



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113350346 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202110609879.X

A61P 9/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.01

审查员 蒋金均

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113350346 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(73) 专利权人 广西医科大学第一附属医院

地址 530021 广西壮族自治区南宁市双拥路6号

(72) 发明人 何燕 葛晨亮

(74) 专利代理机构 北京中仟知识产权代理事务所(普通合伙) 11825

专利代理师 田江飞

(51) Int. Cl.

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 36/24 (2006.01)

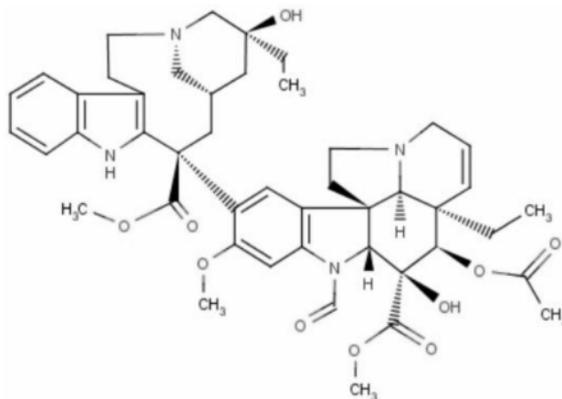
权利要求书1页 说明书5页 附图7页

(54) 发明名称

长春新碱在预防或治疗心肌纤维化中的应用

(57) 摘要

本发明公开长春新碱在预防或治疗心肌纤维化中的应用,长春新碱或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物构成的药物,在大鼠体内实验及体外细胞开展实验,结果证明,长春新碱对心脏重构有明显抑制作用;长春新碱对心肌纤维化有较为明显治疗作用以及可以抑制心肌纤维化。



1. 长春新碱或其药学上可接受的盐作为唯一活性成分在制备治疗心肌纤维化药物中的应用,其特征在於,长春新碱药学上可接受的盐为硫酸长春新碱。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物为有效量的长春新碱或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的辅料组成的药物制剂。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述辅料选自下列物质组中的一种或几种:微晶纤维素、预胶化淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石粉、 β 环糊精、碳酸氢钠和交联羧甲基纤维素钠。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述药物制剂的剂型为液体或固体剂型。

5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述药物制剂的给药途径为注射给药。

长春新碱在预防或治疗心肌纤维化中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于长春新碱应用的技术领域,具体是涉及到长春新碱在预防或治疗心肌纤维化中的应用。

背景技术

[0002] 心血管疾病威胁人类的健康,已成为全球关注的主要公众健康问题。心肌纤维化是各种心血管疾病发展到一定阶段共同的病理变化,各种心血管疾病包括高血压病,冠心病,心房颤动均可导致心肌纤维化,使心脏收缩及舒张功能发生障碍,最终将导致心力衰竭。目前临床上可用于治疗心肌纤维化的药物较少。因此,如何预防及逆转心肌纤维化,是心血管领域迫切需要研究的重点和难点。

[0003] 在心脏组织发生损伤后,激活体内的免疫系统并触发伤口愈合反应,这是机体的一种防御机制,同时促进了单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等炎症免疫细胞在坏死区域的募集和浸润。这些被激活的炎症细胞分泌大量炎性和促纤维化因子,刺激成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞会合成和分泌过多的细胞外基质而导致纤维化,细胞外基质的主要结构蛋白是纤维胶原蛋白,包括I型胶原蛋白(CollagenI)和III型胶原蛋白(CollagenIII)。

[0004] 免疫炎症反应在心肌纤维化的形成和进展中发挥了重要的作用,固有免疫是机体抵抗外源性病原体及各种损伤的第一道防线,而炎症小体是机体固有免疫的重要一环。NLRP3(nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat and pyrin domains-containing protein 3)是被研究的最深入的一种炎症小体,NLRP3炎症小体是多蛋白复合体,由NLRP3、含C-末端caspase募集域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-related speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain,ASC)及caspase-1前体(pro-caspase-1)构成。在各种心血管疾病导致心肌损伤后,坏死的心肌细胞会产生活性氧,引起钾离子外流及ATP的释放,这些信号激活NF(nuclear factor)- κ B and TLR(toll-like receptor)-mediated信号通路,诱导NLRP3炎症小体成分表达上调,启动无菌性质炎症反应。在心血管损伤因素持续存在的条件下,NLRP3保持长期激活的状态,并长期释放白介素1(IL-1 β)和白介素18(IL-18),逐渐导致心脏结构重塑及纤维化的形成。越来越多的研究证实NLRP3炎症小体是心血管疾病导致纤维化进展的关键介质,是治疗心肌纤维化的新的分子靶点。

