

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810022093.2

[51] Int. Cl.

*A61K 31/7048 (2006.01)*

*A61P 9/10 (2006.01)*

*A61P 7/02 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

*A61P 3/10 (2006.01)*

[43] 公开日 2008 年 12 月 24 日

[11] 公开号 CN 101327221A

[22] 申请日 2008.7.18

[21] 申请号 200810022093.2

[71] 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道  
639 号

[72] 发明人 寇俊萍 余伯阳

[74] 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公  
司

代理人 孙立冰

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称

麦冬皂苷 D 作为组织因子途径抑制剂的医药  
用途

[57] 摘要

本发明涉及医药技术领域，具体涉及麦冬皂苷  
D 的医药用途，即其作为组织因子(TF)途经抑制剂的  
用途，可用于治疗心脑血管疾病、凝血障碍、侵  
入性医疗程序、肿瘤转移或糖尿病等疾病。

- 
- 1、麦冬皂苷 D 用于制备预防或治疗与组织因子相关疾病的药物的用途。
  - 2、权利要求 1 的用途，其中与组织因子相关疾病是心脑血管疾病、凝血障碍、侵入性医疗程序、肿瘤转移或糖尿病。
  - 3、权利要求 2 的用途，其中心脑血管疾病是动脉粥样硬化、脑中风或肺栓塞。
  - 4、权利要求 2 的用途，其中凝血障碍是弥散性血管内凝血或脓毒血症。
  - 5、权利要求 2 的用途，其中侵入性医疗程序是血管成形术、动脉内切开术、应用移植模、导管的使用、移植片的植入或动静脉分流器的使用。

## 麦冬皂苷 D 作为组织因子途径抑制剂的医药用途

### 技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体涉及麦冬皂苷 D 作为组织因子（TF）途径抑制剂的医药用途。

### 技术背景

组织因子(tissue factor, TF) 又称为促凝血激酶 thromboplastin 或 CD142, 为单链跨膜促凝糖蛋白, 是丝氨酸蛋白酶凝血因子 F VII a /F VII 的细胞膜受体, 属于细胞因子超家族成员。大量研究显示, 组织因子 (TF) 作为止血平衡和病理状态下凝血级联反应的最初启动因子, 当血管破损后或在病理情况下, 血液暴露于能表达 TF 的细胞表面, 受体 TF 即与其配体 VII 或 VIIa 形成复合物, 进而同时激活凝血因子 X 和 IX, 最后形成纤维蛋白, 导致血液凝固, 是血栓形成和发展的一种关键因素, 在动脉粥样硬化、深静脉血栓、高血压、心绞痛、弥散性内凝血、肿瘤等许多疾病发生发展均起重要作用。新近研究表明, 血栓与炎症密切相关, TF 是联系炎症与血栓回路的重要因子, 通常仅表达于成纤维细胞和外膜细胞等血管外细胞, 在病理刺激如炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等的诱导下内皮细胞和单核细胞等也大量表达 TF, 炎症刺激或组织损伤时, TF 上调激活内源性凝血途径, FVIIa, FXa and FIIa 接连活化, 导致高凝, 纤维蛋白大量生成, 出现血栓。TF 上调在血栓和炎症回路中起关键核心的作用, 凝血因子 FVIIa, FXa and FIIa 和纤维蛋白都具有促炎性, 可激发多种细胞表达 TNF、白介素类、粘附分子等多种细胞内信号, 这样导致的炎症通过反馈性 TF 上调保证“纤维蛋白性血栓”, 反之又可引起血小板/白细胞活化, 形成“细胞性”血栓。TF 引起的凝血可能引发血栓形成而导致各种心血管疾病诸如: 心脏病发作、中风、不稳定性心绞痛、移植片衰竭或其他冠状动脉疾病, 还可能并发各种血栓栓塞障碍及凝塞, 分别例如肺栓塞、心房纤维颤动及栓塞及扩散性血管内凝血。体液操作亦可能引起不良性血栓, 特别是在输血或体液抽样及涉及体外循环(例如心肺迂回辅助外科手术)及透析过程中。因此阻止 TF 表达上调, 关闭血栓炎症回路, 可达到抗栓抗炎目的 TF 的活性抑制, 已成为当前防治心血管疾病的一个引人注目的药物靶点。

