



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102697756 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201210216091. 3

(22) 申请日 2012. 06. 27

(71) 申请人 成都中医药大学

地址 611137 四川省成都市温江区柳台大道  
1166 号

申请人 成都医学院

(72) 发明人 彭成 代敏 曹小玉 王蓬勃

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务  
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 全学荣

(51) Int. Cl.

A61K 31/045(2006. 01)

A61P 15/02(2006. 01)

A61P 31/10(2006. 01)

A61P 33/02(2006. 01)

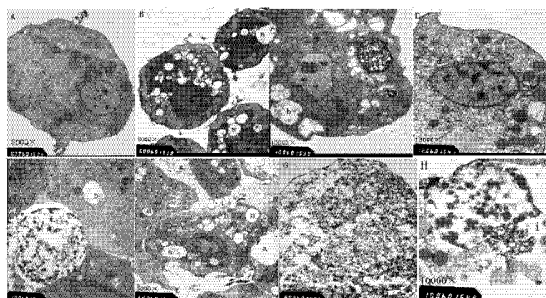
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

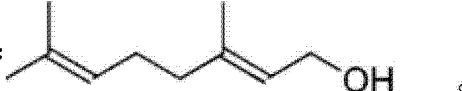
### (54) 发明名称

香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的用途

### (57) 摘要

本发明公开了香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的用途。本发明还公开了一种治疗阴道炎的药物组合物,它是由香叶醇为活性成分,加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成的药剂。本发明香叶醇具有治疗阴道炎的作用,有较强的实际应用价值。



1. 香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于:所述的药物是治疗念珠菌性阴道炎或者滴虫性阴道炎的药物。
3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于:所述药物是治疗白色念珠菌引起的念珠菌性阴道炎。
4. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于:所述香叶醇是(E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇,其结构式为:  
。
5. 一种治疗阴道炎的药物组合物,其特征在于:它是以香叶醇为活性成分,加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成的药剂。
6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其特征在于:所述的药剂是外用制剂、口服制剂或注射制剂。
7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其特征在于:所述外用制剂为洗剂、栓剂、涂膜剂或搽剂。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其特征在于:所述制剂中香叶醇的含量为0.1%~100% w/w。

## 香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及香叶醇的新用途,属医药卫生领域。

### 背景技术

[0002] 阴道炎是阴道粘膜及粘膜下结缔组织的炎症,是妇科门诊常见的疾病。正常健康妇女,由于解剖学及生物化学特点,阴道对病原体的侵入有自然防御功能,当阴道的自然防御功能遭到破坏,则病原体易于侵入,导致阴道炎症。目前,对阴道炎的治疗以抗感染、抗炎为主,同时辅以物理治疗,常用的治疗方法有药用阴道冲洗、局部放药、口服用药等。常见的阴道炎有细菌性阴道炎、念珠菌性阴道炎、滴虫性阴道炎、老年性阴道炎。

[0003] 细菌性阴道炎,是阴道内正常菌群失调所致的一种混合感染,是阴道内有大量的细菌、伴有阴道分泌物性质改变的一组症候群,主要症状为阴道分泌物增多,呈稀薄均质状或稀糊状,为灰白色或灰黄色,有鱼腥臭味,性交后加重,可伴有轻度外阴瘙痒或烧灼感,有的人可发生下腹部疼痛、性交困难或尿痛。治疗细菌性阴道炎的常见药物为四环素等抗生素和磺甲硝咪唑等广谱抗菌药。

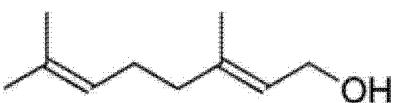
[0004] 念珠菌性阴道炎,是由念珠菌感染引起的阴道炎,主要致病菌为白色念珠菌。念珠菌是条件致病性真菌,其致病性是相对的,是否发病取决于人体免疫力的高低及感染菌的数量、毒力。在正常机体中,其数量少,呈卵圆形,与机体处于共生状态,不引起疾病。当机体在某些生理、病理因素影响下,机体抵抗力或免疫力降低时,平衡状态被破坏,念珠菌由酵母相转为菌丝相,在局部大量生长繁殖,引起阴道炎。表现为白带增多,外阴、阴道瘙痒、灼烧感,小便疼痛,外阴周围常发红、水肿,表皮变化多种多样;可发生很浅的水疱丘疹,成群出现;亦可形成湿疹状糜烂,局限于外阴或向周围扩展至会阴、肛门周围及股生殖皱襞,直至大腿内侧、外表,完全类似急性或亚急性湿疹;阴唇及阴蒂附近黏膜增厚,互相接触的皮肤表面潮红糜烂;个别可引起微小的白色脓疱,严重时发生溃疡、外阴疼痛及局部淋巴结肿大。治疗念珠菌性阴道炎的常见药物为制霉菌素等抗生素和氟康唑、伊曲康唑等广谱抗真菌药。

