

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810150960.0

[43] 公开日 2009 年 1 月 28 日

[11] 公开号 CN 101352427A

[22] 申请日 2008.9.12

[21] 申请号 200810150960.0

[71] 申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁路 28 号

[72] 发明人 邢建峰 孙建宁 董亚琳 屈清慧

袁志墨 胡萨萨 石锐才

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公  
司

代理人 陈翠兰

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

莽草酸在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种莽草酸用于制备治疗溃疡性结肠炎药物的新用途。本发明利用大鼠乙酸性结肠炎模型,考察莽草酸治疗溃疡性结肠炎的作用,发现莽草酸可以有效改善大鼠腹泻、血便、体重减轻、结肠组织形态学改变等症状;对结肠组织中性粒细胞具有清除作用;并能明显降低结肠炎大鼠结肠组织中 MDA 和 NO 含量以及 T-NOS 和 iNOS 活性,升高 SOD 水平。因此,莽草酸可用于制备治疗溃疡性结肠炎药物。

1. 莽草酸在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用。

## 莽草酸在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用

### 技术领域

本发明涉及医药技术领域，特别涉及莽草酸用于制备治疗溃疡性结肠炎药物的新用途。

### 背景技术

莽草酸 (shikimic acid) 为中草药木兰科八角属多种植物果实中含有的有效成分。其分子式为  $C_7H_{10}O_5$ ，相对分子质量为 174.15，化学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸。莽草酸具有抗炎、镇痛作用；莽草酸可通过影响花生四烯酸代谢，抑制血小板聚集，抑制凝血系统而发挥抗血栓形成作用。此外，莽草酸作为抗病毒和抗肿瘤药物的中间体被广泛应用。但截止目前为止，还没有关于莽草酸防治溃疡性结肠炎作用的报道。

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称慢性非特异性结肠炎，是一种主要累及直肠、结肠粘膜的慢性非特异性炎症，临床表现主要为腹泻、腹痛、粘液血便等；其病理改变为弥漫的组织反应，包括溃疡形成、隐窝脓肿、小血管炎症、杯状细胞减少以及各种类型炎细胞浸润等非特异性表现。病程迁延不愈长达十几年，甚至几十年并有癌变的可能。溃疡性结肠炎在欧美国家的发病率很高，在我国的发病率也呈逐年增高的趋势。溃疡性结肠炎的病因及发病机理至今尚不清楚。近年来在感染因子的作用、遗传易感性的影响和免疫调节异常等方面的研究均有一定进展。肠道感染可能作为始动因子破坏粘膜屏障，使固有膜内粘膜相关淋巴组织暴露。肠腔内抗原物质可能作为恒定的刺激引起免疫反应性炎症。遗传易感性决定了辅助性 T 细胞激活占

优势的免疫反应性炎症，各种细胞因子、炎性介质的产生，使之放大和慢性化，形成炎症的级联反应。在溃疡性结肠炎的发生、发展过程，即炎症的级联反应过程中，与一氧化氮和氧自由基密切相关，无论病因如何，都通过炎症放大这个中间环节使其病变发展。氧自由基可增加粘膜的通透性，使吞噬细胞活动进一步加强，其在引起脂质氧化的同时，产生更多的氧自由基，从而导致组织细胞的损伤。溃疡性结肠炎活动期，肠粘膜中有大量中性粒细胞浸润，并产生大量氧自由基，对结肠组织产生攻击作用，充当或激活炎症介质，加重炎症程度。此外，一氧化氮（NO）在 UC 的过程中也发挥了一系列致病作用。作为自由基与  $O^{2-}$  反应生成具有更强氧化性的  $ONOO^-$ ，对组织和细胞产生毒性；NO 可降低 SOD 等抗氧化物质清除降低自由基的能力，造成更大的细胞毒性；NO 可导致结肠组织发生充血；可以介导 IL-2 诱导微血管通透性增高，导致结肠组织发生水肿和组织功能异常；通过调节 COX-2 依赖性的前列腺素的产生，促进 UC 的炎症的发生；NO 还具有促进白细胞趋化，促进淋巴细胞激活、促进炎症介质释放的作用。另外，NO 对结肠运动有影响，NO 是抑制性 NANC 神经递质，NO 增多会导致括约肌松弛，可能也是 UC 病人发生腹泻的原因之一。因此，NO 在溃疡性结肠炎的发病过程中扮演重要角色。

目前，对溃疡性结肠炎传统内科治疗常规药物有三类：氨基水杨酸类、类固醇糖皮质激素及免疫抑制剂。而这些药物均存在疗效欠佳及副作用较大的问题，如临床常用的治疗中、轻度结肠炎的柳氮磺吡啶，约有近半数的病人不能耐受其副作用；类固醇糖皮质激素类药物包括氢化可的松、泼尼松、地塞米松等，这类药物不宜长期使用；免疫抑制剂主要有氨甲蝶呤、硫唑嘌呤等，该类药物因毒性较大而限制了其应用。治疗最新的进展包括新合成的

