



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105106228 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510495710. 0

(22) 申请日 2015. 08. 12

(71) 申请人 河北工业大学

地址 300130 天津市红桥区丁字沽光荣道 8 号河北工业大学东院 330#

(72) 发明人 展永 郭帅 陈娅斐 安海龙
王徐朝 柴燃 韩玥斌 祁金龙
张海林

(74) 专利代理机构 天津翰林知识产权代理事务
所(普通合伙) 12210

代理人 胡安朋

(51) Int. Cl.

A61K 31/704(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

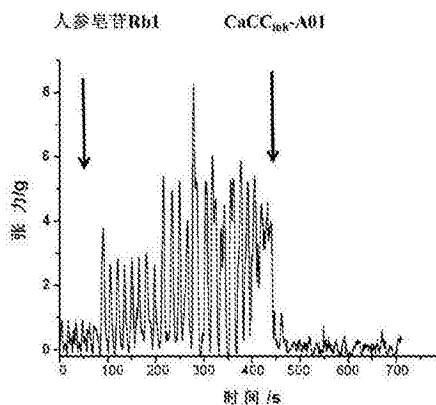
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物

(57) 摘要

本发明用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物, 涉及药物组合物, 是由以人参皂苷 Rb1 为活性成分, 辅以药学上可接受的载体组成, 所述药学上可接受的载体为淀粉、糖粉、糊精、乳糖、微晶纤维素、甘露醇或其 2 ~ 6 种的混合物, 所述活性成分的人参皂苷 Rb1 与辅以药学上可接受的载体的用量的重量比为 1 : 0.5 ~ 1.5, 是一种用于治疗 TMEM16A/CaCCs 离子通道相关疾病的药物。本发明开发了人参皂苷 Rb1 的新的药物用途。



1. 用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:是由以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以药学上可接受的载体组成。

2. 根据权利要求 1 所述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:所述药学上可接受的载体为淀粉、糖粉、糊精、乳糖、微晶纤维素、甘露醇或其 2 ~ 6 种的混合物,所述活性成分的人参皂苷 Rb1 与辅以药学上可接受的载体的用量的重量比为 1 : 0.5 ~ 1.5。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:所述药物组合物的组成方式为口服型给药。

4. 根据权利要求 3 所述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:所述药物组合物的组成方式为口服型给药的剂型为散剂、颗粒、胶囊、片剂、滴丸或口服液。

5. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:所述药物组合物的组成方式为非口服型给药。

6. 根据权利要求 5 所述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,其特征在於:所述药物组合物的组成方式为非口服型给药的剂型为注射剂。

用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明的技术方案涉及药物组合物,具体地说是用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物。

背景技术

[0002] 人参皂苷 Rb1, 中文化学名称:(3 β , 12 β)-20-[(6-O- β -D-吡喃葡萄糖基- β -D-吡喃葡萄糖基)氧]-12-羟基达玛脂-24-烯-3-yl-12-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 英文化学名称:(3beta, 12beta)-20-[(6-O-beta-D-Glucopyranosyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-12-hydroxydammar-24-en-3-yl-12-O-beta-D-glucopyranosyl-beta-D-glucopyranoside。人参皂苷 Rb1 存在于五加科植物人参的根、茎和叶中, 西洋参的根、茎和叶中, 三七的根和叶中, 以及葫芦科绞股蓝的叶和茎中, 分子式为 C₅₄H₉₂O₂₃, 相对分子质量为 1108.26, 白色粉末, 易溶于水、甲醇和乙醇, 可溶于正丁醇、醋酸和乙酸乙酯, 不溶于乙醚和苯, CAS 号: 41753-43-9。

[0003] 人参对中枢神经系统、心血管系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统和泌尿生殖系统有广泛的作用, 从而可提高人体力、智力和增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力。人参皂苷 Rb1 是一种人参提取物, 现有技术中已经报道的人参皂苷 Rb1 被用作药物的作用包括: 具有保护神经作用, 中枢性抗应激作用, 增强学习记忆作用, 其最受关注的药用价值则是体现在对心血管的作用上, 它对心率失常具有调节作用, 可以促进儿茶酚胺的释放, 从而起到强心作用, 此外还可以升高血压, 抗动脉粥样硬化, 促进血浆分泌酮的活性, 对肺、心脏缺血性再灌注损伤具有保护作用, 但是至今未发现也没有检索到被用于治疗 TMEM16A/CaCCs 离子通道相关疾病如胃肠动力障碍性疾病方面的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的报道和相关文献。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是: 提供用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物, 是一种用于治疗 TMEM16A/CaCCs 离子通道相关疾病的药物, 开发了人参皂苷 Rb1 的新的药物用途。

[0005] 本发明解决该技术问题所采用的技术方案是: 用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物, 是由以人参皂苷 Rb1 为活性成分, 辅以药学上可接受的载体组成。