[0005] 滴虫阴道炎(*trichomonas vaginitis*)是常见的阴道炎,由阴道毛滴虫所引起。临床上以白带增多、质稀有泡沫、秽臭,阴道瘙痒为主要表现。检查时可见阴道粘膜充血,严重者有散在的出血斑点,后穹窿有多量白带,呈灰黄色、黄白色稀薄液体或为黄绿色脓性分泌物,常呈泡沫状。常见治疗药物为甲硝唑等灭虫药。

[0006] 老年性阴道炎常见于绝经后的老年妇女,因卵巢功能衰退,雌激素水平降低,阴道壁萎缩,粘膜变薄,上皮细胞内糖原含量减少,阴道内 pH 值上升,局部抵抗力降低,致病菌容易入侵繁殖并且引起炎症。主要症状为阴道分泌物增多及外阴瘙痒、灼热感。检查见阴道呈老年性改变,上皮萎缩,皱襞消失,上皮变平滑、菲薄。阴道粘膜充血,有小出血点,有时见浅表溃疡,若溃疡面与对侧粘连,阴道检查时粘连可被分开而引起出血,粘连严重时可能造成阴道狭窄甚至闭锁,炎症分泌物引流不畅可形成阴道积脓甚或宫腔积脓。补充少量雌激素是老年性阴道炎的治疗原则,可使阴道黏膜增厚,增强抵抗力。

[0007] 目前,常用治疗阴道炎的药物大多为抗生素和广谱抗菌药物,副作用大,且大量使用会产生耐药,需要寻找新的药物。

[0008] 香叶醇(Geraniol),又叫做牻牛儿醇, IUPAC 命名是 (E)-3, 7- 二甲基 -2, 6- 辛二

烯 -1- 醇, 结构式为:  香叶醇天然存在于牻牛儿苗科天

竺葵属天竺葵、禾水科香茅属芸香草和蔷薇科蔷薇属玫瑰的花和掌瑰等 250 多种植物中。香叶醇可以从天然植物中提取,也可以  $\beta$ -蒎烯为原料合成。香叶醇广泛用于花香型日用香精,可用于苹果、草莓等果香型、肉桂、生姜等香型的食用香精,也可制成酯类香料。入药用于抗菌和驱虫,临床治疗慢性支气管炎效果较好,不仅有改善肺通气功能和降低气道阻力的作用,而且对提高机体免疫功能也颇有裨益,且有起效快,副作用小的优点。如,陈珏等,“香叶醇的药理研究”,中成药研究等,1980 年第 1 期公开了香叶醇对慢性支气管炎及支气管哮喘具有良好疗效;孙立宏等,“香叶醇的研究进展”,西北药学杂志 2009 年 10 月第 24 卷第 5 期综述了香叶醇的提取分离、合成的方法,及其药理作用,其具有抗肿瘤、平喘、抗菌的作用,主要是抗黄曲霉、黑曲霉等霉菌,也可抑制革兰氏阴性菌,且对蚊虫和德国小蠊的趋避性强。

## 发明内容

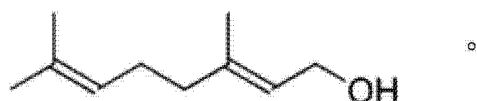
[0009] 本发明的发明目的在于提供香叶醇的新用途,即香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的新用途,还提供了以香叶醇为活性成分的药物组合物。

[0010] 本发明提供了香叶醇在制备治疗阴道炎的药物中的用途。

[0011] 其中,所述的药物是治疗念珠菌性阴道炎或者滴虫性阴道炎的药物。

[0012] 其中,所述药物是治疗白色念珠菌引起的念珠菌性阴道炎。

[0013] 其中,所述香叶醇为 (E)-3, 7- 二甲基 -2, 6- 辛二烯 -1- 醇, 其结构式为:



[0014] 本发明还提供了一种治疗阴道炎的药物组合物,它是以香叶醇为活性成分,加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成的药剂。

[0015] 其中,所述的药剂是外用制剂、口服制剂或注射制剂。优选地,所述外用制剂为洗剂、栓剂、涂膜剂或搽剂。

[0016] 其中,所述制剂中含有香叶醇的含量为 0.1% ~ 100% w/w。

[0017] 本发明香叶醇具有治疗阴道炎的作用,尤其是对念珠菌性阴道炎和滴虫性阴道炎具有确切的疗效,具有良好的临床应用前景。

[0018] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0019] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

## 具体实施方式

[0020] 实验例 1 本发明香叶醇治疗念珠菌性阴道炎的活性

[0021] 1 材料及仪器

[0022] 1.1 实验菌株

[0023] ①标准菌株:白色念珠菌标准株(ATCC14053), 来自美国临床实验室菌种保藏中心;白色念珠菌标准株(CICC32819)和白色念珠菌标准株(CICC31284), 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0024] ②临床分离株:14 株白色念珠菌, 于 2011 年 9 月至 12 月期间分离于四川省妇幼保健院妇科门诊患者的阴道分泌物, 并经 BIO-KONT 公司的 KC-16 鉴定板条与药敏纸片鉴定为白色念珠菌。

[0025] 1.2 药物

[0026] 试验药物:本发明药物:香叶醇(购自 Sigma 公司, 批号:MKBH7931V)。

[0027] 阳性药物:克霉唑阴道片(济南利民制药有限公司, 批号:1108148), 洁尔阴洗液(四川恩威制药有限公司, 批号:1107102)。

[0028] 1.3 实验动物

[0029] 小鼠(SPF 级)[成都中医药大学实验动物研究中心, 生产许可证号:SCXK(川)2008-11, 使用合格证号:SCXK(川)2008-049]。

[0030] 1.4 培养基、试剂及耗材

[0031] 沙氏琼脂培养基(每升含氯霉素 0.1g, 广东环凯微生物科技有限公司), TRICHOMONAS MEDIUM No. 2 (OXOID Ltd. 批号:1180675)。

[0032] 苯甲酸雌二醇注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号:1007061), 生理盐水(成都科伦药业股份有限公司), 一次性无菌培养皿(江苏康健生物有限公司)等。

[0033] 1.5 主要仪器

[0034] 多点接种仪(日本佐久间制作所, SAKUMA MIT-P 型), 实验室用高压灭菌器(SANYO, MLS-3780 型), CO<sub>2</sub> INCUBATOR(SANYO, MOC-15A), 节能净化工作台(成都新光非兰特净化工程有限公司)。

[0035] 2 实验方法

[0036] 2.1 本发明药物治疗念珠菌性阴道炎的体内活性

[0037] (1)受试菌活化:将白色念珠菌标准株 CICC32819 接种于沙氏琼脂培养基, 37℃ 培养 48h, 活化后备用。

[0038] (2)模型制备:通过预实验对影响模型建立的各项因素进行优化, 确定念珠菌性阴道炎模型的建立方法。在正式实验中, 选取 SPF 昆明小鼠 70 只, 体重(20±2)g, 其中 60 只在感染前 6 天开始, 每只小鼠隔日颈部(或背部)皮下注射 1mg/ml 苯甲酸雌二醇油剂 0.1ml, 并于最后 1 次注射后接种白色念珠菌  $1.5 \times 10^7$  CFU/只, 24h 后重复感染 1 次。并于最后 1 次感染后 48h 和 72h 分别取阴道分泌物进行涂片镜检, 观察菌丝及芽生孢子生成情况, 同时接种于沙氏琼脂平板上, 观察菌株的生长情况;并观察阴道分泌物等变化。在最后 1 次感染 48h 后用接种环取小鼠阴道分泌物接种于沙氏琼脂平板上培养 24h~48h, 观察平板上白色念珠菌的菌落生长情况, 显微镜观察菌丝生长情况。若在平板中生长有典型的白色念珠菌, 显微镜下观察到菌丝及芽生孢子, 说明念珠菌性阴道炎模型小鼠制备成功。

