



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112716930 A

(43) 申请公布日 2021.04.30

(21) 申请号 202011602217.1

A61P 27/02 (2006.01)

(22) 申请日 2016.09.07

(62) 分案原申请数据

201680064851.X 2016.09.07

(71) 申请人 东莞市凯法生物医药有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖松科苑
15栋314

申请人 谭文

(72) 发明人 谭文

(51) Int. Cl.

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

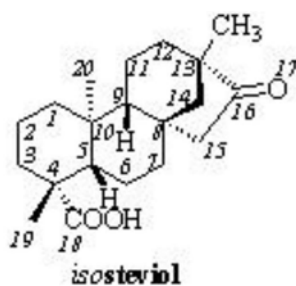
(54) 发明名称

贝壳杉烷类化合物在制备抑制组织、器官病理性纤维化和重构的药物应用

(57) 摘要

本发明是关于贝壳杉烷类化合物在抑制器官组织的病理性纤维化和重构的药物应用,其结

构式如图(I)所示:



(I)

1. 一种使用异甜菊醇制备抑制器官组织的病理性纤维化和重构的药物的方法,其特征在于其治疗机制涉及TGF- β 抑制,microRNA调节,新型磷酸二酯酶活性的调节及过氧化物清除或它们的联合作用。其特征还在于使用异甜菊醇及药学上可接受的盐来制备特定药用标准的固体或液体制剂,以供患者使用。

2. 权利要求1中的方法所述的器官组织是心、肝脏、肺脏、肾脏组织。

3. 权利要求1中所述的病理性纤维化重构,其特征于是基于成纤维细胞增多,细胞外基质或胶原的过度生成、组织影像密度增强。

4. 权利要求1中的方法所述的纤维化重构,其特征在于病理性的肺组织的纤维化及重构,肝组织的纤维化及重构或肾组织的纤维化及重构,视网膜的纤维化,手术和创伤后皮肤、肠、脑和其他器官、血管或冠状动脉血管成形术中的伤口愈合的纤维化重构。

5. 权利要求4中所述的病理性的肺组织纤维化及重构,其特征在于血管壁的纤维增生及肺动脉阻力增加以及细微支气管纤维化和增加的气道阻力,和肺泡组织的纤维化及降低的肺顺应性。

6. 权利要求4中所述的肝组织的纤维化及重构,其特征在于高脂、糖尿病、代谢性疾病或其他因素导致的肝组织成纤维细胞的增加、胶原蛋白的沉积和TGF- β 活性的增加,肝细胞内脂肪的堆积、肝功能损伤及血清相关肝脏转氨酶活性的增加。

7. 权利要求4中所述的肾组织的纤维化及重构,其特征在于由糖尿病、代谢性疾病或其他疾病引起的肾组织纤维细胞的增生,肾间隙的胶原蛋白的沉积,肾小球的炎症浸润,肾功能损伤。

8. 权利要求1中的方法所述的治疗和预防疾病的方法,其特征在于在疾病治疗过程中涉及激活cGMP。

9. 权利要求1中的方法所述的治疗和预防疾病的方法,其特征在于在所治疗的疾病中涉及cGMP的刺激和/或microRNA21的调节。

10. 权利要求1中的方法所述的治疗和预防疾病的方法,其特征在于涉及使用一种新的磷酸二酯酶抑制剂,其特征还在于该抑制剂增加cGMP和降低细胞中活性氧水平。

11. 权利要求1中的方法所述的磷酸二酯酶,其特征在于其底物为1' 3'、2' 3' 和3' 5' 的相应的环磷腺苷二酯酶、环磷鸟苷二酯酶、及其同工酶。

12. 权利要求11中的方法所述的环磷鸟苷二酯酶、及其同工酶,其特征为环核苷酸二酯酶(CNPase)。

13. 权利要求1中的方法所述的治疗和预防疾病的方法,其特征在于在治疗上述疾病中使用一种新型磷酸二酯酶调节剂,其特征还在于该调节剂可以改变2', 3' -cGMP、3', 5' cGMP、2', 3'-cAMP和3', 5' -cGMP的产量或它们在细胞中的相对比值。

14. 权利要求1中的方法所述的药物的制备,其特征是片剂、胶囊剂、颗粒剂、栓剂、软膏剂,以及经口服、经皮或阴道或直肠给药的缓控释剂或由经肺或经鼻的吸入雾化剂、定量气雾剂或干粉吸入剂。

15. 权利要求1的方法所述的特定药物标准,其特征在于使用符合药典药用标准的水和有机溶剂或混合溶剂作为溶剂或增溶剂。

16. 权利要求15的方法所述的溶剂是乙醇、1,2-丙二醇、甘油、聚乙二醇或其它药用有机溶剂,混合体积从5%到90%。

17. 权利要求15的方法所述的增溶剂包括符合药典药用标准的醇、二氧杂环戊烷、乙醚、甘油、胺、酯、植物油、亚砷, 高分子化合物和其它药用的增溶剂。

18. 权利要求15的方法所述的特定的药物标准的药用液体注射剂, 其特征在于注射剂的杂质含量、长期稳定性及溶血作用和细胞相容性的标准满足美国、欧盟、日本和中国药典的相关要求。

贝壳杉烷类化合物在制备抑制组织、器官病理性纤维化和重构的药物应用

背景技术

[0001] 纤维化是由器官损伤等异常反应引起的成纤维细胞增殖、向肌成纤维细胞分化以及过度细胞外基质产生等一系列的病理变化。破坏了细胞外基质的合成与降解平衡,导致纤维结缔组织过度沉积而发生病变,引起器官功能障碍,最终导致器官衰竭甚至死亡。常见的纤维化病变主要发生在心脏、肺、肝脏和肾脏等器官中。

[0002] 心肌肥大是心脏对压力超负荷的代偿性反应(Hilfiker-Klemer et al, JACC.2006:48(9):A55-A66)。随着心功能的恶化,心脏最终进入失代偿阶段。在压力的刺激下,从代偿到失代偿的转变,常常伴有心脏重构(Konstam et al.,JACC Cardiovascular imaging.2011;4(1):98-108)。心脏重构是一个复杂的过程,包括心肌细胞的增大或者死亡、血管稀疏、纤维化、炎症以及进行性的心功能紊乱(Burchfield et al., Circulation.2013;128(4)388-400)。围绕心肌细胞外的细胞基质和相关胶原网络的增多会增加心脏的僵硬度。间质网络的紊乱和纤维化损害了收缩功能,并促成了高血压性心脏病后的不良心肌重塑。心脏成纤维细胞是心脏中最丰富的细胞类型(占总细胞群的三分之二),负责细胞外基质(ECM)的沉积,并为心肌细胞构建支架。活化的肌成纤维细胞导致ECM的过度生成,主要是I型和III型胶原进入间质和血管周围间隙。过度的胶原蛋白沉积导致心肌硬化,还会影响心脏的舒张功能和充盈(舒张功能障碍)以及心脏超载。