另外, 随着对 TF 作用的了解加深, 除了其在凝血过程中的作用, TF 还承担了信号受体和其他非凝血功能。这使得它在系统性炎症、凝血紊乱、动脉粥样硬化、肿瘤的血管发生及转移, 糖尿病等疾病中起重要作用。TF 的非凝血功能中, 与肿瘤生长、侵袭、转移的关系甚为引人注目, 它在恶性黑色素瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞表面的表达均异常增高, 近年来国外临床观察及体内、体外实验均证实 F VIIa/TF 复合物具有促进肿瘤生长、侵袭、转移的作用。另据研文献报道, TF 在人朗格罕胰岛中也有

表达,在大部分的胰岛内分泌细胞中发现了 TF (“胰岛产生 TF”),表明 TF 的分泌和胰岛素的分泌存在着一定的联系。这种 TF 很有可能与 II 型糖尿病或其前期患者患动脉粥样硬化和心血管疾病的高发病率有关。因此,干预 TF 途径可能为多种疾病的治疗、预防提供新的策略,已成为国内外日益关注的研究热点(Chu AJ. *Cell Biochem Funct.* 2006, 24(2):173-92.; Steffel J, Thomas F, Felix C. Tissue Factor in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation.* 2006; 113:722-31)。

目前国内外研究发现,内源性的 TF 抑制剂为组织因子途径抑制剂(tissue factor pathway inhibitor, TFPI),对维持体内凝血平衡有重要意义,重组获得的 TFPI 早期临床前景美好,但在败血症三期临床实验结果不甚理想,还造成出血危险性增加;TF 的寡核苷酸反义片段可抑制 TF 的合成,TF 的抗体及其突变体通过直接拮抗 TF 作用,活性位点失活的 FVIIa (FVIIai)在动物实验中均显示良好的抗血栓活性;自犬钩虫唾液分离的一种抗凝血蛋白(NAP<sub>C2</sub>)可通过与 FXa 结合阻断 TF 效应,2 期临床实验中可安全有效地抑制凝血酶生成。另外,一些已在临床应用的药物包括他汀类调脂药及环加氧酶-2(COX-2)抑制剂,具有抑制 TF 表达及活性作用,为其在心血管疾病应用提供新依据。我国中草药资源丰富,中药有效成分众多,从中寻找发现新型高效副作用低的 TF 途径抑制剂,具有广阔的研究前景。

#### 发明内容

本发明公开了麦冬皂苷 D 的治疗新用途,即其具有较强的组织因子(TF)途经抑制活性。其具有治疗心脑血管疾病、凝血障碍、侵入性医疗程序、肿瘤转移或糖尿病的功效。所述的心脑血管疾病优选动脉粥样硬化、脑中风或肺栓塞。所述的凝血障碍优选弥散性血管内凝血或脓毒血症。所述的侵入性医疗程序优选血管成形术、动脉内切开术、应用移植膜、导管的使用、移植片的植入或动静脉分流器的使用。

麦冬皂苷D可以从市场购得,也可以制备,相关制备文献如:(Yu BY et al. Studies on the Glycosides of the Subterranean part of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler cv. *Nanus.* Chem. Pharm. Bull.,1993,41(3):566~570 ; Cheng ZH et al. Steroidal glycosides from tubers of *Ophiopogon japonicus*. Journal of Asian Natural Products Research, Vol. 8, No. 6, September 2006, 555-559)。

本发明为治疗 TF 相关疾病提供了新的先导化合物或治疗药物。

以下是部分药理药效学试验方法及结果:

## 1 麦冬皂苷 D 抑制 TF 活性及表达的体外实验研究

### 1.1 实验材料

人脐带静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞, 购自中国科学院上海细胞所; 地塞米松磷酸钠注射液(Dexamethasone Sodium Phosphate Injection, 浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 040901); 重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , R&D Systems, Inc.), NF- $\kappa$ B 抑制剂二硫代氨基甲酸咯奈啉(Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC); RPMI1640 培养基干粉(GIBCO BEL), 新生牛血清(NCS, 中美合资兰州民海生物工程材料有限公司); TF 发色底物试剂盒(American Assaypro); 兔抗 TF 多克隆抗体(武汉博士德公司); 磷酸化的丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK P38)、细胞外调节激酶(ERK)、原癌基因 C-Jun 氨基末端激酶(JNK)抗体(美国 Cell signaling Technology 公司), 微管蛋白  $\alpha$ -tubulin (Santa Cruz 公司)。

