



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102000101 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 201010522879.8

A61P 25/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.10.28

A61P 25/14(2006.01)

(71) 申请人 天津中医药大学

地址 300193 天津市南开区鞍山西道 312 号

(72) 发明人 胡利民 王少峡 高秀梅 康立源
王虹

(74) 专利代理机构 北京市惠诚律师事务所
11353

代理人 雷志刚

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 7 页

(54) 发明名称

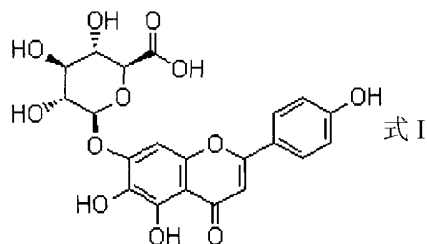
野黄芩苷治疗小胶质细胞介导的疾病的用途

(57) 摘要

本发明涉及式 I 所示野黄芩苷治疗小胶质细胞介导的疾病的用途。具体地, 本发明涉及野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的疾病的药物中的用途, 特别涉及野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎症性疾病的药物中的用途。本发明发现野黄芩苷具有以下新功能: 能明显抑制活化小胶质细胞的炎性介质 NO、TNF α 及 IL-1 β 的产生, 抑制 iNOS、TNF α 及 IL-1 β mRNA 的表达, 抑制小胶质细胞中活性氧簇的产生, 能降低 NF- κ B 活化, 明显减轻激活小胶质细胞对神经元的细胞毒性。因此, 野黄芩苷可以应用于帕金森病等脑部免疫炎症性相关疾病

CN 102000101 A

的防治。



式 I

1. 野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的疾病的药物中的用途。
2. 野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病的药物中的用途。
3. 野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防选自下列的疾病的药物中的用途 : 帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。
4. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中所述药物给予受试者 (例如哺乳动物, 如人) 的每日剂量以野黄芩苷计为 0.01 ~ 100mg/kg 体重。
5. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中所述野黄芩苷是以野黄芩苷单体的形式提供, 或者是以包含野黄芩苷的植物提取物的形式提供。
6. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述植物选自 : 高黄芩 (*Scutellaria altissima* L.) 的叶, 黄芩 (*S. baicalensis* Georgi) 的茎、叶, 以及半枝莲 (*S. Barbara* D. Don) 全草。
7. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述植物提取物中包含 30% (w/w) 以上的野黄芩苷。
8. 用于治疗 and / 或预防小胶质细胞介导的疾病的药物组合物, 其中包含预防和 / 或治疗有效量的野黄芩苷、或者包含野黄芩苷的植物提取物, 以及任选的药学可接受的载体。
9. 根据权利要求 8 的药物组合物, 其为单位剂量的制剂形式, 该单位剂量的制剂形式中包含 0.001mg ~ 5000mg 的野黄芩苷。
10. 根据权利要求 8 的药物组合物, 其中所述小胶质细胞介导的疾病是小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病, 或者其中所述小胶质细胞介导的疾病选自 : 帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

野黄芩苷治疗小胶质细胞介导的疾病的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及野黄芩苷的新用途,具体涉及野黄芩苷治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎症性疾病例如帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等疾病的新用途。

背景技术

[0002] 帕金森病 (Parkinson's disease) 是一种中老年人常见的运动障碍性疾病,又称震颤麻痹,其主要病理改变为中脑黑质多巴胺能神经元变性坏死和脑内路易 (Lewy) 小体的形成。临床主要表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓等症状。帕金森病的病因和引起多巴胺能神经元变性的准确机制至今仍未充分阐明。帕金森病仍是不可治愈的进展性疾病,目前的治疗实质上主要是提高病人的生活质量和工作能力。随着人口老龄化日趋明显,本病发病率有明显上升趋势。最保守的估计,近 20 年我国帕金森病发病率至少增长了 20 多倍,已高达 2% 左右。目前西医临床治疗帕金森病,主要选用金标准药物左旋多巴 (L-dihydroxy-phenylalanine) 类制剂。但在治疗的 2-5 年内常出现诸多毒副反应,如恶心、厌食、血压轻度降低、直立性低血压、“剂末现象”、“开关现象”、精神异常等,严重地影响了病人顺从性和生活质量,随着服药时间延长而毒副反应变明显、严重,并且存在疗效减退等问题。

[0003] 多发性硬化 (multiple sclerosis) 是一种由自身免疫异常所致的中枢神经系统炎症性脱髓鞘性疾病,病程中缓解-复发是重要特点,是青年神经残疾的最常见原因。确切病因及发病机制未明,但认为多发性硬化是主要由 CD4+T 细胞介导的自身免疫反应性疾病。目前用于治疗多发性硬化的药物包括免疫调节剂和免疫抑制剂,如 β 干扰素 (IFN- β)、格拉默 (乙酸盐, glatiramer acetate)、米托蒽醌 (novantrone) 等,但上述药物都是肠外给药,患者使用不便,并且不良反应均较大。

[0004] 亨廷顿氏病 (Huntington's disease) 是一种遗传性退行性脑病,亨廷顿氏病的病因在于亨廷顿基因 (Huntingtin gene) 的突变。尽管相应的突变物亨廷顿氏蛋白 (Htt) 聚合物的形成与亨廷顿氏病的发病机理有关,但人们仍不清楚它是否真的导致了神经系统的损伤。目前尚无有效的治疗亨廷顿氏病的方法。

[0005] 近几年来,随着研究的不断深入,发现小胶质细胞 (microglia) 的异常激活在帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等疾病中都发挥重要作用,是上述疾病病理发展过程中造成神经损伤的主要病因之一。小胶质细胞是中枢神经系统免疫细胞,在帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等疾病的病理状态下,微环境的微小变化即可激活小胶质细胞,使其从静息状态快速转向活化状态。整个活化过程呈现瀑布效应:分化、增殖,免疫分子表达或表达上调,迁移至损害部位,发生形态、免疫显性和功能改变等。其形态上体积增大、胞体变圆并具有变形、吞噬作用;功能上开始大量表达一些与抗原识别和提呈有关的膜表面分子,如表达主要组织相容性复合物 II (MHC) 等;超表达基质蛋白酶 9 (MMP9),降解血脑屏障。更重要的是,显著上调许多细胞因子的分泌水平,其中少部分如

GDNF 促进神经元存活,而大部分如肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6 (IL-6) 等具有神经元损害作用,还有趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、不规则趋化因子 (Fractalkine)、巨噬细胞炎性蛋白 1 (MIP-1) 等介导白细胞趋化;还产生一氧化氮 (NO)、活性氧簇 (ROS) 和类花生酸类 (如前列腺素 E2) 等,导致继发性脑损害。小胶质细胞不仅是天然免疫效应细胞,同时参与启动和调节获得性免疫,参与多发性硬化发病。

[0006] 因此,抑制小胶质细胞的过度活化,平衡其分泌的各种促炎因子,可以有效预防和治疗帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等疾病。以往的文献或专利也表明,耐勒克松 (naloxone, J Pharmacol Exp Ther 2000,293:607-617)、右美沙芬 (dextromethorphan, J Pharmacol Exp Ther 2003,305:212-218)、四氢异喹啉衍生物 (CN101553229A, 中国专利申请号 200780045274.0, 公开日 2009 年 10 月 7 日)、雷公藤氯内酯醇 T4 (CN101332200A, 中国专利申请号 200810071485.8, 公开日 2008 年 12 月 31 日) 等可以通过抑制小胶质细胞活化防治脑部炎症相关疾病。

[0007] 已有文献报道,野黄芩苷具有防治心肌梗死 (中国药业,2010,19:12-13)、血栓形成 (昆明医学院学报,2006,4:1-5)、抗癌 (Phytomedicine,2010,17:63-68) 和保护肝脏 (J Asian Nat Prod Res,2010,12:175-184) 等功能。然而,野黄芩苷在抑制小胶质细胞介导的神经毒性,并防治帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等方面还未见报道。