[0039] (3) 实验分组

[0040] 待小鼠造模成功后,每只小鼠用 0. 1ml 无菌生理盐水进行阴道冲洗,将冲洗液进行菌落计数,根据小鼠阴道菌落计数结果将小鼠随机分为 6 组,包括本发明药物高、中、低三个剂量组,阳性药物克霉唑组和洁尔阴组,模型组,每组 10 只。另以 10 只不感染白色念珠菌的小鼠作为空白对照。其中各组小鼠阴道感染白色念珠菌的情况分析见表 1。

[0041] 表 1 :各组小鼠阴道感染白色念珠菌的情况分析

[0042]

项目	空白	模型	洁尔阴	克霉唑	高剂量	中剂量	低剂量
菌落数(×10 <sup>5</sup> CFU/ml)	0. 00±0. 00 <sup>A</sup>	36. 00±24. 85 <sup>A</sup>	36. 00±17. 46 <sup>A</sup>	35. 00±28. 06 <sup>A</sup>	38. 00±14. 83 <sup>A</sup>	40. 00±28. 94 <sup>A</sup>	36. 00±12. 94 <sup>A</sup>

[0043] 注 :A 表示与空白组比较有极显著统计学意义(P < 0. 01)。

[0044] (4) 念珠菌性阴道炎模型小鼠的治疗

[0045] 采用药物阴道内给药法对念珠菌性阴道炎模型小鼠进行治疗,即每天分别采用高、中、低三个剂量的发明药对感染模型小鼠进行治疗,每天 1 次,连续 20d。阳性药分别用克霉唑和洁尔阴,模型组用生理盐水。分别在给药前(0d),以及第 3d、5d 和 7d 给药 6h 后用 0. 1ml 无菌生理盐水冲洗阴道,对冲洗液内的白色念珠菌进行菌落计数,统计分析给药前(0d)、给药 3d、给药 5d 和给药 7d 小鼠阴道内菌落数的变化情况,观察药物对感染小鼠阴道内白色念珠菌的杀灭或抑制作用。在给药第 7d 后每天接种观察阴道分泌物的菌丝及芽生孢子生长情况以及在沙氏琼脂平板中的生长情况,并每天观察小鼠阴道分泌物等的变化情况。分别统计给药 14d 和给药 20d 的治愈时间和治愈率。以连续 3d 阴道分内容物在沙氏琼脂平板上未白色念珠菌生长,且阴道无分泌物,无明显充血、肿胀等临床症状判定为治愈,治愈小鼠不再用药。采用 SPSS 17. 0 软件中的单因素方差分析法比较分析各组之间的差异显著性,用配对 T 检验分析发明药各剂量组在给药前后及不同给药时间的差异显著性。

[0046] 2. 2 本发明药物抗白色念珠菌的体外活性

[0047] 含药平板的制备 :采用倍比稀释法对本发明药香叶醇进行稀释,分别稀释成 1 : 2~1 : 2048 共 11 个梯度,在一次性无菌培养皿中分别加入不同浓度梯度的药液 1ml 和 14ml 灭菌的沙氏琼脂培养基,即各药物在平板中的稀释梯度分别为 29. 27mg/ml~28. 58 μ g/ml,充分混匀,烘干后备用,以平板内加入等量生理盐水代替药物制备阳性对照平板。

[0048] 菌液配置 :将白色念珠菌标准株和临床分离株用无菌生理盐水调至菌液浓度 1. 5×10<sup>6</sup>CFU/ml。

[0049] 最低抑菌浓度(MIC)的测定 :采用多点接种仪将实验菌株的菌液加入不同浓度梯度的含药平板和阳性对照平板,并以生理盐水代替菌液作阴性对照。37℃恒温培养 24h~48h,观察各菌株在含不同浓度梯度药物平板中的生长情况。

[0050] 结果判定 :以平板内无白色念珠菌生长的药物最小浓度为此药对该菌株的最低抑菌浓度。

[0051] 3 实验结果

[0052] 3. 1 本发明药物治疗念珠菌性阴道炎的活性

[0053] 本发明药物香叶醇对念珠菌性阴道炎模型小鼠阴道内白色念珠菌生长的影响结果见表 2,治愈时间和治愈率分析见表 3。

[0054] 表 2 :本发明药物对念珠菌性阴道炎模型小鼠阴道内白色念珠菌生长的影响

[0055]