[0005] 长春新碱是从草本植物长春花中提取出来的重要次生代谢产物。分子式为 $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$,目前在临床上主要用于治疗急性淋巴白血病、何杰金氏病、乳腺癌、恶性淋巴瘤和小细胞肺癌等疾病。关于长春新碱对心肌纤维化的防治作用未见有报道。

发明内容

[0006] 针对上述现有技术的不足,本发明提供了有效预防或治疗心肌纤维化药物,而提供一种长春新碱的新的应用。长春新碱能够很好的预防或治疗心肌纤维化。

[0007] 本发明提供了一种长春新碱或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物构成的药物，在制备预防或治疗心肌纤维化的药物的应用。

[0008] 一种长春新碱或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物构成的药物，在体内溶出长春新碱后，长春新碱能够有效的对心肌纤维化进行预防或治疗。

[0009] 所述的心肌纤维化一般指心肌组织中成纤维细胞过度活化，分泌大量胶原纤维并过量沉积，胶原浓度和胶原容积分数显著增加，各型胶原比例失调并排列紊乱的一种心脏病理改变，一般由心肌组织慢性炎症和细胞凋亡引起。

[0010] 所述盐为硫酸长春新碱、叶酸长春新碱、琥珀酸长春新碱中的任一种。

[0011] 进一步的，所述药物为有效量的长春新碱和药学上可接受的辅料组成的药物制剂；所述辅料选自下列物质组中的一种或几种：微晶纤维素、预胶化淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石粉、β环糊精、碳酸氢钠和交联羧甲基纤维素钠。

[0012] 进一步的，所述长春新碱的用量：25ug/kg；

[0013] 进一步的，所述药物制剂的剂型为液体或固体剂型；

[0014] 进一步的，所述药物制剂的给药途径为注射给药。

[0015] 本发明的有益效果在于：

[0016] 本发明通过在大鼠体内实验及体外细胞实验开展长春新碱对心肌纤维的治疗作用，结果证明：长春新碱对心脏重构有明显抑制作用；长春新碱对心肌纤维化的有较为明显治疗作用以及可以抑制心肌纤维化。

附图说明

[0017] 图1是本发明所述长春新碱的化学结构式；

[0018] 图2是本发明心脏指数(Heart index)的测定的结果示意图；

[0019] 图3是本发明心肌纤维化的程度的结果示意图；

[0020] 图4是本发明免疫组化检测心肌CollagenI, CollagenIII的表达结果示意图；

[0021] 图5是本发明免疫组化检测心肌白介素1 (IL-1 β) 及白介素18 (IL-18) 的表达结果示意图；

[0022] 图6是本发明蛋白质印迹法 (Western blot) 检测心肌组织中IL-1 β , IL-18蛋白的表达结果示意图；

[0023] 图7是本发明蛋白质印迹法 (Western blot) 检测心肌组织中ASC, NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1-p20蛋白的表达水平结果示意图；

[0024] 图8是本发明CCK8检测长春新碱对心脏成纤维细胞的毒性。酶联免疫吸附剂测定 (Elisa) 检测心脏成纤维细胞上清液中IL-1 β , IL-18浓度的结果示意图；

[0025] 图9是本发明蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞中ASC, NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1-p20蛋白的表达水平检测结果示意图。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图1-9对本发明做进一步描述：

[0027] 大鼠体内实验及体外细胞实验

[0028] 原料：32只8周龄SPF级雄性SD大鼠，体重为(200 \pm 20g)，购自广西医科大学实验动

物中心;硫酸长春新碱为白色粉末,溶于生理盐水,购自索莱宝公司(2068-78-2),盐酸异丙肾上腺素为白色粉末,溶于生理盐水,购自美国Sigma-Aldrich(I5627)。使用的抗体:collagen I(Proteintech,14695-1-AP),collagen III(Proteintech,22734-1-AP),NLRP3(NOVUS,NBP2-12446),ASC(Cell Signaling Technology,67824),pro-caspase1(Abcom,ab179515),cleaved-caspase1-p20(Proteintech,22915-1-AP),IL-18(ab71495;Abcam),IL-1 β (31202;Cell Signaling Technology),GAPDH(Proteintech,60004-1-Ig,1:5000)。大鼠白介素1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒(中国生工生物工程公司),大鼠白介素18(IL-18)ELISA试剂盒(中国生工生物工程公司)。

[0029] 模型构建及动物实验:大鼠随机分为对照组(n=8)、心肌纤维化模型组(n=8)及长春新碱低剂量组(25ug/kg,n=8)长春新碱高剂量组(50ug/kg,n=8)。异丙肾上腺素注射复制大鼠心肌纤维化模型。长春新碱高、低剂量组预先在每天上午分别给与大鼠皮下注射VCR25ug/kg,50ug/kg,对照组及心肌纤维化组注射等量的生理盐水。下午给与心肌纤维化组及长春新碱高、低剂量组皮下注射5mg/kg异丙肾上腺素,对照组注射等量生理盐水。期间正常进食饮水,连续进行10天。第十一天处死大鼠,进行各项指标检测。备注:长春新碱的加入量,大鼠按照每千克给药25ug(低剂量组)\50ug(高剂量组)的长春新碱,长春新碱按照硫酸长春新碱中的长春新碱含量即824.96/923.0361来进行折算。