[0003] 研究表明,间质胶原和心脏纤维化的增加可能并不是导致心肌肥厚时心功能不全的唯一因素。其他机制,如神经性内分泌激活、电生理重构、自主神经失衡、交感增加以及迷走神经活动减弱等,也可能是心脏功能恶化的原因。预防病理性心脏肥大和心脏重构是防止心功能恶化,保护心脏的重要治疗目标。

[0004] 据报道,通过用西地那非阻断磷酸二酯酶5(PDE-5)而增加cGMP能抑制心室和心肌细胞肥大,并能改善慢性主动脉缩窄(TAC)模型小鼠的心脏功能(Yuan F.,JMCC.1997;29(10):2836-48)。西地那非也可以逆转由于压力负荷引起的心肌肥大,并恢复心室功能。

[0005] 此外,随着TAC模型大鼠左心功能的恶化,最终导致肺动脉缺氧、肺动脉压的升高以及肺动脉血管重构(Chen et al.,Hypertension.2012;59:1170-1178)。

[0006] 肺动脉狭窄使阻力增加,造成肺动脉高压。肺动脉高压(PH)是一种进展快速的肺血管疾病,继而导致右心衰竭。长期缺氧将导致肺血管的结构重塑,从而形成肺动脉高压。在血管收缩和重构的同时作用下,引起致丛性肺动脉病的发生,其病症特点包括中层肥厚、内膜增生、小肌型动脉纤维化、胶原的合成与堆积、和前毛细血管的肌化以及致丛状肺动脉病变。肺部大量表达PDE-5(Burchfield et al.,Circulation.2013;128(4):388-400)。已有结果表明,在慢性缺氧或缺氧引起的肺动脉高压的大鼠模型中,采用事先或病程中给予西地那非(PDE-5抑制剂),可以有效减弱肺动脉压力的升高和血管的重构(Kwong et al., Cell metabolism.2015;21(2):206-14)。临床观测结果也显示,西地那非的治疗能够有效改善肺动脉高压患者的病情。

[0007] PDE-5是一种催化环磷酸鸟苷(cGMP)水解的酶,后者是一种胞内必需的第二信使,

调控着活细胞的多种生物过程。世界上已有数百万心肌肥大、心肌病、肺动脉高压和其它循环系统疾病患者成功地使用三种PDE-5抑制剂(西地那非,伐地那非和他达拉非)进行治疗。最近的研究结果发现,PDE-5抑制剂可用于包括心脏肥大、心肌病、在内的多种疾病的潜在治疗。

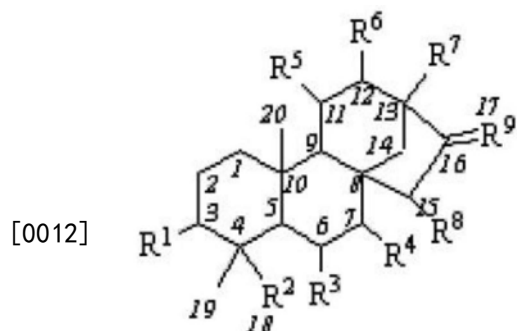
[0008] 然而,西地那非可能给患者带来严重的副作用。因此,开发防治心、肺组织纤维化方面的高效低毒的新一代PDE药物,是目前尚未满足的临床需求。

[0009] 化合物A是一种来自甜菊糖的贝壳杉烷二萜类化合物。甜菊糖是广为熟知的南美洲的传统药物,具有甜味以及对心血管系统的功效(Geuns JMC.Stevioside.Phytochemistry.2003;64(5):913-21)。先前的研究表明,该贝壳杉烷型化合物,例如化合物A和B,在心脏急性缺血再灌注损伤的模型大鼠中具有心脏保护作用 and 抗心律失常作用(Tan,US Patent,11/596,514,2006)。同时也有异甜菊醇(化合物A)可能用于糖尿病的治疗的报道。然而,贝壳杉烷类化合物-化合物A用于预防和治疗心脏或血管重构、心脏肥大和以胶原沉积、纤维细胞增殖为特征的纤维化病变的功效未见报道。同时先前也没有关于该类化合物以及甜菊醇(化合物A)对cGMP或TGF- β 的作用的报道,而cGMP或TGF- β 是公认的与心脏肥厚和纤维化相关的因子。

[0010] 在此发明中,我们首次提出结构式(I)的贝壳杉烷类化合物,如化合物A,可用于治疗TAC诱导的大鼠心肌肥大。它可以减少心肌纤维化和胶原沉积以及心肌细胞的大小从而预防心脏重构。贝壳杉烷类化合物,如化合物A,可以预防在同一TAC诱导的心肌肥厚大鼠中的肺动脉增厚。贝壳杉烷类化合物如化合物A,具有增强cGMP信号通路和清除活性氧的作用。此外,本发明揭示了化合物A的治疗效果优于其他药物,以及化合物A涉及其他磷酸二酯酶或机制。

发明内容

[0011] 本发明揭示贝壳杉烷类化合物,如结构式(I),用于制备抑制组织、器官病理性纤维化和重构,及治疗功能损伤效果。结构式(I)代表一类天然的、合成的或半合成的化合物。其中许多化合物已被公众所知(Kinghorn AD,2002,p86-137;SinderBB et al.,1998;Chang FR et al.,1998;Hsu FL et al.,2002)。结构式(I)的化合物可能有一个或多个不对称中心,也有可能以不同的立体异构体存在。



i. (I)

[0013] 其中

[0014] ii.R1:氢、羟基或烷氧基。

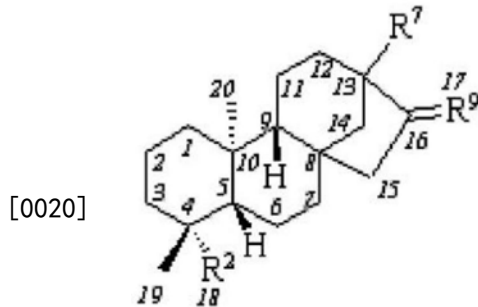
[0015] iii.R2:羧基、羧酸盐、酰卤、醛基、羟甲基,和可以生成羧基的酯基、丙烯酰胺基、酰基或醚键基团。