### 1.2 实验仪器

细胞培养箱(德国 Heraeus), 超净工作台(苏净集团安泰公司), Z-323K 冷冻离心机(德国 HERMLE 公司), 离心机(上海安亭科学仪器厂制造 80-2B; ), XSZ-D2 倒置显微镜(重庆光学仪器厂), Nuair 超低温冰箱(-70℃, 美国 Revoc Technologies), 紫外分光光度计(Beckman)、电泳仪(Bio-Rad), 多功能酶标仪(Sunrise, TECAN)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 ECV304 细胞 TF 活性测定

ECV304 细胞 37℃、5% CO<sub>2</sub> 常规培养, 消化传代, 接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l, 待长满单层后, 分别加不同浓度麦冬皂苷 D 孵育 1 h, 再加 TNF- $\alpha$  (终浓度 10 ng/ml) 孵育 4 h。随后收集细胞, 反复冻融 3 次裂解细胞。参考试剂盒说明书, 采用发色底物法, 测定裂解液 TF 活性。

#### 1.3.2 ECV304 细胞 TF 表达及信号通路测定

ECV304 细胞消化传代, 分为 4 个实验组, 即对照组, 模型组, 麦冬皂苷 D 和阳性对照组, 分别接种于 100 ml 细胞培养瓶, 待长满单层后, 分别加对照溶媒、麦冬皂苷 D (终浓度 10  $\mu$ M) 及 PDTC (终浓度 50  $\mu$ M) 作用 1 h, 再加 TNF- $\alpha$  (终浓度 10 ng/ml) 处理 4 h。随后收集细胞, 提取总蛋白, 采用蛋白印迹(Western blotting) 方法测定 TF 表达及其上游信号转导通路 P38 蛋白激酶、P42 JNK 磷酸化的情况。

### 1.4 实验结果

#### 1.4.1 麦冬皂苷 D 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 ECV304 细胞 TF 活性的影响

图 1 结果显示, TNF- $\alpha$ 可明显增加 ECV304 细胞 TF 活性, 预先给予麦冬皂苷 D 0.1、1、10 $\mu$ M 三个浓度, 均可显著抑制升高的 TF 活性。

#### 1.4.2 麦冬皂苷 D 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 ECV304 细胞 TF 表达及其信号通路的影响

图 2 结果显示, TNF- $\alpha$ 可明显促进 ECV304 细胞 TF 表达, 并诱导 MAPK p38 和 JNK 显著活化, 磷酸化抗体表达明显增加, 而总 p38 和 JNK 无明显变化, 提示 p38 和 JNK 信号通路参与 TF 活化; 麦冬皂苷 D 预处理, 可明显下调 TF 表达, 抑制 P38 和 JNK 磷酸化, 而不影响 ERK。

### 2 麦冬皂苷 D 抑制 TF 表达的体内实验研究

#### 2.1 实验材料

雄性 SD 大鼠, 体重 280~340g。

核糖核酸提取试剂 TRIZOL 试剂 (Invitrogen life technologies), RNA 酶抑制剂、MMLV 逆转录酶、dNTP 混合液(Promega 公司); GAPDH 引物, 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC, 3'-GGTACCACCATGTACCCAGG; Rat TF 引物, 5'-GGAGTGGCAACCGAAACC, 3'-TGTAAGGAGTGAGACGCCG; (北京三博生物技术公司合成)。兔抗 TF 多克隆抗体, 磷酸化的丝裂原活化的蛋白激酶 MAPK P38、JNK 抗体, 微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 抗体来源同上。

#### 2.2 实验仪器

PCR 仪 (MJ Minicycler 公司), JD-801 凝胶电泳图像分析系统(南京大学江苏省捷达科技发展有限公司), 紫外分光光度计 (Beckman), 电泳仪 (Bio-Rad), Z-323K 冷冻离心机 (德国 HERMLE 公司), Nuair 超低温冰箱 (-70 $^{\circ}$ C, 美国 Revoc Technologies)。

#### 2.3 实验方法

##### 2.3.1 下腔静脉结扎大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 基因表达测定

18 只大鼠随机分为 3 组, 分别为假手术组、模型组和药物处理组, 分别灌胃给予等容量蒸馏水与麦冬皂苷 D 0.7mg/kg, 1 h 后进行下腔静脉结扎手术, 于术后 17 h, 再给药 1 次, 1 h 后放血处死, 分离血管, 采用 TRIZOL 试剂提取组织 RNA, 取上述组织 RNA 5 $\mu$ g, 逆转录得到 cDNA 溶液, 在 MJ Minicycler PCR 仪进行扩增。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 个循环。PCR 产物在含 1  $\mu$ g/ml EB 1.5% agarose 进行电泳, 用 UVP 成像系统拍照, JD-801 凝胶电泳图像分析系统分析。