[0008] 综上所述,小胶质细胞的异常激活是帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等疾病病理发展过程中造成神经损伤的主要病因之一,抑制小胶质细胞的过度活化,可以有效防治上述脑部炎症性疾病。而寻找新的临床治疗方法,以治疗和/或预防神经免疫炎症性疾病,尤其是治疗和/或预防与小胶质细胞相关的神经免疫炎症性疾病,例如治疗和/或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用引起的帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等神经免疫炎症性疾病,仍是本领域技术人员期待的。

发明内容

[0009] 本发明目的是为临床提供治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的方法,尤其是治疗和/或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎症性疾病的方法,例如治疗和/或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用引起的例如帕金森病、多发性硬化、和/或亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等神经免疫炎症性疾病的方法。本发明人令人惊奇地发现,野黄芩苷对小胶质细胞具有令人期待的作用。本发明基于上述发现而得以完成。

[0010] 发明概述:

[0011] 本发明第一方面提供了野黄芩苷在制备治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的药物中的用途。

[0012] 本发明第二方面提供了一种用于治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的药物组合物,其中包含预防和/或治疗有效量的野黄芩苷、或者包含野黄芩苷的植物提取物,以及任选的药学可接受的载体。

[0013] 本发明第三方面提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的方法,该方法包括给所述受试者施用有效量的野黄芩苷、或者包含野黄芩苷的植物提取物。

[0014] 本发明第四方面提供了用于治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的野黄芩苷。

[0015] 发明详述：

[0016] 本发明第一方面提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的疾病的药物中的用途。

[0017] 本发明第一方面还提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病的药物中的用途。

[0018] 本发明第一方面还提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防选自下列的疾病的药物中的用途：帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

[0019] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述小胶质细胞介导的疾病是小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病。

[0020] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述小胶质细胞介导的疾病选自：帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

[0021] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病选自：帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

[0022] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述药物给予受试者（例如哺乳动物，如人）的每日剂量以野黄芩苷计为 0.01 ~ 100mg/kg 体重，优选为 0.01 ~ 75mg/kg 体重、0.01 ~ 50mg/kg 体重、0.02 ~ 20mg/kg 体重、0.02 ~ 10mg/kg 体重、0.02 ~ 5mg/kg 体重、0.02 ~ 2.5mg/kg 体重、0.02 ~ 1mg/kg 体重、或 0.02 ~ 0.5mg/kg 体重。

[0023] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述野黄芩苷是以野黄芩苷单体的形式提供。

[0024] 根据本发明第一方面任一项的用途，其中所述野黄芩苷是以包含野黄芩苷的植物提取物的形式提供。在一个实施方案中，所述植物选自：高黄芩 (*Scutellaria altissima* L.) 的叶，黄芩 (*S.baicalensis* Georgi) 的茎、叶，以及半枝莲 (*S.Barbara* D.Don) 全草。在一个实施方案中，所述植物提取物中包含 30% (w/w) 以上的野黄芩苷，优选包含 40% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、60% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、或 95% (w/w) 以上的野黄芩苷。

[0025] 本发明第二方面提供了一种用于治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的疾病的药物组合物，其中包含预防和 / 或治疗有效量的野黄芩苷、或者包含野黄芩苷的植物提取物，以及任选的药学可接受的载体。

[0026] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物，其中所述植物选自：高黄芩 (*Scutellaria altissima* L.) 的叶，黄芩 (*S.baicalensis* Georgi) 的茎、叶，以及半枝莲 (*S.Barbara* D.Don) 全草。

[0027] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物，其中所述植物提取物中包含 30% (w/w) 以上的野黄芩苷，优选包含 40% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、60% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、或 95% (w/w) 以上的野黄芩苷。

[0028] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物，其为制剂形式。

[0029] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物，其为选自下列的制剂形式：片剂、胶囊剂、软胶囊剂、丸剂、颗粒剂、注射液（包括小容量注射液和大容量注射液）等。

[0030] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物，其为单位剂量的制剂形式。在一个实施方案中，该单位剂量的制剂形式中包含 0.001mg ~ 5000mg 的野黄芩苷；或者包含

0.001mg ~ 5000mg 的范围中任一子范围的野黄芩苷;优选包含 0.01mg ~ 2500mg、0.01mg ~ 1000mg、0.1mg ~ 500mg、或 0.1mg ~ 500mg 的野黄芩苷。

[0031] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物,其中所述的药物组合物给予受试者(例如哺乳动物,如人)的每日剂量以野黄芩苷计为 0.01 ~ 100mg/kg 体重,优选为 0.01 ~ 75mg/kg 体重、0.01 ~ 50mg/kg 体重、0.02 ~ 20mg/kg 体重、0.02 ~ 10mg/kg 体重、0.02 ~ 5mg/kg 体重、0.02 ~ 2.5mg/kg 体重、0.02 ~ 1mg/kg 体重、或 0.02 ~ 0.5mg/kg 体重。

[0032] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物,其中所述小胶质细胞介导的疾病是小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病。

[0033] 根据本发明第二方面任一项的药物组合物,其中所述小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病选自:帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

[0034] 本发明第三方面提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防小胶质细胞介导的疾病的方法,该方法包括给所述受试者施用有效量的野黄芩苷、或者包含野黄芩苷的植物提取物。

[0035] 根据本发明第三方面任一项的方法,其中所述小胶质细胞介导的疾病是小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病。

[0036] 根据本发明第三方面任一项的方法,其中所述小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的神经免疫炎性疾病选自:帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等。

[0037] 根据本发明第三方面任一项的方法,其中给予受试者(例如哺乳动物,如人)的每日剂量以野黄芩苷计为 0.01 ~ 100mg/kg 体重,优选为 0.01 ~ 75mg/kg 体重、0.01 ~ 50mg/kg 体重、0.02 ~ 20mg/kg 体重、0.02 ~ 10mg/kg 体重、0.02 ~ 5mg/kg 体重、0.02 ~ 2.5mg/kg 体重、0.02 ~ 1mg/kg 体重、或 0.02 ~ 0.5mg/kg 体重。

[0038] 根据本发明第三方面任一项的方法,其中所述植物选自:高黄芩 (*Scutellaria altissima* L.) 的叶,黄芩 (*S.baicalensis* Georgi) 的茎、叶,以及半枝莲 (*S.Barbara* D. Don) 全草。

[0039] 根据本发明第三方面任一项的方法,其中所述植物提取物中包含 30% (w/w) 以上的野黄芩苷,优选包含 40% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、60% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、或 95% (w/w) 以上的野黄芩苷。

[0040] 本发明第四方面提供了用于治疗 and/或预防小胶质细胞介导的疾病的野黄芩苷。

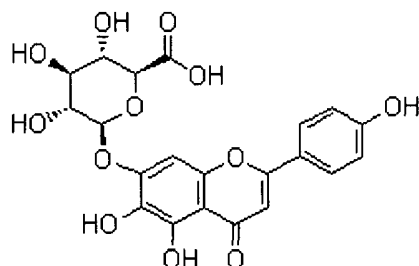
[0041] 本发明任一方面或该任一方面的任一项所具有的特征同样适用其它任一方面或该其它任一方面的任一项,只要它们不会相互矛盾,当然在相互之间适用时,必要的话可对相应特征作适当修饰。在本发明中,例如,提及“本发明第一方面任一项”时,该“任一项”是指本发明第一方面的任一子方面;在其它方面以类似方式提及时,亦具有相同含义。

[0042] 下面对本发明的各个方面和特点作进一步的描述。

[0043] 本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。此外,本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

[0044] 根据本发明,野黄芩苷 (Scutellarin, 7-(beta-D-Glucopyranuronosylo xy)-5, 6-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, 分子式: $C_{21}H_{18}O_{12}$, 分子量: 462.37, CAS 登记号: 27740-01-8), 其具有如下式 I 的结构式:

[0045]



