



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103610668 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201310577167. X

(22) 申请日 2013. 11. 18

(66) 本国优先权数据

201310539667. 4 2013. 11. 04 CN

(71) 申请人 南方医科大学南方医院

地址 510515 广东省广州市广州大道北  
1838 号

(72) 发明人 侯凡凡 程永现 聂静 艾军  
何江波

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司  
44202

代理人 刘宇峰

(51) Int. Cl.

A61K 31/05 (2006. 01)

A61P 43/00 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

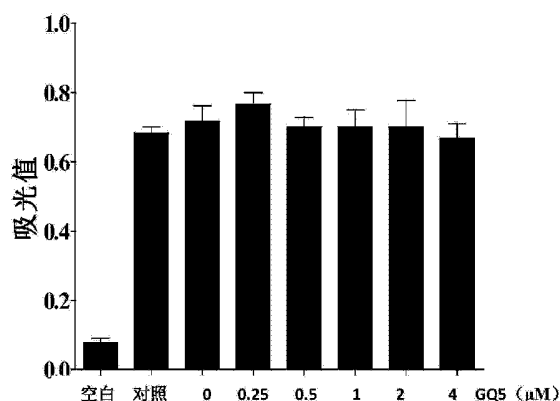
权利要求书1页 说明书6页 附图10页

(54) 发明名称

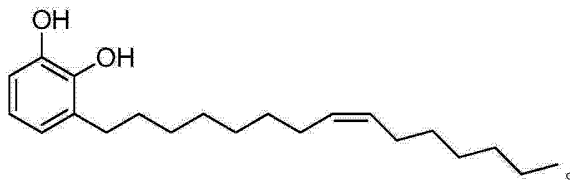
漆酚化合物用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途

(57) 摘要

本发明公开了一种漆酚化合物(代号 GQ-5)用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途。体外实验表明,本发明所述的漆酚化合物不仅能够抑制 TGF  $\beta$  1 介导的 Smad3 磷酸化,还能有效地抑制其下游  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白的 mRNA 与蛋白的表达。在体内试验也得到了相同的结果。由此表明 GQ-5 具有特异抑制 Smad3 磷酸化的作用,可用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物。



1. 漆酚化合物用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于:所述漆酚化合物是从漆树科植物漆树(*Rhus verniciflua* Stokes)提取的漆酚化合物。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其特征在于:所述的漆酚化合物的结构式为:



## 漆酚化合物用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途

### 技术领域

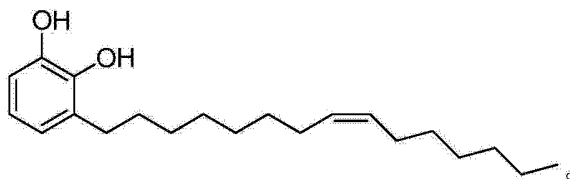
[0001] 本发明涉及一种从漆树科植物漆树(*Rhus verniciflua* Stokes)提取的漆酚化合物的新用途,具体涉及该漆酚化合物用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途。

### 背景技术

[0002] 天然药物在医疗保健和药物研究中占有重要角色,资料表明约 80% 的抗菌药物和 60% 的抗癌药物直接或间接来自天然产物(J Nat Prod, 2003, 66 :1022-1237)。自然界已经成为人类治疗药物的重要源泉。

[0003] 名称为“漆酚化合物,其药物组合物及其制备方法和应用”中国发明专利(专利号:201010149042.3;申请日:2010年4月16日;公开号:CN101805246A;公开日:2010年8月18日;授权日:2013年6月5日)披露,中国科学院昆明植物研究所的研究人员从传统中药干漆(漆树科植物漆树的干燥树脂)中分离纯化出一种漆酚(Urushiol)化合物,其结构式为:

[0004]



[0005] 该专利揭示,上述漆酚化合物具有良好的抗肿瘤活性,对多种肿瘤细胞株均有细胞毒活性。研究发现,该漆酚化合物对人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移和成管具有明显的抑制作用。

[0006] 本发明人对于上述报道的漆酚化合物进行了进一步的研究,发现该化合物还具有抑制肝脏、肾脏组织纤维化的作用。参见名称为“漆酚化合物在制备抑制肝脏组织纤维化的药物中的用途”的中国发明专利申请(申请号:201210111641.5;申请日:2012年4月17日;公开号:CN103371986A,公开日:2013年10月30日),以及名称为“漆酚化合物用于制备抑制肾脏纤维化药物中的应用”的中国发明专利申请(申请号:201210111642.X;申请日:2012年4月17日;公开号:CN103371987A;公开日:2013年10月30日)。

[0007] 本发明是在上述研究的基础上进行的,上述专利或专利申请在此全文引入作为参考。

[0008] Smad3 和 Smad2 是介导转化生长因子  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) 细胞内信号的重要信号分子。TGF  $\beta 1$  与细胞膜表面 TGF  $\beta 2$  型受体(TGF  $\beta R2$ )结合,活化的 TGF  $\beta R2$  与 TGF  $\beta R1$  结合,使得 TGF  $\beta R1$  活化,进而与 Smad2/Smad3 结合使得后者磷酸化,磷酸化的 Smad2 与 Smad3 与胞浆 Smad4 形成三聚体后进入细胞核,激活下游基因而产生一系列作用。已有研究证明,Smad2/3 在肝脏组织纤维化、肾脏组织纤维化、心肌纤维化、肺纤维化等疾病中都起着至关重要的作用。因此,抑制 Smad2/3 磷酸化无疑对于组织纤维化的防治具有重要的意义。目前,研究抑制 Smad2/Smad3 磷酸化的药物已经成为热点。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种漆酚化合物(代号 GQ-5)的新用途。

[0010] 本发明提供了漆酚化合物(代号 GQ-5)用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物的用途。

[0011] 本发明通过漆酚 GQ-5 影响 TGF  $\beta$  1 介导 NRK52E 细胞、NRK49F 细胞 Smad3、Smad2、p38、PI3K 与 ERK 磷酸化以及 Smad4、Smad7 蛋白表达水平的实验发现:与 TGF  $\beta$  1 刺激组相比较,应用 GQ-5 组细胞 Smad3 磷酸化水平明显降低,而 Smad2、p38、PI3K 及 Erk 的磷酸化水平无明显变化,同时 Smad4 及 Smad7 蛋白表达水平也无明显变化。

[0012] 本发明还通过漆酚 GQ-5 对于 Smad3 磷酸化入核水平以及 TGF  $\beta$  1 介导  $\alpha$ -SMA、纤连蛋白及 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达水平影响的实验发现:Smad3 入细胞核水平也明显下降, $\alpha$ -SMA、纤连蛋白及 I 型胶原蛋白表达均显著降低,且呈浓度梯度依赖。