[0030] 1、心脏重量及心脏指数

[0031] 干预结束后检测各组大鼠心脏重量,体重及计算心脏指数(心脏重量/体重)的比较。图2的A图外观显示相比对照组,心肌纤维化组中心脏更为肥大,提示心肌纤维造模成功,而长春新碱高、低剂量组显示心脏体积比心肌纤维化组有缩小。图2的B图中显示测量的各组大鼠的心脏指数(心脏质量/大鼠体重),模型组较对照组明显升高,而长春新碱高、低剂量组的心脏指数值较模型组有降低,从而证实长春新碱对心脏重构有抑制作用(*P<0.05)。

[0032] 2、苏木精-伊红(HE)染色和Masson染色观察组织学变化及心肌纤维化程度

[0033] 取大鼠心室组织固定在10%甲醛溶液中,石蜡包埋及切片,进行苏木精-伊红(HE)染色和Masson染色观察组织变化及心肌纤维化程度。在Masson染色下纤维组织呈蓝色。图3的A图中HE染色结果如图所示,对照组心肌细胞正常排列,心肌纤维整齐,无断裂,形状基本一致;心肌纤维化组可见心肌细胞溶解,心肌纤维结构紊乱,炎性细胞浸润;长春新碱给药组心肌纤维受损减轻,炎症细胞浸润减少。Masson染色结果显示:正常对照组可见红色的心肌细胞排列整齐密实,心肌间质内散在分布少量蓝色胶原纤维;心肌纤维化组可见心肌间质和血管周围大量蓝色胶原沉积,走向紊乱,纵横交错;长春新碱高、低剂量组心血管及间质胶原沉积较为明显,相较于模型组纤维化程度明显减轻。图3的B图中通过Image J软件计算各组大鼠心肌纤维化面积占总面积的比值。心肌纤维化组较对照组明显升高,证实心肌纤维化造模成功,而长春新碱高、低剂量组纤维化区域的比值显著降低,证实了长春新碱对心肌纤维化的治疗作用(*P<0.05)。

[0034] 3、免疫组化检测心肌组织中CollagenI,CollagenIII的表达

[0035] 图4的A图中显示与对照组相比,心肌纤维化组中心肌间质的CollagenI,CollagenIII的表达明显增加,证实心肌纤维化造模成功。相比心肌纤维化组,长春新碱高、低剂量组CollagenI,CollagenIII的表达降低。图4的B图是用Image J软件进行图像分析也

得出类似的数据统计结果,进一步证实了长春新碱可以抑制心肌纤维化(*P<0.05)。

[0036] 4. 免疫组化检测心肌组织中白介素1(IL-1 β)及白介素18(IL-18)的表达。在图5的A图中显示与对照组相比,心肌纤维化组中IL-1 β ,IL-18的表达明显增加。相比心肌纤维化组,长春新碱高、低剂量组IL-1 β ,IL-18的表达降低。用Image J软件进行图像分析也得出同样的结论,进一步证实了长春新碱可以降低心肌组织中IL-1 β ,IL-18的表达(*P<0.05)。

[0037] 5. 蛋白质印迹法(Western blot)检测心肌组织中IL-1 β ,IL-18蛋白的表达水平检测。在图6的A图中显示与正常组相比,心肌纤维化模型组中IL-1 β ,IL-18蛋白的表达水平显著增加(*P<0.05)。与模型组相比,长春新碱高、低剂量组中IL-1 β ,IL-18蛋白的表达水平显著降低(P<0.05)。在图6的B,C图中用ImageJ软件分析得到了同样的结论,进一步证实了长春新碱可以降低心肌组织中IL-1 β ,IL-18的表达(*P<0.05)。

[0038] 6. 蛋白质印迹法(Western blot)检测心肌组织中ASC,NLRP3,pro-Caspase-1,Caspase-1-p20蛋白的表达水平。图7中显示与正常组相比,心肌纤维化模型组中NLRP3,Caspase-1-p20蛋白的表达水平显著增加(*P<0.05),证实了在心脏中NLRP3炎症小体被激活。与模型组相比,长春新碱高、低剂量组中Caspase-1-p20蛋白的表达水平显著降低(P<0.05),结合上文中长春新碱降低了心肌组织中IL-1 β ,IL-18的表达,证实了长春新碱可以通过抑制NLRP3炎症小体的激活来改善心肌纤维化(*P<0.05)。