组别	剂量 (g/kg)	菌落数 (×10 <sup>3</sup> CFU/ml)			
		0d	3d	5d	7d
空白	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	-	36.00±24.85 <sup>**</sup>	31.00±18.84	17.60±13.25	10.00±6.28
洁尔阴	5.00ml 原药	36.00±17.46 <sup>**</sup>	19.38±8.82	16.31±10.03	16.00±7.74
克霉唑	0.05	35.00±28.06 <sup>**</sup>	5.68±3.74	0.49±0.79	0.05±0.10
高剂量	0.44	38.00±14.83 <sup>**</sup>	5.76±5.16 <sup>▲</sup>	0.77±0.89 <sup>▲▲</sup>	0.20±0.18 <sup>▲▲</sup>
中剂量	0.22	40.00±28.94 <sup>**</sup>	5.92±3.87 <sup>▲</sup>	1.00±0.93 <sup>▲▲</sup>	0.52±0.71 <sup>▲▲</sup>
低剂量	0.11	36.00±12.94 <sup>**</sup>	7.00±4.72 <sup>▲▲</sup>	1.10±1.06 <sup>▲▲</sup>	0.67±0.97 <sup>▲▲★</sup>

[0056] 注 :0d、3d、5d、7d 分别表示给药前,给药后第 3 天、第 5 天和第 7 天。

[0057] 与空白组比较, <sup>\*\*</sup>P < 0.01 ;与给药前比较, <sup>▲</sup>P < 0.05, <sup>▲▲</sup>P < 0.01 ;与给药后第 3d 比较, <sup>★</sup>P < 0.05。

[0058] 由表 2 可知,给药前,与空白组比较,模型组、阳性药组和本发明药物高、中、低剂量组阴道内菌落数明显增加,具有明显统计学意义外(P < 0.01),而模型组和实验组各组之间均无统计学意义(P > 0.05),说明造模成功。

[0059] 给药后,与模型组相比,本发明药物高、中、低剂量组以及克霉唑组阴道内菌落数明显下降 ;与阳性组洁尔阴相比,本发明药物高、中、低剂量组以及克霉唑组阴道内菌落数明显下降。本发明药物高、中、低三个剂量组与阳性药组具有相似的体内抗白色念珠菌活性 :随着给药时间的延长,菌落数呈明显下降趋势,病情逐渐好转。

[0060] 比较各剂量组给药前后的菌落数变化情况,与同组内给药前比较,高剂量组给药后第 3d 菌落数显著性下降(P < 0.05)、第 5d 和第 7d 菌落数均极显著性下降(P < 0.01) ;中剂量组给药后第 3d 菌落数显著降低(P < 0.05),第 5d 和第 7d 菌落数均极显著性下降(P < 0.01);低剂量组给药后第 3d、5d 和 7d 菌落数均极显著性下降(P < 0.01)。与给药后第 3d 比较,低剂量组给药后第 7d 菌落数呈显著性下降(P < 0.05)。

[0061] 实验结果说明本发明药物香叶醇在体内能显著抑制白色念珠菌。

[0062] 表 3 :本发明药物对念珠菌性阴道炎的治愈情况分析

[0063]

组别	剂量 (g/kg)	用药 14d		用药 20d	
		治愈时间 (d)	痊愈率 (%)	治愈时间 (d)	痊愈率 (%)
空白组	-	-	-	-	-
模型	-	14.30±2.21	10.00	18.90±4.20	30.00
洁尔阴	5.00ml 原药	11.30±3.50	70.00	12.10±4.72	90.00
克霉唑	0.05	5.90±2.08	100.00	5.90±2.08	100.00
高剂量	0.44	11.00±3.86 <sup>*</sup>	80.00	12.00±5.33 <sup>**</sup>	90.00
中剂量	0.22	11.20±2.70	80.00	12.10±4.36 <sup>**</sup>	90.00
低剂量	0.11	12.20±2.44	70.00	13.00±3.80 <sup>**</sup>	90.00

[0064] 注 :在用药 14d 统计结果中,14d 内未治愈小鼠的治愈时间记为 15d。在用药 20d 统计结果中,20d 内未治愈小鼠的治愈时间记为 21d。