[0046] 式 I

[0047] 野黄芩苷的植物来源包括但不限于唇形科植物高黄芩 (*Scutellaria altissima* L.) 的叶, 黄芩 (*S. baicalensis* Georgi) 的茎、叶以及半枝莲 (*S. Barbara* D. Don) 全草等。

[0048] 如本文所述的, 术语“有效量”是指可在受试者中实现预防和 / 或治疗本发明所述疾病的目的剂量。本领域技术人员根据本发明上下文, 可以容易地确定野黄芩苷的使用剂量。特别地, 本据本发明, 术语“有效量”可以理解为野黄芩苷 (或者以包含野黄芩苷的植物提取物的形式) 以适用于任何医学治疗的合理效果 / 风险比治疗障碍的足够量。但应认识到, 本发明野黄芩苷或其组合物的总日用量可以由本领域技术人员在可靠的医学判断范围内作出决定。对于任何具体的受试者, 具体的预防有效剂量水平须根据多种因素而定, 所述因素包括受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食; 所采用的具体组合物; 与野黄芩苷组合使用或同时使用的其它治疗活性物质; 及医疗领域公知的类似因素。

[0049] 如本文所述的, 术语“药物组合物”, 其可与“组合物”互换使用, 其中包含活性成分野黄芩苷以及任选的药学可接受的载体或赋形剂。

[0050] 如本文所述的, 术语“受试者”, 亦可指“患者”、服用该野黄芩苷的“使用者”等, 可以指接受本发明所述野黄芩苷或包含野黄芩苷的组合物以预防和 / 或治疗本发明所述疾病的动物, 特别是哺乳动物, 例如人、狗、猴、牛、马等。

[0051] 本据本发明, 术语“制剂形式”亦称为“剂型”、“药剂”、“药物制剂”等。本据本发明, 术语“单位剂量的制剂形式”亦称为“单位剂量形式”, 例如, 是指单个药片、单个胶囊剂等, 该单位剂量形式可以提供例如 1/3、1/2、1 或 2 个日剂量。例如对于片剂, 其一片中可以含有一天用的日剂量, 此种情况是优选的; 此外, 一个片剂中还可以含有 2 天用的日剂量, 其可以例如在片剂中间划一刻痕以便于使用者将该片剂分成两半, 对于体重较重者对药物耐受者可以一天使用一片, 而对于半片剂量即有效的使用者可以每天使用半片。

[0052] 如本文所述的, “% (w/w)”是指重量比重量的百分比。

[0053] 如本文所述的, 术语“植物提取物”或称为“提取物”, 如未另外指明, 是指由例如但不限于本文所述植物提取的包含野黄芩苷的“提取物”。本领域技术人员理解, 本发明所述野黄芩苷可以是化学合成的, 亦可以上来源于植物的如本文所述的植物提取物。此外, 人们从植物提取获得包含野黄芩苷的植物提取物是本领域技术人员已知的, 采用化学合成方法获得野黄芩苷亦是本领域技术人员已知的。需要指出的是, 包含 30% (w/w) 以上的野黄芩苷的植物提取物, 特别是包含 40% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、60% (w/w) 以上、70% (w/

w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、或 95% (w/w) 以上的野黄芩苷的植物提取物, 其在实现本发明目的方面等效于野黄芩苷, 例如纯度大于 98% (w/w) 的野黄芩苷, 只要给药量折算成等当量即可。因此, 根据本发明, 在提及“野黄芩苷”时, 其欲意表示包括各种纯度野黄芩苷的植物提取物, 而无需明确其具体来源于植物提取还是来源于化学合成, 亦无需明确其具体来源于自行提取或合成还是来源于商业途径。在本发明中, 特别是在本发明具体实施方式部分, 当提及野黄芩苷时, 如未另外指明, 是指纯度大于 98% (w/w) 的野黄芩苷, 其来源于商业途径。

[0054] 本发明提供包含与一种或多种无毒药理学可接受的载体配制在一起的野黄芩苷的药物组合物。所述药物组合物可特别专门配制成为固体或液体形式供口服给药或供直肠给药, 或者配制成供注射给药。

[0055] 供口服给药的固体剂型包括但不限于胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在此类固体剂型中, 活性化合物可与至少一种惰性的药物可接受赋形剂或载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或以下物质混合: a) 填充剂或增量剂如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸; b) 粘合剂如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶; c) 保湿剂如甘油; d) 崩解剂如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠; e) 溶液阻滞剂如石蜡; f) 吸收加速剂如季铵化合物; g) 湿润剂如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯; h) 吸附剂如高岭土和膨润土以及 i) 润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠和它们的混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下, 所述剂型中也可包含缓冲剂。

[0056] 供口服给药的液体剂型包括药物可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。液体剂型除含有活性化合物外还可含有本领域常用的惰性稀释剂, 例如水或其他溶剂, 增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类 (特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及它们的混合物。

[0057] 本发明的目的在于提供一种野黄芩苷新用途, 具体为预防和治疗涉及活化小胶质细胞介导的神经毒性作用所引起的脑部炎症相关疾病的应用。在一个实施方案中, 所述脑部免疫炎症性疾病为帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病。在本发明的一个实施方案, 提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防神经免疫炎症性疾病的药物中的用途。在本发明的一个实施方案, 提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防与小胶质细胞相关的疾病的药物中的用途。在本发明的一个实施方案, 提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防小胶质细胞介导的神经毒性作用引起的帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等脑部炎症相关疾病的药物中的用途。在本发明的一个实施方案, 提供了野黄芩苷在制备治疗和 / 或预防与小胶质细胞活化有关的疾病的药物中的用途。在本发明的一个实施方案, 提供了野黄芩苷在制备治疗帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等与脑部炎症相关疾病的药物中的用途。

[0058] 本发明的野黄芩苷一般以药物组合物的形式使用, 这种组合物含治疗有效剂量的作为活性成分的野黄芩苷和可药用辅料。含有野黄芩苷的药物组合物可通过口服、注射或粘膜给药, 可以制成片剂、胶囊、粉剂、颗粒、锭剂等剂型供临床应用。上述各种剂型的药物均可以按照药学领域的常规方法制备。

[0059] 本发明提供涉及的化合物野黄芩苷具有以下功能:减少活化小胶质细胞 NO、TNF α 、IL-1 β 、ROS 等细胞毒性炎症介质的产生,减少活化小胶质细胞诱导性一氧化氮合酶(iNOS)、TNF α 、IL-1 β mRNA 的表达,抑制小胶质细胞激活诱导细胞死亡,抑制活化小胶质细胞核因子 κ B(NF- κ B) 的核转移及 DNA 结合活力,减轻活化小胶质细胞对神经元的损伤,有助于减少炎症病理对神经免疫炎症疾病进程中神经功能缺损的症状。从而为野黄芩苷应用于帕金森病、多发性硬化、亨廷顿氏病、脑炎、古迦雷病等脑部免疫炎症相关疾病的防治提供了直接有力的实验依据和理论基础,既有很强的科学性和创新性,又有很高的开发应用价值。

附图说明

[0060] 图 1a:野黄芩苷(Scu)对激活小鼠小胶质细胞系 BV-2 产生炎症介质(NO、TNF α 及 IL-1 β)水平的影响。不同浓度的野黄芩苷(2、10、50 μ mol/L)预孵育 BV-2 细胞 0.5h,然后加入 LPS(0.1 μ g/mL)进行刺激。培养 24h 后收集细胞培养上清液,Greiss 法检测 NO 的浓度,Elisa 法检测细胞因子 TNF α 、IL-1 β 含量。值用均数 + 标准差(mean+SD)表示,n = 6。**p < 0.01,与对照组相比;#p < 0.05,##p < 0.01,与模型组比较。