##### 2.3.2 下腔静脉结扎大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 蛋白表达及信号通路测定

18只大鼠随机分为3组, 分别为假手术组、模型组和药物处理组, 分别灌胃给予等容量蒸馏水与麦冬皂苷D 0.7mg/kg, 1 h后进行下腔静脉结扎手术, 给药4次后, 分离血栓部位血管组织, 加入裂解液(250 mM 蔗糖, 1 mM 乙二胺四乙酸, 50 mM 三氨基甲烷-盐酸缓冲液, 1 mM 二硫苏糖醇, 1 mM 苯甲磺酰氟, pH 7.4), 提取组织总蛋白, 利用考马氏亮蓝试剂盒定量蛋白。采用Western blotting 方法测定血管组织TF表达及其上游信号转导通路蛋白激酶P38、JNK 磷酸化的情况。

## 2.4 实验结果

### 2.4.1 麦冬皂苷 D 对大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 基因表达的影响

图 3 结果显示, 假手术组少量表达 TF, 模型组 TF 表达明显增加, 给予麦冬皂苷 D 可明显下调 TF 表达。经扫描分析, 其比值分别为 0.29, 1.26, 0.38, 表明麦冬皂苷 D 体内给药可抑制 TF 基因表达增加。

### 2.4.2 麦冬皂苷 D 对大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 蛋白表达的影响

图 4 结果显示, 假手术组静脉血管基本不表达 TF, 模型组血栓形成部位血管大量表达 TF, 同时 MAPK p38 和 JNK 显著活化, 磷酸化抗体表达明显增加, 而总 p38 和 JNK 无明显变化, 提示 p38 和 JNK 信号通路参与 TF 活化; 麦冬皂苷 D 0.7 mg/kg 处理组大鼠血管 TF 表达明显下调, 同时磷酸化-p38、磷酸化-JNK 表达亦明显降低, 表明麦冬皂苷 D 体内给药可通过 TF 上游信号转导通路, 抑制 TF 蛋白表达增加。

综上所述, 体内外结果均表明麦冬皂苷 D 可明显抑制 TF 活性, 并通过上游信号通路下调 TF 表达, 为防治 TF 相关疾病提供有利依据。

## 附图说明

图 1 是麦冬皂苷 D 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 ECV304 细胞 TF 活性的影响。## $P<0.01$ , 与对照组比较; \*  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  与模型组比较

图 2 是麦冬皂苷 D 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 ECV304 细胞 TF 表达及其信号通路的影响。Phospho 代表磷酸化