[0006] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物, 所述药学上可接受的载体为淀粉、糖粉、糊精、乳糖、微晶纤维素、甘露醇或其 2~6 种的混合物, 所述活性成分的人参皂苷 Rb1 与辅以药学上可接受的载体的用量的重量比为 1:0.5~1.5。

[0007] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物, 所述药物组合物的组成方式为口服型给药。

[0008] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,所述药物组合物的组成方式为口服型给药的剂型为散剂、颗粒、胶囊、片剂、滴丸或口服液。

[0009] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,所述药物组合物的组成方式为非口服型给药。

[0010] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,所述药物组合物的组成方式为非口服型给药的剂型为注射剂。

[0011] 上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,所涉及的成分原料均可通过公知途径获得,所述药物组合物的口服型给药和所述药物组合物的非口服型给药的配置方法均使用药理学上公知的可接受的形式,其配制方法是本领域的技术人员所能掌握的。

[0012] 将上述用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物中的任意一种剂型用于治疗 TMEM16A/CaCCs 离子通道相关疾病,包括用于治疗人的胃肠动力障碍疾病,以及用于治疗牛、马、羊、狗、猫、猪或鼠的胃肠动力障碍疾病,其治疗操作方法是本技术领域技术人员所能掌握的。

[0013] 本发明的有益效果是:与现有技术相比,本发明的突出的实质性特点如下:

[0014] (1) 胃肠动力障碍性疾病 (Disorders of gastrointestinal motility, DGIM) 属常见疾病,其表现形式多样,既有胃肠功能减弱、胃肠功能亢进,也有胃肠功能紊乱,目前治疗这些疾病的主要措施是调节胃肠动力,促胃肠动力药是主要的治疗手段,但这些药物都存在不同程度的副反应,临床应用受到限制 (Mc Callum R W. Motility agenis and the gastrointestinal tract. Am J Med Sci, 1996, 312(1):19-25)。胃肠动力障碍是由于神经或者肌肉病变导致的,包括功能性肠病和胃肠动力性疾病,主要常见于胃食管反流病,功能性消化不良,肠易激综合征和慢性便秘等。随着社会的发展,胃肠动力障碍疾病患病率逐年上升并影响人们的生活质量,此类疾病也成为国内外研究的热点。胃肠运动的调节主要受两方面因素的影响:即肠神经系统和体液因素。近期研究表明, TMEM16A 离子通道能够调节胃肠的体液分泌,从而调控胃肠的运动 (Hwang SJ 等. Expression of anoctamin1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. The Journal of Physiology. 2009, 587. 20:4887 - 4904), TMEM16A 基因表达于小肠间质细胞中,它能够控制平滑肌的收缩节律。本发明的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物中的人参皂苷 Rb1 正是通过激活 TMEM16A 通道,进而影响胃肠平滑肌的收缩张力,从而可以用于胃肠动力疾病特别是胃肠动力障碍的防治。也就是说,本发明的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物治疗胃肠动力障碍疾病的原理是通过人参皂苷 Rb1 激活 TMEM16A 离子通道蛋白活性,使肠道收缩进而促进胃肠蠕动,改善胃肠动力障碍。通过对于人参皂苷 Rb1 的深入研究,本发明的发明人发现:人参皂苷 Rb1 通过作用于胃肠上皮细胞上的 TMEM16A 通道而发挥作用,人参皂苷 Rb1 通过激活 TMEM16A 通道,进而影响胃肠平滑肌的收缩频率和张力。

[0015] 与现有技术相比,本发明的显著进步如下:

[0016] (1) 本发明的用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物能明显激活 TMEM16A 通道,效果显著,为胃肠动力障碍方面的疾病治疗提供了潜在的应用前景。

[0017] (2) 本发明的用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物对

TMEM16A 通道的激活效率与目前所发现的其它激活剂相比更高,其 EC_{50} 值为 $38.4 \mu M$ 。

[0018] (3) 人参皂苷 Rb1 一种是一种天然化合物,存在于五加科植物人参,西洋参,三七,葫芦科绞股蓝等天然多产的植物,来源丰富。

[0019] (4) 本发明的用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物配置方法简单,成本低廉。

[0020] (5) 本发明的用作 TMEM16A 离子通道激活剂的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的应用方法简单,容易操作。

附图说明

[0021] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0022] 图 1 为全细胞模式下转染 TMEM16A 通道的 CHO 细胞在不同浓度游离钙离子及人参皂苷 Rb1 的作用下电流变化情况的实验结果,其中:

[0023] 图 1A 为不转染 TMEM16A 离子通道的 CHO 细胞的空白组激活电流的代表性实验结果图。

[0024] 图 1B 为实施例 13 中溶液中含 $1 \mu M$ 游离钙离子时的激活电流的代表性实验结果图。

[0025] 图 1C 为实施例 13 中溶液中含浓度 $10 \mu M$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流的代表性实验结果图。

[0026] 图 1D 为实施例 13 中溶液中含浓度 $100 \mu M$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流的代表性实验结果图。