[0061] 图 1b:野黄芩苷(Scu)对激活大鼠原代小胶质细胞产生炎症介质(NO、TNF α)水平的影响。不同浓度的野黄芩苷(Scu,2、10、50 μ mol/L)预孵育原代小胶质细胞 0.5h,然后加入 LPS(0.1 μ g/mL)进行刺激。培养 8、12、16、20、24h 后收集细胞培养上清液,Greiss 法检测 NO 的浓度,Elisa 法检测细胞因子 TNF α 含量。值用均数 + 标准差(mean+SD)表示,n = 6。**p < 0.01,与对照组相比;##p < 0.01,与模型组比较。

[0062] 图 2:野黄芩苷(Scu)对小胶质细胞 iNOS、TNF α 、IL-1 β mRNA 表达的影响。小鼠小胶质细胞系 BV-2(a)和原代大鼠小胶质细胞(b),加入野黄芩苷(50 μ mol/L)预孵育 0.5h,然后加入 LPS(0.1 μ g/mL)进行刺激 8h。用 PBS 洗 1 次,以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。采用 TaqMan Reverse Transcription Reagents 试剂盒将总 RNA(0.2 μ g)反转录为 cDNA(10 μ l 体系)。取 0.5 μ l 的 cDNA 产物用作定量 PCR 扩增的模板。看家基因 GAPDH 作为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法分析。值用均数 + 标准差(mean+SD)表示,n = 3。**p < 0.01,与对照组相比;#p < 0.05,##p < 0.01,与模型组比较。

[0063] 图 3:野黄芩苷(Scu)对小胶质细胞 ROS 的影响。BV-2 细胞种于 48 孔板或 24 孔(含盖玻片)中。LPS 和 / 或野黄芩苷处理 BV-2 细胞 4h 后,弃去上清,用 PBS 洗涤细胞。每孔加入含有 DCFH-DA(10 μ mol \cdot L⁻¹)探针的 DMEM 培养基继续培养 30min。弃去上清,用 PBS 洗去未进入细胞的探针,每孔中再加入 200 μ L PBS,在酶标仪上读取荧光值(a),或采用激光共聚焦扫描显微镜观察(b)。激发波长 488nm,发射波长 535nm。值用均数 + 标准差(mean+SD)表示,n = 6。**p < 0.01,与对照组相比;#p < 0.05,##p < 0.01,与模型组比较。标尺 = 100 μ m。

[0064] 图 4:野黄芩苷(Scu)对小胶质细胞激活诱导细胞死亡(AICD)的影响。BV-2 细胞加入野黄芩苷(2、10、50 μ mol/L)预孵育 0.5h,然后加入 LPS(0.1 μ g/mL)进行刺激。培养 24h 后,弃上清,加入 MTT(0.5g/L, PBS 配制),继续孵育 4h,弃去上清,每孔加入 400 μ L DMSO,震荡 10min,于 570nm 波长处测定吸光度。值用均数 + 标准差(mean+SD)表示,n = 6。**p < 0.01,与对照组相比;##p < 0.01,与模型组比较。

[0065] 图 5a:野黄芩苷 (Scu) 对小胶质细胞 NF- κ B 核转移的影响。BV-2 细胞接种到 24 孔培养板 (含盖玻片) 内,加入野黄芩苷 (50 μ mol/L) 预孵育 0.5h,然后加入 LPS (0.1 μ g/mL) 进行刺激 45min。吸除孔内培养液, PBS 洗涤 2 次。加入 4% 多聚甲醛固定 15min, PBS 洗涤 3 次,每次 5min。加入 5% 牛血清白蛋白,室温封闭 1h。加入兔抗 NF- κ B p65 抗体 (1 : 100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5min.,加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG,室温孵育 1h。PBS 洗涤 2 次,每次 5min。加入细胞核染色液 (DAPI),室温染色 5min。PBS 洗涤 3 次,每次 3min,滴加适量的抗荧光淬灭封片液,激光扫描共聚焦显微镜下观察。结果显示,对照组 p65 亚基主要分布于胞浆区, LPS 组 p65 大量进入细胞核区,野黄芩苷处理后,胞浆内 p65 明显减少,说明野黄芩苷对 NF- κ B 核转移有显著抑制作用。标尺 = 20 μ m。

[0066] 图 5b:野黄芩苷 (Scu) 对小胶质细胞 NF- κ B DNA 结合活性的影响。野黄芩苷 (50 μ mol/L) 预孵育 BV-2 细胞 0.5h,然后加入 LPS (0.1 μ g/mL) 进行刺激 1h。弃去培养液, PBS 洗涤 2 次。采用试剂盒提取核蛋白。取 10 μ g 核蛋白,采用试剂盒检测 DNA 结合活力。值用均数 + 标准差 (mean+SD) 表示, n = 3。**p < 0.01,与对照组相比 ;#p < 0.05,与模型组比较。

[0067] 图 6:野黄芩苷 (Scu) 处理的小胶质细胞条件培养基对神经元细胞活力的影响。BV-2 细胞接种到 48 孔培养板内,加入野黄芩苷 (50 μ mol/L) 预孵育 0.5h,然后加入 LPS (0.1 μ g/mL) 进行刺激。培养 3h 后, DMEM 培养基洗涤 3 遍,加入新鲜培养基继续孵育 16h 后,取上清离心制得小胶质细胞条件培养基。将此条件培养基加入培养有神经元的 96 孔板中孵育 24h,弃上清,加入 MTT (0.5g/L, PBS 配制),继续孵育 4h,弃去上清,每孔加入 100 μ L DMSO,震荡 10min,于 570nm 波长处测定吸光度。值用均数 + 标准差 (mean+SD) 表示, n = 3。**p < 0.01,与对照组相比 ;##p < 0.01,与模型组比较。

具体实施方式

[0068] 下面通过具体的实施例 / 实验例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例和实验例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0069] 本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和 / 或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0070] 实施例 1:野黄芩苷对小胶质细胞分泌炎性介质的影响

[0071] 完全 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 培养小鼠小胶质细胞系 BV-2 及原代培养的大鼠小胶质细胞。调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,接种到 48 孔培养板内过夜,加入不同浓度的野黄芩苷 (终浓度为 2、10、50 μ mol/L) 预孵育 0.5h,然后加入内毒素 (LPS,终浓度 0.1 μ g/mL) 进行刺激。实验分组:正常对照组、LPS 组和野黄芩苷加 LPS 组。细胞加入 LPS 后培养 24h (或 8、12、16、20、24h),收集各处理组细胞培养上清液,用 Greiss 法检测 NO 的浓度, Elisa 法检测细胞因子 TNF α 、IL-1 β 含量。操作步骤按试剂盒说明书 (R&D Systems 公司) 完成。

[0072] 结果:在正常情况下小胶质细胞 BV-2 培养上清中 NO、TNF α 及 IL-1 β 含量极低,

当用 $0.1 \mu\text{g/mL}$ LPS 刺激后, TNF- α 和 IL-1 β 的含量均极显著增高。而野黄芩苷干预能明显抑制 LPS 引起的 NO、TNF α 及 IL-1 β 的释放, 并在 $2\text{--}50 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈剂量依赖性, 见附图 1a。

[0073] 在原代小胶质细胞上得到的结果与图 1a 相似, 野黄芩苷在 16、20、24h 时能明显抑制 LPS 引起的 NO 的释放, 并呈剂量依赖性。LPS 诱导的 TNF- α 亦能被野黄芩苷抑制, 且量效关系良好, 见附图 1b。

[0074] 实施例 2: 野黄芩苷对小胶质细胞 iNOS、TNF α 、IL-1 β mRNA 表达的影响

[0075] 小鼠小胶质细胞系 BV-2 及原代大鼠小胶质细胞, 种于 12 孔培养板内过夜, 加入野黄芩苷 ($50 \mu\text{mol/L}$) 预孵育 0.5h, 然后加入 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 进行刺激 8h。用 PBS 洗 1 次, 以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。取样品进行波长为 260nm 和 280nm 的紫外检测, 分析总 RNA 的纯度并进行定量。采用 TaqMan Reverse Transcription Reagents 试剂盒 (Applied Biosystems 公司) 和 oligod(T)16 引物将总 RNA ($0.2 \mu\text{g}$) 反转录为 cDNA ($10 \mu\text{l}$ 体系)。0.5 μl 的 cDNA 产物用作定量 PCR 扩增的模板。PCR 扩增反应采用 SYBR Green PCR Master Mix reagent kits 试剂盒 (Applied Biosystems 公司), 和相应特异引物:

[0076] 小鼠 -GAPDH

[0077] 正向: CTTACACCACCATGGAGAAGGC,

[0078] 反向: GGCATGGACTGTGGTCATGAG;

[0079] 小鼠 -iNOS

[0080] 正向: GGCAGCCTGTGAGACCTTTG,

[0081] 反向: GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC;

[0082] 小鼠 -TNF- α

[0083] 正向: CGGGGTGATCGGTCCCCAAAG,

[0084] 反向: GGAGGGCGTTGGCGCGCTGG;

[0085] 小鼠 -IL-1 β

[0086] 正向: CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC,

[0087] 反向: TGTCTCATCTGGAAGGTCCACG;

[0088] 大鼠 -GAPDH

[0089] 正向: CCCCCAATGTATCCGTTGTG,

[0090] 反向: TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT;

[0091] 大鼠 -iNOS

[0092] 正向: GACATCGACCAGAAGCTGTC,

[0093] 反向: GGGCTCTGTTGAGGTCTAAAG;

[0094] 大鼠 -TNF α

[0095] 正向: GCTCCCTCTCATCAGTTCCA,

[0096] 反向: TTGGTGGTTTGCTACGACG;

[0097] 大鼠 -IL1 β

[0098] 正向: GCTAGTGTG TGATGTTCCCATTAG,

[0099] 反向: CTTTTCCATCTTCTTCTTTGGGTA。

[0100] 看家基因 GAPDH 作为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法分析。

[0101] 结果如图 2 所示, LPS 可以显著地增加 BV-2 及原代大鼠小胶质细胞 iNOS、TNF α 、IL-1 β mRNA 的表达, 而野黄芩苷显著降低了 LPS 诱导的 iNOS、TNF α 、IL-1 β mRNA 表达。

[0102] 实施例 3: 野黄芩苷对小胶质细胞 ROS 的影响

[0103] 采用 DCFH-DA 作为指示细胞内 ROS 水平的荧光探针, 研究野黄芩苷对小鼠 BV-2 细胞 ROS 释放的影响。DCFH-DA 本身不发荧光, 进入细胞后, 被细胞内的 ROS 氧化后发出荧光, 从而指示细胞内的 ROS 水平。BV-2 细胞种于 48 孔板或 24 孔 (含盖玻片) 中。LPS 和 / 或野黄芩苷处理 BV-2 细胞 4h 后, 弃去上清, 用 PBS 洗涤细胞。每孔加入含有 DCFH-DA ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 探针的 DMEM 培养基继续培养 30min。弃去上清, 用 PBS 洗去未进入细胞的探针, 每孔中再加入 $200 \mu\text{L}$ PBS, 在酶标仪上读取荧光值, 或采用激光共聚焦扫描显微镜照相, 激发波长 488nm, 发射波长 535nm。

[0104] 图 3a 结果表明, LPS 显著诱导 BV-2 细胞内 ROS 水平。野黄芩苷可抑制 ROS 的产生, 且随着野黄芩苷浓度的加大, 其对 BV-2 细胞内 ROS 水平的抑制作用逐渐增强。激光共聚焦显微镜更清晰的印证了这一点 (图 3b)。

[0105] 实施例 4: 野黄芩苷对小胶质细胞激活诱导细胞死亡 (AICD) 的影响

[0106] BV-2 细胞加入野黄芩苷 (2 、 10 、 $50 \mu\text{mol/L}$) 预孵育 0.5h, 然后加入 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 进行刺激。培养 24h 后, 弃上清, 加入 MTT ($0.5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, PBS 配制), 继续孵育 4h, 弃去上清, 每孔加入 $400 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡 10min, 于 570nm 波长处测定吸光度。

[0107] 图 4 结果表明, LPS 可引起激活诱导细胞死亡, 显著降低 BV-2 细胞活力。野黄芩苷可抑制 LPS 引起的激活诱导细胞死亡, 且呈剂量依赖关系。

[0108] 实施例 5: 野黄芩苷对小胶质细胞 NF- κ B 核转移的影响

[0109] 培养小鼠小胶质细胞系 BV-2 及原代大鼠小胶质细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 接种到 24 孔培养板 (含盖玻片) 内, 过夜后加入野黄芩苷 ($50 \mu\text{mol/L}$) 预孵育 0.5h, 然后加入 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 进行刺激 45min。吸除孔内培养液, PBS 洗涤 2 次。加入 4% 多聚甲醛固定 15min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。加入 5% 牛血清白蛋白, 室温封闭 1h。加入兔抗 NF- κ B p65 抗体 ($1:100$), 4°C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 每次 5min., 加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG, 室温孵育 1h。PBS 洗涤 2 次, 每次 5min。加入细胞核染色液 (DAPI), 室温染色 5min。PBS 洗涤 3 次, 每次 3min, 滴加适量的抗荧光淬灭封片液, 激光扫描共聚焦显微镜下观察。

[0110] 激光共聚焦显微镜结果显示 (图 5a), 对照组 p65 亚基主要分布于胞浆区, 而核区不见, 提示 NF- κ B 主要处于静止状态; LPS 组 p65 大量进入细胞核区, 提示 NF- κ B 出现核转移, 为激活状态。野黄芩苷处理后, 核区内 p65 明显减少, 说明野黄芩苷对 NF- κ B 核转移有显著抑制作用。

[0111] 实施例 6: 野黄芩苷对小胶质细胞 NF- κ B DNA 结合的影响

[0112] 野黄芩苷 ($50 \mu\text{mol/L}$) 预孵育 BV-2 细胞 0.5h, 然后加入 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 进行刺激 1h。弃去培养液, PBS 洗涤 2 次。采用 Nuclear Extraction kit 试剂盒 (Millipore 公司) 提取核蛋白。取 $10 \mu\text{g}$ 核蛋白, 采用 NF- κ B p65EZ-TFA 转录因子试剂盒 (Millipore 公司) 检测 DNA 结合活力, 方法依试剂盒说明书。

[0113] 图 5b 结果表明, LPS 可激活 BV-2 细胞 NF κ B DNA 结合活性, 野黄芩苷处理则显著抑制其 DNA 结合活性, 这与图 5a 结果相吻合。

[0114] 实施例 7:野黄芩苷处理的小胶质细胞条件培养基对神经元细胞活力的影响

[0115] BV-2 细胞按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种到 48 孔培养板内,过夜后加入野黄芩苷 ($50 \mu\text{mol/L}$) 预孵育 0.5h,然后加入 LPS ($0.1 \mu\text{g/mL}$) 进行刺激。培养 3h 后,DMEM 培养基洗涤 3 遍,加入新鲜培养基继续孵育 16h 后,取上清离心制得小胶质细胞条件培养基。将此条件培养基加入培养有神经元的 96 孔板中孵育 24h,弃上清,加入 MTT ($0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, PBS 配制),继续孵育 4h,弃去上清,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO,震荡 10min,于 570nm 波长处测定吸光度。

[0116] 图 6 结果表明,来源于 LPS 激活小胶质细胞的条件培养基可显著降低神经细胞活力。而与 LPS 组条件培养基相比,来源于野黄芩苷组小胶质细胞条件培养基可明显升高神经元细胞活力。这说明野黄芩苷可以抑制激活小胶质细胞的神经毒性,抑制神经炎症引起的神经细胞死亡。

