



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103494794 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201310464314. 2

(22) 申请日 2013. 10. 08

(71) 申请人 上海中医药大学

地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路 1200  
号

(72) 发明人 季莉莉 王峥涛 龚陈媛 杨莉  
余增洋

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253

代理人 冯子玲

(51) Int. Cl.

A61K 31/09 (2006. 01)

A61P 27/02 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

联苕类化合物的医药用途

(57) 摘要

本发明涉及医药学领域,特别是涉及一种毛兰素、杓唇石斛素以及石斛酚等联苕类化合物的医药用途及其药物组合物。本发明的联苕类化合物可用于制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂。

1. 毛兰素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。
3. 一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,其特征在于,它包含治疗有效量的毛兰素。
4. 枸橼石斛素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。
5. 如权利要求 4 所述的应用,其特征在于,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。
6. 一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,其特征在于,它包含治疗有效量的枸橼石斛素。
7. 石斛酚在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。
8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。
9. 一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,其特征在于,它包含治疗有效量的石斛酚。

## 联苳类化合物的医药用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药保健品领域,特别是涉及一种联苳类化合物的医药用途及其药物组合物。

### 背景技术

[0002] 视网膜新生血管性疾病是指因为视网膜内新生血管的生长,并伴随出血、渗出、增生等病理性的改变从而致盲的眼部疾病。目前,视网膜新生血管性疾病已经日渐成为世界范围内最严重的致盲性眼病之一,包括糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)、早产儿视网膜病变(Retinopathy of prematurity, ROP)、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜血管阻塞性疾病、视网膜静脉周围炎等。

[0003] 石斛(Dendrobium)为兰科石斛属植物,其作为一种名贵中药在《本草纲目》中已有收载,在《神农本草经》中更是被列为上品,其具有滋阴清热、生津养胃、明目的功效。鼓槌石斛(Dendrobium chrysotoxum Lindl.)是石斛一个重要品种,收载于中华人民共和国药典(2010版),具有益胃生津,滋阴清热的药效。研究证实,从鼓槌石斛中提取获得的联苳类化合物主要包括毛兰素(Erianin)、枸唇石斛素(Moscatilin)、石斛酚(Gigantol)等。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的旨在提供一种联苳类化合物的新的医药用途及其药物组合物。

[0005] 具体地说,本发明第一方面是提供了毛兰素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

[0006] 在一优选例中,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0007] 本发明的第二方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,它包含治疗有效量的毛兰素。

[0008] 本发明的第三方面是提供了枸唇石斛素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

[0009] 在一优选例中,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0010] 本发明的第四方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,它包含治疗有效量的枸唇石斛素。

[0011] 本发明的第五方面是提供了石斛酚在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

[0012] 在一优选例中,所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0013] 本发明的第六方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物,其特征在于,它包含治疗有效量的石斛酚。

[0014] 本发明各个方面的细节将在随后的章节中得以详尽描述。通过下文以及权利要求的描述,本发明的特点、目的和优势将更为明显。

### 附图说明

[0015] 图1体现了本发明的 Erianin 和 Moscatilin (10  $\mu$ M)对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞

增殖的抑制作用。(Data=Mean±SEM, n=3, 与 Blank 比较 \*P<0.05; 与 VEGF (10ng/ml) 比较 \*P<0.05, \*\*\*P<0.001);

[0016] 图 2 体现了本发明的 Gigantol (25 μM) 对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖的抑制作用。(Data=Mean±SEM, n=5, 与 Blank 比较 \*\*\*\*P<0.001; 与 VEGF(10ng/ml) 比较 \*\*\*P<0.001);

[0017] 图 3 体现了本发明的 Erianin 对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖的抑制作用。(Data=Mean±SEM, n=3, 与 Blank 比较 \*P<0.05, 与 VEGF (10ng/ml) 比较 \*P<0.05, \*\*\*P<0.001);

[0018] 图 4 体现了本发明的 Erianin 对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞管腔形成的影响。其中, A 为管腔照片, 于显微镜下拍摄, B 为管腔数目统计柱状图。(Data=Mean±SEM, n=3, 与 Blank 比较 \*\*\*\*P<0.001, 与 VEGF (10ng/ml) 比较 \*\*\*P<0.001);

[0019] 图 5 体现了本发明的 Moscatilin 对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖的抑制作用。(Data=Mean±SEM, n=3, 与 Blank 比较 \*P<0.05, 与 VEGF (10ng/ml) 比较 \*P<0.05);