[0027] 图 1E 为 $100 \mu M$ 单宁酸对溶液中含浓度 $100 \mu M$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流抑制作用的代表性实验结果图。

[0028] 图 1F 为不同人参皂苷 Rb1 浓度下诱导 TMEM16A 激活电流的量效曲线图。

[0029] 图 2 为同一视野下人参皂苷 Rb1 用作 TMEM16A 离子通道激活剂对黄色荧光蛋白的荧光强度影响的代表性实验结果,其中:

[0030] 图 2A 为实施例 14 中未加入人参皂苷 Rb1 时细胞内黄色荧光蛋白荧光强度的代表性实验结果图。

[0031] 图 2B 为实施例 14 中加入人参皂苷 Rb1 后细胞内黄色荧光蛋白荧光强度的代表性实验结果图。

[0032] 图 3 为实施例 15 中人参皂苷 Rb1 引起豚鼠回肠收缩反应增强,并且收缩反应可被 TMEM16A 离子通道抑制剂 $CaCC_{inh}-A01$ 迅速抑制到本底水平的代表性实验结果图。

[0033] 图 4 为实施例 15 中显示人参皂苷 Rb1 可显著增大胃肠道收缩张力柱状图。

[0034] 图 5 为人参皂苷 Rb1 分子结构式。

具体实施方式

[0035] 图 1A 所示实施例表明,不转染 TMEM16A 离子通道的 CHO 细胞的空白组激活电流为本底电流,稳态电流小于 $100 pA$ 。

[0036] 图 5 所示为人参皂苷 Rb1 分子结构式。

[0037] 实施例 1

[0038] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以淀粉载体,人参皂苷 Rb1 与淀粉载体的用量的重量比为 1:0.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0039] 实施例 2

[0040] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以糖粉载体,人参皂苷 Rb1 与糖粉载体的用量的重量比为 1:0.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的颗粒。

[0041] 实施例 3

[0042] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以糊精载体,人参皂苷 Rb1 与糊精载体的用量的重量比为 1:1,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的胶囊。

[0043] 实施例 4

[0044] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以乳糖载体,人参皂苷 Rb1 与乳糖载体的用量的重量比为 1:1.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的片剂。

[0045] 实施例 5

[0046] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以微晶纤维素载体,人参皂苷 Rb1 与微晶纤维素载体的用量的重量比为 1:1,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的滴丸。

[0047] 实施例 6

[0048] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以甘露醇载体,人参皂苷 Rb1 与甘露醇载体的用量的重量比为 1:1.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为非口服型给药的注射剂。

[0049] 实施例 7

[0050] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以任意比例的淀粉加糖粉的混合物载体,人参皂苷 Rb1 与任意比例的淀粉加糖粉的混合物的用量的重量比为 1:1,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0051] 实施例 8

[0052] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素的混合物的载体,人参皂苷 Rb1 与任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素的混合物的用量的重量比为 1:1.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0053] 实施例 9

[0054] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇的混合物的载体,人参皂苷 Rb1 与任意比例糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇的混合物的用量的重量比为 1:1.5,其配制方法使用药学

上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0055] 实施例 10

[0056] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇加糖粉的混合物载体,人参皂苷 Rb1 与任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇加糖粉的混合物的用量的重量比为 1 : 1,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0057] 实施例 11

[0058] 本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,以人参皂苷 Rb1 为活性成分,辅以任意比例的糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇加糖粉加淀粉的混合物载体,人参皂苷 Rb1 与任意比例糊精加乳糖加微晶纤维素加甘露醇加糖粉加淀粉的混合物的用量的重量比为 1:0.5,其配制方法使用药学上可接受的形式,本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的组成方式为口服型给药的散剂。

[0059] 实施例 12

[0060] 取蒸馏水 500mL,加入聚山梨酯-80 制成溶液,再加入人参皂苷 Rb1100g,边加热边搅拌使之溶解成含人参皂苷 Rb1 的溶液,另外将糖粉 50g 加入公知标准用量的防腐剂并溶于蒸馏水 100mL 中,制得糖粉溶液,再将该糖粉溶液在搅拌下加入上述含人参皂苷 Rb1 的溶液中,加蒸馏水至 1000mL,混匀,过滤,分装成 200 支,灭菌,制得本实施例的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的口服液。

[0061] 在以下本发明含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的应用的实施例中,所选用的含人参皂苷 Rb1 的药物组合物为上述实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物。

[0062] 实施例 13

[0063] 将上述实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物作为 TMEM16A 离子通道的一种激活剂,用于使转染有 TMEM16A 离子通道的 CHO 细胞电流值增强:

[0064] 将表达质粒 pEGFP-N1-TMEM16A 转入哺乳动物细胞 CHO 中,在细胞转染后 24-72h 之内,进行电生理检测。具体方法如下:

[0065] CHO 细胞用含有 10%胎牛血清的 F12K 培养液传代培养(加入 100UI/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)。转染过程用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)脂质体进行。细胞于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养至对数生长期用于实验。电生理检测在 22 $^{\circ}$ C 的室温下进行,采用全细胞 (Whole Cell) 记录模式 (EPC-10Amplifier, HEKA 公司,德国),内液成分为(单位:mM):CsCl 130, MgCl₂·6H₂O 1, HEPES 10, EGTA 10, Mg ATP1,用 CsOH 调至 pH7.3。外液成分为(单位:mM):NaCl 150, MgCl₂·6H₂O 1, CaCl₂1, HEPES10, 甘露醇 10, 葡萄糖 10,用 NaOH 调至 pH7.3。加入药物的内液中人参皂苷 Rb1,即实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物的浓度分别设为 10、100 μ M,用 10mM EGTA 无钙溶液做阴性对照,最后加 100 μ M 单宁酸的混合溶液抑制钙激活氯通道,并与 1 μ M 游离钙条件下的电流作比较。通过电压去极化激活膜电流,操作条件是:膜去极化电压从 -80mV 至 +80mV,步阶为 20mV,维持电压为 0mV。

[0066] 图 1B 为本实施例中溶液中含 $1\ \mu\text{M}$ 游离钙离子时的激活电流的代表性实验结果图,该图表明,溶液中含 $1\ \mu\text{M}$ 游离钙离子时的激活电流,其为 TMEM16A 离子通道被激活时的典型电流,稳态电流大小约为 800pA 。

[0067] 图 1C 为本实施例中溶液中含浓度 $10\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流的代表性实验结果图,该图表明溶液中含浓度 $10\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流,稳态电流大小约为 350pA ,显示比空白组明显增大。

[0068] 图 1D 为本实施例中溶液中含浓度 $100\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流的代表性实验结果图,该图表明溶液中含浓度 $100\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流,稳态电流大小约为 1200pA ,显示比空白组明显增大,且激活电流随着溶液中含人参皂苷 Rb1 的浓度增加而增大。高浓度 ($100\ \mu\text{M}$) 的人参皂苷 Rb1 对 TMEM16A 通道的激活程度高于高浓度游离钙离子 ($1\ \mu\text{M}$),说明人参皂苷 Rb1 对转染有 TMEM16A 质粒的 CHO 细胞有明显的激活作用,可能是 TMEM16A 通道特异性的激活剂。

[0069] 图 1E 为本实施例中浓度为 $100\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下产生的激活电流被 $100\ \mu\text{M}$ 单宁酸 (TMEM16A 特异性抑制剂) 抑制电流的代表性实验结果图。该图显示了 $100\ \mu\text{M}$ 单宁酸对溶液中含浓度 $100\ \mu\text{M}$ 人参皂苷 Rb1 条件下的激活电流的抑制作用,由于单宁酸为钙激活氯离子通道的抑制剂,所以图 1E 显示从图 1C 到图 1D 所示的本实施例中的电流均为 TMEM16A 离子通道所介导的电流, TMEM16A 离子通道可被人参皂苷 Rb1 激活。

[0070] 图 1F 为本实施例中不同浓度人参皂苷 Rb1 激活电流的量效曲线的代表性实验结果图。该图显示人参皂苷 Rb1 对于 TMEM16A 离子通道的激活作用呈浓度依赖性。

[0071] 实施例 14

[0072] 将上述实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物作为 TMEM16A 离子通道的一种激活剂,用于在碘离子黄色荧光蛋白 (YFP) 荧光淬灭法中,结果使转染有 TMEM16A 的细胞荧光发生淬灭。

[0073] 黄色荧光蛋白 (YFP) 是一种来源于绿色荧光蛋白 (GFP) 的荧光蛋白,可在波长 515nm 下被激发发出黄色荧光。碘离子可以与 YFP 结合使荧光淬灭,而突变 YFP 的两个位点 H148Q 和 I152L 可以使 YFP 对碘离子的敏感性增强。CaCCs 通道不仅是一种氯通道,其对包括碘离子在内的大部分阴离子都有通透作用。本实施例的药物筛选试验用脂质体的方法将外源的双突变 YFP 基因导入 CHO 细胞中,使 YFP 在胞内大量表达;再将备选药物与细胞孵育使其与通道充分作用;最后观察加入含有碘离子的溶液以后 YFP 荧光的淬灭程度。此种方法中,可以使 YFP 明显淬灭的药物可以被认为是 CaCCs 通道的激活剂,该结果与膜片钳实验结果相互印证。

[0074] 实验前一天在激光共聚焦显微镜专用培养皿中培养稳定转染 YFP 的 CHO 细胞;第二天将转染 YFP 并培养过夜的 CHO 细胞用 D-PBS 冲洗 3 次,最后留下 $500\ \mu\text{l}$ 的 D-PBS;加入含有 $150\text{mM}\ \text{I}^-$ 的溶液 $500\ \mu\text{l}$,使 I^- 浓度达到 75mM ;加入 1mg/ml 人参皂苷 Rb1,即实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物贮液 $10\ \mu\text{l}$ 使其终浓度达到 $100\ \mu\text{g/ml}$,用激光共聚焦显微镜实时记录荧光强度。