[0117] 序列表

[0118] <110> 天津中医药大学

[0119] <120> 野黄芩苷治疗小胶质细胞介导的疾病的用途

[0120] <130>

[0121] <160>16

[0122] <170>PatentIn version 3.5

[0123] <210>1

[0124] <211>21

[0125] <212>DNA

[0126] <213> 人工序列

[0127] <220>

[0128] <223> 小鼠 -GAPDH 正向引物

[0129] <400>1

[0130] cttcaccacc atggagaagg c 21

[0131] <210>2

[0132] <211>21

[0133] <212>DNA

[0134] <213> 人工序列

[0135] <220>

[0136] <223> 小鼠 -GAPDH 反向引物

[0137] <400>2

[0138] ggcatggact gtggtcatga g 21

[0139] <210>3

[0140] <211>20

[0141] <212>DNA

[0142] <213> 人工序列

[0143] <220>

[0144] <223> 小鼠 -iNOS 正向引物

[0145] <400>3

[0146]	ggcagcctgt gagacctttg	20
[0147]	<210>4	
[0148]	<211>21	
[0149]	<212>DNA	
[0150]	<213> 人工序列	
[0151]	<220>	
[0152]	<223> 小鼠 -iNOS 反向引物	
[0153]	<400>4	
[0154]	gcattggaag tgaagcgttt c	21
[0155]	<210>5	
[0156]	<211>21	
[0157]	<212>DNA	
[0158]	<213> 人工序列	
[0159]	<220>	
[0160]	<223> 小鼠 -TNF- α 正向引物	
[0161]	<400>5	
[0162]	cgggggtgatc ggtccccaaa g	21
[0163]	<210>6	
[0164]	<211>20	
[0165]	<212>DNA	
[0166]	<213> 人工序列	
[0167]	<220>	
[0168]	<223> 小鼠 -TNF- α 反向引物	
[0169]	<400>6	
[0170]	ggagggcggtt ggcgcgctgg	20
[0171]	<210>7	
[0172]	<211>23	
[0173]	<212>DNA	
[0174]	<213> 人工序列	
[0175]	<220>	
[0176]	<223> 小鼠 -IL-1 β 正向引物	
[0177]	<400>7	
[0178]	cgcagcagca catcaacaag agc	23
[0179]	<210>8	
[0180]	<211>24	
[0181]	<212>DNA	
[0182]	<213> 人工序列	
[0183]	<220>	
[0184]	<223> 小鼠 -IL-1 β 反向引物	

[0185]	<400>8	
[0186]	tgtcctcatc ctggaaggtc cacg	24
[0187]	<210>9	
[0188]	<211>20	
[0189]	<212>DNA	
[0190]	<213> 人工序列	
[0191]	<220>	
[0192]	<223> 大鼠 -GAPDH 正向引物	
[0193]	<400>9	
[0194]	cccccaatgt atccgttgtg	20
[0195]	<210>10	
[0196]	<211>21	
[0197]	<212>DNA	
[0198]	<213> 人工序列	
[0199]	<220>	
[0200]	<223> 大鼠 -GAPDH 反向引物	
[0201]	<400>10	
[0202]	tagcccagga tgccctttag t	21
[0203]	<210>11	
[0204]	<211>20	
[0205]	<212>DNA	
[0206]	<213> 人工序列	
[0207]	<220>	
[0208]	<223> 大鼠 -iNOS 正向引物	
[0209]	<400>11	
[0210]	gacatcgacc agaagctgtc	20
[0211]	<210>12	
[0212]	<211>21	
[0213]	<212>DNA	
[0214]	<213> 人工序列	
[0215]	<220>	
[0216]	<223> 大鼠 -iNOS 反向引物	
[0217]	<400>12	
[0218]	gggctctgtt gaggtctaaa g	21
[0219]	<210>13	
[0220]	<211>20	
[0221]	<212>DNA	
[0222]	<213> 人工序列	
[0223]	<220>	

[0224]	<223> 大鼠 -TNF α 正向引物	
[0225]	<400>13	
[0226]	gctccctctc atcagttcca	20
[0227]	<210>14	
[0228]	<211>19	
[0229]	<212>DNA	
[0230]	<213> 人工序列	
[0231]	<220>	
[0232]	<223> 大鼠 -TNF α 反向引物	
[0233]	<400>14	
[0234]	ttggtggttt gctacgacg	19
[0235]	<210>15	
[0236]	<211>24	
[0237]	<212>DNA	
[0238]	<213> 人工序列	
[0239]	<220>	
[0240]	<223> 大鼠 -IL1 β 正向引物	
[0241]	<400>15	
[0242]	gctagtgtgt gatgttccca ttag	24
[0243]	<210>16	
[0244]	<211>24	
[0245]	<212>DNA	
[0246]	<213> 人工序列	
[0247]	<220>	
[0248]	<223> 大鼠 -IL1 β 反向引物	
[0249]	<400>16	
[0250]	cttttccatc ttcttctttg ggta	24