[0013] 本发明还通过漆酚 GQ-5 抑制 UUO 大鼠肾脏组织 Smad3 及 Smad2 磷酸化的实验发现:与 UUO 组相比较,应用 GQ-5 组细胞 Smad3 磷酸化水平明显降低,而对于 Smad2 磷酸化水平无明显影响。

[0014] 综上所述,实验结果提示,漆酚 GQ-5 具有特异性抑制 Smad3 磷酸化的作用。因此,本发明所述的漆酚化合物(代号 GQ-5)可用于制备抑制 Smad3 磷酸化的药物。

## 附图说明

[0015] 图 1 是应用 MTT 法检测 GQ-5 对细胞增殖活性影响的统计图。

[0016] 图 2A 至图 2D 显示采用免疫印迹法检测 GQ-5 对 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平的影响;其中,图 2A 是 GQ-5 在 NRK52E 细胞中作用的代表图,图 2B 是对所有图 2A 结果的统计图,图 2C 是 GQ-5 在 NRK49F 细胞中作用的代表图,图 2D 是对所有图 2C 结果的统计图。 $*p<0.05$ VS 对照组,  $**p<0.05$ VS TGF  $\beta$  1 组,采用 ANOVA 统计方法。

[0017] 图 3A 至图 3D 显示采用免疫印迹法检测 GQ-5 对 TGF  $\beta$  1 介导 Smad4、Smad7 蛋白表达水平与 p38、PI3K 及 ERK 磷酸化水平的影响;其中,图 3A 是 GQ-5 对 Smad4、Smad7 蛋白表达水平的影响的表图,图 3B 是对所有图 3A 结果的统计图,图 3C 是 GQ-5 对 p38、PI3K 及 ERK 磷酸化水平的影响的代表图,图 3D 是对所有图 3C 结果的统计图。

[0018] 图 4 是免疫荧光染色检测 Smad3 入核的情况。

[0019] 图 5A 至图 5B 显示实时荧光定量 PCR 方法检测 GQ-5 对于 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 磷酸化下游  $\alpha$ -SMA、纤连蛋白及 I 型胶原 mRNA 表达水平的影响;其中,图 5A 是在 NRK52E 细胞中作用的统计图,图 5B 是在 NRK49F 细胞中作用的统计图。 $*p<0.05$ VS TGF  $\beta$  1 组,采用 ANOVA 统计方法。

[0020] 图 6A 至图 6D 显示免疫印迹方法检测 GQ-5 对于 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 磷酸化下游  $\alpha$ -SMA、纤连蛋白及 I 型胶原蛋白表达水平的影响。其中,图 6A 是 GQ-5 在 NRK52E 细胞中作用的代表图,图 6B 是对所有图 6A 结果的统计图,图 6C 是 GQ-5 在 NRK49F 细胞中作用的代表图,图 6D 是对所有图 6C 结果的统计图。 $*p<0.05$ VS 对照组,  $**p<0.05$ VS TGF  $\beta$  1 组,采用 ANOVA 统计方法。

[0021] 图 7A 至图 7B 显示免疫组化染色检测 GQ-5 对 UUO 大鼠肾脏组织 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平的作用。其中,图 7A 是 Smad3 及 Smad2 磷酸化的免疫组化代表图,图 7B 是对

所有图 7A 结果的统计图。该图中, Sham:假手术组;UUO:阳性对照组;UUO+GQ-5:用药组; \* $p < 0.05$ , VS Sham 组; \*\* $p < 0.05$ , VS UUO 组。

[0022] 图 8A 至图 8B 显示免疫印迹法检测 GQ-5 对 UUO 大鼠肾脏组织 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平的作用。其中,图 8A 是 Smad3 及 Smad2 磷酸化的免疫印迹代表图,图 8B 是对所有图 8A 结果的统计图。该图中, Sham:假手术组;UUO:阳性对照组;UUO+GQ-5:用药组; \* $p < 0.05$ , VS Sham 组; \*\* $p < 0.05$ , VS UUO 组。

### 具体实施方式

[0023] 下面仅以实施例结合附图的方式对本发明做详细的说明。

[0024] 实施例一:本发明所述的漆酚化合物的制备

[0025] 本发明参照前述的中国专利 201010149042.3 所述的方法制备得到漆酚化合物,代号为 GQ-5。

[0026] 制备方法:取来自漆树科漆树的干燥树脂干漆粉碎,80% 乙醇浸泡提取 3 次,丙酮浸泡提取 1 次,提取液减压浓缩成膏,经适量水分散后,等量乙酸乙酯萃取 3 次,硅胶柱层析,氯仿-甲醇梯度洗脱,以薄层层析(10%硫酸乙醇显色)作为指导进行合并得组分:A1-11(氯仿-甲醇 98:2),B12-17(氯仿-甲醇 96:4),C18-24(氯仿-甲醇 92:8),D25-32(氯仿-甲醇 90:10)。C 组分经 MCI Gel CHP20P (3.5×40cm,丙酮-水,50%,60%,70%,80%。500ml/梯度)柱层析,以薄层层析作为合并的指导原则得组分 BI(上述 70%洗脱部分)及 BII(上述 80%洗脱部分)。BII 经过 Sephadex LH-20(氯仿-甲醇 6:4)凝胶过滤后得到小分子化合物漆酚,结构式与中国专利 201010149042.3 所披露的结构式相同。

[0027] 将该漆酚化合物 GQ-5 用于以下实施例的实验。

[0028] 实施例二:漆酚 GQ-5 的细胞毒性

[0029] 1、实验细胞:采用大鼠正常肾小管上皮细胞系 NRK52E 细胞。常规培养、分组、96 孔板无血清静置 12 小时后开始干预。

[0030] 2、实验分组及其处理

[0031] 1) 正常对照组:继续无血清培养 48 小时。

[0032] 2) 用药组:分别用 0.25、0.5、1.0、2.0 及 4.0  $\mu\text{M}$  GQ-5 预孵育 1 小时,无血清培养 48 小时。每个浓度设置 3 个复孔。

[0033] 3、实验过程

[0034] GQ-5 用 DMSO 溶解成不同终浓度。按上述条件刺激完毕后每孔加入 MTT(0.01M) 20  $\mu\text{L}$ ,孵育 4 小时,弃去培养基,每孔滴加二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ ,37℃震荡 15 分钟,酶标仪在 540nm 波长测定吸光值。

[0035] 4、实验结果

[0036] 如图 1 所示,不同浓度 GQ-5 对于细胞活性无明显影响。

[0037] 实施例三:漆酚 GQ-5 对 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 磷酸化水平的抑制作用

[0038] 1、实验细胞:分别采用大鼠正常肾小管上皮细胞系 NRK52E 细胞及大鼠正常纤维母细胞系 NRK49F 细胞。常规培养、分组、无血清静置 12 小时后开始干预。

