



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101856347 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 13

(21) 申请号 200910097521. 2

(22) 申请日 2009. 04. 08

(71) 申请人 伍义行

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学  
源街 258 号

(72) 发明人 伍义行 郝冰洁

(51) Int. Cl.

A61K 31/216 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

C07C 69/732 (2006. 01)

C07C 67/48 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页

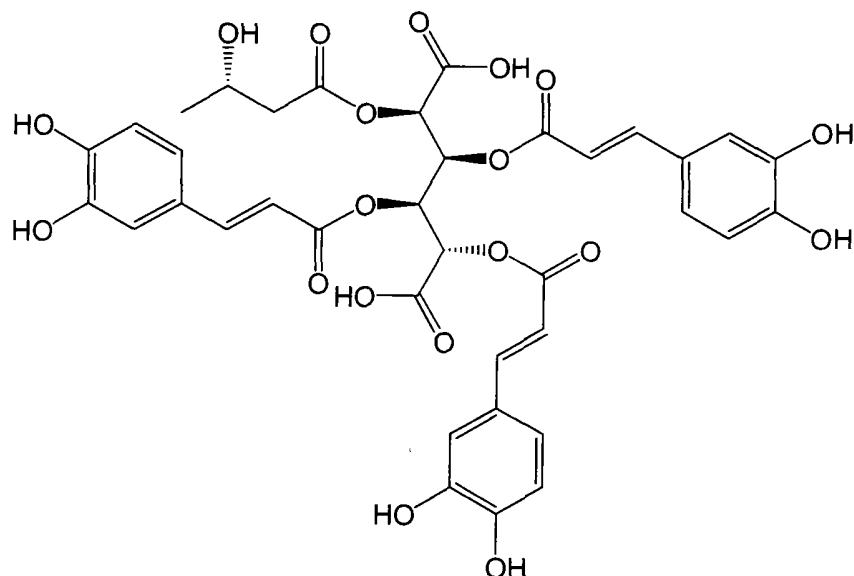
### (54) 发明名称

火绒草属植物提取物及其活性成分在治疗肝炎中的用途

### (57) 摘要

本发明涉及含火绒草素 (Leontopodic acid) 类化合物的火绒草属植物提取物、火绒草素及其衍生物、含火绒草素的药物组合物在治疗肝炎上的应用,尤其是在制备治疗乙型肝炎药物上的用途。本发明的火绒草素及含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物,具有显著的抗乙肝病毒、抗炎保肝和免疫调节作用,可以用于肝炎的治疗,尤其是用于乙肝病毒感染相关疾病的治疗。

1. 一种含火绒草素 (Leontopodic acid) 类化合物的植物提取物、火绒草素及其衍生物、含火绒草素的药物组合物在制备治疗肝炎的药物,尤其是治疗乙肝病毒感染相关疾病的药物中的用途:



火绒草素 (分子式  $C_{37}H_{33}O_{19}$ , 分子量 781.16)

2. 权利要求1所述的火绒草素类化合物,其特征在于该化合物主要从菊科 (Asteraceae) 火绒草属 (Leontopodium genus) 植物中分离制备。或通过全合成或半合成制备。

3. 权利要求1所述的含火绒草素类化合物的植物提取物,其特征在于该提取物主要从火绒草 (*Leontopodium leontopodioides*)、高山火绒草 (*Leontopodium alpinum*)、黄白火绒草 (*Leontopodium ochroleucum*)、香芸火绒草 (*Leontopodium haplophyloides*)、薄雪火绒草 (*Leontopodium japonicum*)、美头火绒草 (*Leontopodium calocephalum*)、戟叶火绒草 (*Leontopodium dedekensii*)、长叶火绒草 (*Leontopodium longifolium*)、绢茸火绒草 (*Leontopodium smithianum*)、华火绒草 (*Leontopodium sinense*)、剪花火绒草 (*Leontopodium conglobatum*) 和矮火绒草 (*Leontopodium nanum*)、(*Leontopodium coreanum*)、*Leontopodium campestre*, *Leontopodium francheti*, *Leontopodium palbinianum*, *Leontopodium souliei*, *Leontopodium subulatum* 等火绒草属植物药材中提取。