[0065] 与模型组比较, <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup>P < 0.01。

[0066] 由表 3 可知 :

[0067] 用药 14d 时,本发明药物高、中、低剂量组在 14d 内对阴道炎模型小鼠的平均治愈

时间分别为 11.00 天、11.20 天和 12.20 天,治愈率分别为 80.00%、80.00% 和 70.00%;与模型组(平均自愈时间为 14.30d,自愈率为 10%)比较,本发明药物高剂量组治愈时间极显著性减少( $P < 0.01$ ),中、低剂量组治愈率显著提高;与阳性药物洁尔阴相比,各剂量组的治愈时间无统计学意义;各剂量组内之间比较,均无明显统计学意义,说明在试验剂量范围内,量效关系不显著。

[0068] 用药 20d 时,本发明药物高、中、低剂量组在 20d 内对阴道炎模型小鼠的平均治愈时间分别为 12.00d、12.10d 和 13.00d,治愈率均为 80.00%;与模型组(平均自愈时间为 18.90d,自愈率为 30%)比较,本发明药物三个剂量组治愈时间均极显著性减少( $P < 0.01$ ),治愈率显著提高;与阳性药物洁尔阴相比,无显著性差异;各剂量组内之间比较,均无明显统计学意义,在试验剂量范围内,量效关系不显著。

[0069] 实验结果说明本发明药物香叶醇具有治疗念珠菌性阴道炎的作用,且低剂量组与高、中剂量组的药效无显著差异,临床使用时,低剂量组更有优势。

[0070] 3.2 本发明药物抗白色念珠菌的体外活性

[0071] 采用琼脂平板二倍稀释法测定了本发明药物、阳性药克霉唑和洁尔阴对 3 株白色念珠菌标准株和 14 株临床分离株的最低抑菌浓度,结果见表 4。

[0072] 表 4:本发明药物对白色念珠菌的体外抗菌活性

[0073]

菌种		MIC		
		发明药 (mg/ml)	克霉唑 (μg/ml)	洁尔阴
白色念珠菌标准株	CICC32819	0.23	26.04	-
	CICC1284	0.11	26.04	-
	ATCC14053	0.11	-	-
白色念珠菌临床分离株	1	0.23	26.04	-
	2	0.11	3.26	-
	3	0.11	3.26	-
	4	0.23	3.26	-
	5	0.11	0.81	-
	6	0.23	26.04	-
	7	0.11	3.26	-
	8	0.23	3.26	-
	9	0.23	3.26	-
	10	0.23	3.26	-
	11	0.23	-	-
	12	0.23	3.26	-
	13	0.23	-	-
	14	0.11	3.26	-

[0074] 注:“-”表示该药在平板中的最大浓度对对应的白色念珠菌无明显抗菌活性。其中发明药在平板中的最大浓度为 29.27mg/ml;克霉唑在平板中的最大浓度为 1.67mg/ml;洁尔阴以原药在平板中做 15 倍稀释。

[0075] 由上表可知,本发明药物对 3 株白色念珠菌标准株和临床分离株均有较强的抗菌活性。对 3 株白色念珠菌标准株的最低抑菌浓度为 0.11~0.23mg/ml,对来自于临床阴道炎感染患者分离株的最低抑菌浓度为 0.11~0.23mg/ml (平均抑菌浓度为 0.19±0.06g/ml)。



阳性药克霉唑对 1 株白色念珠菌标准株 ATCC14053 和 2 株临床分离株无明显抗菌活性,说明克霉唑对部分白色念珠菌产生了一定程度的耐药性。而洁尔阴对白色念珠菌标准株和临床分离株均无明显体外抗菌活性。

[0076] 实验说明本发明药物香叶醇对白色念珠菌有明显体外抑菌作用。

[0077] 上述体内实验和体外实验结果说明本发明香叶醇可以显著抑制白色念珠菌,具有治疗念珠菌性阴道炎的作用。

[0078] 实验例 2 本发明香叶醇治疗滴虫性阴道炎的活性

[0079] 1 材料及仪器

[0080] 1.1 实验虫株

[0081] 阴道毛滴虫:2 株(编号分别为 Tv1 和 Tv2)。该实验虫株通过用 OXOID 毛滴虫 2 号培养基对 2012 年 4 月四川省妇幼保健院妇科门诊患者阴道分泌物进行分离、纯化和显微鉴定获得。