[0039] 2、实验分组及其处理

[0040] 1) 正常对照组:继续无血清培养 2 小时。

- [0041] 2) 阴性对照组 :2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。
- [0042] 3) 阳性对照组 :0.1%DMSO 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。
- [0043] 4) 用药组 :分别用 0.1、0.5 及 2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。
- [0044] 3、实验过程
- [0045] GQ-5 用 DMSO 溶解成不同终浓度。按上述条件刺激完毕后提取细胞总蛋白, 采用免疫印记法检测 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平。
- [0046] 4、实验结果
- [0047] 1) 免疫印迹法检测 TGF  $\beta$  1 介导 NRK52E 细胞 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平。
- [0048] 如图 2A 及图 2B 所示, GQ-5 呈浓度依赖抑制 TGF  $\beta$  1 介导 NRK52E 细胞 Smad3 磷酸化, 对于 Smad2 磷酸化水平无明显影响。
- [0049] 2) 免疫印迹法检测 TGF  $\beta$  1 介导 NRK49F 细胞 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平。
- [0050] 如图 2C 及图 2D 所示, GQ-5 呈浓度依赖抑制 TGF  $\beta$  1 介导 NRK49F 细胞 Smad3 磷酸化, 对于 Smad2 磷酸化水平无明显影响。
- [0051] 综上所述, GQ-5 在不同细胞系均呈浓度依赖抑制 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 磷酸化, 而对于 Smad2 磷酸化则无明显影响。
- [0052] 实施例四 :漆酚 GQ-5 对 TGF  $\beta$  1 刺激 NRK52E 细胞 Smad4、Smad7 蛋白水平及 p38、PI3K、ERK 磷酸化水平的作用
- [0053] 1、实验细胞 :采用大鼠正常肾小管上皮细胞系 NRK52E 细胞。常规培养、分组、无血清静止 12 小时后开始干预。
- [0054] 2、实验分组及其处理
- [0055] 1) 正常对照组 :继续无血清培养 2 小时。
- [0056] 2) 阴性对照组 :2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时
- [0057] 3) 阳性对照组 :0.1%DMSO 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。
- [0058] 4) 用药组 :2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。
- [0059] 3、实验过程
- [0060] GQ-5 用 DMSO 溶解成不同终浓度。采用免疫印记法检测 Smad4、Smad7 蛋白水平及 p38、PI3K、ERK 磷酸化水平
- [0061] 4、实验结果
- [0062] 1) 免疫印迹法检测 Smad4 及 Smad7 蛋白水平。
- [0063] 如图 3A 和 3B 所示, GQ-5 对于 TGF  $\beta$  1 介导 NRK52E 细胞 Smad3 磷酸化 Smad4 及 Smad7 蛋白表达水平无影响。
- [0064] 2) 免疫印迹法检测 p38、PI3K 及 ERK 磷酸化水平
- [0065] 如图 3C 和 3D 所示, GQ-5 对于 TGF  $\beta$  1 介导 NRK52E 细胞 p38、PI3K、ERK 磷酸化水平无明显影响。
- [0066] 综上所述, GQ-5 在对于 TGF  $\beta$  1 介导 Smad4 及 Smad7 蛋白表达水平无影响, 对于 p38、PI3K 及 ERK 磷酸化也无影响。
- [0067] 实施例五 :漆酚 GQ-5 对 TGF  $\beta$  1 刺激 Smad3 入核的影响
- [0068] 1、实验细胞 :采用大鼠正常肾小管上皮细胞系 NRK52E 细胞。常规培养、分组、爬

片、无血清静止 12 小时后开始干预。

[0069] 2、实验分组及其处理

[0070] 1) 正常对照组 :继续无血清培养 2 小时。

[0071] 2) 阳性对照组 :0.1%DMSO 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。

[0072] 3) 用药组 :2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。

[0073] 3、实验过程

[0074] GQ-5 用 DMSO 溶解成不同终浓度。按上诉条件刺激完毕后,采用免疫荧光法检测 Smad3 入核的情况。

[0075] 4、实验结果

[0076] 免疫荧光法检测 Smad3 入核情况。

[0077] 如图 4 所示, GQ-5 可以显著抑制 TGF  $\beta$  1 介导 Smad3 入核

[0078] 实施例六 :漆酚 GQ-5 对 Smad3 下游基因表达的影响

[0079] 1、实验细胞 :采用大鼠正常肾小管上皮细胞系 NRK52E 细胞及大鼠正常纤维母细胞系 NRK49F 细胞。常规培养、分组、无血清静止 12 小时后开始干预。

[0080] 2、实验分组及其处理

[0081] 1) 正常对照组 :继续无血清培养 48 小时。

[0082] 2) 阴性对照组 :2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时

[0083] 3) 阳性对照组 :0.1%DMSO 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 1 小时。

[0084] 4) 用药组 :分别用 0.1、0.5 及 2.5  $\mu$  M GQ-5 预孵育 1 小时, TGF  $\beta$  110ng/ml 刺激 48 小时。

[0085] 3、实验过程

[0086] GQ-5 用 DMSO 溶解成不同终浓度。按上诉条件刺激完毕后提取细胞 mRNA 及总蛋白,采用实时定量 PCR 及免疫印记法检测  $\alpha$ -SMA、纤连蛋白及 I 型胶原 mRNA 及蛋白的表达水平。

[0087] 4、实验结果

[0088] 1) GQ-5 呈浓度依赖抑制 TGF  $\beta$  1 介导的  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白 mRNA 表达水平。

[0089] 实验结果如图 5A 和 5B 所示,与阳性对照组比较, GQ-5 呈浓度依赖降低 TGF  $\beta$  1 介导的 NRK52E (图 5A) 与 NRK49F (图 5B) 细胞  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白 mRNA 表达水平。

[0090] 2) GQ-5 呈浓度依赖抑制 TGF  $\beta$  1 介导的  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白蛋白表达水平。

[0091] 实验结果如图 6A-D 所示,与阳性对照组比较, GQ-5 呈浓度依赖降低 TGF  $\beta$  1 介导的 NRK52E (图 6A、6B) 与 NRK49F (图 6C、6D) 细胞  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白蛋白表达水平。

[0092] 综上所述, GQ-5 可以呈浓度依赖显著降低 TGF  $\beta$  1 介导的  $\alpha$ -SMA、I 型胶原及纤连蛋白的 mRNA 与蛋白表达水平。

[0093] 实施例七 :漆酚 GQ-5 对 UUO 大鼠 Smad3 及 Smad2 磷酸化的影响

[0094] 1、实验动物 :SD 大鼠,雄性,体重 200-250g, SPF 级。先将动物称重、编号,选择健康、体重在 200-250g 的大鼠 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只。包括假手术组、阳性对照组及用药组。

[0095] 2、各组处理

[0096] 1) 假手术组 : 室温, 3% 戊巴比妥钠以 1ml/ 公斤体重麻醉大鼠后, 选择左背侧肋缘下 1-2cm 为切口 ; 局部消毒后, 逐层切开皮肤、皮下、肌层及腹膜, 发现左侧输尿管后随即逐层缝合。局部消毒后, 核实标记, 置于相应鼠笼。