化合物、药物的结肠靶向制剂和生物学疗法。生物学疗法如应用肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  抗体、干扰素、细胞粘附分子抑制剂等，然其或长期应用副作用大，或效果不肯定，或价格昂贵而限制其临床应用。因此，研制新的安全、有效的治疗药物有着重要意义。我国传统的中药历经数千年临床，为寻找有效药物提供了丰富的药源，因此从传统中草药中筛选治疗溃疡性结肠炎的药物不仅是可行的，而且可填补我国在这一领域的空白。

### 发明内容

为了克服上述现有技术不足，提供一种莽草酸在制备治疗溃疡性结肠炎药物中的应用，该药物具有良好的疗效。

本发明的技术方案是这样实现的：

莽草酸在制备抗溃疡性结肠炎药物中的应用。

本发明采用类似人类活动性和急性溃疡性结肠炎的大鼠乙酸性结肠炎模型进行了动物实验，证实了本发明莽草酸可使溃疡性结肠炎大鼠体重恢复，粪便隐血程度降低，结肠粘膜损伤指数、肠重指数、炎性结肠组织中髓过氧化物酶活性明显降低，并对大鼠结肠粘膜病理损伤改善作用；具有升高超氧化物歧化酶活性，降低丙二醛的抗氧化作用；并能抑制一氧化氮合酶活性，从而抑制一氧化氮的生成。由此说明莽草酸具有确切的治疗溃疡性结肠炎的作用，因此可以用于制备治疗溃疡性结肠炎的药物。

### 具体实施方式

本发明通过建立溃疡性结肠炎动物模型等技术证明了莽草酸对溃疡性结肠炎的作用及作用机制。

实施例 1 莽草酸对大鼠乙酸性结肠炎的治疗作用

实验材料

(1) 动物 SD 大鼠，清洁级，雄性，体重 220~240g，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，合格证编号：scxk（京）2002—0003。

(2) 药物与试剂 阳性对照药：柳氮磺吡啶片（SASP），上海三维制药有限公司生产；冰乙酸为北京化工厂产品；髓过氧化物酶（MPO）测试盒，粪便隐血（OB）测试盒，均由南京建成生物工程研究所提供。

(3) 仪器 高速组织匀浆仪，D-37520 型高速低温离心机，722 分光光度计，OHAUS 分析天平等。

## 实验方法

### (1) 大鼠乙酸性结肠炎模型的制备

大鼠实验室常规饲养，造模前禁食 24h，同时灌胃给予 10% 的  $\text{MgSO}_4$  溶液致泻，3mL/只，一日两次。将禁食 24h 的大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉（ $250\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ），用聚乙烯导管（ $\Phi 2\text{mm}$ ）经肛门插入大鼠结肠内，头端距肛门 8cm 左右，缓慢注入体积分数为 6% 的乙酸 2mL，作用 20s 后立即注入 5mL 生理盐水冲洗，连续 2 次。正常对照组给予生理盐水灌肠。造模 24h 后开始给药。

### (2) 实验分组及观察指标

实验设正常对照组、模型对照组、阳性药物对照组（SASP  $0.50\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）、莽草酸（SA）给药组（0.40,  $0.20\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ），灌胃给药，每天 2 次，连续 6d。正常及模型对照组均给予等量的蒸馏水。

于造模后第七天，将禁食 24h 的大鼠以 10% 的水合氯醛（ $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）腹腔注射麻醉，颈总动脉放血，背位固定。大鼠剖开腹部，取出全结肠。沿肠系膜纵向剪开结肠，以冷生理盐水冲洗掉肠内容物，肉眼观察结肠粘膜损伤的情况，结肠粘膜损伤指数评分标准：0 分：无损伤；1 分：轻度充血水

肿，表面光滑，无糜烂或溃疡；2分：充血水肿，粘膜粗糙，呈颗粒感，有糜烂或肠粘连；3分：高度充血水肿，表面有坏死及溃疡形成，面积 $<1\text{cm}^2$ ，肠壁增厚或表面有坏死及炎性息肉；4分：重度充血水肿，粘膜坏死及溃疡形成，面积 $>1\text{cm}^2$ 或全肠壁坏死。测量全结肠长度并称重，计算肠重指数（肠重指数=全结肠重量/全结肠长度）。取一块病变部位结肠组织（约 $0.5\times 0.5\text{cm}^2$ ），甲醛固定，石蜡包埋，HE染色，光镜下观察病理组织学变化。另取结肠病变部位组织一块， $-70^\circ\text{C}$ 保存，匀浆后测定髓过氧化物酶（MPO）活性，测定方法按试剂盒方法进行。MPO是中性粒细胞中含量较高的一种酶（在单核和巨噬细胞中也有少量存在），其含量的增高可以反映中性粒细胞在某一组织中的增高，间接反映炎症在组织中的存在。因此，凡是存在中性粒细胞浸润的组织都可以通过MPO活性测定来决定细胞浸润程度。