[0020] 图 6 体现了本发明的 Moscatilin 对 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞管腔形成的影响。其中, A 为管腔照片, 于显微镜下拍摄, B 为管腔数目统计柱状图。(Data=Mean±SEM, n=3, 与 Blank 比较 \*\*\*\*P<0.001, 与 VEGF (10ng/ml) 比较 \*\*\*P<0.001)。

## 具体实施方式

[0021] 本发明的问世部分是基于这样一个意外发现: 毛兰素(Erianin)、枸橼石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)等联苄类化合物可以显著抑制 VEGF 诱导的视网膜血管内皮细胞 RF-6A 的增殖。因此, 上述化合物可有望开发成为一种抑制 RF-6A 细胞增殖的物质即 RF-6A 细胞增殖抑制剂。如本领域的技术人员所知, 所述的“RF-6A 细胞增殖抑制剂”可以是各种形式的物质, 包括但不限于: 药物、保健品、食品等等。进而, 用毛兰素(Erianin)、枸橼石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)等联苄类化合物制备的“RF-6A 细胞增殖抑制剂”可用于防治各种视网膜新生血管性疾病, 这些疾病包括但不限于: 糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)、早产儿视网膜病变(Retinopathy of prematurity, ROP)、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜血管阻塞性疾病、视网膜静脉周围炎等。

[0022] 进而, 本发明的第一方面是提供了毛兰素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

[0023] 较优选例中, 所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0024] 本发明的第二方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物, 它包含治疗有效量的毛兰素。

[0025] 本发明的第三方面是提供了枸橼石斛素在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

[0026] 在一优选例中, 所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0027] 本发明的第四方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物, 它包含治疗有效量的枸橼石斛素。

[0028] 本发明的第五方面是提供了石斛酚在制备 RF-6A 细胞增殖抑制剂中的应用。

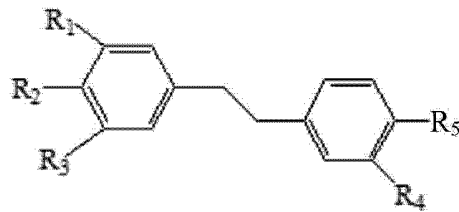
[0029] 在一优选例中, 所述的 RF-6A 细胞增殖由 VEGF 诱导产生。

[0030] 本发明的第六方面是提供了一种可抑制视网膜血管新生的药物组合物, 其特征在

于,它包含治疗有效量的石斛酚。

[0031] 如本领域的技术人员所知,毛兰素(Erianin)、杓唇石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)等三种联苳类化合物具有如下结构通式:

[0032]



[0033]	其中	bibenzyl	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
		Erianin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
		Gigantol	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
		Moscatilin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

[0034] 本发明的上述三种联苳类化合物可通过商业途径从 Sigma 化学公司、成都曼斯特生物科技有限公司等处购买获得,亦用本领域的常规方法从鼓槌石斛中提取获得。其纯度均符合药用标准。

[0035] 以将本发明的毛兰素(Erianin)、杓唇石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)等三种联苳类化合物制成药物为例。本发明的联苳类化合物可以单独使用或以药物组合物的形式使用。药物组合物包括作为活性成分的本发明的联苳类化合物及可药用载体。较佳地,本发明的药物组合物含有 0.1-99.9% 重量百分比的作为活性成分的本发明的联苳类化合物。“可药用载体”不会破坏本发明的联苳类化合物的药学活性,同时其有效用量,即能发挥药物载体作用时的用量对人体无毒。

[0036] 所述可药用载体包括但不限于:软磷脂、硬脂酸铝、氧化铝、离子交换材料、自乳化药物传递系统、吐温或其他表面活性剂、血清蛋白、缓冲物质如磷酸盐、氨基乙酸、山梨酸、水、盐、电解质如硫酸盐精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅酸镁、饱和脂肪酸部分甘油酯混合物等。

[0037] 其他常用的药物辅料如粘合剂(如微晶纤维素)、填充剂(如淀粉、葡萄糖、无水乳糖和乳糖珠粒)、崩解剂(如交联 PVP、交联羧甲基淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素)、润滑剂(如硬脂酸镁)以及吸收促进剂、吸附载体、香味剂、甜味剂、赋形剂、稀释剂、润湿剂等。

[0038] 本发明的联苳类化合物以及其药物组合物可按本领域常规方法制备并可以通过肠道或非肠道或局部途径给药。口服制剂包括胶囊剂、片剂、口服液、颗粒剂、丸剂、散剂、丹剂、膏剂等;非肠道给药制剂包括注射液等;局部给药制剂包括霜剂、贴剂、软膏剂、喷雾剂等。优选为口服制剂。