[0039] 7. 进一步通过体外实验来证实长春新碱对NLRP3活化的抑制作用。原代培养大鼠心肌成纤维细胞,通过免疫荧光检测成纤维细胞标记蛋白Vimentin的表达来鉴定细胞,在图8的A图中,Vimentin呈阳性表达,证实所培养的细胞为成纤维细胞。通过Cell Counting Kit-8(CCK8)研究长春新碱对心肌成纤维细胞的毒性,在图8的B图中显示,浓度范围在10~100 $\mu\text{mol/L}$ 的长春新碱对心肌成纤维细胞无明显毒性,因此选用10 $\mu\text{mol/L}$,20 $\mu\text{mol/L}$,50 $\mu\text{mol/L}$ 的长春新碱来进行下一步实验。用脂多糖(LPS)+腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)刺激成纤维细胞激活NLRP3炎症小体,加入长春新碱探讨长春新碱能否抑制心脏成纤维细胞NLRP3炎症小体的活化,通过酶联免疫吸附剂测定(Elisa)检测细胞上清中IL-1 β ,IL-18的浓度。C,D图中显示,与对照组相比,LPS+ATP刺激组中细胞上清中IL-1 β ,IL-18的浓度明显升高,证实了LPS+ATP刺激后成纤维细胞中的NLRP3炎症小体被激活。而与LPS+ATP刺激组相比,长春新碱10 $\mu\text{mol/L}$,20 $\mu\text{mol/L}$,50 $\mu\text{mol/L}$ 组中细胞上清中IL-1 β ,IL-18的浓度明显降低,证明长春新碱可抑制心脏成纤维细胞中NLRP3炎症小体的激活(*P<0.05)。

[0040] 8. 蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞中ASC,NLRP3,pro-Caspase-1,Caspase-1-p20蛋白的表达水平检测。图9中显示与正常组相比,LPS+ATP刺激组中NLRP3,Caspase-1-p20蛋白的表达水平显著增加(*P<0.05),证实了在成纤维细胞中NLRP3炎症小体被激活。与LPS+ATP刺激组相比,长春新碱10 $\mu\text{mol/L}$,20 $\mu\text{mol/L}$,50 $\mu\text{mol/L}$ 组中Caspase-1-p20蛋白的表达水平显著降低(P<0.05),结合上文中长春新碱降低了细胞上清夜中IL-1 β ,IL-18的浓度,证实了长春新碱可以抑制心脏成纤维细胞中NLRP3炎症小体的激活(*P<0.05)。

[0041] 本领域技术人员将认识到,对以上描述做出众多变通是可能的,所以实施例仅是用来描述一个或多个特定实施方式。

[0042] 尽管已经描述和叙述了被看作本发明的示范实施例,本领域技术人员将会明白,可以对其作出各种改变和替换,而不会脱离本发明的精神。另外,可以做出许多修改以将特