（3）统计学分析 实验数据以均值 $\pm$ 标准差表示，统计方法采用t检验或Ridit分析。

## 实验结果

### （1）莽草酸对大鼠乙酸性结肠炎的影响

大鼠经乙酸处理后即出现粪便性状改变，粪便稀或粘液样，且粪便隐血试验阳性，结肠出现类似于人类炎症性肠病的连续性病变，表现为粘膜高度充血水肿，表面有坏死及溃疡形成，溃疡成点片状，甚或出现节段性肠壁溃疡。部分动物甚至发生中毒性巨结肠导致死亡。粘膜病理改变表现为粘膜上皮脱落，缺损，充以大量的炎性白细胞及淋巴细胞，有溃疡、坏死组织形成；肠粘膜隐窝局部或弥漫性消失，黏蛋白分泌减少或缺如；溃疡周围见水肿、充血及出血。造模后大鼠体重降低，因炎症、水肿、溃疡形成等而使全结肠长度缩短，重量增加。模型组粘膜损伤指数、粪便隐血（OB）程度和MPO

水平均比正常组明显升高,表明模型复制成功。莽草酸可改善造模后大鼠的体重降低,可减轻乙酸性结肠炎大鼠的粘膜损伤指数和粪便 OB 程度,降低炎性部位结肠 MPO 水平,表明对结肠组织中性粒细胞具有清除作用,并对大鼠结肠粘膜病理损伤改善作用,说明莽草酸对乙酸引起的大鼠结肠粘膜损伤具有明显的保护作用(结果见表 1, 2)。

表 1 莽草酸对乙酸致大鼠溃疡性结肠炎的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	动物数	体重	结肠长度	结肠重量	肠重指数	粘膜损伤指数
	$/g \cdot kg^{-1}$		$/g$	$/cm$	$/g$	$/g \cdot cm^{-1}$	
对照组		10	$301.1 \pm 16.9$	$17.4 \pm 0.9$	$1.33 \pm 0.17$	$0.08 \pm 0.01$	$0 \pm 0$
模型组		9	$224.7 \pm 34.5^{\Delta\Delta}$	$13.8 \pm 1.9^{\Delta\Delta}$	$2.47 \pm 0.70^{\Delta\Delta}$	$0.18 \pm 0.06^{\Delta\Delta}$	$2.9 \pm 1.2^{\Delta\Delta}$
SA 组	0.40	10	$263.9 \pm 17.9^{**}$	$15.7 \pm 1.2^{*}$	$1.97 \pm 0.20^{*}$	$0.13 \pm 0.02^{**}$	$1.6 \pm 0.8^{*}$
	0.20	9	$242.1 \pm 18.0$	$15.1 \pm 1.1$	$2.01 \pm 0.44$	$0.13 \pm 0.03^{*}$	$2.0 \pm 0.7$
SASP 组	0.50	10	$258.5 \pm 15.6^{*}$	$15.4 \pm 1.2^{*}$	$1.92 \pm 0.27^{*}$	$0.12 \pm 0.02^{**}$	$1.8 \pm 0.8^{*}$

注: 与对照组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$

表 2 莽草酸对乙酸性结肠炎大鼠 OB 和 MPO 活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	动物数	OB <sup>#</sup>	MPO $/U \cdot g^{-1}$
对照组		10	$1.0 \pm 0.0$	$0.14 \pm 0.04$
模型组		9	$2.0 \pm 0.7^{\Delta\Delta}$	$0.55 \pm 0.15^{\Delta\Delta}$
SA 组	0.40	10	$1.2 \pm 0.4^{*}$	$0.27 \pm 0.10^{**}$
	0.20	9	$1.4 \pm 0.5$	$0.41 \pm 0.13^{*}$
SASP 组	0.50	10	$1.3 \pm 0.5^{*}$	$0.29 \pm 0.12^{**}$

注: 与对照组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$

#: 由于大鼠饲料用隐血试剂测试时呈弱阳性(+), 所以正常对照组大鼠 OB 值为  $1.0 \pm 0.0$ 。



## 实施例 2 莽草酸对乙酸性结肠炎大鼠肠粘膜氧化损伤的影响

### 实验材料

(1) 动物 SD 大鼠, 清洁级, 雄性, 体重 220~240g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证编号: scxk(京) 2002-0003。