[0082] 1.2 药物

[0083] 试验药物:本发明香叶醇(购自 Sigma 公司,批号:MKBH7931V)。

[0084] 阳性药物:阳性药物:甲硝唑(四川科伦药业股份有限公司,批号:M11120602),洁尔阴洗液(四川恩威制药有限公司,批号:1107102)。

[0085] 1.3 培养基、试剂和耗材

[0086] TRICHOMONAS MEDIUM No.2 (OXOID Ltd. 批号:1180675), PBS 缓冲液,96 孔细胞培养板,细胞计数板等。

[0087] 1.4 主要仪器

[0088] 日立透射电镜(H-600IV 型),超薄切片机(ULTRACUT-E 型),实验室用高压灭菌器(SANYO,MLS-3780 型),CO<sub>2</sub>INCUBATOR (SANYO, MOC-15A),节能净化工作台(成都新光非兰特净化工程有限公司),高速离心机(HC-3518,科大创新股份有限公司),低速离心机(型号 KDC-40,科大创新股份有限公司)。

[0089] 2 实验方法

[0090] 2.1 本发明药物抗阴道毛滴虫活性研究

[0091] 虫悬液的制备:取鉴定的阴道毛滴虫于 2 号毛滴虫培养基中 37℃ 培养 48h,振摇混匀后作为原始培养物,用细胞计数板计数虫密度和活虫率。原始培养物活虫率>95%,细胞形态完好,运动活跃,虫密度  $2.0 \times 10^6$  虫/ml。取 1ml 原始培养物,500rpm 离心 10min,用 10ml 预温的新培养液重悬虫体,使虫密度为  $2.0 \times 10^5$  虫/ml。

[0092] 药物配制:首先对本发明药香叶醇进行乳化处理,配制 10% 乳浊液。用 2 号毛滴虫培养对制备好的发明药进行倍比稀释,分别稀释成 1:2~1:1024 共 10 个梯度。

[0093] 最小杀虫浓度(MLC)的测定:在 96 孔板中每孔加入虫悬液 100  $\mu$ l 和 100  $\mu$ l 不同浓度梯度稀释的本发明药物,37℃ 湿盒培养 48h,用毛细管从各药物逐孔取样涂片镜检,统计死虫率。分别以甲硝唑和洁尔阴为阳性药,不含药物仅含培养基和阴道毛滴虫的孔为阴性对照。以死虫率>95% 的最小药物浓度为药物对该阴道毛滴虫的最小致死浓度(MLC)。实验重复三次。

[0094] 2.2 本发明药物对阴道毛滴虫超微结构的影响

[0095] 虫株的制备和固定:将本发明药物加入含 Tv2 虫株的滴虫培养基中,其中虫密度

为  $2.0 \times 10^6$  虫 /ml, 本发明药物的浓度为 1/2MLC。在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 分别作用 1h、3h 和 5h, 2000rpm 离心 10min, 弃上清液 ; 沿管壁缓慢加入冷 0.5% 戊二醛 1ml, 4℃ 静置 30min, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 沿管壁缓慢加入冷 3% 戊二醛 1ml 进行预固定, 1% 四氧化钨固定。以生理盐水能代替本发明药物的 Tv2 虫株作为正常对照组。

[0096] 超薄切片及染色 : 用丙酮对固定好的样品逐级脱水, Epon812 包埋, 半薄切片光学定位, 超薄切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色。

[0097] 超微结构分析 : 采用日立 H-600IV 型透射电镜观察经 1/2MLC 本发明药物分别作用 1h、3h 和 5h 后滴虫株的超微结构变化, 探讨其作用机制。3 实验结果

[0098] 3.1 本发明药物对阴道毛滴虫的杀虫活性

[0099] 采用 96- 孔板微量稀释法测定了本发明药物对分离于院内阴道炎感染患者毛滴虫杀虫活性, 结果见表 5。

[0100] 表 5 : 本发明药物对阴道毛滴虫的最低杀虫浓度

[0101]

阴道毛滴虫	MLC		
	本发明药物 (mg/ml)	甲硝唑 (μg/ml)	洁尔阴 (体积比)
Tv1	0.34	4.88	1:128
Tv2	0.34	9.77	1:64