4. 权利要求1所述的火绒草素及其衍生物,其特征在于火绒草素及其衍生物的单一成分与不同组合。

5. 权利要求1所述的含火绒草素的药物组合物,其特征在于该药物组合物中除作为活性成分的火绒草素外,可加有各种药物赋形剂和载体。

6. 根据权利要求2所述的火绒草素的提取方法,其特征在于该提取物按照如下步骤制备:

1) 取干燥药材,经乙醇常压回流提取三次,经提取液合并后,减压浓缩回收乙醇,制得棕黑色浸膏;

2) 将制得的棕黑色浸膏用蒸馏水溶解后,分别用石油醚和乙酸乙酯等反复萃取,除去

中小极性部位后,得到提取物的大极性部位;

3) 将剩下的大极性部位分别通过 RP-18 和 Sephadex LH-20 柱层析,并用甲醇洗脱分离出一种浅黄色的粉末,即:火绒草素 (Leontopodic acid)。

7. 权利要求 3 所述的含火绒草素类化合物的植物提取物的提取方法,其特征在于该提取物可由火绒草属植物鲜品或干品经醇水提取、柱层析、醇溶剂洗脱精制而成。该提取物中按比色法测定酚性化合物含量在 20% 以上。

8. 权利要求 1 ~ 7 所述的含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物、火绒草素及其衍生物、含火绒草素的药物组合物,具有显著的抗乙肝病毒、抗炎保肝和免疫调节作用。可以制成肠道或非肠道给药的各种剂型,如胶囊、片剂、颗粒剂、滴丸、注射剂、口服液、缓释或控释剂等剂型,用于预防和治疗肝炎等用途。

## 火绒草属植物提取物及其活性成分在治疗肝炎中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物提取物及其活性成分在肝炎治疗上的应用,尤其是含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物、火绒草素及其衍生物、含火绒草素的药物组合物在制备治疗乙型肝炎药物上的用途。

### 背景技术

[0002] 肝炎是肝脏发生炎性病变的总称,根据病因可分为病毒性、酒精性、药源性和自身免疫性肝炎等,以病毒性肝炎为多见,其中以乙型肝炎为主,丙型肝炎次之。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的一种危害极大的世界性流行的传染病,据统计目前全世界约有3.5亿HBV携带者,而中国是HBV高感染地区,HBV携带者占总人口比例高达10%~15%,其中慢性乙肝患者约3000万例,每年约有35万人死于慢性乙肝相关疾病。1990年起我国开展的新生儿疫苗接种虽然显著降低了儿童慢性乙肝感染率,但并未遏止乙肝发病率的上升趋势,大量已感染HBV的携带者和慢性患者依然存在,乙肝及其相关疾病仍是我国面临的严重公共卫生问题。HBV主要通过血液和性接触传播,母婴垂直传播也很常见。成人感染HBV多表现为无症状感染或急性肝炎,约有15%~20%患者转为慢性携带者和慢性患者,部分慢性乙肝患者进一步转化为肝硬化和原发性肝细胞性肝癌。尽管国内外科学家研制了一些新的抗乙肝药物(如干扰素和核苷类似物)可一定程度控制病情发展,但其疗效距离清除病毒感染、治愈绝大多数乙肝患者及病毒携带者的目标尚有很长的距离,而且长期应用易出现耐药和不同程度的反跳。因此,继续研制高效低毒的抗乙肝药物仍是当务之急。