(2) 药物与试剂 阳性对照药: 柳氮磺吡啶片 (SASP), 上海三维制药有限公司生产; 冰乙酸为北京化工厂产品; 超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒, 丙二醛 (MDA) 测试盒, 一氧化氮测试盒 (硝酸还原酶法), 一氧化氮合酶 (NOS) 测试盒, 蛋白测定 (考马斯亮兰法) 试剂盒, 以上测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。

(3) 仪器 高速组织匀浆仪, D-37520 型高速低温离心机, 722 分光光度计, OHAUS 分析天平等。

### 实验方法

#### (1) 大鼠乙酸性结肠炎模型的制备

大鼠实验室常规饲养, 造模前禁食 24h, 同时灌胃给予 10% 的  $\text{MgSO}_4$  溶液致泻, 3mL/只, 一日两次。将禁食 24h 的大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 ( $250\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 用聚乙烯导管 ( $\Phi 2\text{mm}$ ) 经肛门插入大鼠结肠内, 头端距肛门 8cm 左右, 缓慢注入体积分数为 6% 的乙酸 2mL, 作用 20s 后立即注入 5mL 生理盐水冲洗, 连续 2 次。正常对照组给予生理盐水灌肠。造模 24h 后开始给药。

#### (2) 实验分组及观察指标

实验设正常对照组、模型对照组、阳性药物对照组 ( $\text{SASP } 0.50\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、莽草酸 (SA) 给药组 ( $0.40, 0.20 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 灌胃给药, 每天 2 次, 连续 6d。正常及模型对照组均给予等量的蒸馏水。

于造模后第七天, 将禁食 24h 的大鼠以 10% 的水合氯醛 ( $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 腹腔注射麻醉, 颈总动脉放血, 背位固定。大鼠剖开腹部, 取出全结肠。沿肠系膜纵向剪开结肠, 以冷生理盐水冲洗掉肠内容物, 肉眼观察结肠粘膜损伤的情况。取结肠病变部位组织一块,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存, 匀浆测定结肠组织 MDA 和 NO 含量以及 SOD 和 T-NOS、iNOS 活性, 测定方法均按测试盒方法进行。

(3) 统计学分析 实验数据以均值 $\pm$ 标准差表示, 统计方法采用 t 检验。

### 实验结果

氧化损伤在乙酸性结肠炎大鼠结肠粘膜损伤过程中起重要作用, 表现为受损肠组织中 MDA 含量明显增加, SOD 水平降低; 并且受损肠组织中 NO 含量明显增加, T-NOS 和 iNOS 活性升高。莽草酸可降低大鼠结肠炎肠组织 MDA 含量, 增加 SOD 水平; 并可降低大鼠结肠炎肠组织 NO 含量以及 T-NOS 和 iNOS 活性。表明莽草酸对大鼠结肠炎的治疗作用部分通过抗氧化损伤而产生 (结果见表 3, 4)。

表 3 莽草酸对乙酸性结肠炎大鼠 MDA 和 SOD 的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	动物数	MDA / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
对照组		10	$0.61\pm 0.08$	$47.14\pm 5.37$
模型组		9	$1.51\pm 0.61^{\Delta\Delta}$	$33.83\pm 7.29^{\Delta\Delta}$
SA 组	0.40	10	$0.92\pm 0.18^{**}$	$44.49\pm 5.96^{**}$
	0.20	9	$1.04\pm 0.22^{*}$	$43.19\pm 8.25^{*}$
SASP 组	0.50	10	$0.98\pm 0.17^{*}$	$42.56\pm 5.11^{**}$

注: 与对照组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ;

与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$

表4 莽草酸对乙酸性结肠炎大鼠 NO 和 NOS 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数	NO $/\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	T-NOS $/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	iNOS $/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
对照组		10	$0.66 \pm 0.18$	$0.59 \pm 0.14$	$0.07 \pm 0.04$
模型组		9	$1.20 \pm 0.47^{\Delta}$	$1.40 \pm 0.21^{\Delta\Delta}$	$0.29 \pm 0.11^{\Delta\Delta}$
SA 组	0.40	10	$0.75 \pm 0.18^*$	$0.78 \pm 0.21^{**}$	$0.12 \pm 0.07^{**}$
	0.20	9	$0.89 \pm 0.24$	$1.10 \pm 0.23^*$	$0.20 \pm 0.10$
SASP 组	0.50	10	$0.80 \pm 0.19^*$	$0.86 \pm 0.20^{**}$	$0.13 \pm 0.08^{**}$

注：与对照组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；

与模型组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$

综上所述，可以证明，莽草酸能够用于制备治疗溃疡性结肠炎药物的应用。