定情况适配到本发明的教义,而不会脱离在此描述的本发明中心概念。所以,本发明不受限于在此披露的特定实施例,但本发明可能还包括属于本发明范围的所有实施例及其等同物。

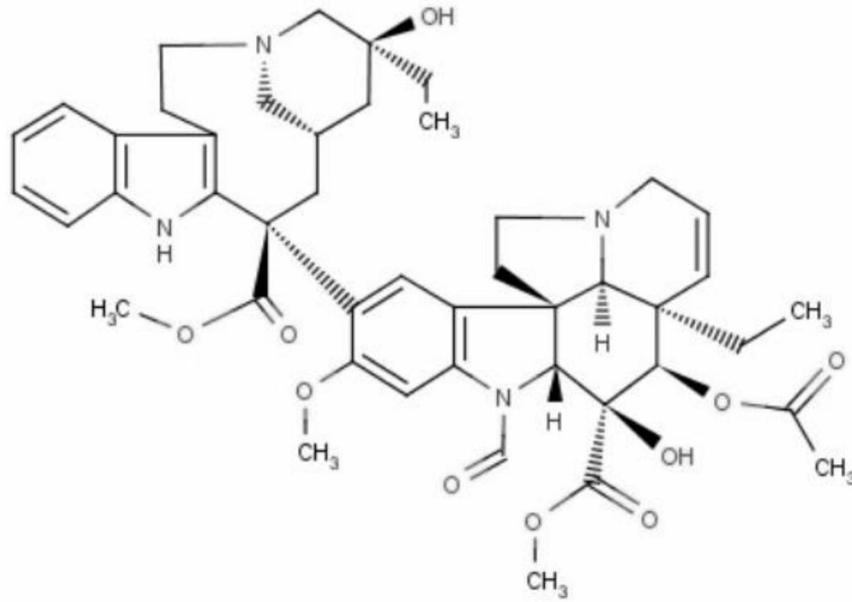


图1