[0097] 2) 阳性对照组 : 同上麻醉、消毒。逐层切开皮肤、皮下、肌层及腹膜, 找到左侧输尿管后, 于输尿管上 1/3 段结扎, 逐层缝合。局部消毒后, 核实标记, 置于相应鼠笼。

[0098] 3) 用药组 : 同上麻醉、消毒。逐层切开皮肤、皮下、肌层及腹膜, 找到左侧输尿管后, 于输尿管上 1/3 段结扎, 逐层缝合。局部消毒后, 核实标记, 置于相应鼠笼。

[0099] 3、实验过程

[0100] GQ-5 用含 5% 丙二醇的纯水溶解。各组分笼饲养。假手术组仅观察。阳性对照组每日予以含 5% 丙二醇的纯水 1ml/Kg 体重腹腔注射。用药组每日予以 GQ-540mg/Kg 体重腹腔注射。饲养 7 天后杀死各组大鼠, 均取左侧肾脏, 分别予以 10% 中性缓冲甲醛固定及液氮冷冰冻组织。甲醛固定组织在经脱水、包埋、切片、制片后, 采用免疫组化染色检测 p-Smad3 及 p-Smad2 在组织的表达水平。冰冻组织匀浆后提取蛋白, 用免疫印迹法检测 p-Smad3, Smad3, p-Smad2 及 Smad2 蛋白水平。

[0101] 4、实验结果

[0102] 1) 免疫组化染色检测 p-Smad3 及 p-Smad2 在组织的表达水平。

[0103] 实验结果如图 7A 与图 7B 所示, 与 UUO 组比较, GQ-5 组大鼠肾小管 p-Smad3 表达水平明显降低, 而 p-Smad2 表达水平无明显变化。

[0104] 2) 免疫印迹法检测 Smad3 及 Smad2 磷酸化水平。

[0105] 实验结果如图 8A 与图 8B 所示, 与 UUO 组比较, GQ-5 组大鼠肾小管 p-Smad3 表达水平明显降低, 而 p-Smad2 表达水平无明显变化。