[0039] 本发明的联苳类化合物以及其药物组合物的给药途径可以为口服、舌下、经皮、经肌肉或皮下、皮肤粘膜、静脉、尿道、阴道等。

[0040] 除了制成药剂之外,亦可在本发明的联苳类化合物中加入抗氧化剂、色素、酶制剂等各种食品添加剂,按本领域的常规方法制成保健食品。

[0041] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

[0042] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0043] 本发明提到的上述特征,或实施例提到的特征可以任意组合。本专利说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0044] 实施例 1:毛兰素等联苳类化合物体外抑制视网膜血管新生的活性

[0045] 血管内皮细胞的增殖和管腔形成是体外评价血管新生的主要实验方法。本发明人在恒河猴视网膜血管内皮细胞 RF/6A 细胞上,观察了联苳类化合物毛兰素(Erianin)、杓唇石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)对重要的促血管因子血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)促进视网膜血管新生的影响。在 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖实验中,联苳类化合物中的 Erianin (10  $\mu$ M) 与 Moscatilin (10  $\mu$ M) 能显著抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖,而 Tristin、Gigantol、4,4'-di hydroxy-3,5-dimethoxy bibenzyl (DC-18) 未显示出明显的抑制作用,进一步实验发现 Gigantol (25  $\mu$ M) 也具有一定的抑制活性,而 Tristin 则仍无活性。同时 Erianin 与 Moscatilin 可以显示良好的抑制 VEGF 诱导 RF/6A 细胞管腔形成的活性。由此可见,联苳类化合物毛兰素(Erianin)、杓唇石斛素(Moscatilin)以及石斛酚(Gigantol)体外可以抑制由 VEGF 诱导的视网膜血管新生,而 VEGF 是参与视网膜血管新生的最主要的促血管新生因子。

[0046] 2.1 实验材料和方法

[0047] 试剂:胎牛血清(FBS)、1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶、Matrigel、ECGS (endothelial cell growth supplement) 均购自 Gibco 公司。VEGF (isoform165) 购于 PeproTech。明胶、I 型胶原酶、溴化 -3 (4,5-二甲基噻唑 -2)2,5-二甲基四氮唑(MTT)购自 Sigma 公司。肝素(生工生物工程有限公司),BSA (Life sciences)。其它试剂购于国药试剂,均为分析纯。

[0048] 药物配制:用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成母液浓度为 0.1mol/L,母液均用一次性灭菌滤器(0.22  $\mu$ M)过滤灭菌。加药时用无血清 RPMI1640 培养基配制,使 DMSO 在培养中总浓度不超过 0.1%。

[0049] RF-6A 细胞株:购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

[0050] 药物抑制 VEGF 诱导 RF/6A 细胞增殖实验:

[0051] 取对数生长期的细胞,将细胞制成细胞悬液,按一定的浓度铺入 96 孔板中,待细胞贴壁生长状态良好时,弃原培养基,换含 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,加入待测药物 15 分钟后,加入 VEGF 与细胞共孵 48 小时后,加入 10  $\mu$ l MTT (终浓度 0.5mg/ml)置培养箱反应 4 小时,加入 50  $\mu$ l 三联剂(10%SDS-5%异丁醇-0.01M HCL)于培养箱中充分溶解 12 小

时以上,最后在 OD570/630nm 处测定吸光值。细胞存活率(%)= 给药组 OD (570nm-630nm)/ 对照组 OD (570nm-630nm) × 100%, 对照组加含等量 DMSO 的细胞培养液而不加任何药物。

[0052] 药物抑制 VEGF 诱导 RF-6A 细胞管腔形成实验

[0053] 将 Matrigel 于 4℃ 溶解后,铺入 96 孔板中,30 μl/ 孔,等 30min 待胶凝固,将 0.1%BSA 饥饿 4h 后的对数期 RF-6A 细胞制成细胞悬液,铺入 96 孔板中,密度为  $1 \times 10^4$ , 100 μl/ 孔。分别加入不同浓度的药物与细胞共同孵育 15min 后,除 Control 孔外均加入 VEGF (10ng/ml) 于培养箱中 37℃ 培养 4h,之后于显微镜下观察,计算管腔形成数目,并拍照。