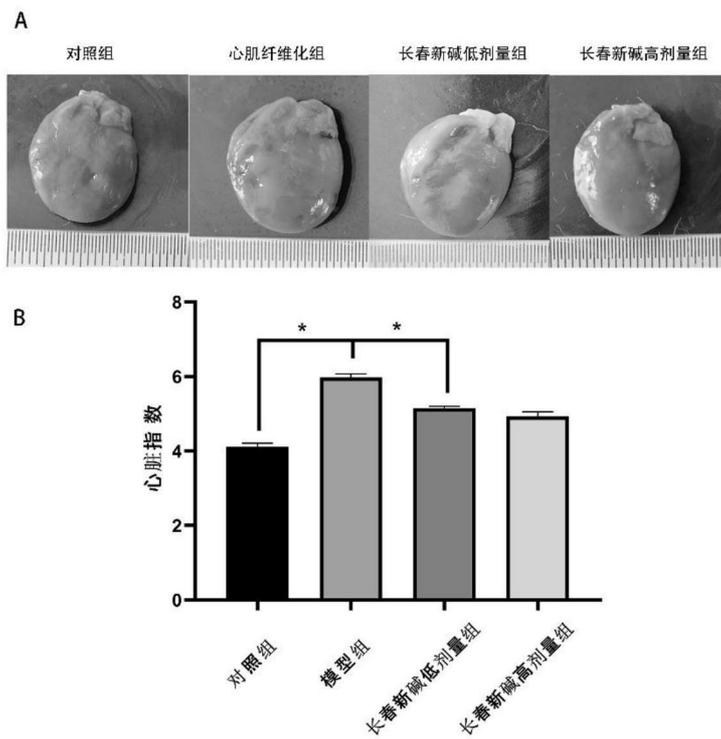


图2

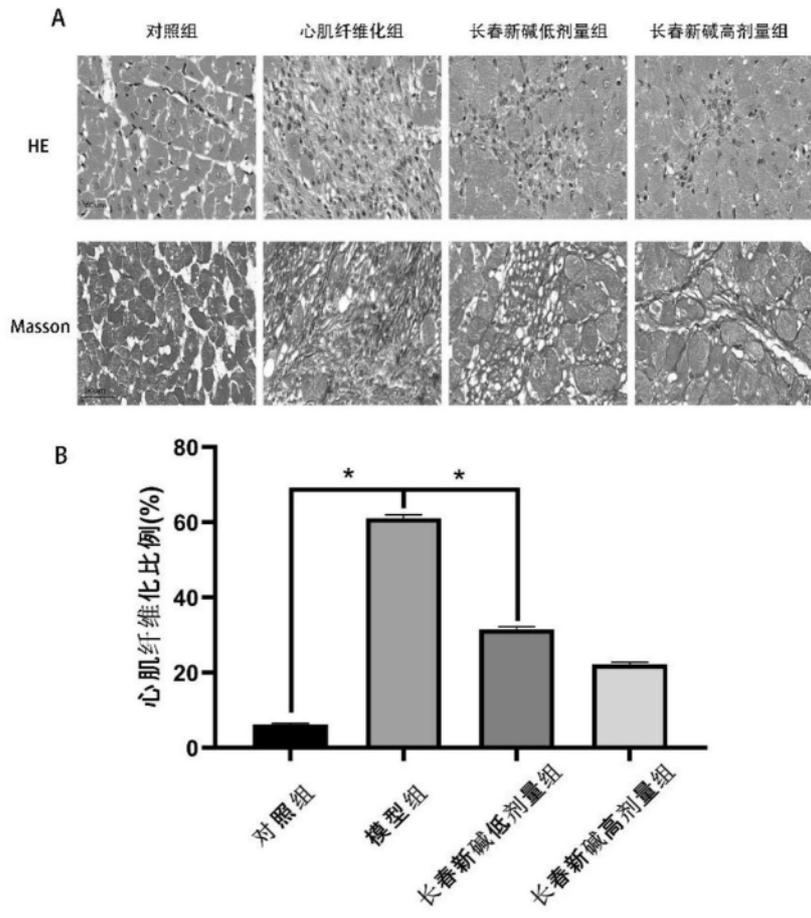


图3

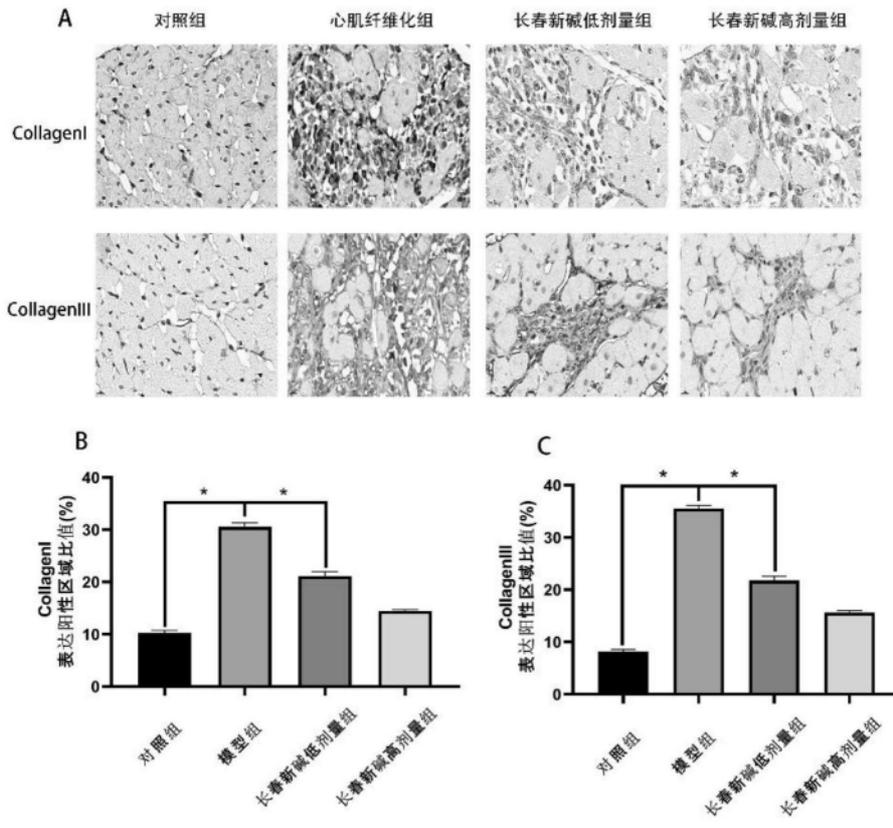


图4

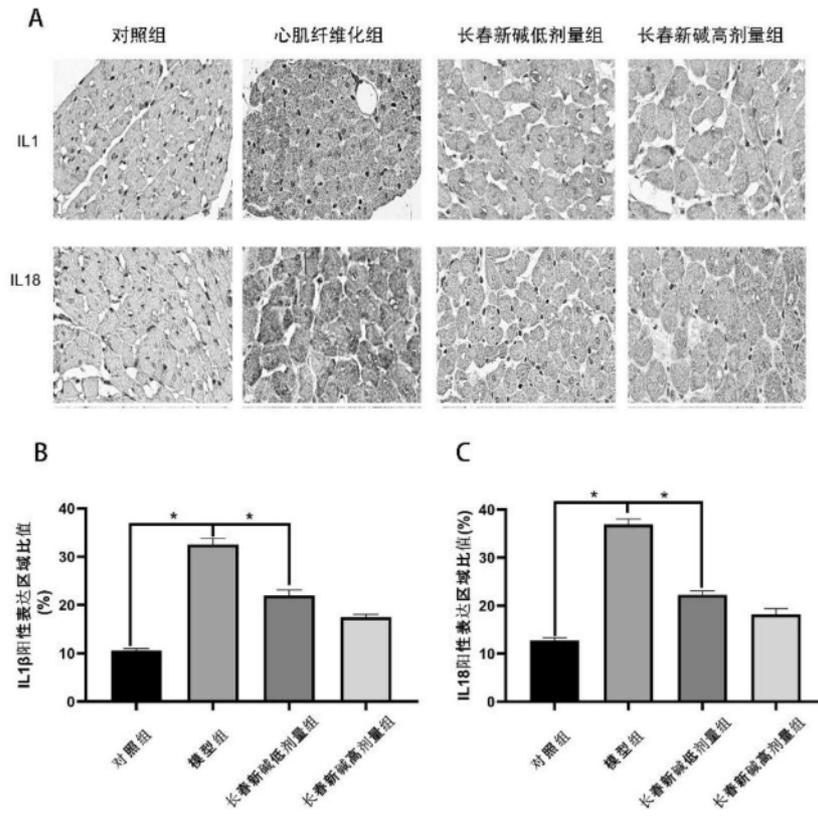