[0016] iv.R3、R4、R5、R6、R8:氧、羟基、羟甲基和能水解生成羟甲基的酯基或烷氧甲基。

[0017] v.R7:甲基、羟基,和能水解生成羟甲基的酯基或烷氧甲基。

[0018] vi.R9:亚甲基或氧

[0019] 一组优选化合物的结构如式(I')所示。所述化合物具有贝壳杉烷结构,在C13位置上被取代,在C17,C18上衍生化。所述化合物可能具有多个不对称中心,并存在不同的立体异构体或非对映异构体。位置8和13的绝对构型为(8R,13S)或(8S,13R)。



(I')

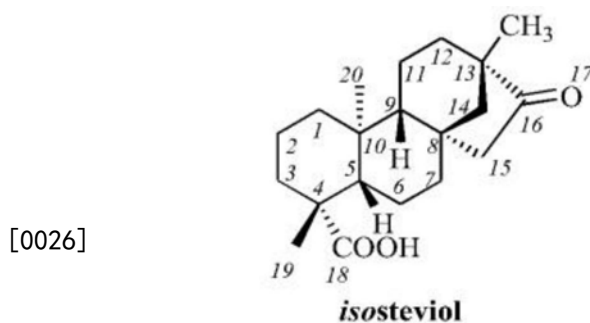
[0021] 其中

[0022] vii.R2:羧基、羧酸盐、醛基、羟甲基、甲基酯、酰甲基、酰卤。

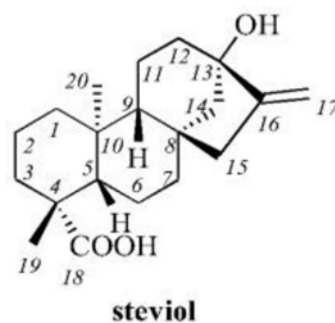
[0023] viii.R7:甲基,羟甲基或甲基醚。

[0024] ix.R9:亚甲基或氧。

[0025] 天然甜菊苷酸解后可以得到化合物A。化合物B是甜菊糖的糖苷配基,甜菊糖是化合物B的苷类。化合物A和B是同分异构体。化合物B可通过甜菊糖水解、氧化得到,或通过动物肠道细菌催化反应得到。



Formula (II) –compound A



Formula (III) –compound B

[0027] 化合物A的分子式为C₂₀H₃₀O₃,化学名称为(4 α ,8 β ,13 β)-13-methyl-16-oxo-17-norkauran-18-oic acid。化合物A也被称为ent-16-ketobeyran-18-oic acid。该化合物是含有贝壳杉烷结构的四环二萜类化合物,其中,不对称碳原子的绝对构型为:(4R,5S,8R,9R,10s,13s),碳13位上为甲基取代基,碳16上为羰基,碳18位上为羧基(Rodrigues et

al.,1988)。

[0028] 化合物B的分子式为 $C_{20}H_{30}O_3$ ，化学名称为ent-13-hydroxykaur-16-en-18-oic acid，它也被称为甜菊醇。该化合物也是含有贝壳杉烷结构的四环二萜类化合物。其中，手性碳原子的绝对构型为(4R,5S,8R,9R,10S,13S)，碳13上连接羟基，与碳16相邻的双键连接亚甲基，碳18连接羧基(Rodrigues et al.,1993)。

[0029] 化合物A或B在碳18位上也可以羧酸盐的形式存在，其中羧酸盐是钠和碱性金属或氯化物和卤素。化合物A和B都是含有贝壳杉烷结构的贝壳杉烷类化合物。化合物A是本发明的优选化合物。本发明公开了化合物A或B在抑制组织、器官病理性纤维化和重构等方面具有相似的治疗效果。可以推断，结构式(I)的所有其它化合物也具有与A化合物相同的治疗效果。据报道，化合物B在体外一定条件下会致突变。因此，与化合物B相比，化合物A更适合作为治疗药物。

[0030] 本发明所使用的化合物A是溶解度较好的化合物A的钠盐。

[0031] 结构式(I)所代表的贝壳杉烷类化合物可能的生物学和药理的作用已被广泛研究。大多数研究关注它们在代谢机制中的作用(Kinghorn,AD.2002,Stevia,by Taylor&Francis Inc.)。

[0032] 例如，所述化合物对细胞代谢、肠道内葡萄糖吸收和碳水化合物代谢、肝细胞线粒体能量代谢和肾细胞碳水化合物和氧代谢产物都有影响。也有报道指出，所述化合物可以引起血管舒张和低血压。最近，还有报道指出化合物A对心肌缺血过程中的心肌缺血、脑缺血、心律失常、心肌收缩能力均有影响。目前没有研究表明结构式(I)的贝壳杉烷类化合物或化合物A在抑制组织、器官病理性纤维化和重构的作用。此外，也没有研究表明结构式(I)的贝壳杉烷类化合物可以作为磷酸二酯酶抑制剂或活性氧(ROS)清除剂。

[0033] 本发明揭示了在TAC诱导的心肌肥厚和心肌重构大鼠中以及博来霉素诱导的肺纤维化大鼠中：1)在TAC手术3周后给予化合物A可显著抑制心肌肥厚；2)化合物A能明显改善心功能，而不增加细胞内钙离子浓度，改善电生理重构；3)化合物A可以抑制体内心肌纤维化和体外TGF- β 1诱导的成纤维细胞增生；4)化合物A可明显减少由异丙肾上腺素诱导的心肌增大；5)化合物A的作用是通过抑制PDE而升高cGMP；6)化合物A也可以调节心肌成纤维细胞中的cGMP和cAMP的水平，既包括2',3'-环化结构，也包括3',5-环化结构。7)化合物A可以明显减少博来霉素导致的纤维化灶和肺损伤；显著改善肺功能、肺组织炎性细胞浸润和肺组织结构病变、减少胶原沉积。

[0034] 本发明揭示化合物A可以降低TAC诱导的大鼠心脏肥大、扩张以及肌成纤维细胞的增生。TAC诱导3周后，作为心脏肥大指数的重量/体重比(HW/BW)显著增加，而给予化合物A后，重量/体重比大大下降。重量/体重比的增加伴随着心肌细胞横截面积的增加。与假手术组相比，TAC诱导3周后的大鼠心肌细胞横截面积增加76%，而给予化合物A后，同样的TAC大鼠的心肌细胞横截面积只增加了10%；上述结果还伴随着心脏收缩和舒张功能的明显改善。化合物A可以改善心脏肥厚和心肌肥大。

[0035] 心肌肥厚形成的同时也引起胶原蛋白形成和肌动蛋白重构。一种熟知的TAC大鼠组织结构改变是其肌动蛋白细胞骨架动态改变，即F/G肌动蛋白含量比值增高。TAC诱导肌动蛋白的极化，增加了聚合物(F-肌动蛋白)对单体(G-肌动蛋白)的比率。心室压力超负荷也引起间质纤维化，增加心肌胶原沉积。