[0054] 2.2 实验结果

[0055] 2.2.1 联苳类化合物在 RF-6A 上抑制 VEGF 诱导的细胞增殖实验

[0056] 从图 1、图 2 可见,联苳类化合物中的 Erianin 和 Moscatilin 在 10 μM 都能显著抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖,25 μM Gigantol、DC-18 可以抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖,而 Tristin 未显示出明显的抑制作用。

[0057] 2.2.2 Erianin 抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖

[0058] 从图 3 可见,VEGF 能明显诱导 RF-6A 细胞的增殖,Erianin 抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖最低有效剂量为 25nM,且其抑制作用具有一定的剂量依赖关系。

[0059] 2.2.3 Erianin 抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞管腔形成

[0060] 从图 4 可见,VEGF 能显著诱导 RF-6A 细胞的管腔形成,Erianin 能显著抑制其诱导的 RF-6A 细胞管腔形成,最低有效浓度为 1nM,且具有明显的剂量依赖关系。

[0061] 2.2.4 Moscatilin 抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖

[0062] 从图 5 可见,Moscatilin 能显著抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞增殖,最低有效浓度为 10 μM,且作用呈明显的剂量依赖关系。

[0063] 2.2.5 Moscatilin 抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞管腔形成

[0064] 从图 6 可见,Moscatilin 能显著抑制 VEGF 诱导的 RF-6A 细胞管腔形成,最低有效浓度为 1 μM,且作用呈明显的剂量依赖关系。

[0065] 实施例 2:毛兰素等联苳类化合物体外抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞增殖和 RF-6A 细胞增殖的活性比较

[0066] 实验材料和方法:

[0067] 试剂:胎牛血清(FBS)、1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶、Matrigel、ECGS (endothelial cell growth supplement) 均购自 Gibco 公司。VEGF (isoform165) 购于 PeproTech。明胶、I 型胶原酶、溴化 -3 (4,5- 二甲基噻唑 -2)2,5- 二甲基四氮唑(MTT)购自 Sigma 公司。肝素(生工生物工程有限公司),BSA (Life sciences)。其它试剂购于国药试剂,均为分析纯。

[0068] 药物配制:用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成母液浓度为 0.1mol/L,母液均用一次性灭菌滤器(0.22 μM)过滤灭菌。加药时用无血清 RPMI1640 培养基配制,使 DMSO 在培养中总浓度不超过 0.1%。

[0069] RF-6A 细胞株:购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

[0070] HUVEC 细胞的分离培养:取无菌条件下健康产妇分娩的胎盘端脐带,置于 4℃ HBSS 中送回细胞培养室。在脐静脉一段插入灌胃注射针头,用止血钳固定,注入 HBSS 冲洗数

遍以除去残留血液。洗净后,将另一端用止血钳封闭,注入 0.25% 胰蛋白酶: I 型胶原酶 (1:1),注满后将两端封闭,放入 HBSS 中,37℃ 孵育 15min。消化后取出脐带,消化液转入 50ml 离心管中,脐带用含 20% 血清 M199 培液冲洗,洗液并入离心管。1000r · min<sup>-1</sup>, 离心 3min,弃上清,沉淀用 20%FBS M199 培液重悬,转入培养皿中,加入 30ng · ml<sup>-1</sup>ECGS,5U · ml<sup>-1</sup> 肝素,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶:0.04%EDTA 消化及传代,取处于对数生长期的细胞用于实验。

[0071] 药物抑制 VEGF 诱导 RF/6A 和 HUVEC 细胞增殖实验:

[0072] 取对数生长期的细胞,将细胞制成细胞悬液,按一定的浓度铺入 96 孔板中,待细胞贴壁生长状态良好时,弃原培养基,换含 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,加入待测药物 15 分钟后,加入 VEGF 与细胞共孵 48 小时后,加入 10 μl MTT (终浓度 0.5mg/ml)置培养箱反应 4 小时,加入 50 μl 三联剂(10%SDS-5%异丁醇-0.01M HCL)于培养箱中充分溶解 12 小时以上,最后在 OD570/630nm 处测定吸光值。细胞存活率(%) = 给药组 OD (570nm-630nm) / 对照组 OD (570nm-630nm) × 100%,对照组加含等量 DMSO 的细胞培养液而不加任何药物。以 VEGF 诱导组为对照计算抑制率,并计算药物的半数有效抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

[0073] 实验结果:

[0074]

细胞种类	半数抑制浓度 (IC <sub>50</sub> )		
	Erianin	Moscatilin	Gigantol
脐静脉内皮细胞 (HUVEC)	1.02 μmol/L	10.8 μmol/L	52.6 μmol/L
视网膜内皮细胞(RF/6A)	0.028 μmol/L	9.75 μmol/L	49.2 μmol/L