图5

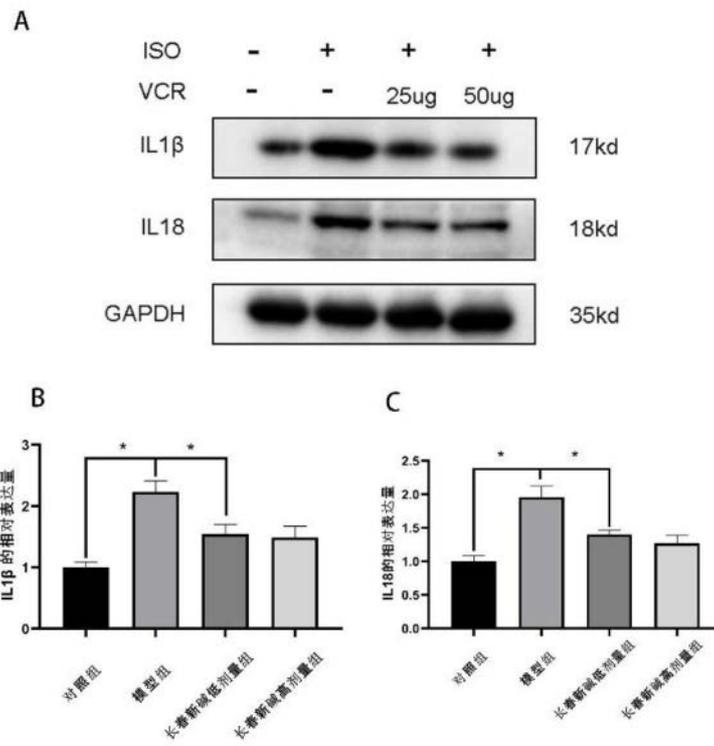


图6

A

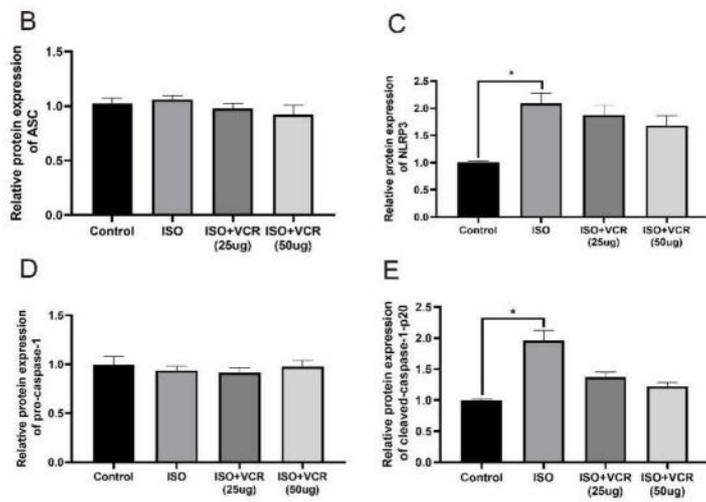
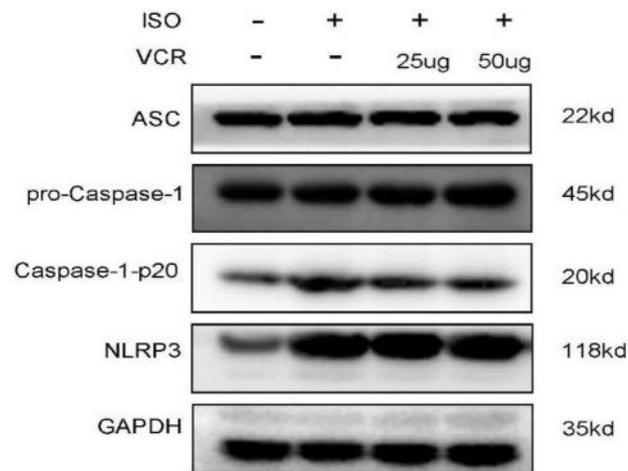