[0003] 火绒草属(*Leontopodium* genus)是菊科(Asteraceae)的一个属,全球约有56种植物,主要分布于亚洲、欧洲和南美洲,寒带、温带、亚热带及热带均有分布。我国约有41种,主要分布于东北、西北、华北及西南地区,特别是青藏高原尤为丰富。其中有25种在民间作为药用植物,如火绒草(*Leontopodium leontopodioides*)、高山火绒草(*Leontopodium alpinum*)、黄白火绒草(*Leontopodium ochroleucum*)、香芸火绒草(*Leontopodium haplophytloides*)、薄雪火绒草(*Leontopodium japonicum*)、美头火绒草(*Leontopodium calocephalum*)、戟叶火绒草(*Leontopodium dedekensii*)、长叶火绒草(*Leontopodium longifolium*)、绢茸火绒草(*Leontopodium smithianum*)、华火绒草(*Leontopodium sinense*)、剪花火绒草(*Leontopodium conglobatum*)和矮火绒草(*Leontopodium nanum*)、(*Leontopodium coreanum*)、*Leontopodium campestre*, *Leontopodium francheti*, *Leontopodium palbinianum*, *Leontopodium souliei*, *Leontopodium subulatum*等。火绒草属植物民间广泛用于治疗肾炎、肝炎、流行性感、瘟病时疫、支气管炎等炎症性和感染性疾病。

[0004] 本发明人针对肝炎对火绒草属植物的化学成分和药理活性进行了系统研究,结果表明:火绒草素(*Leontopodic acid*)类化合物及其衍生物是火绒草属植物的活性成分,该类化合物和含该类化合物的植物提取物对乙型肝炎模型(HBV基因转染HepG2.2.15细胞模型、鸭乙肝模型和HBV转基因小鼠模型)、肝损伤模型(D-GaIN、CCl<sub>4</sub>、醋氨酚诱发的肝损伤

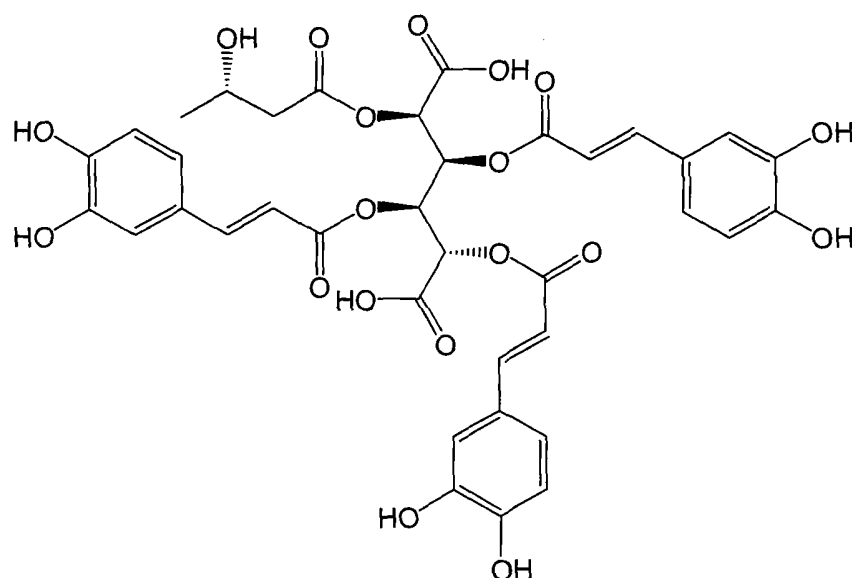
和 BCG-LPS 介导的免疫性肝损伤) 和急慢性炎症模型(二甲苯致小鼠耳肿胀模型、角叉菜胶致大鼠足肿胀模型、大鼠棉球肉芽肿模型) 具有显著抑制作用。因此, 火绒草素类化合物和含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物, 预期可以成为治疗肝炎尤其是乙型肝炎的药物。文献检索表明, 到目前为止, 尚无火绒草素类化合物和含火绒草素类化合物的植物提取物治疗肝炎和制备抗肝炎药物的报道。本发明具有新颖性和创造性, 故而完成本发明。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是克服上述背景技术的不足, 提供一种新的治疗肝炎尤其是乙型肝炎的药物, 其具有显著的疗效、毒副作用很低, 且长期用药无耐药和反跳发生。

[0006] 本发明的第一个目的涉及一种含火绒草素 (Leontopodic acid) 类化合物的植物提取物在治疗肝炎上的应用, 该提取物具有显著的抗乙肝病毒、抗炎保肝和免疫调节作用。

[0007]



[0008] 火绒草素 (分子式  $C_{37}H_{33}O_{19}$ , 分子量 781.16)