[0075] 图 2A 为本实施例中未加入人参皂苷 Rb1 时细胞内黄色荧光蛋白荧光强度的代表性实验结果图。该图表明未加入人参皂苷 Rb1 时细胞内黄色荧光蛋白的荧光强度,每个细胞内部均为强烈的黄色荧光。如该图显示,未加入人参皂苷 Rb1 时 YFP 的荧光强度很高。

[0076] 图 2B 为本实施例中加入人参皂苷 Rb1 后细胞内黄色荧光蛋白荧光强度的代表性实验结果图。该图表明加入人参皂苷 Rb1 时细胞内黄色荧光蛋白的荧光强度,由于人参皂苷 Rb1 激活了 TMEM16A 离子通道,从该离子通道进入的碘离子使得胞内的黄色荧光蛋白发生荧光淬灭,即在加入 I 以后,YFP 荧光明显淬灭,5min 以后荧光几乎完全消失。

[0077] 另做一组空白对照实验:只加入含有碘离子的溶液而不加入人参皂苷 Rb1,在该对照组中 YFP 的荧光强度始终没有变化。这充分证明人参皂苷 Rb1 是 TMEM16A 通道的激活剂。

实施例 15

[0078] 将上述实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物作为 TMEM16A 离子通道的一种激活剂,用于激活 TMEM16A 通道,引起豚鼠回肠收缩。

[0079] 取 Hatley 豚鼠一只,杀死后立即剖开腹腔,取出一段回肠 10cm 左右,置于氧饱和的台氏液培养皿中。沿肠壁除去肠系膜,然后将回肠剪成长度为 1 ~ 1.5cm 的小段 3 ~ 8 段,用 5ml 注射器吸取台氏液将肠内容物冲洗干净,换以新鲜的台氏液备用。

[0080] 取一上述备用的肠管段,置于盛有台氏液的培养皿中,在其两端对角壁处,分别用缝针穿线,并打结。注意保持肠管通畅,勿使其封闭。肠管一端连线系于浴槽的固定钩上,然后放入 37℃ 麦氏浴槽中。再将肠管的另一端系结在张力换能器的悬臂梁上,调节前负荷至 1g。待离体回肠稳定 30 分钟后,记录一段正常收缩曲线后,依次向麦氏浴槽中滴加药物,即实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物,观察并记录其收缩曲线。

[0081] 图 3 为本实施例中人参皂苷 Rb1 引起豚鼠回肠收缩反应增强,并且收缩反应可被 TMEM16A 离子通道抑制剂 $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ 迅速抑制到本底水平的代表性实验结果图。该图表明,在豚鼠回肠收缩反应测定实验中,人参皂苷 Rb1 可引起豚鼠回肠收缩反应增强,并且收缩反应可被 TMEM16A 离子通道抑制剂 $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ 迅速抑制到本底水平。即加入 10mM 的人参皂苷 Rb1 10.5 μl ,数秒后人参皂苷 Rb1 进入细胞激活 TMEM16A 通道促使回肠的收缩显著增加;3 分钟后换液,加入 10mM 的 TMEM16A 抑制剂 $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ 溶液 14 μl ,抑制 TMEM16A 通道使回肠的收缩反应明显下降,这表明人参皂苷 Rb1 对动物体上的 TMEM16A 通道也具有极为显著的激活作用。依次加入 10mM 的人参皂苷 Rb1 10.5 μl 和 10.5 μl 后,使浴槽中人参皂苷 Rb1 的浓度达到 15 μM 和 30 μM ,人参皂苷 Rb1 通过进入细胞激活 TMEM16A 通道使回肠的收缩力明显增强。人参皂苷 Rb1 在 15 μM -60 μM 范围内对回肠张力和收缩频率具有明显的激活作用,且人参皂苷 Rb1 在 60 μM 时的激活作用最佳。

[0082] 图 4 为本实施例中显示人参皂苷 Rb1 可显著增大胃肠道收缩张力柱状图。该图表明在豚鼠回肠收缩反应测定实验中,人参皂苷 Rb1 可显著增大胃肠道收缩的张力。本实施例的独立实验次数为 6 次。图中,** 表示与对照组相比,存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

[0083] 实施例 16

[0084] 将上述实施例 1 至实施例 12 中的任意一种含人参皂苷 Rb1 的药物组合物作为 TMEM16A 离子通道的一种激活剂,用于治疗人的胃肠动力障碍疾病,该药物组合物的临床试验如下:

[0085] 病例选择:胃肠动力障碍患者 68 例,临床表现以食欲不振、腹痛、腹胀、恶心、食欲不振、呕吐、腹泻及排便困难等为主,所有患者除胃肠动力障碍外无其他消化道气质性病变,无用药史,无严重系统性疾病。68 例患者随机分为人参皂苷 Rb1 治疗组和吗丁啉治疗对