[0075] 从上表可见,Erianin 在视网膜内皮细胞上抑制 VEGF 诱导细胞增殖的 IC<sub>50</sub> 为 0.028 μmol/L,而在 HUVEC 上为 1.02 μmol/L,两者相差 36.4 倍,说明 Erianin 对视网膜内皮细胞的活性要远大于脐静脉内皮细胞。而 Moscatilin 和 Gigantol 在两种细胞上对 VEGF 诱导的细胞增殖的抑制没有明显的区别。

[0076] 本发明所涉及的多个方面已做如上阐述。然而,应理解的是,在不偏离本发明精神之前提下,本领域专业人员可对其进行等同改变和修饰,所述改变和修饰同样落入本申请所附权利要求的覆盖范围。



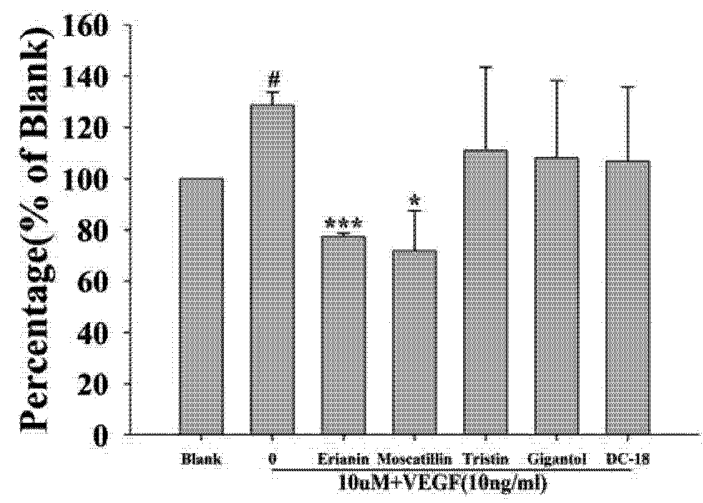


图 1

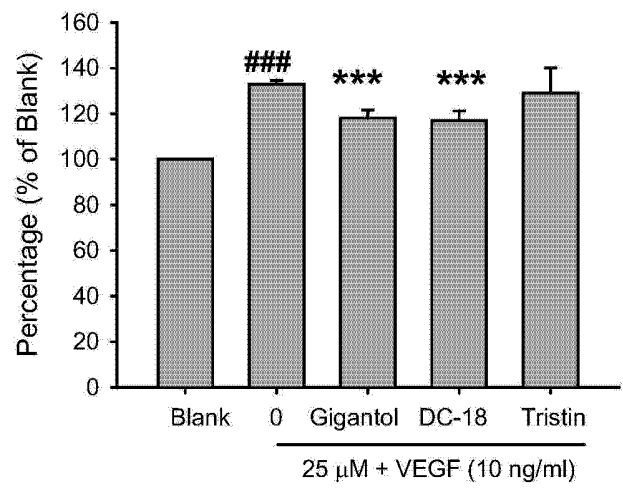


图 2

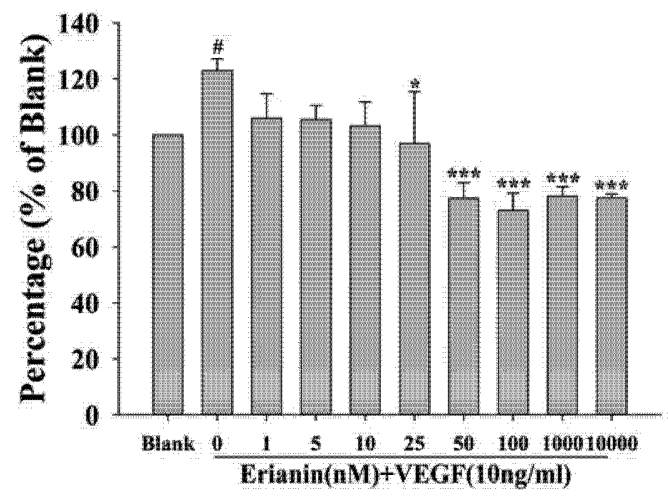


图 3

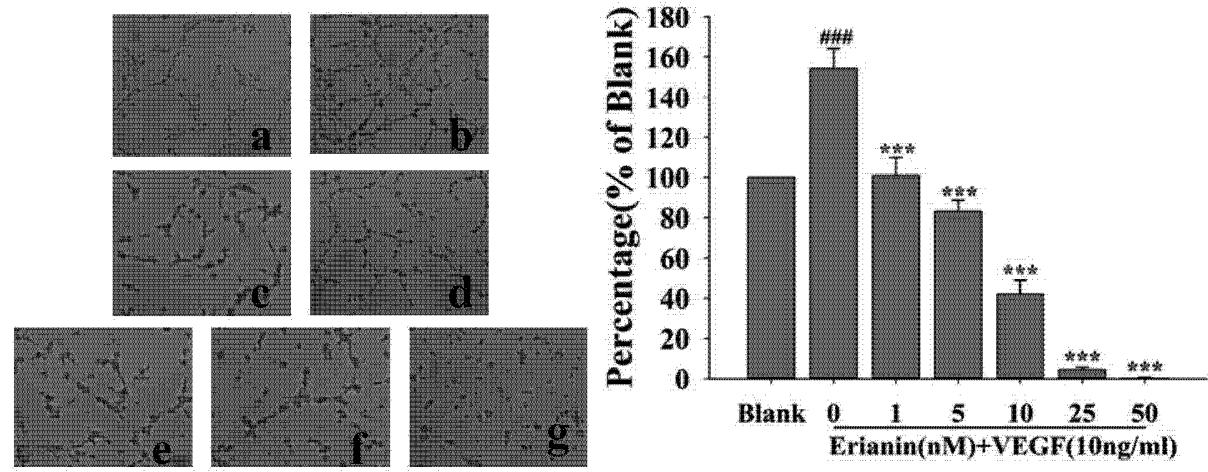


图 4

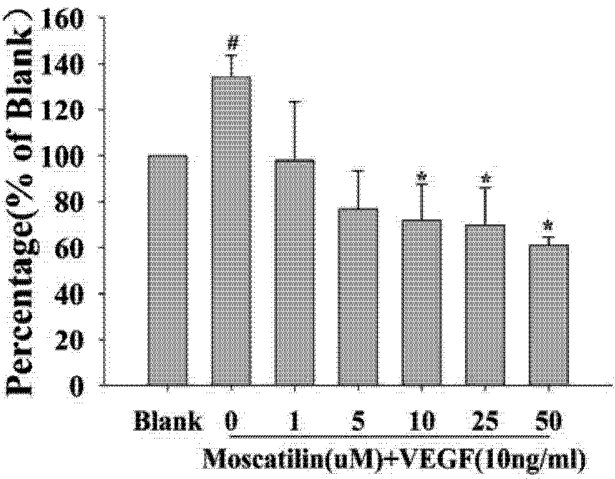


图 5

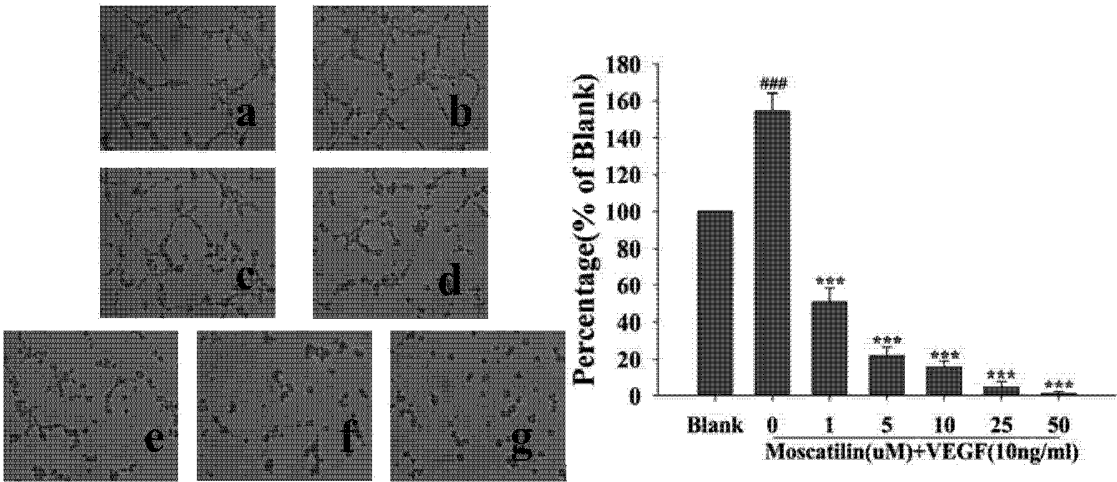


图 6