[0009] 本发明的另一目的涉及火绒草素及其衍生物在制备用于治疗乙肝病毒感染相关疾病的药物中的用途。

[0010] 本发明的再一目的涉及含火绒草素的药物组合物, 该药物组合物对乙型肝炎具有显著治疗作用。根据本发明, 该药物组合物中除作为活性成分的火绒草素外, 可加有各种药物赋形剂和载体。

[0011] 根据本发明, 本发明的火绒草素类化合物, 主要分离自菊科火绒草属植物, 如从火绒草 (*Leontopodium leontopodioides*)、高山火绒草 (*Leontopodium alpinum*)、黄白火绒草 (*Leontopodium ochroleucum*)、香芸火绒草 (*Leontopodium haplophytoides*)、薄雪火绒草 (*Leontopodium japonicum*)、美头火绒草 (*Leontopodium calocephalum*)、戟叶火绒草 (*Leontopodium dedekensii*)、长叶火绒草 (*Leontopodium longifolium*)、绢茸火绒草 (*Leontopodium smithianum*)、华火绒草 (*Leontopodium sinense*)、剪花火绒草 (*Leontopodium conglobatum*) 和矮火绒草 (*Leontopodium nahum*)、(*Leontopodium coreanum*)、*Leontopodium campestre*, *Leontopodium francheti*, *Leontopodium palbinianum*, *Leontopodium souliei*, *Leontopodium subulatum* 等植物中分离制备。也可

通过全合成或半合成方法制备。

[0012] 根据本发明,火绒草素可从上述植物中通过以下提取路线制备:

[0013] 1) 取干燥药材,经乙醇常压回流提取三次,经提取液合并后,减压浓缩回收乙醇,制得棕黑色浸膏;

[0014] 2) 将制得的棕黑色浸膏用蒸馏水溶解后,分别用石油醚和乙酸乙酯等反复萃取,除去中小极性部位后,得到提取物的大极性部位;

[0015] 3) 将剩下的大极性部位分别通过 RP-18 和 Sephadex LH-20 柱层析,并用甲醇洗脱分离出一种浅黄色的粉末,即:火绒草素 (Leontopodic acid)。

[0016] 根据本发明,火绒草属植物提取物可由火绒草属植物鲜品或干品经醇水提取、柱层析、醇溶剂洗脱精制而成。该提取物中按比色法测定酚性化合物含量在 20% 以上。

[0017] 根据本发明,通过采用 HepG2. 2. 15 细胞模型和 D- 半乳糖胺 (D-GalN) 诱发肝损伤模型对火绒草不同提取物进行了大量筛选,确定其抗乙肝药效部位,分离鉴定其药效成分,并采用乙肝模型 (HepG2. 2. 15 细胞模型、鸭乙肝模型和 HBV 转基因小鼠模型)、肝损伤模型 (D-GalN、CCl<sub>4</sub>、醋氨酚诱发的肝损伤和 BCG-LPS 介导的免疫性肝损伤) 和急慢性炎症模型 (二甲苯致小鼠耳肿胀模型、角叉菜胶致大鼠足肿胀模型、大鼠棉球肉芽肿模型) 对火绒草提取物的抗乙肝作用进行了深入研究。初步药效研究表明:火绒草属植物提取物具有显著的抗乙肝病毒、抗炎保肝和免疫调节作用,其药效优于阳性药物“拉米夫定”和“水飞蓟宾”,且长期用药后未出现耐药和“反跳”现象,未见明显毒性反应。

[0018] 根据本发明,含有火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物、火绒草素及其衍生物、含火绒草素的药物组合物,均具有显著的抗乙肝病毒、抗炎保肝和免疫调节作用,从而可能开发成抗乙肝药物。本发明的药物可用医药领域的已知技术制成,可以制成肠道或非肠道给药的各种剂型,如胶囊、片剂、颗粒剂、滴丸、注射剂、口服液、缓释或控释剂等剂型。这些药物可用于预防和治疗肝炎等用途。