[0106] 综上所述, GQ-5 可以选择性降低 UUO 大鼠肾小管的 Smad3 磷酸化水平, 而对 Smad2 磷酸化水平无影响。



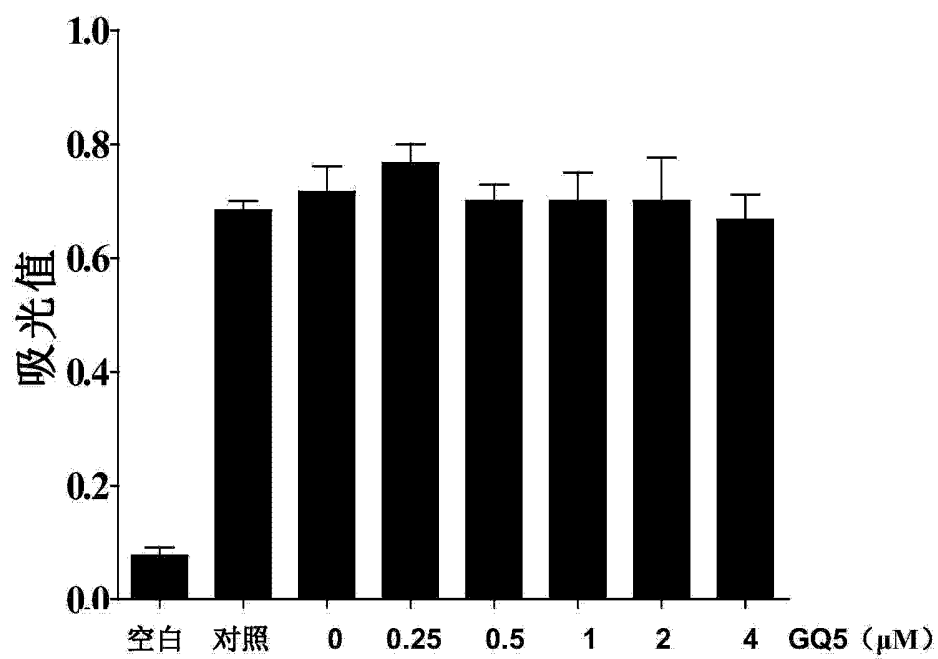


图 1

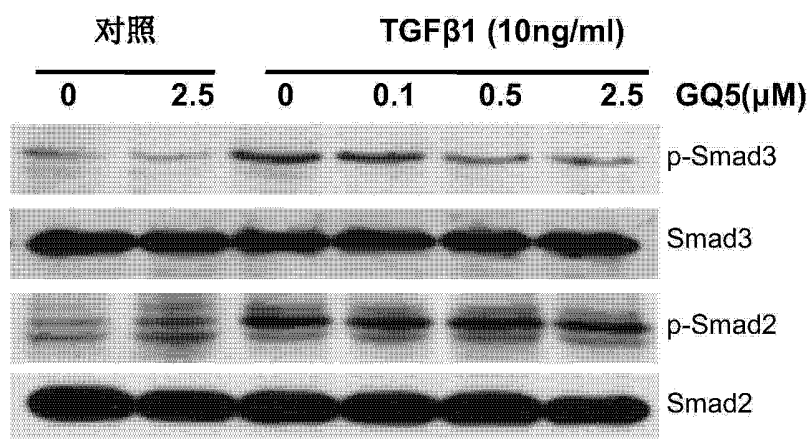


图 2A

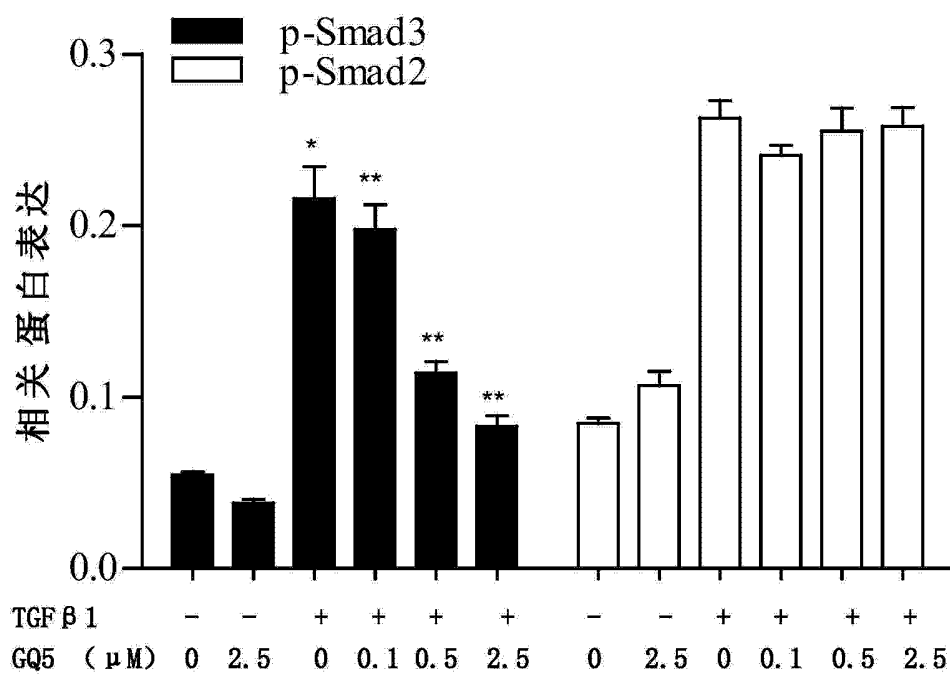


图 2B

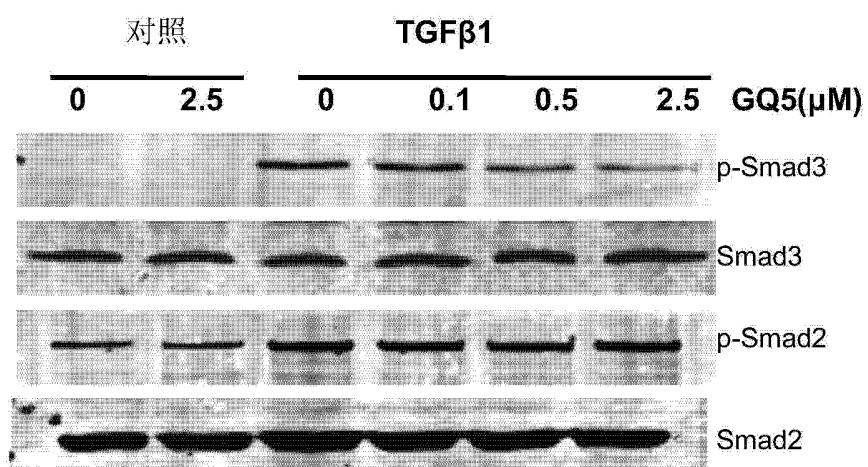