图 3 是麦冬皂苷 D 对大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 基因表达的影响

图 4 是麦冬皂苷 D 对大鼠静脉血栓模型血管组织 TF 蛋白表达及信号通路的影响。Phospho 代表磷酸化。

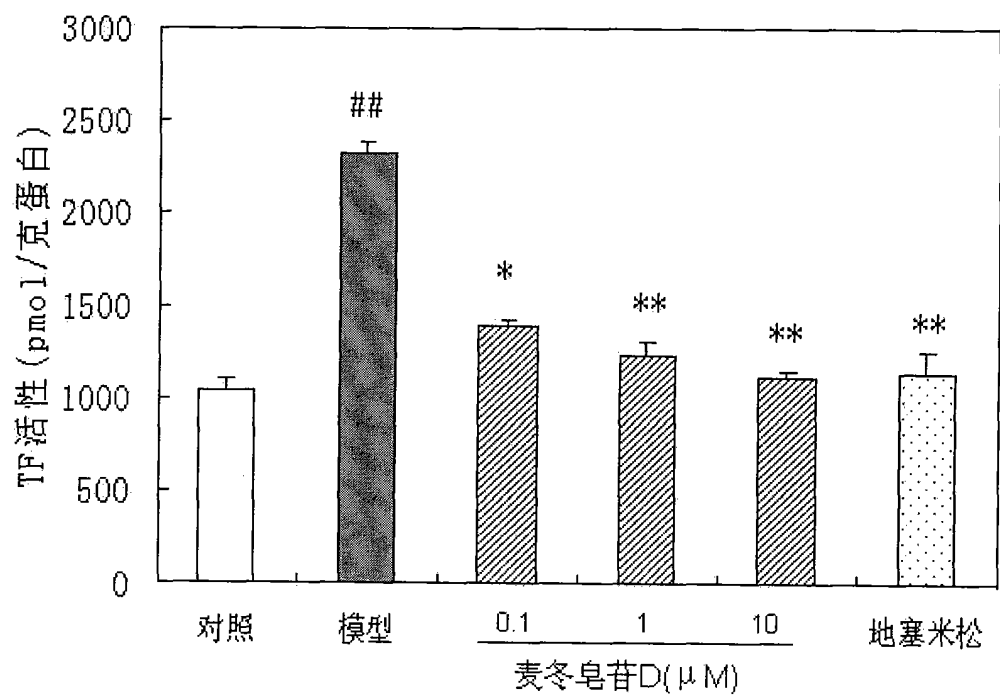


图 1

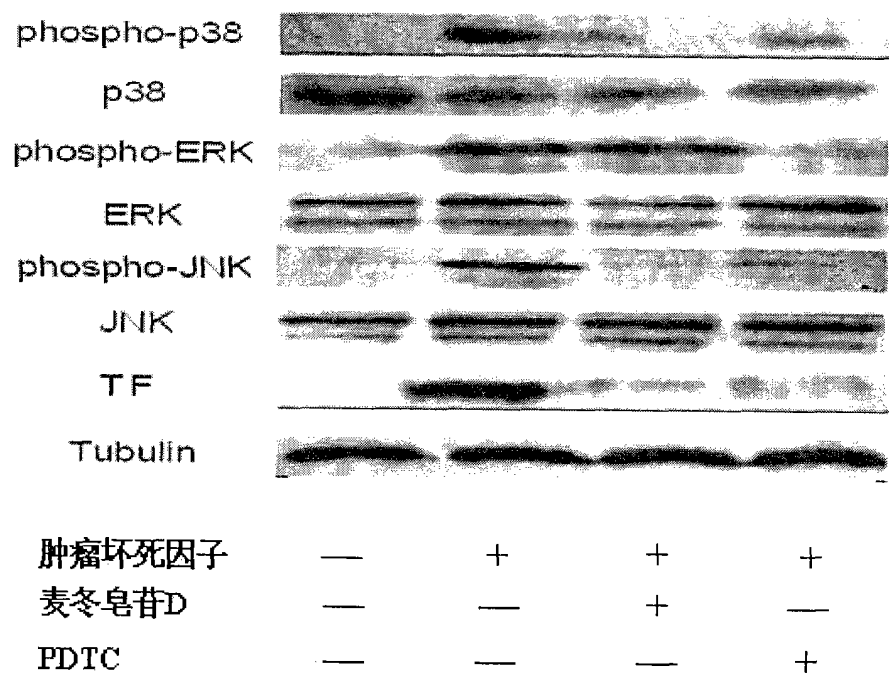


图 2



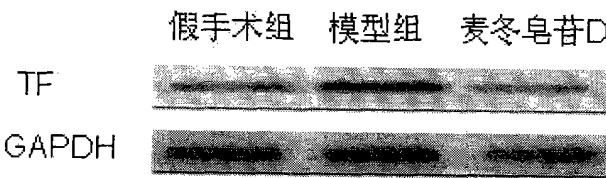


图 3

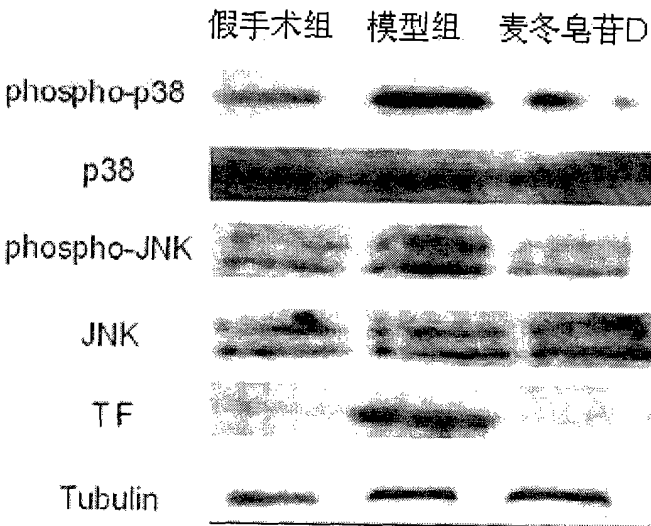


图 4