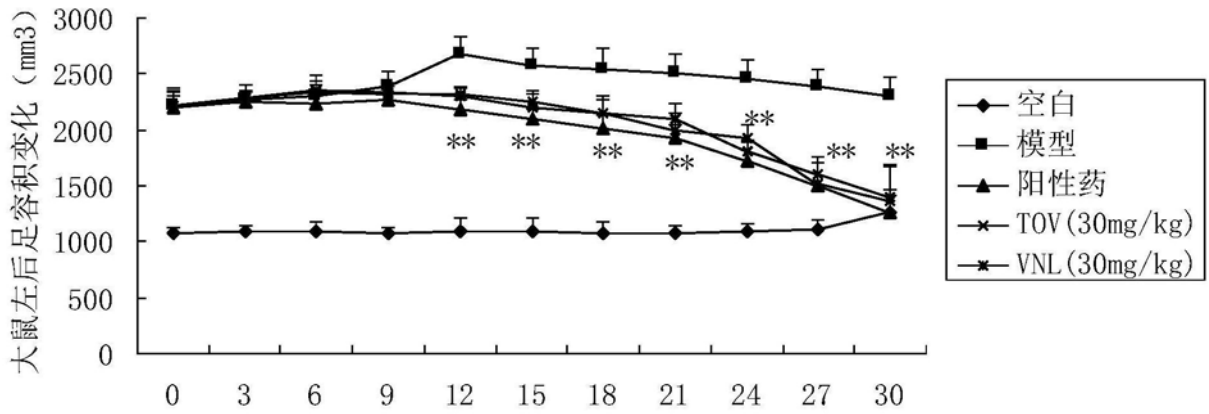


图2

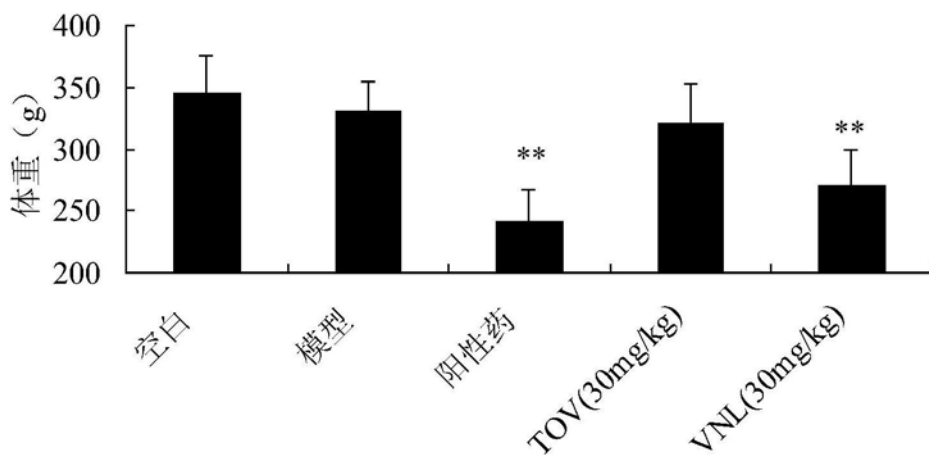


图3

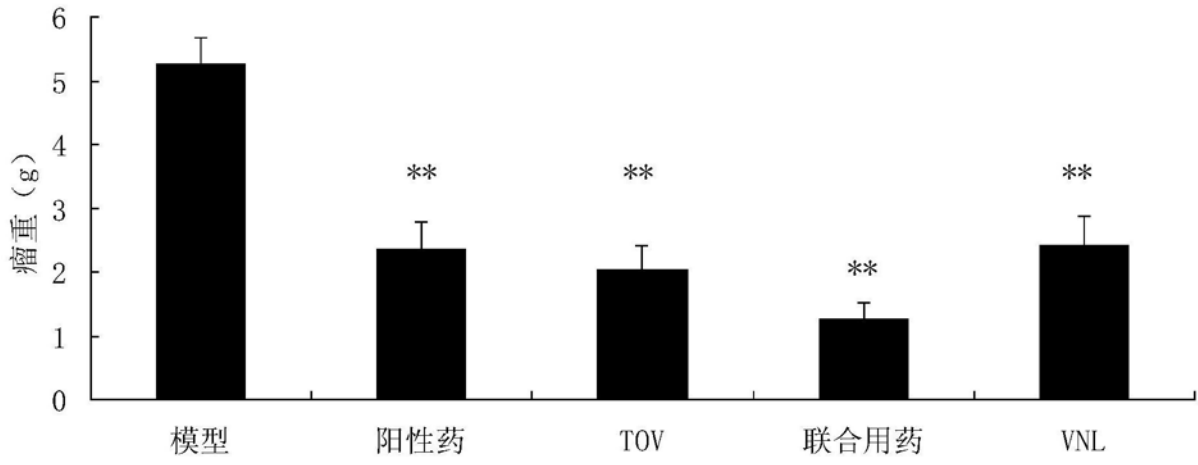


图4