图 2C

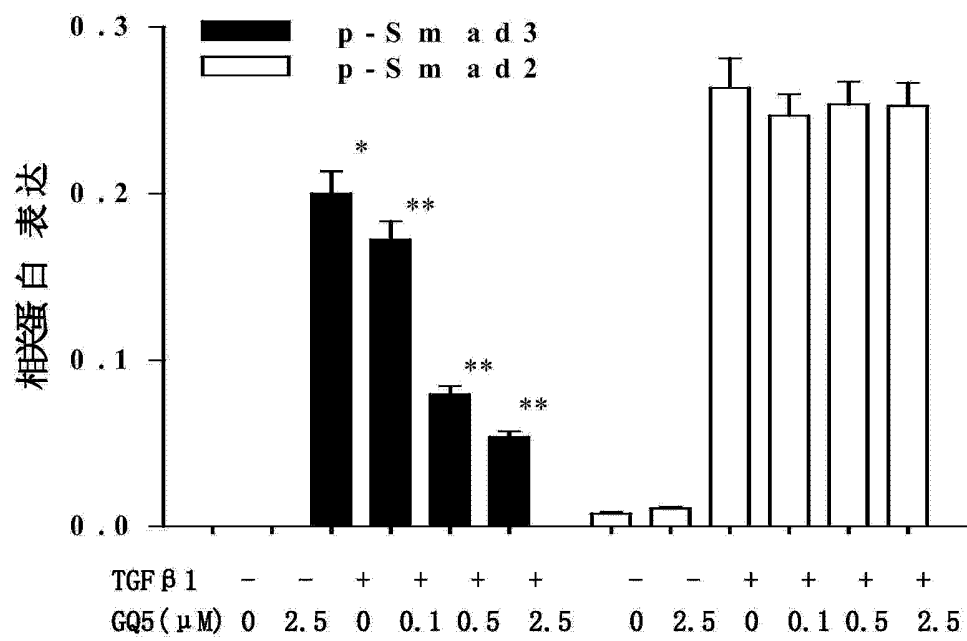


图 2D

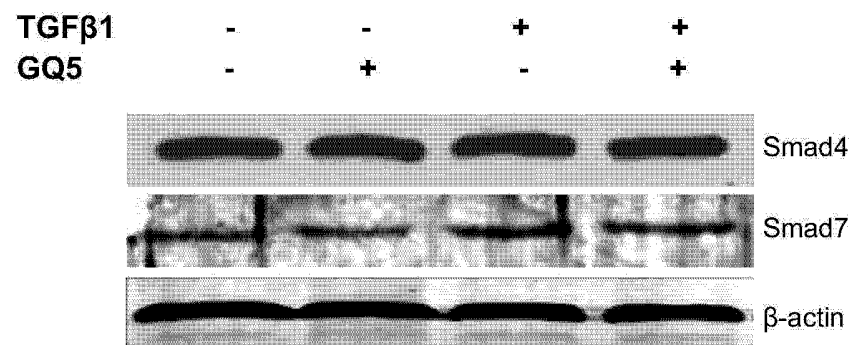


图 3A

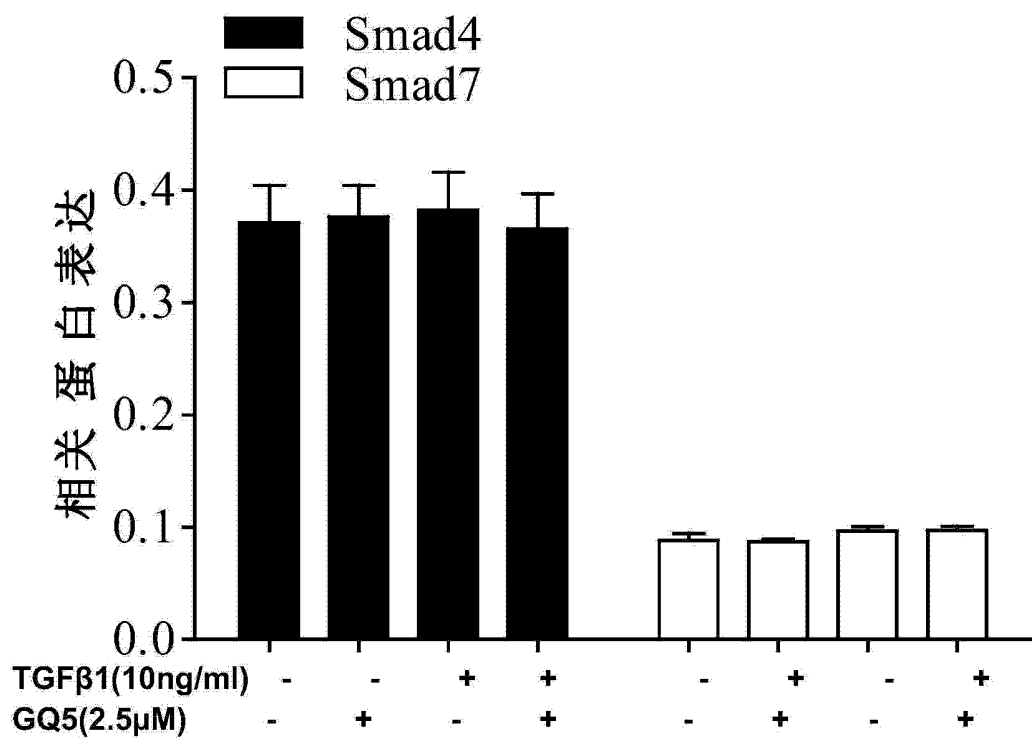


图 3B

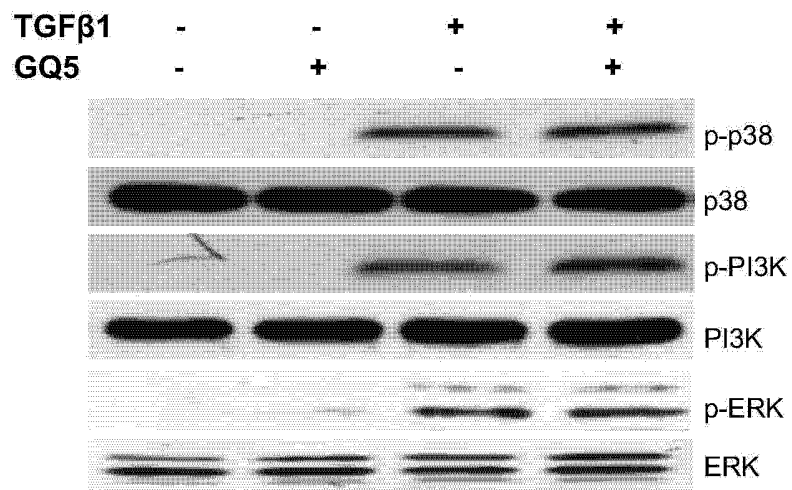


图 3C

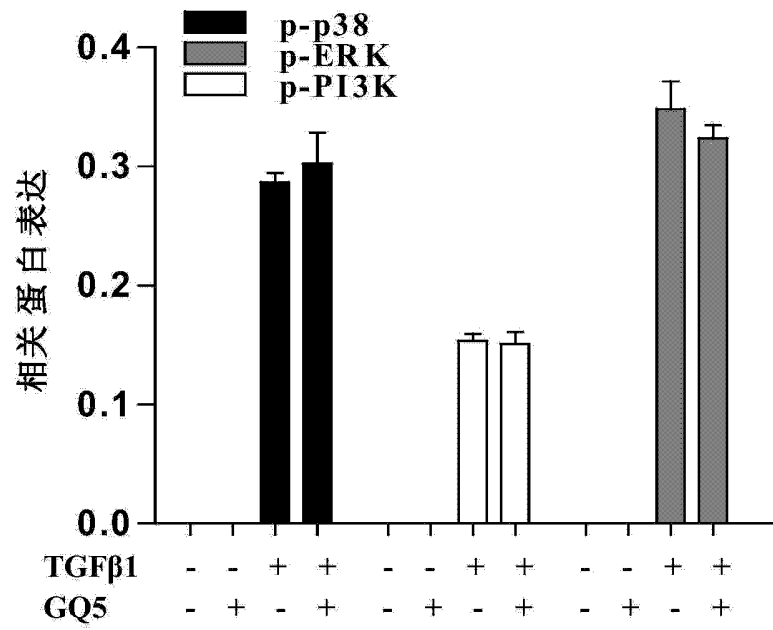


图 3D