照组,每组各 34 例,治疗组男性 18 例,女性 16 例,年龄 17-68 岁;对照组男性 19 例,女性 15 例,年龄 18-69 岁。治疗组和对照组的性别、年龄、病程、治疗前临床表现差异均无统计学意义。

[0086] 用法用量:治疗时嘱患者注意饮食卫生。人参皂苷 Rb1 治疗组采用口服药剂,每天 1 次,一次一粒;吗丁啉治疗组采用吗丁啉(西安杨森制药有限公司)口服片,每天 3 次,一次一粒。

[0087] 疗效评价标准:

[0088] (1) 显效:用药 2 天后呕吐、腹泻症状减退,无恶心症状,食欲增强。

[0089] (2) 有效:用药 4 天后临床症状基本消失,食欲加强。

[0090] (3) 无效:超过 7 天仍有腹痛、腹胀、恶心、早饱、呕吐、腹泻及排便困难等症状。

[0091] 治疗结果:本发明药物组合物所制备而成的人参皂苷 Rb1 药剂治疗组显效 31 例,占 91.18%;有效 3 例,总有效率为 100%;吗丁啉治疗组显效 25 例,有效 4 例,无效 5 例,总有效率为 85.29%。人参皂苷 Rb1 治疗组总有效率明显高于吗丁啉治疗组。