## 具体实施方式

[0019] 为了更好地理解本发明的实质,下面分别用实施例的形式说明含有火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物在医药领域中的新用途。药理实施例给出了火绒草属植物提取物的部分活性数据。同样必须说明,本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范围。

[0020] 实施例 1:火绒草属植物提取物对 HepG2. 2. 15 细胞分泌乙肝病毒表面抗原 (HBsAg)、乙肝病毒 E 抗原 (HBeAg) 和乙肝病毒 DNA (HBV-DNA) 的抑制作用。

[0021] 测定样品对 HepG2. 2. 15 细胞生长的抑制作用:将细胞用胰蛋白酶-EDTA 消化并稀释成  $1 \times 10^5$ /mL, 加到 96 孔细胞培养板中,每孔 100uL,置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。接种 24h 后,倾去培养基,加入用培养基稀释的样品,每孔 200uL,每个浓度加 3 孔,培养 72h 后在细胞培养孔中加入 5mg/mL 的 MTT,每孔 10uL,置 37℃ 孵育 3h,加入 DMSO 150uL,使甲臞完全溶解,用酶标仪在 570nm 波长下比色。计算样品对 HepG2. 2. 15 细胞生长的半数中毒浓度。

[0022] 测定样品对 HBV 的抑制作用:每 4 天换含无毒浓度样品的培养基,将同一样品同一浓度的换出的培养基等体积混匀,作为待测样品。用 ELISA 试剂盒测定培养基中 HBsAg 和 HBeAg 浓度;用 HBV-DNA 定量 PCR 试剂盒测定培养基中 HBV-DNA 浓度。

[0023] 抗 HBV 作用评价 :以转染有 HBV DNA 细胞株 (HepG2. 2. 15) 为模型,通过被测样品对细胞培养上清中的 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 的影响情况,来评价样品的抗 HBV 的作用。

[0024] 表 1 火绒草属植物提取物对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用

[0025]

化合物	浓度 ( $\mu$ g/ml)	HBsAg (抑制 %)	HBeAg (抑制%)	HBV-DNA (抑制%)
火绒草属植 物提取物	100	85.66	62.27	92.37
	50	72.12	43.75	78.24
	10	45.77	22.15	45.48
	1	20.86	18.24	36.55
拉米夫定	100	65.77	43.28	74.57
	50	51.02	32.12	54.21
	10	28.65	20.74	38.64
	1	16.41	12.52	28.94

[0026] 结果表明,含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 具有较强抑制作用,对 HBV-DNA 复制也具有较强的抑制作用。

[0027] 实施例 2 火绒草属植物提取物对 D-GaIN 致肝细胞损伤的影响

[0028] 人正常肝细胞株 HL-7702,置 37℃ 下 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;待肝细胞贴壁后,更换培养液,加入 200mmol/l 的 D-GaIN,作用 8h;然后弃去培养液,分别加入不同浓度的试验药液各 200  $\mu$  l,每一浓度设 6 个复孔,同时设溶剂和阳性对照;继续培养 48h,每孔加入 10  $\mu$  l MTT (5mg/ml),作用 4h,吸弃上清,加入 150  $\mu$  l DMSO,振荡混匀;在 570nm 波长下,用酶标仪测定 A 值。

[0029] 保护作用评价 :计算保护率 (%) 和增生指数。

[0030] 注 1 :保护率 (%) = 
$$\frac{\text{样品组 (A)} - \text{损伤组 (A)}}{\text{正常组 (A)} - \text{损伤组 (A)}} \times 100\%$$

[0031] 注 2 :增生指数 = 样品组 (A) / 损伤组 (A)

[0032] 表 2 火绒草属植物提取物对 D-GaIN 致人正常肝细胞损伤的影响

[0033]

组别	浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	保护率 (%)	增生指数
溶剂对照	-	-	-
D-GaIN 对照	-	-	-
	100	30.2	4.08
水飞蓟宾	50	18.4	2.97
	10	10.8	2.12
	1	4.5	1.58
火绒草属植物	100	56.8	6.76
提取物	50	31.4	4.21
	10	20.8	3.22
	1	10.4	2.04