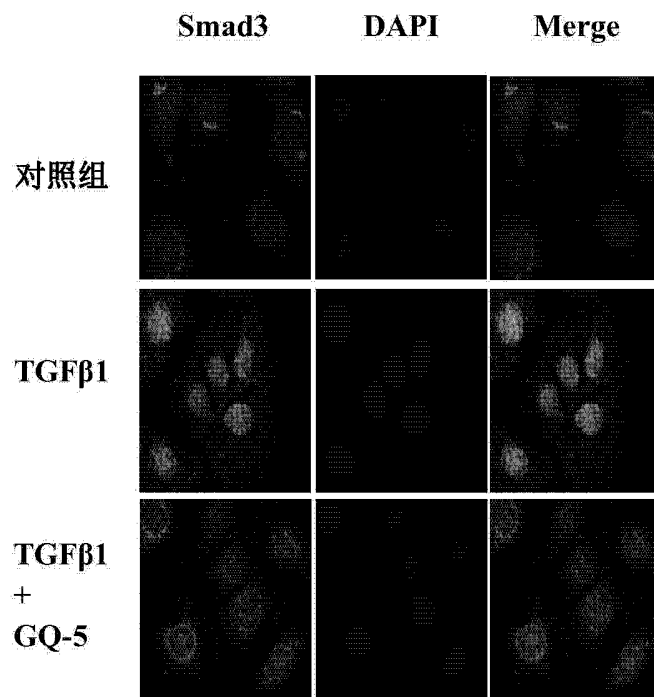


图 4

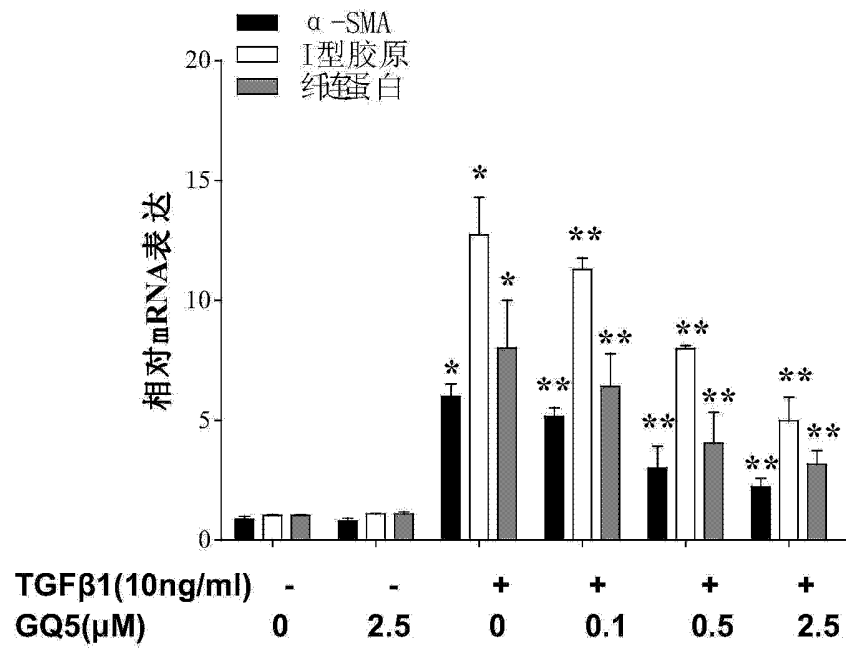


图 5A

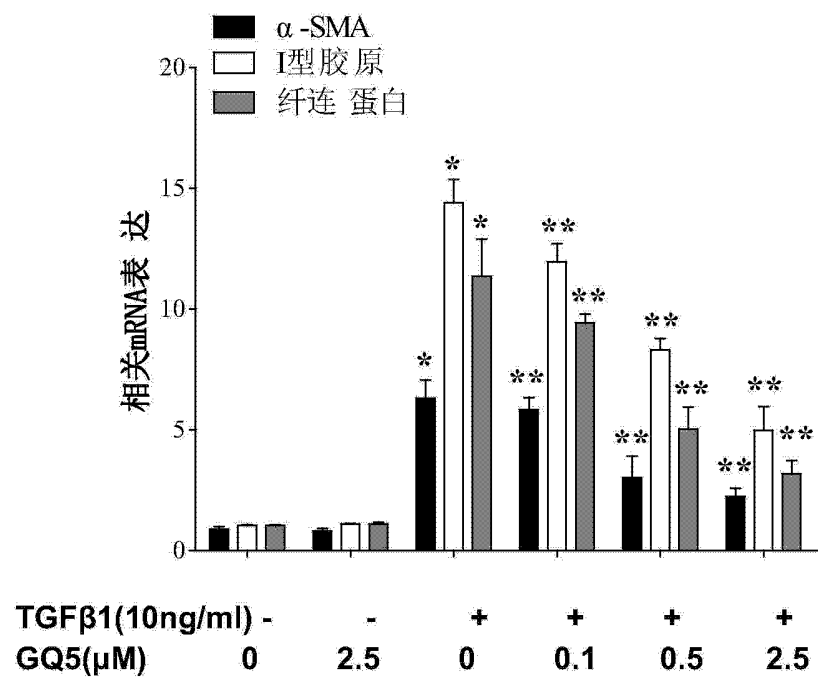


图 5B

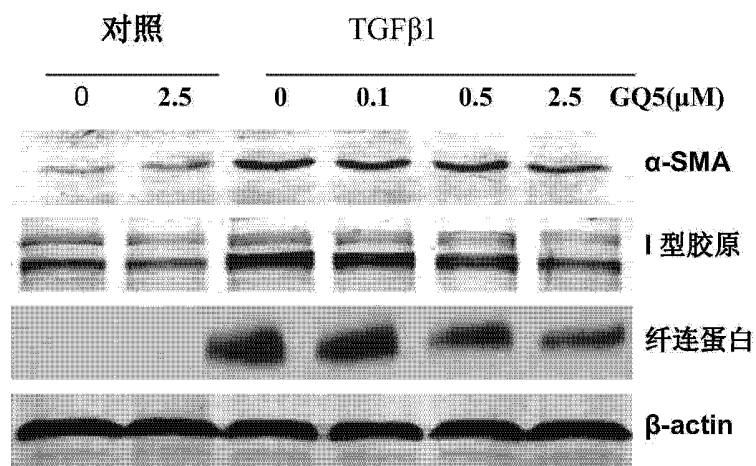


图 6A

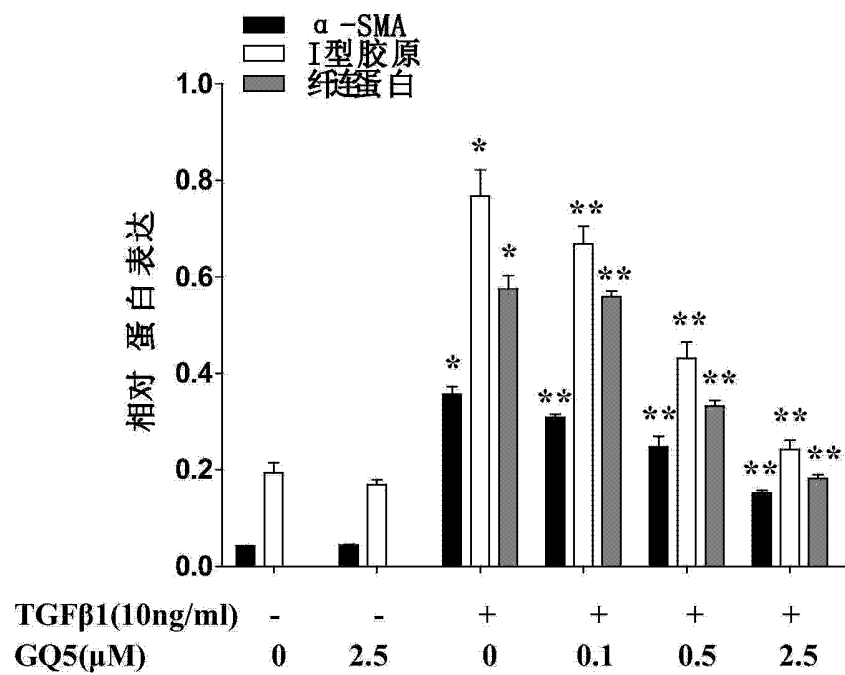


图 6B

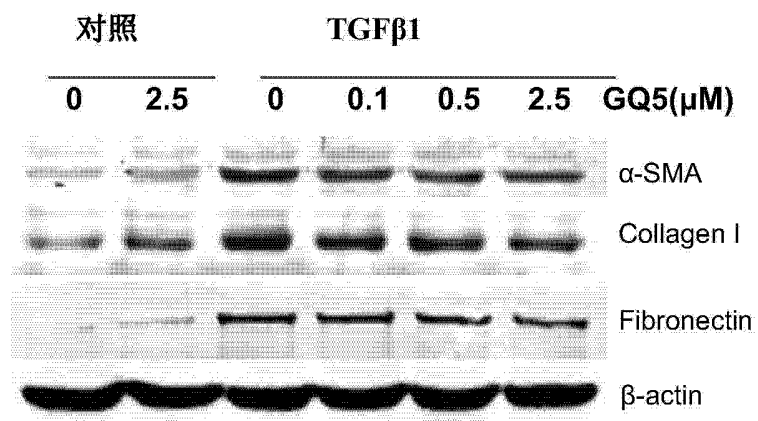