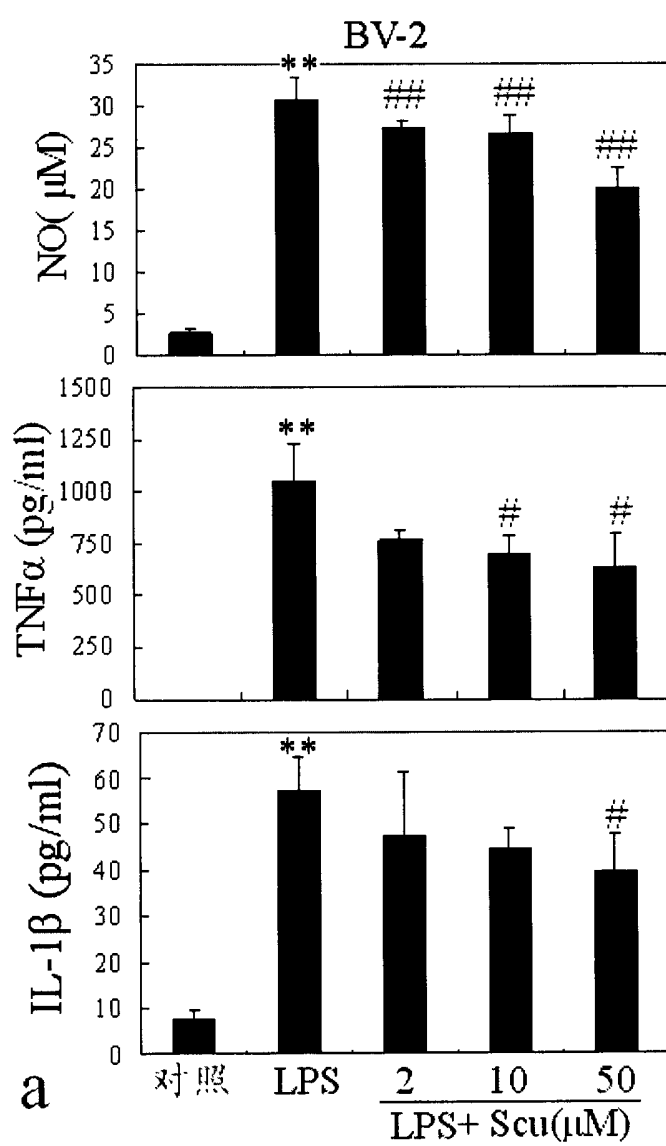


图 1a

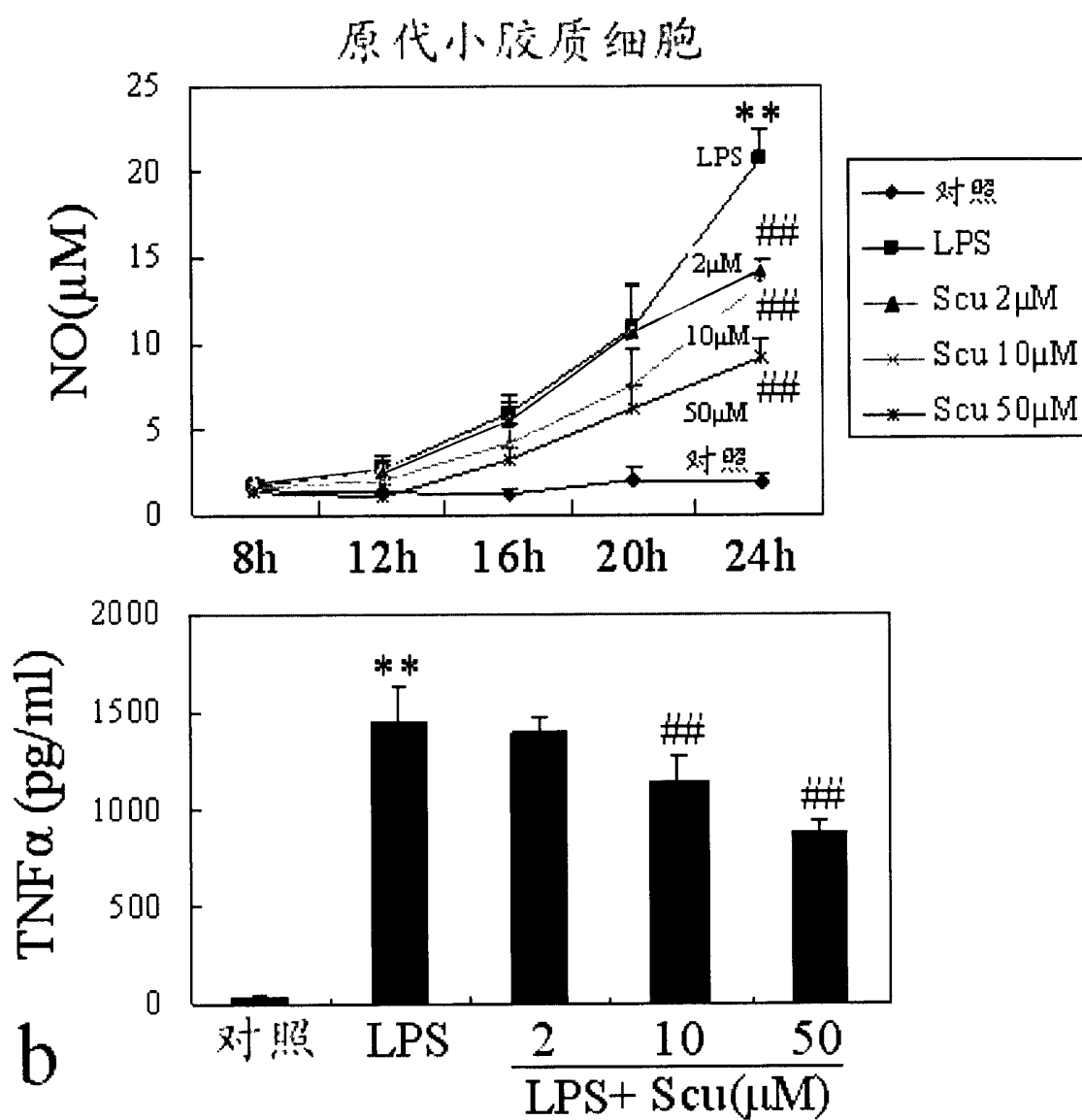


图 1b

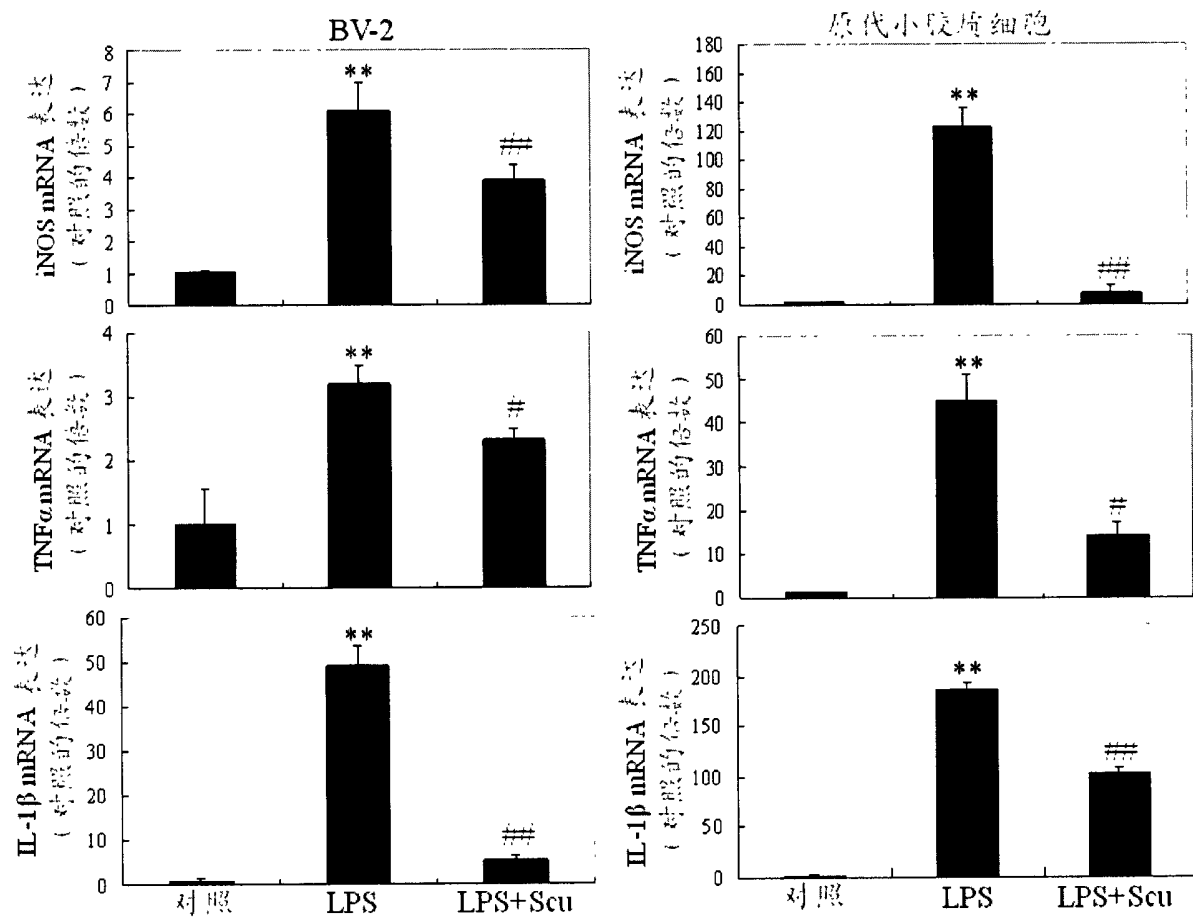


图 2

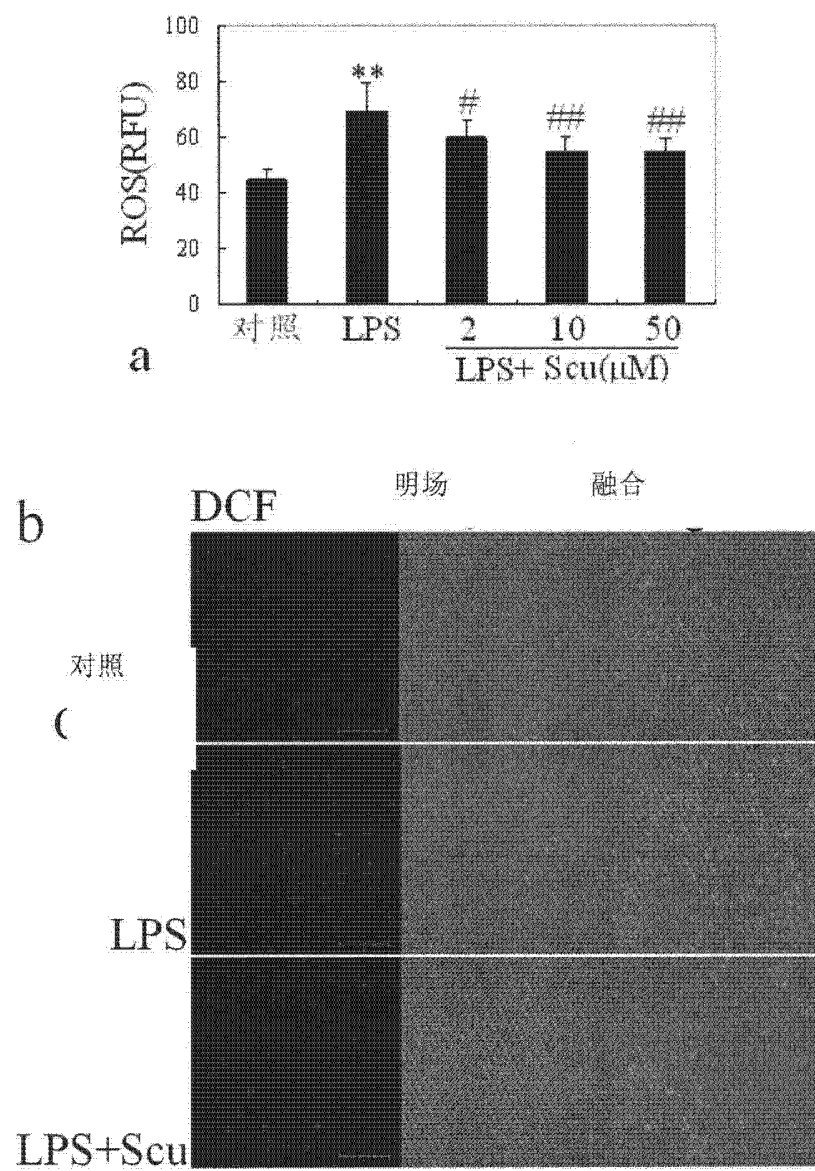