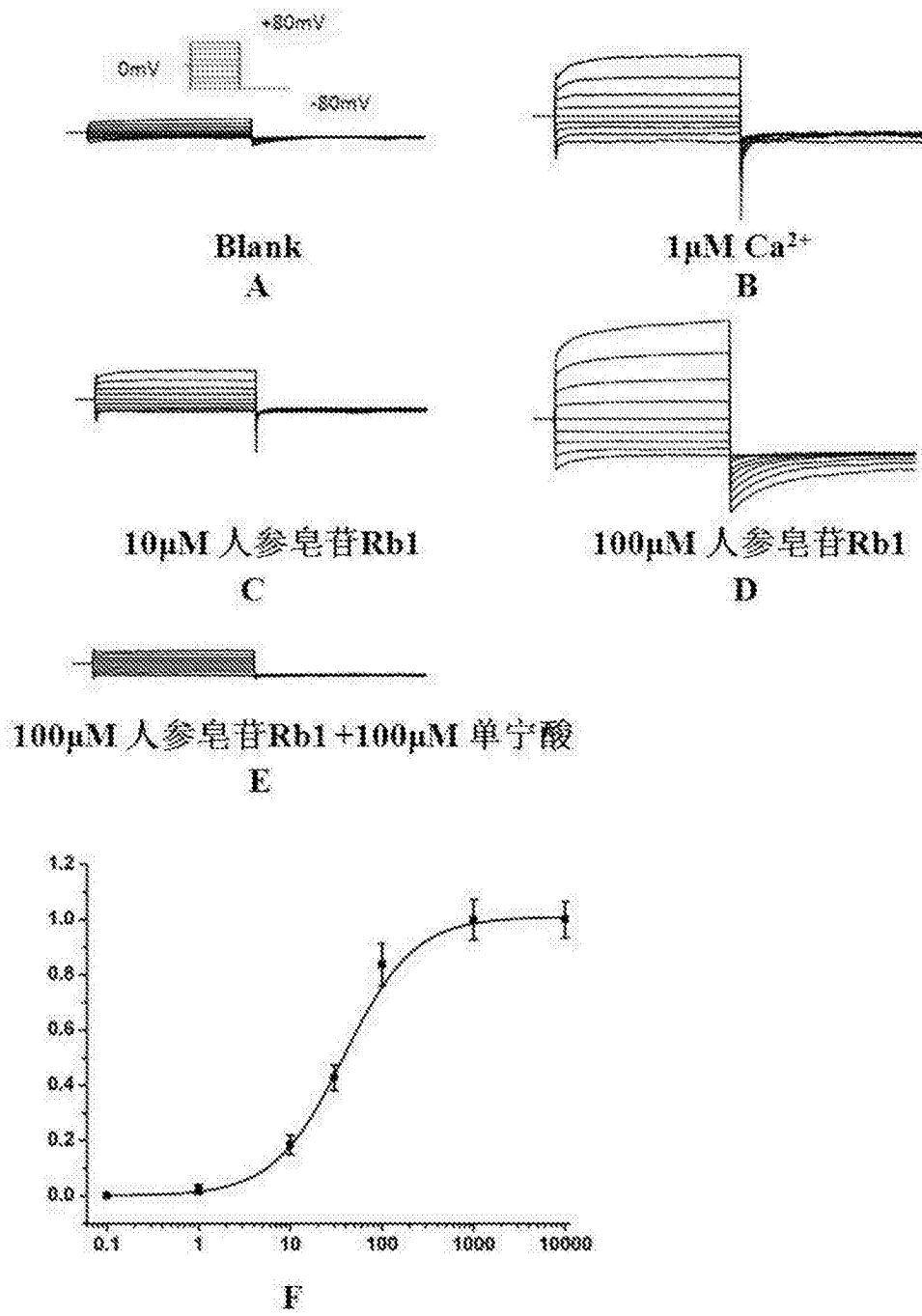


图 1

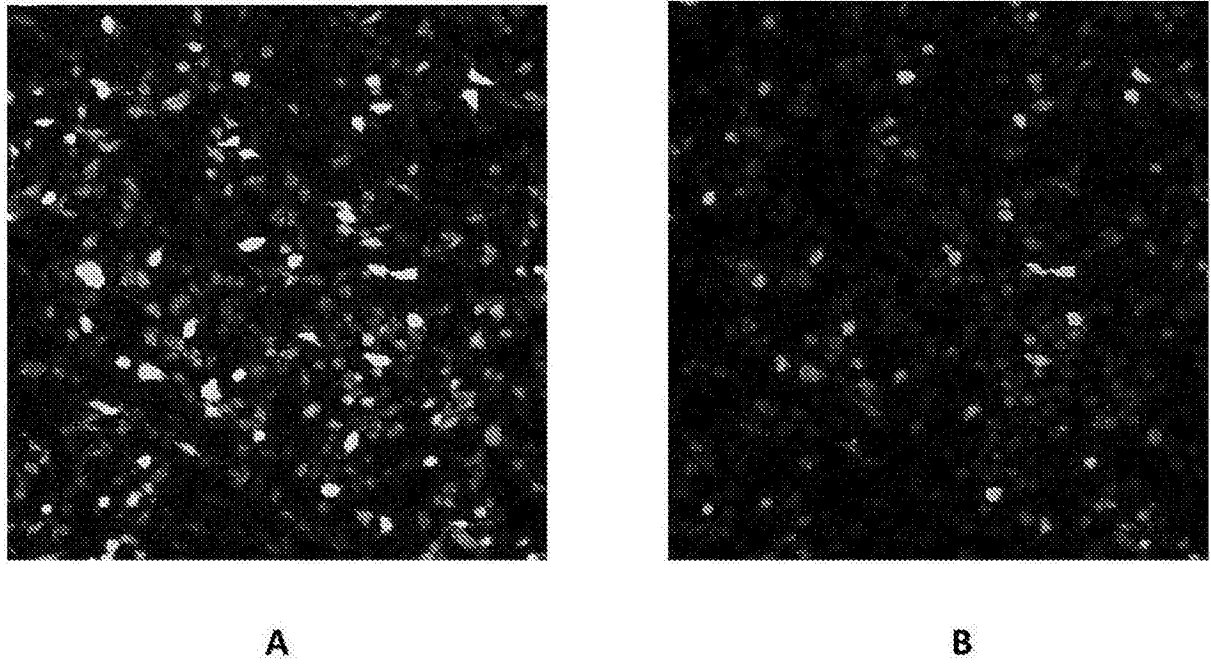


图 2

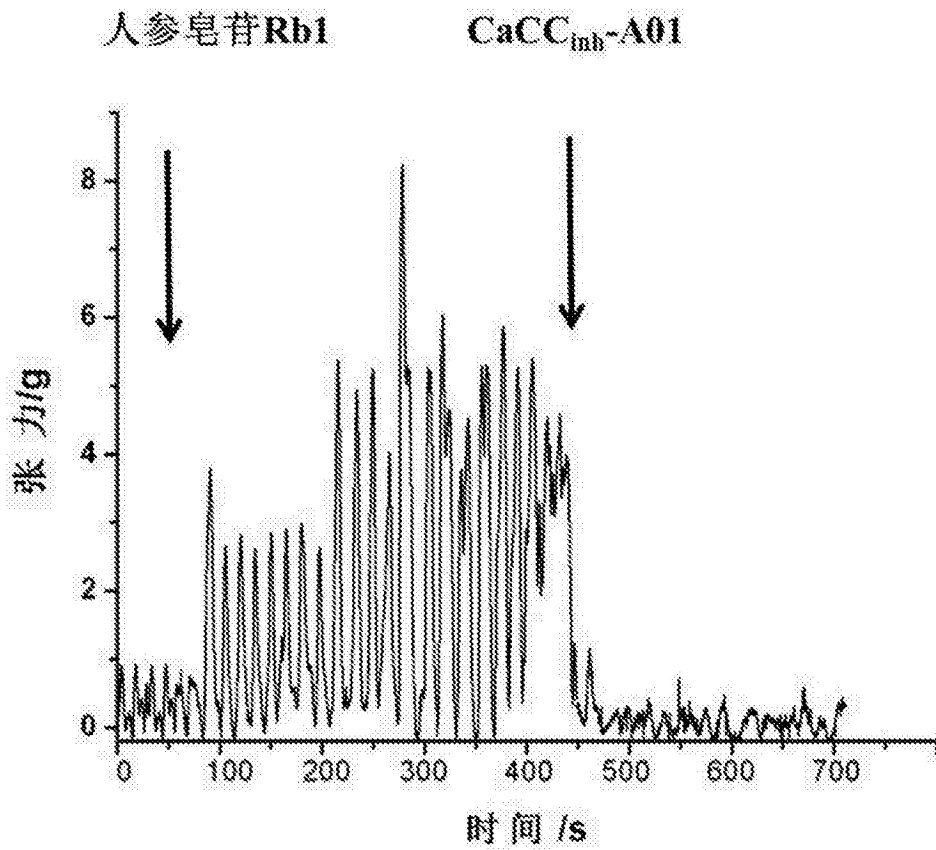