图 6C

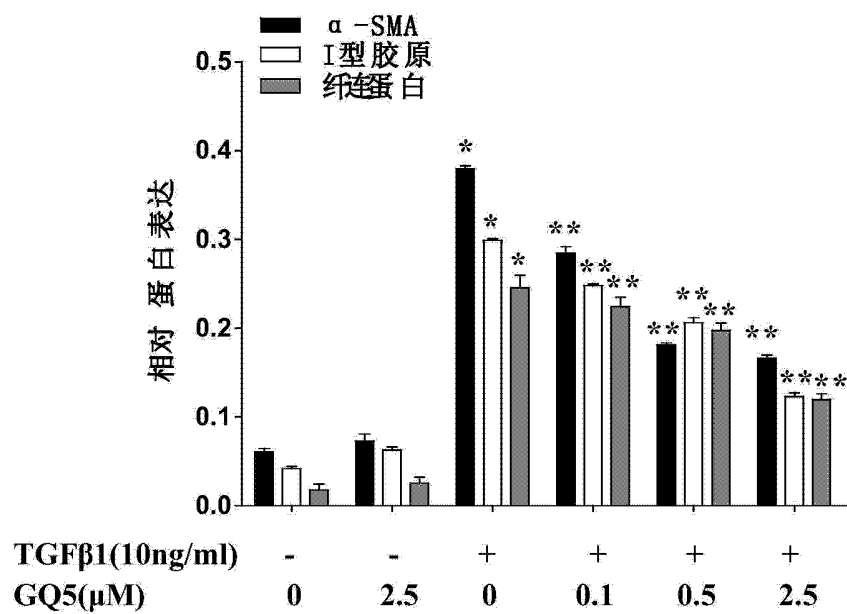


图 6D



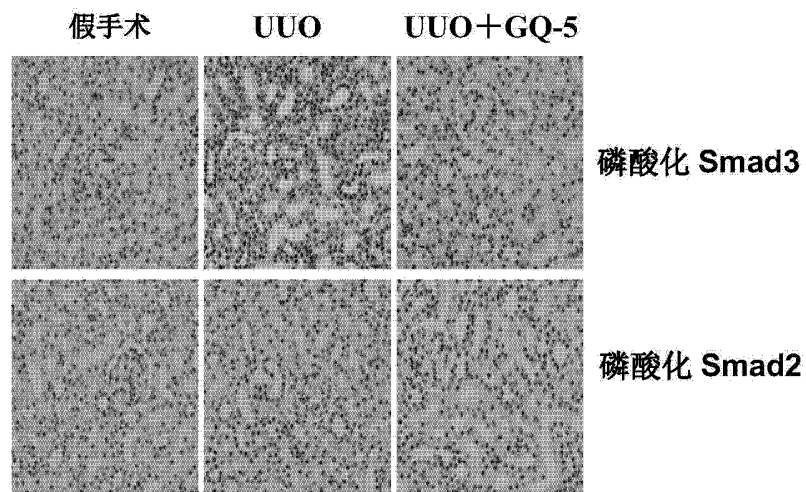


图 7A

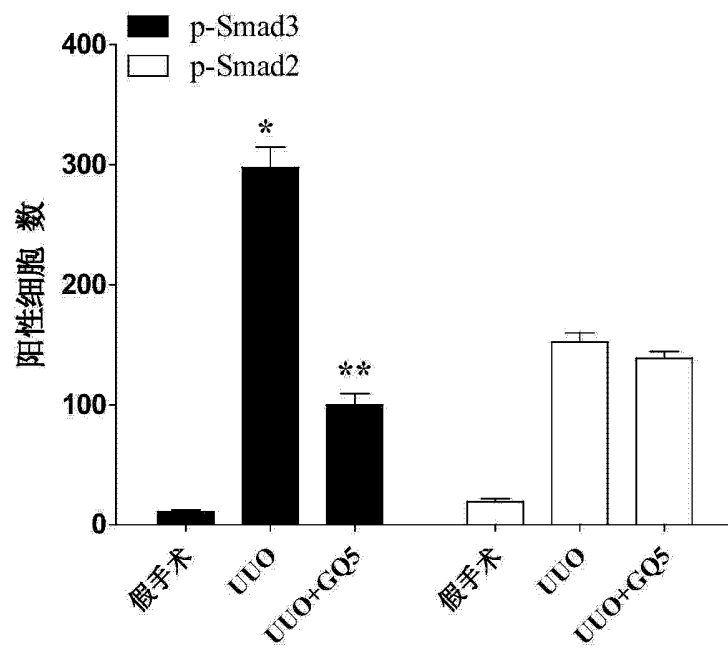


图 7B

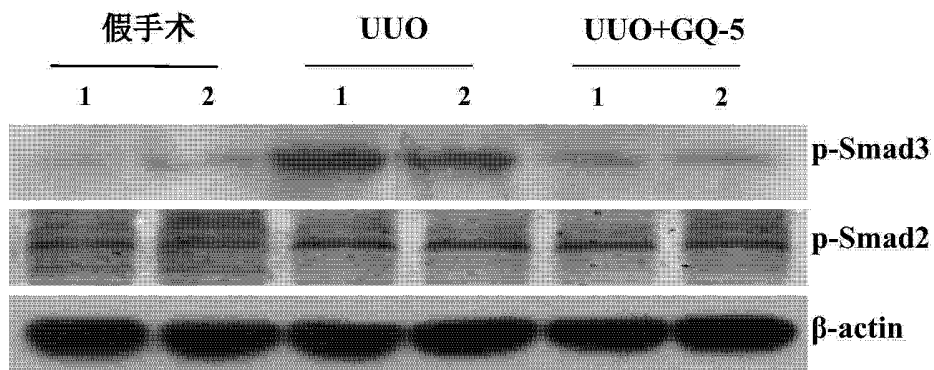


图 8A

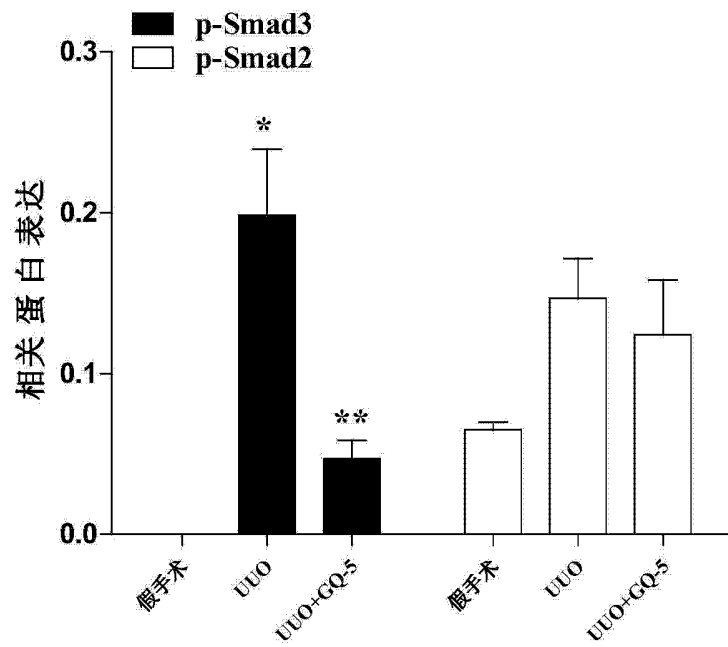


图 8B