图7

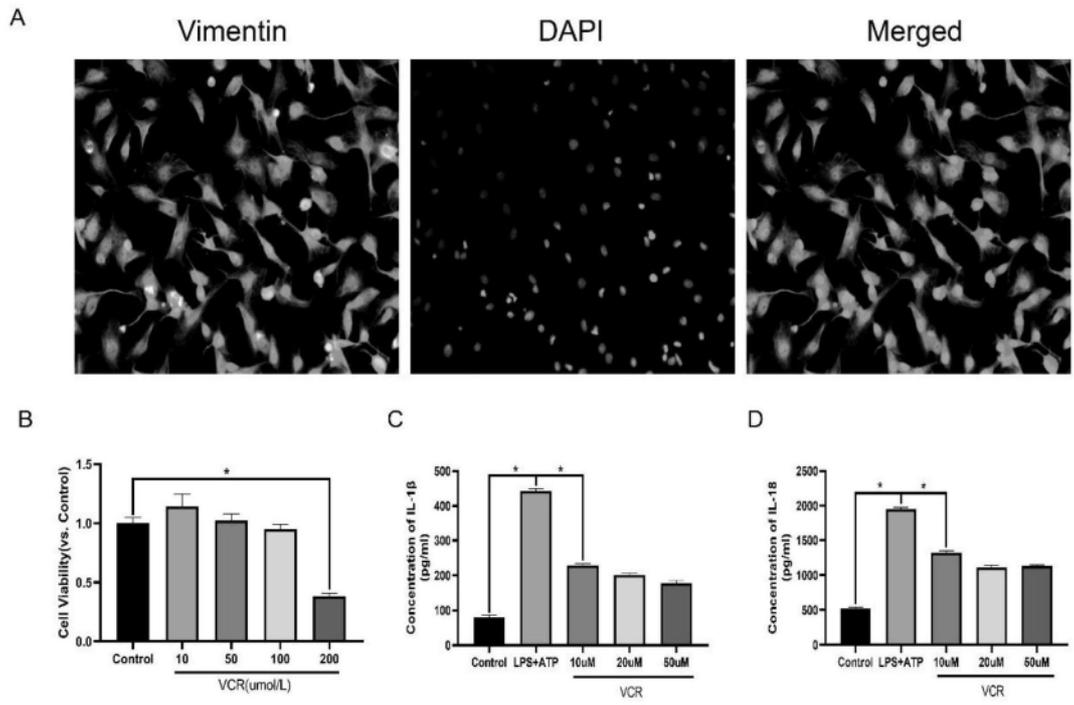


图8

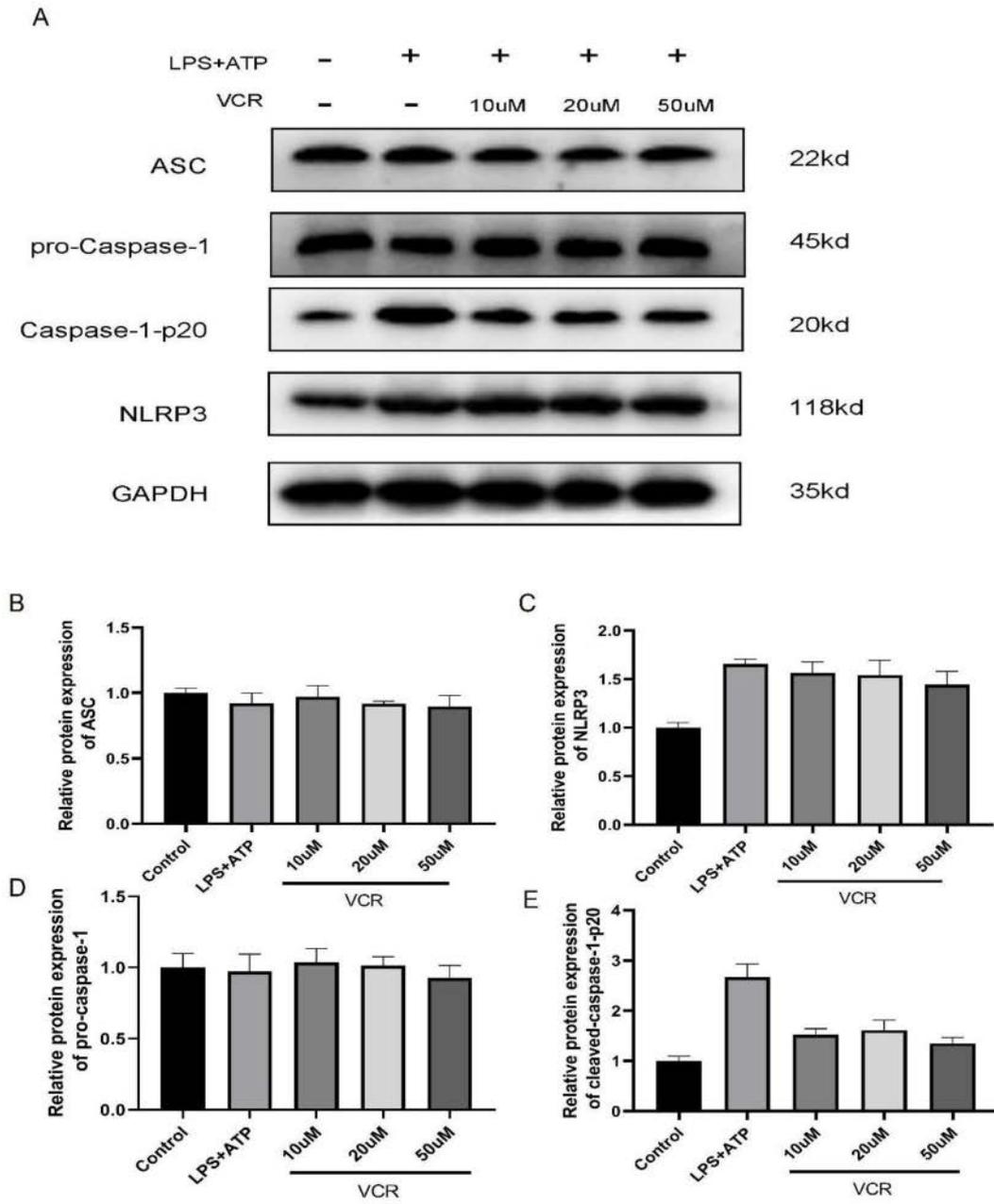


图9