图 3

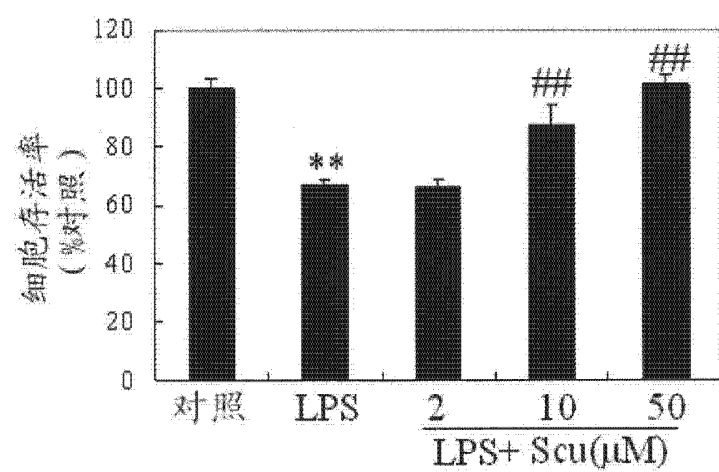


图 4

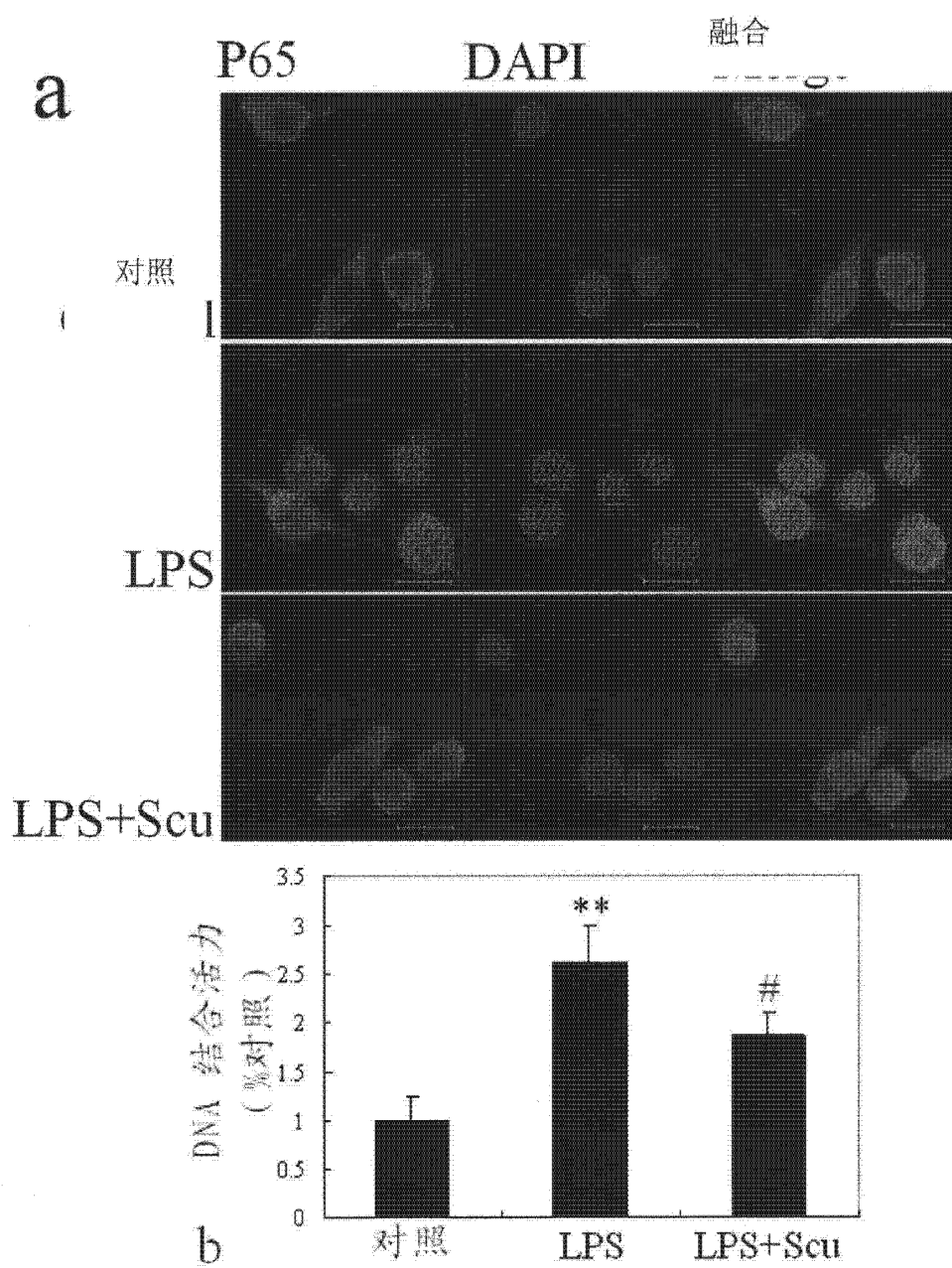


图 5

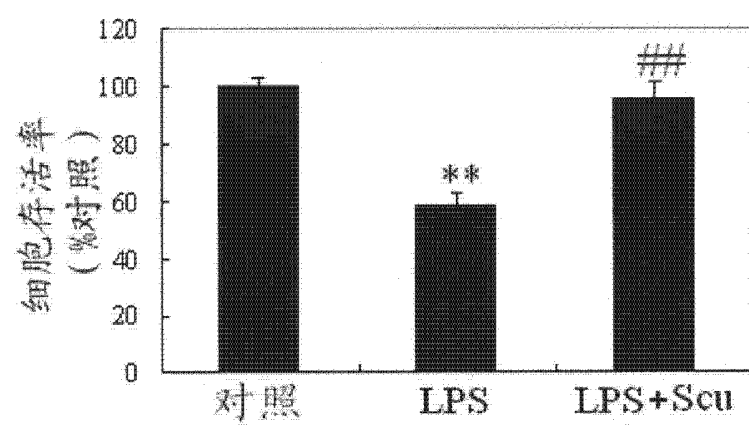


图 6