[0036] 本发明揭示了化合物A治疗可以降低F-肌动蛋白水平和胶原沉积。此外,本发明揭示化合物A比西地那非在上述治疗中效果更加明显。

[0037] 纤维化和胶原沉积的减少会增加心肌顺应性和收缩力,从而使心脏具有更好的泵血功能,表现为在左室收缩和舒张过程中具有较高的弹性和较低的僵硬度。

[0038] 同时测量左心室压力和容积。通过在前负荷或后负荷变化中研究压力容积的关系可以导出两个相关参数:ESPVR,收缩末期压力容积之间关系的斜率,代表收缩末期弹性;EDPVR,舒张末期压力容积之间的关系的斜率,代表心脏的僵硬度。TAC诱导3周或9周的心肌肥厚模型大鼠出现心脏泵血功能障碍,主要表现为ESPVR的显著减少和EDPVR的显著增加。本发明揭示,与假手术组相比,在TAC大鼠中使用化合物A可以阻止ESPVR、EDPVR以及收缩和舒张功能的恶化。因此,化合物A有助于维持收缩过程中的正常弹性,降低TAC模型大鼠高压负荷引起的心脏舒张僵硬度。

[0039] 研究表明,TGF- β 信号通路在压力超负荷引起的心肌纤维化中起关键作用,同时调节胶原蛋白的产生。而cGMP信号通路对TGF- β 诱导的心肌纤维化过程中起关键调节作用。

[0040] 本发明揭示化合物A能抑制TGF- β 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖。此外,本发明揭示经过化合物A处理的心脏成纤维细胞中,cGMP水平显著增加,这与它的抗肥厚和抗纤维化作用有关。

[0041] 另外,miR-21已被证实可以促进心肌纤维化。本发明揭示,化合物A能显著减少在缺血心脏的半影区中的miR-21含量,同时伴随着这一区域纤维化程度的显著降低。化合物A的这种效果从未被报道过。

[0042] 脑尿钠肽(Brain natriuretic peptide, BNP)是心肌肥厚的重要标志物。本发明已经通过RT-PCR和Western blot等分子生物学技术证实异丙肾上腺素诱导的心肌肥大中BNP mRNA和BNP蛋白的表达增加,而化合物A能显著降低心肌细胞中BNP的产生和BNP mRNA的表达。

[0043] cGMP的增加可能是由于刺激BNP或抑制PDE的结果。由于化合物A对BNP具有显著抑制作用,因此由化合物A诱导的cGMP的增加可能是其抑制PDE作用所致。

[0044] 研究表明,cAMP、cGMP和它们的异构体都可能在细胞内信号通路中发挥作用。通过高效液相色谱-质谱法可以同时检测不同的细胞产生的cAMP和cGMP的异构体。本发明揭示化合物A能显著改变在心肌肥大细胞、正常心肌细胞和成纤维细胞里的3',5'-cGMP,2',3'-cGMP,3',5'-cAMP and 2',3'-cAMP水平,而且随着化合物A处理的时间不同,这种改变的程度也不同。这些结果表明,不同的cAMP、cGMP和其同分异构体与化合物A对纤维化、心肌肥大等疾病的治疗作用有关。关于化合物A的这些治疗作用从未被报道过。

[0045] 本发明还揭示了化合物A在治疗心肌肥大、纤维化、心肌病和肾纤维化及功能损伤中的用途。

[0046] 此外,线粒体产生的ROS可能作为细胞内的递质介导心肌肥大的产生。Daofu Dai等的研究表明,线粒体中产生的ROS是G α q蛋白诱导心肌肥大的关键调节因子(Dai DF, Rabinovitch P. Autophagy. 2011;7:917-918)。

[0047] 在本发明中,我们揭示了化合物A可以通过减少细胞外基质或线粒体中的活性氧(ROS)来抑制心肌细胞肥大,同时还抑制PDE。然而迄今没有报道经典的磷酸二酯酶抑制剂如西地那非具有相似的作用。这说明与西地那非相比,化合物A在抑制心肌肥大和其他疾病

方面具有优势。本发明也揭示了具有新机制的作为磷酸二酯酶抑制剂的化合物A的新用途，其机制与作用方式与现有文献报道的不同。

[0048] 本发明表明，化合物A在治疗心肌肥大和胶原蛋白的沉积，以及刺激cGMP生成比西地那非更为有效，

[0049] 在现有技术中，上述的化合物A或化合物B的治疗效果可能涉及多种机制。Wang KL等的研究表明化合物A的降压作用可能与平滑肌细胞的钾通道有关(Wang, KL et al, 2004)。然而，Jeppesen PB等的研究表明化合物A促进胰岛素的分泌作用与钾通道没有关系(Jeppesen PB., et al, 2000)。Tan揭示化合物A和B在缺血线粒体起保护作用，这种保护作用只能被5-OH-decdanoate(一种三磷酸腺苷敏感钾通道抑制剂)部分阻断((Tan, US Patent, 11/596, 514, 2006)。因此，化合物A和三磷酸腺苷敏感钾通道的相关作用目前尚不清楚。

[0050] 本发明清晰的揭示了化合物A本身对肌膜或线粒体三磷酸腺苷敏感钾通道没有直接的开放作用。化合物A不是一种开放剂，而只是一种增敏剂，它可以增加钾离子-三磷酸腺苷敏感钾通道对已知开放剂的反应程度，这些开放剂包括吡那地尔和ATP的改变。

[0051] 结构式(I)的化合物包括化合物A和B，也被用于治疗涉及纤维化或胶原蛋白过度产生的其他疾病，减少在皮肤伤口愈合、眼角膜恢复、视网膜损伤、肺纤维化、肺气肿和肝硬化中疤痕组织形成。

[0052] 结构式(I)的化合物，包括化合物A和B可以与其他药用材料制备成可接受的盐，如碱性金属(如钠)和卤素。它们可以与药物载体结合制成载体药物。结构式(I)的化合物及它们的组合药物可通过口服、静脉、吸入给药，或其他途径，也可经导管介入静脉和动脉。

[0053] 在另一个实施案例中，将用无菌生理盐水溶解化合物A的钠盐形成的溶液，装于由压缩空气提供雾化动力的雾化杯中(PARI喷雾装置)。为了得到更好的肺部沉积，使用碰撞器来评估气溶胶液滴的体外粒径分布，来确定气溶胶粒子的尺寸符合药品标准(FDA或欧盟)。麻醉的豚鼠通过气管插管吸入化合物A的气溶胶。在动物处死前后评价了化合物A对肺功能、肺纤维化、肺部炎症的明确治疗作用。在现有文献中，化合物A从来没有被用作吸入药物。