[0034] 结果表明,含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物对 D-GaIN 诱导的肝细胞损伤具有明显的保护作用,其作用优于阳性对照药物水飞蓟宾。

[0035] 实施例 3 火绒草属植物提取物对 D-GaIN 致小鼠急性肝损伤模型的保护作用

[0036] 取材:取 20-25g、雄性,ICR 小鼠,按体重随机分组,每组 10 只。设正常对照组、损伤对照组、阳性对照组和试药高、中、低剂量组。药物组动物预防给药,每天 1 次,连续 7 天。正常对照组及损伤对照组给予等体积的溶剂,阳性对照组给予水飞蓟素 50mg/kg。末次给药后 1h,除正常组外,各组动物腹腔注射 650mg/kg 氨基半乳糖 (D-GaIN) 致毒。末次给药 24h 后,分离血清,测谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT)。同时取肝组织用于制作病理切片。

[0037] 疗效评价:比较治疗组与损伤对照组间 AST 和 ALT 差异的显著性,以及病理学变化的改善。

[0038] 表 3 火绒草属植物提取物对 D-GaIN 诱发的小鼠急性肝损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ )

[0039]

组别	剂量 (mg/kg)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
溶剂对照	-	46.77 $\pm$ 4.25***	30.54 $\pm$ 3.26***
模型对照	-	188.26 $\pm$ 9.37	87.25 $\pm$ 6.02
水飞蓟宾	50	95.44 $\pm$ 6.12***	55.24 $\pm$ 5.27*
	25	85.25 $\pm$ 5.78***	45.39 $\pm$ 5.88**
火绒草属植物提 取物	50	64.37 $\pm$ 5.22***	35.64 $\pm$ 3.89***
	100	56.58 $\pm$ 5.14***	32.18 $\pm$ 3.78***

[0040] 与模型对照比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,和 \*\*\* $P < 0.001$ ,即与模型对照组相比具有显著的差异。

[0041] 结果表明,含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物对 D-GaIN 急性肝损伤小



鼠血清转氨酶具有显著抑制作用,且能明显改善 D-Ga1N 急性肝损伤组织学病变。其作用优于阳性对照药物水飞蓟素。

[0042] 实施例 4 火绒草属植物提取物对  $\text{CCl}_4$  致小鼠急性肝损伤模型的保护作用

[0043] 取体重 20-25g 雄性 ICR 小鼠,按体重随机分组,每组 10 只。设正常对照组、损伤对照组、阳性对照组和试药高、中、低剂量组。药物组动物预防给药,每天 1 次,连续 7 天。正常对照组及损伤对照组给予等体积的溶剂,阳性对照组给予水飞蓟素 50mg/kg。末次给药后 1h,除正常组外,各组动物腹腔注射 1% 的  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液 (10ml/kg) 致毒。末次给药 24h 后,分离血清,测谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT)。同时取肝组织用于制作病理切片。

[0044] 疗效评价:比较治疗组与损伤对照组间 AST 和 ALT 差异的显著性,以及病理学变化的改善。

[0045] 表 4 火绒草属植物提取物对  $\text{CCl}_4$  诱发的小鼠急性肝损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ )

[0046]

组别	剂量 (mg/kg)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
溶剂对照	-	38.55 $\pm$ 4.24***	21.32 $\pm$ 3.56***
模型对照	-	98.36 $\pm$ 6.15	62.15 $\pm$ 6.04
水飞蓟素	50	62.24 $\pm$ 5.67**	36.35 $\pm$ 5.57**
火绒草属植物 提取物	25	63.55 $\pm$ 6.11*	41.88 $\pm$ 5.03*
	50	52.88 $\pm$ 4.63***	31.22 $\pm$ 2.88***
	100	41.27 $\pm$ 3.22***	24.88 $\pm$ 2.05***

[0047] 与模型对照比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,和 \*\*\* $P < 0.001$ ,即与模型对照组相比具有显著的差异。

[0048] 结果表明,含火绒草素类化合物的火绒草属植物提取物对  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤小鼠血清转氨酶具有显著抑制作用,且能显著改善  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤组织学病变。其保护作用优于阳性对照药物水飞蓟素。