图 3

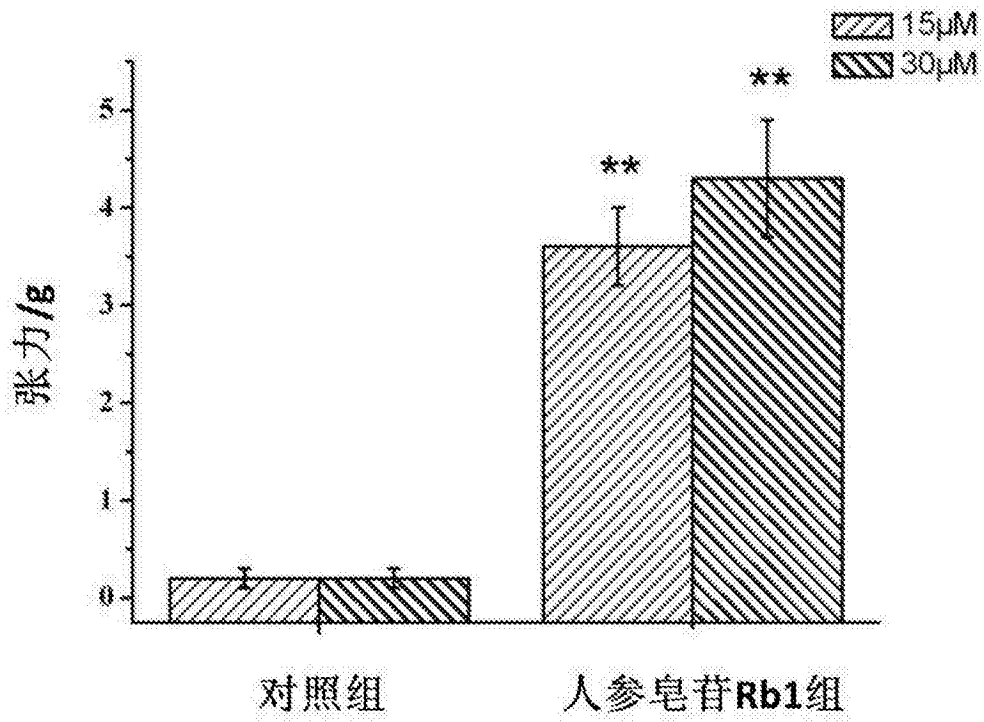


图 4

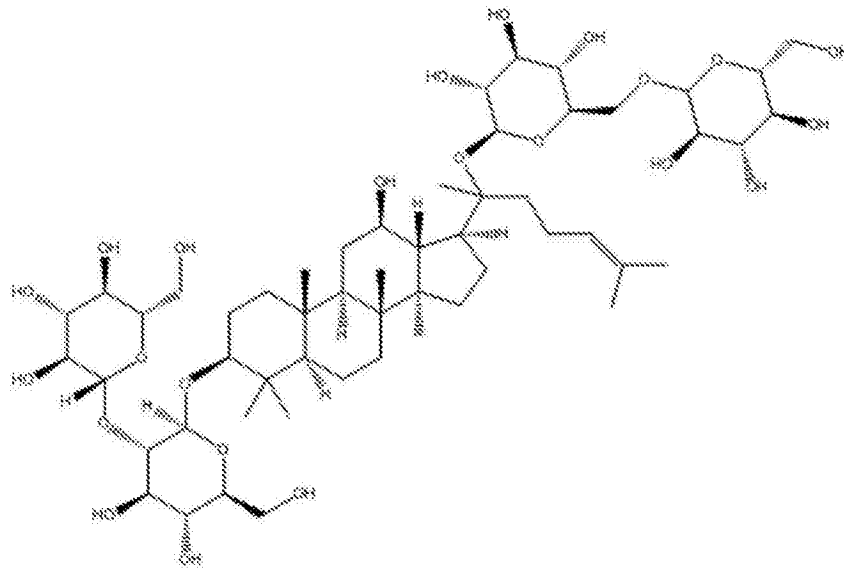


图 5