[0054] 此外，本发明使用共溶剂技术，制备了一种医用的化合物A钠盐的静脉注射制剂。通过静脉注射给药，可以产生快速的治疗效果。由于化合物A等萜烯化合物具有疏水的烃基骨架，极大的限制了其静脉注射的给药方式。目前，尚未有技术报道足够稳定、安全的，可用于静脉注射给药的化合物A液体制剂。对于医用药物，需要按照药监相关部门的要求，在严格的条件下，根据药物的毒性，对其溶解性及稳定性进行严格的药代动力学研究。而目前尚未有可用于临床注射的化合物A制剂。本发明首次发明了一种化合物A的药物制剂，其具有合适的生理pH，良好的溶解性，足够的物理化学稳定性，并被证明具有良好的生物学安全性。

[0055] 目前有多种增加疏水化合物的水溶性的方法，包括使用表面活性剂，纳米微粒体系(例如脂质体，胶束和微乳液)和环糊精。然而，由于表面活性剂较明显的毒性，其在静脉注射给药的应用非常受限，而纳米颗粒系统目前的临床应用仍具有挑战性。

[0056] 在本发明中，通过调节pH值和使用低剂量的有机溶剂，开发了可用于静脉注射的化合物A液体制剂，其涉及到的有机溶剂均为药学和临床广泛接受的溶剂。

[0057] 本发明中,用于增加化合物A溶解度的有机溶剂均已被FDA批准用于静脉注射。通过对几种溶剂进行筛选后,本发明确定了化合物A的最佳溶剂体系,其由pH为10.0的盐水,25%的乙醇和20%的丙二醇(2%,w/w)(化合物A钠)组成。化合物A钠盐以20mg或50mg/ml的最大浓度充分溶解在本发明的溶剂中,以最小化溶剂的用量,减少负面影响。本发明的这种优化的制剂在至少90天内物理化学稳定,在高湿度和高温条件下的加速测试中,30天内无结晶或降解。高温灭菌可以保证此化合物制剂的静脉注射安全性,并且不会破坏化合物A钠盐的稳定性。

[0058] 此注射制剂在低温和高温储存期间保持稳定。在加速和严苛环境的长期研究过程中,此注射制剂产生的杂质和含量可以忽略不计,并在FDA指导原则的可接受的范围内。本发明中检查了化合物A的溶血作用和细胞相容性。在H₉C₂细胞系中,该制剂在9.1%(v/v)浓度下,3小时内不诱导溶血作用,且在50μg/ml以内均没有显著的细胞毒性。体内研究表明,给予过量制剂的大鼠中,未观察到显著的急性毒性。这些测试表明此注射用制剂具有药学上可接受的安全性。

[0059] 此化合物制剂可使用的药学上可接受的盐包括常规的药学上可接受的无机或有机酸,例如:硫酸氢盐,磷酸二氢盐,甲磺酸盐,溴化物,甲基硫酸盐,乙酸盐,草酸盐,马来酸盐,富马酸盐,琥珀酸盐,2-萘磺酸盐,葡糖酸盐,柠檬酸盐,酒石酸盐,乳酸盐,丙酮酸羟乙基磺酸盐,苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

[0060] 以上是本发明整体的介绍。为了更好地说明本发明的方法和技术,以下将给出实施例,以便可以由本领域技术人员执行。

[0061] 在以下实施例中详细提供了本发明的方法和实施方式。

具体实施方式

[0062] 为了进一步说明用于实现本发明目的的技术,下文描述了关于确定和鉴定本发明中化合物的药物和治疗用途的详细方法,技术,流程和特点。案例提供了用于支持及验证本发明所使用的动物模型的实验方法和结果。涉及的案例均使用了适当的对照组实验及统计分析方法。以下的案例均用于描述而非限制本发明的应用。这些案例所涉及的方法及技术可用于筛选及确定此类Kaurane制剂的治疗效果。其他此类化合物制剂的治疗效果评价可使用相同的方法。

[0063] 本发明中列举的案例用于支持本发明的实验方法和结果,并验证本发明中使用的动物模型。本发明的所有实验均采用了适当的对照和统计检验。提供以下实施例来说明而非限制本发明。这些例子说明了用于筛选和确定结构式(I)中某些具有特定药理活性的贝壳杉烷化合物的方法和技术。也可以用相同的方法测定结构式(I)的其他化合物的治疗用途。

[0064] 实验材料实验动物:成年雄性Wistar大鼠,体重200g±20g,9周龄。每只大鼠被安置在一个单独的笼子里,饲养环境包括恒定的温度、湿度以及严格的黑暗光照周期,自由采食。

[0065] 化学试剂:化合物A(ent-17-norkaurane-16-oxo-18-oic acid,分子式,C₂₀H₄₀O₃,分子量:318.5)是由甜菊糖通过酸性水解、结晶纯化而得到。化合物A的钠盐可以通过加入NaOH或其他含钠碱获得;用高效液相色谱法测得化合物A的钠盐的纯度大于99%。化合物B

(ent-13-hydroxykaur-16-en-18-oic acid) 是由甜菊糖通过氧化、水解、酸化、萃取、纯化与结晶等一系列过程得到的；用红外分析和核磁共振证实了化合物B的结构，与已报道的数据一致。利用高效液相色谱法测定，化合物B的纯度大于99%。受试化合物的给药方式：静脉注射或腹腔注射或口服。剂量：化合物A(或其钠盐)，0.5mg/kg至10mg/kg；化合物B，2mg/kg至20mg/kg。

[0066] 实验方法

[0067] 心肌肥厚(主动脉弓缩窄)动物模型的建立及实验方案

[0068] 实验动物采用3%戊巴比妥钠进行腹腔注射(40毫克/公斤体重)麻醉。在无名动脉和左颈总动脉之间进行压力超负荷，持续3周或9周，诱导主动脉弓缩窄。假手术组进行同样的操作，但没有进行主动脉狭窄。手术期间，大鼠进行气管插管和用小动物呼吸机辅助通气(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)。

[0069] 3周和9周的TAC模型动物随机被分为五个剂量组(每组8-10只)，包括TAC空白对照组、化合物A低剂量(L, TAC+化合物A, 1mg/kg/d)，中间剂量(M, TAC+化合物A, 2mg/kg/d)，高剂量(H, TAC+化合物A, 8mg/kg/d)和作为阳性对照的西地那非组(TAC+SIL, 70mg/kg/d)。假手术组使用溶剂处理作为对照。分别在手术后3周和9周检查动物，大鼠TAC模型的急性和慢性手术死亡率<5%。利用盐水和有机溶剂中溶解(1:1, 0.5毫升)化合物A钠盐，利用蒸馏水溶解西地那非，然后分别进行灌胃给药。手术后三天给予药物或者溶剂处理，每日两次。观察期结束，测定体内血流动力学后，将所有动物处死，并把心脏取出做进一步分析。