[0102] 由上表可知, 本发明药物对阴道毛滴虫具有明显的杀虫活性, 对来自于临床阴道炎患者分泌物中的 2 株阴道毛滴虫的最低杀虫浓度 (MLC) 为 0.34mg/ml, 说明本发明药香叶醇具有杀灭阴道毛滴虫的作用。

[0103] 3.2 本发明药物对阴道毛滴虫的作用机制

[0104] 采用透射电镜分别观察和分析了 Tv2 虫株在 1/2MLC 本发明药物作用 1h、3h 和 5h 后虫株超微结构的变化。结果发现虫株在本发明药物不同作用时间点下, 虫株出现相同的超微结构变化, 说明本发明药物作用时间长短对虫体超微结构和作用机制无明显差异。

[0105] 其中, 本发明药物作用 1h 后阴道毛滴虫的超微结构变化如图 1 所示, 阴道毛滴虫超微结构较正常对照出现明显变化。由内至外的变化主要有 : 细胞核出现多种变化, 如核周隙增宽 (图 D), 核固缩 (图 G), 染色质积聚 (图 E), 最后核膜消失 (图 G), 细胞核逐渐溶解 ; 胞质内出现大量空泡 (图 B 和图 C), 粗面内质网扩张 (图 D), 核糖体减少至消失 (图 E 和图 F), 出现自噬泡 (图 C、图 E 和图 F), 细胞器崩解 (图 G) ; 局部细胞膜被损坏 (图 H), 胞浆漏出 (图 H), 最后细胞崩解坏死 (图 H) ; 说明本发明药物通过对细胞核和细胞器结构的破坏, 最终杀灭虫体。

[0106] 由上述本发明药物对阴道毛滴虫杀虫活性和超微结构影响的实验结果可知, 本发明药物具有杀灭阴道毛滴虫的作用, 可用于治疗滴虫性阴道炎。

[0107] 综上, 香叶醇具有治疗阴道炎的作用, 尤其是念珠菌性阴道炎和滴虫性阴道炎的疗效显著, 市场前景良好。

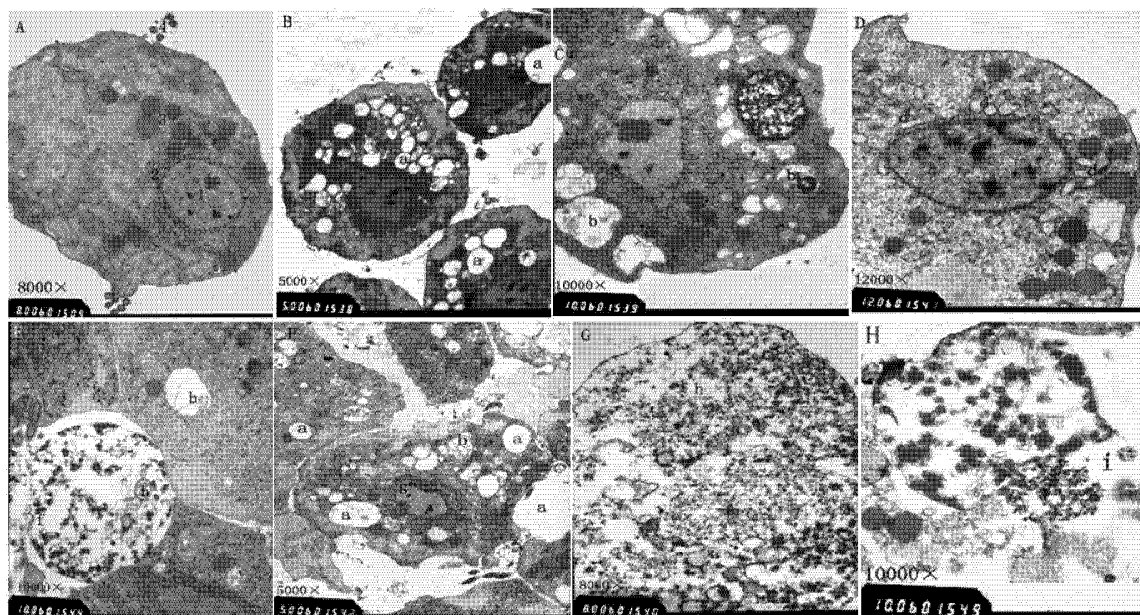


图 1