[0070] 心脏血流动力学参数测量

[0071] 采用压力容积(PV)导管进行心脏血流动力学分析。实验导管采用肝素盐水(100U/ml)处理，防止血液凝固。大鼠麻醉后放在37℃的暖垫上，分离气管并连接呼吸机，潮气量4-6mL/200g，呼吸频率70次/分钟。分离右颈总动脉，将四电极压力容积导管(model SPR-838, Millar Instrument Inc)插入右颈总动脉，然后缓慢推入左心室直到获得了稳定的PV环。当信号稳定10-15分钟后，记录稳定状态下的PV环基线。然后打开腹部找到门静脉和下腔静脉，用棉签压迫下腔静脉施加负荷。在数据采集时，将小动物呼吸机关闭5秒，以避免肺运动产生的干扰。在稳定状态下记录数据后，从右颈静脉注入40μL高渗盐水，以便获得平行电导值。通过使用先前描述的方法，校准电导信号和绝对体积信号。在测量体内左心室功能时，外周动脉导管经股动脉逆行插入到腹主动脉，将外周动脉导管连接到压力传感器，使用Powerlab系统采集数据。

[0072] 组织学分析

[0073] 利用10%的中性福尔马林固定大鼠心肌组织，进行石蜡包埋，切成3毫米的切片，然后用苏木精-伊红(H&E)，天狼星红或鬼笔环肽染色。采用尼康系统和蔡司共聚焦显微镜拍照。用H&E染色结果检测细胞形态大小，使用天狼星红染色检测纤维化，使用鬼笔环肽染色检测纤维型肌动蛋白的数量。使用计算机辅助图像分析(图像处理软件)来确定细胞横截面面积和间隙胶原含量。样本量至少为四个或五个不同的心脏组织。

[0074] 心脏成纤维细胞的分离与培养

[0075] 参照文献方法，从1-2日龄的SD新生大鼠分离出心脏成纤维细胞。简而言之，将1-2日龄SD新生大鼠的心脏置于冰上切碎，在37℃下，使用胰蛋白酶孵化分离细胞。采用差速贴壁法除去非心肌细胞，将成纤维细胞培养在培养皿里。细胞传代3天后，使用0.05%的胰蛋

白酶溶液消化。使用含有5%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养细胞,保持温度37℃,5%CO₂的条件。

[0076] 细胞增殖

[0077] 采用(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物) (MTT) 法评估心肌成纤维细胞活力。这个实验检测活细胞中线粒体酶降低MTT底物(黄色到蓝色)的能力。在无血清96孔板上培养所分离的原代心脏成纤维细胞。培养24h后,加入0.5mg/mL MTT底物,再孵育细胞4个小时,然后在室温下用DMSO溶解10min。

[0078] 统计分析

[0079] 依次通过方差分析(单因素方差分析),Fisher检验比较多组间的差异。所有检验的P值均为双尾,以P<0.05被认为是具有统计学差异。

[0080] 实施例1

[0081] 本案例主要说明化合物A在降低TAC诱导的心肌肥厚和心肌扩张中的作用。

[0082] 成年的Wistar大鼠经过TAC诱导3周后,分别使用赋形剂、化合物A和西地那非治疗。心脏体重比(HW/BW)是反映心肌肥大的指数。在3周TAC模型组中,心脏体重比(HW/BW)增加34.6%(P<0.001)的同时,伴随有心脏横截面积增加81.6%(P<0.001)。在3周TAC模型组,化合物A或西地那非可显著改善心脏和心肌细胞肥大(表1)。经过化合物A处理,心肌细胞的横截面积增幅减少到15.1%(1mg/kg)和4.1%(2mg/kg),而西地那非使心肌细胞的横截面积增幅减少到16.3%(70mg/kg)。与西地那非相比,化合物A更有效。

[0083] 表1化合物A对TAC模型大鼠心重与体重的影响(n=8)

	3周	假手术组	模型组	化合物A(低剂量组)	西地那非
[0084] 心重(g)		0.68±0.03	0.91±0.06***	0.72±0.03**	0.76±0.04*
体重(g)		272.6±10.82	270.75±8.41	250.5±5.17	264±7.9
心重/体重(mg/g)		2.497±0.101	3.361±0.155**	2.862±0.099**	2.86±0.117**

[0085] 实施例2

[0086] 本案例主要说明了化合物A在抑制心肌重塑和纤维化形成中的作用。

[0087] 一些重要的转录因子影响肌动蛋白的动力学,其受游离的G肌动蛋白和聚合的F-肌动蛋白调节。激活心肌肥大通路的一个重要结果是得到更高的F/G肌动蛋白含量。用FITC标记的鬼笔环肽染色测量心肌F-肌动蛋白的水平。9周后,TAC组的免疫荧光图像显示F-肌动蛋白的绿色荧光明显增加,而通过化合物A(8mg/kg/d)或西地那非(70mg/kg/d)治疗后恢复到正常组的水平。大鼠经过TAC处理后,F-肌动蛋白的水平明显增加,进而导致肌动蛋白的动态变化。化合物A和西地那非均可降低F-肌动蛋白的表达,并且维持F/G-肌动蛋白的平衡。

[0088] 为了确定化合物A是否可以减弱TAC诱导的心肌纤维化,我们使用天狼猩红染色检测左心室心肌间质胶原的分布。在3和9周TAC组中,TAC引起明显的间质纤维化(P<0.05)。与对照组相比,3周和9周TAC组中的胶原蛋白含量分别增加了5.7倍和7.5倍。化合物A(8mg/kg/d)使3周和9周TAC组的间质纤维化分别减少58.2%和80.8%。与化合物A相比,西地那非

抑制心肌纤维化的作用较弱。

[0089] 实施例3

[0090] 本案例说明了化合物A对cGMP产生的影响。

[0091] cGMP的测定

[0092] 使用赋形剂、化合物A和西地那非处理后,采用ELISA试剂盒检测新生大鼠中成纤维细胞的cGMP水平。使用不同剂量的化合物A (1M,10M) 或西地那非 (100M) 处理稳定期细胞3小时。处理后,用0.1N HCl溶解细胞,通过ELISA方法检测cGMP。结果见下表。

[0093] 表2化合物A和西地那非刺激cGMP的产生(以对照组为参比,%)

	对照组	1.00±0.00
	化合物 A-1Na 1μm	1.57±0.43
[0094]	化合物 A-1Na 10μm	2.07±0.54
	西地那非	1.41±0.27

[0095] 实施例4

[0096] 这个例子说明化合物A能改善心肌病大鼠的心功能,防止心脏重塑、纤维化和糖尿病损伤引起的炎症,以及改善糖尿病引起的肾功能下降。

[0097] 糖尿病心肌病(DCM)诱导心肌损伤。由链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病心肌病伴随着炎症、氧化应激和纤维化相关标志物的变化。Wistar大鼠随机分为4组:A组(正常对照组)、B组(模型病)、C组(DCM/STVNa)和D组(DCM/TMZ,曲美他嗪治疗组)。12-16周后,利用压力容积导管检测左心室功能。用苏木精-伊红染色、天狼猩红染色和氧化应激测定法对心脏组织进行组织学研究。用分子生物学技术评估氧化应激、炎症和纤维化相关标志物。所有数据进行形态观察统计学分析。与对照组相比,各处理组大鼠血糖均显著升高,胰岛素水平显著降低。与正常组比较,模型组心肌细胞肥大、炎症、间质纤维化、胶原含量显著增加,同时TGF-β表达量和氧化应激相关指标在心脏组织也显著升高,并伴随超氧化物歧化酶2表达量和活性的降低。与模型组比较,化合物A以及D组的TMZ均能显著显著抑制糖尿病大鼠的心肌肥厚,心脏重量,并增加抗氧化活性。然而,B组和D组的血糖与胰岛素水平无显著性差异。与B组比较,D组的心功能明显改善。

[0098] 本发明揭示化合物A可预防糖尿病引起的心脏损伤、心脏重构和纤维化,并能改善糖尿病心肌病大鼠的心脏功能,其作用与葡萄糖或胰岛素的变化无关。

[0099] 糖尿病会诱发显著的肾功能异常,通过分析血浆内的肌酐(Cr)和血尿氮(BUN)发现,糖尿病大鼠血浆中Cr和BUN明显高于正常组,而STVNa治疗组大鼠血浆Cr和BUN都显著降低。

[0100] 表3化合物A对血浆内肌酐和血尿氮的影响

	肌酐 (Cr)	血尿氮 (BUN)
[0101] 对照组	5.1±2.5	5.7±3.8

[0102]	模型组	10.3±3.3*	10.6±6.8**
	STVNa 高剂量组	6.7±2.3#	8.2±5.7##

[0103] 注:*,**与正常组相比, $p<0.05$, $p<0.01$;#,,##,与模型组相比, $p<0.05$, $p<0.01$ 。

[0104] 实施例5

[0105] 本案例说明了化合物A在治疗肺动脉高压的疗效。

[0106] 用 $200\pm 20\text{g}$ 体重的Wistar大鼠,进行横向主动脉缩窄(TAC)造模,产生压力超负荷诱导的肺动脉高压。假手术组为对照组。在主动脉缩窄3天后,开始用化合物A(2或4mg/kg,灌胃给药)持续治疗9周。9周后,将动物处死,并进行肺组织固定,石蜡包埋,切片和HE染色,进行平均壁厚和肺动脉血管肌化分析。利用共聚焦显微镜观察I型胶原的免疫荧光染色。

[0107] 结论

[0108] (1) 肺血管重构

[0109] 在肺动脉高压大鼠中肺血管重构是相当明显的,表现在小(内径 $<100\mu\text{m}$),中肺动脉内壁增厚(内径 $>100\mu\text{m}$)。化合物A可以预防中、小动脉血管重构。

[0110] 表4. 内径 $<100\mu\text{m}$ 的肺动脉血管壁平均厚度($\bar{x}\pm\text{SD}$,N=3)

分组	血管壁平均厚度
对照组	24.39±7.87
模型组	30.49±8.51**
[0111] 化合物 A (1 mg/kg)	22.96±7.83##
化合物 A (4 mg/kg)	17.60±6.28 ##&&
西地那非 (70mg/kg)	24.10±7.48##

[0112] 注:**:与假手术组相比 $p<0.01$;##:与TAC组相比 $P<0.01$;&&:与西地那非组相比 $p<0.01$ 。

[0113] 表5. 内径 $>100\mu\text{m}$ 的肺小动脉血管壁平均厚度($\bar{x}\pm\text{SD}$,N=3)

分组	血管壁平均厚度
对照组	16.53±7.45
TAC 组	24.75±8.40*
[0114] 化合物 A (1 mg/kg)	16.60±6.00##
化合物 A (4 mg/kg)	10.67±5.01##
西地那非 (70mg/kg)	14.88±6.83##

[0115] 注:*表示与假手术组相比 $p<0.05$;##表示与TAC组相比 $p<0.01$;&&表示与西地那非

组相比 $p < 0.01$ 。

[0116] (2) 血管肌化

[0117] 根据肺血管的直径,血管肌化分为3种不同程度:即非肌化,部分肌化和全面肌化。经过化合物A处理后,非肌化肺血管增多,提示肺动脉高压的改善。与西地那非组相比,化合物A效果更明显。

[0118] 表6. 五组大鼠不同程度的血管肌化的百分比 ($\bar{x} \pm SD, N=3$)

分组	非肌化	部分肌化	全面肌化
对照组	72.38±10.91	18.47±5.822	9.147±7.620
TAC 组	30.78±15.96*	27.12±8.217	42.08±10.72*
[0119] 化合物 A (1 mg/kg)	66.78±5.876#	23.00±9.938	10.20±9.787#
化合物 A (4 mg/kg)	81.10±16.60#	17.04±18.98	1.851±3.207#&
西地那非 (70mg/kg)	57.57±7.182#	18.61±15.09	23.80±8.247#

[0120] 注:*表示与假手术组相比 $p < 0.05$;#表示与TAC组相比 $p < 0.05$;&表示与西地那非组相比 $p < 0.05$ 。

[0121] (3) I型胶原免疫荧光染色

[0122] 荧光成像显示肺组织中I型胶原的表达。结果显示:与假手术组相比,TAC组肺组织的I型胶原明显增加;与TAC组相比,化合物A可明显降低I型胶原的表达。

[0123] 表7各组I型胶原的荧光强度

分组	I 型胶原
对照组	7.518
[0124] TAC 组	15.88
化合物 A (1 mg/kg)	10.75
西地那非 (70mg/kg)	7.591

[0125] 实施例6

[0126] 本案例说明了化合物A在治疗肺纤维的疗效

[0127] 采用博来霉素溶液气管滴注的方法造模,雄性SD大鼠(180~210g)随机分为空白对照组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、阳性对照组和吸入毒性组。治疗组分别给予STVNa雾化吸入给药和吡非尼酮口服给药。每天两次,连续给药28天。然后进行CT肺部扫描、肺功能检测、肺系数检测、病理学分析和胶原蛋白含量检测。模型组CT肺部扫描显示蜂窝状阴影,提示组织纤维化灶。

[0128] (1) STVNa降低博来霉素诱导的肺纤维化大鼠的肺系数

[0129] 大鼠在取材前先称量动物的体重,然后将全肺重量与体重按如下公式计算肺系数:肺系数=肺重(g)/体重(g)×100。当肺组织发生纤维化病变时,由于细胞增生、细胞外

基质的过度分泌和胶原沉积等因素,导致肺重量增加。因此,肺系数在一定程度上可以反映肺部的病变程度。STVNa对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠的肺系数改变作用。在博来霉素诱导的模型组,大鼠肺系数增加。给予STVNa和吡非尼酮治疗后,大鼠肺系数明显降低。STVNa雾化吸入的治疗组呈现出剂量依赖性。

[0130] 表8. 各组肺系数值

组别	羟脯氨酸
对照组	0.56±0.11
模型组	1.04±0.27**
[0131] STV 低剂量组	0.75±0.15
STV 中剂量组	0.72±0.11##
STV 高剂量组	0.64±0.06##
吡非尼酮组	0.76±0.16#

[0132] 注:**p<0.01与对照组比较。#p<0.05,##p<0.01与模型组比较。

[0133] (2) STVNa减少博来霉素诱导的肺纤维化大鼠的肺部胶原蛋白沉积羟脯氨酸是胶原纤维所独有的一类氨基酸,其在胶原蛋白中的含量占比约为13.4%。因此,羟脯氨酸的含量能初步反映组织中胶原的代谢情况,可以作为纤维化程度的判断。在博来霉素造模组,羟脯氨酸的含量增加,提示纤维化程度高。给予STVN高剂量和吡非尼酮治疗后,肺组织中羟脯氨酸的含量接近正常水平。

[0134] 表9各组羟脯氨酸的含量($\bar{x} \pm SD, n=4$)

组别	羟脯氨酸
[0135] 对照组	0.53±0.16
模型组	0.95±0.16*
STV 高剂量组	0.55±0.16#

[0136] 注:*p<0.05与对照组比较。#p<0.05与模型组比较。

[0137] 实施例7

[0138] 本案例说明了化合物A在治疗肝脏、心脏纤维化的疗效100-120g的雄性SD大鼠(4-5周龄),购置于南方医科大学动物实验中心,动物许可证号为(scxk(粤)2016-0041)。大鼠饲养在恒温(20-22℃)条件下,不同组动物以4-5只/笼分笼饲养,整个试验期间光照和黑暗(12小时/12小时)交替,同时给予充足的食物和水。每天观察动物活动情况,每周至少称量1次体重并记录,另外按实验计划在特定的时间点测定血糖浓度。

[0139] SD大鼠分为正常组(n=12)和高糖高脂组(n=48);高糖高脂饲料连续喂养5周后,将高脂饲料喂养大鼠随机分为4组,即高脂高胆固醇组,高糖高脂异甜菊醇钠低、中、高治疗组(STVNa)每组12只,每天灌胃STVNa,给药两次,剂量为1,10,20mg/kg/天,连续给药5周后,测定相关指标,处死后进行各种分析检测(从开始喂养高脂饲料开始计算,共饲养10周)后进行各种生化和分子生物学分析检测。

[0140] 完成心功能测定后,依然处于麻醉状态的大鼠,打开胸腔,从心尖处插入采血用注射器,抽取适量的血液,加入一定比例的肝素钠,在4℃下3000-5000g离心10分钟,将上清转移到另一离心管即为血浆,分装后-80℃保存备用。抽血完成后,放血使大鼠安乐死。快速分

离心脏、肝脏、肾脏和主动脉血管等,用冰浴的磷酸盐缓冲液清洗,吸干水分后准确称重,并测定胫骨长度。心肝肾各组织一部分采用10%的中性福尔马林固定,一部分迅速放入液氮中,随后转移到-80℃长期保存备用。

[0141] (1) STVNa可有效缓解高糖高脂引起的肝脏纤维化

[0142] 高糖高脂饲养,大鼠体内脂肪堆积持续刺激肝脏,引起肝脏细胞逐步凋亡坏死,肝脏为了维持结构的完整性,成纤维细胞被激活,通过产生大量的胶原蛋白、形成细胞外基质而填补肝脏细胞凋亡留下的空缺,从而导致肝脏纤维化。在分子水平,QPCR检测mRNA水平表明,高糖高脂大鼠纤维化信号通路相关基因,如TGF-β1表达明显升高,细胞外基质沉积相关的一型胶原蛋白和三型胶原的表达都显著增强。此外,模型组还伴随肝功能损伤和血清转氨酶升高,STVNa治疗组显示明显的缓解。

[0143] 表10各组的TGF-β、一型胶原和三型胶原的表达量(±SD,n=4)

	TGF-β	CollagenI	CollagenIII
对照组	1	1	1
模型组	5.86±1.36***	4.91±1.38**	2.23±0.59**
[0144] STV-低	3.61±1.62	4.99±1.32	1.94±0.14 [#]
STV-中	2.36±1.87 ^{###}	2.98±0.31 ^{###}	1.17±0.22 ^{####}
STV-高	3.18±2.06 [#]	3.31±1.04 [#]	1.46±0.51 ^{###}

[0145] 注:**p<0.01,***p<0.001与对照组比较。[#]p<0.05,^{###}p<0.01,^{####}p<0.001与模型组比较。

[0146] (2) STVNa可有效缓解高糖高脂引起的心脏纤维化

[0147] 通过Qpcr检测心肌组织中一型胶原和三型胶原在基因水平的表达,结果表明STV干预组中CollgenI、CollgenIII表达显著降低,提示STVNa可在一定程度上有效缓解高糖高脂引起的心脏纤维化。

[0148] 表11各组的一型胶原和三型胶原的表达量(±SD,n=4)

	Collagen I	Collagen III
对照组	1	1
模型组	13.31±1.32**	15.39±1.05***
[0149] STV-低	12.19±0.80	14.65±2.27
STV-中	5.36±0.83 ^{###}	6.64±0.10 ^{###}
STV-高	5.10±1.62 ^{##}	0.93±0.91 ^{###}

[0150] 注:**p<0.01,***p<0.001与对照组比较。[#]p<0.05,^{###}p<0.01,^{####}p<0.001与模型组比较。