

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/365 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710185342.5

[43] 公开日 2008 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 101229153A

[22] 申请日 2007.12.10

[21] 申请号 200710185342.5

[71] 申请人 河北医科大学

地址 050000 河北省石家庄市中山路 361 号

[72] 发明人 韩 梅 温进坤 张嫡群 王云志
石晓伟

[74] 专利代理机构 石家庄国域专利商标事务所有限
公司

代理人 白海静

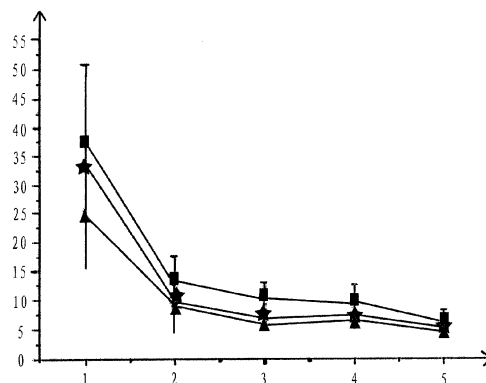
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

旋覆花内酯在制备抗痴呆症药物制剂中的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种旋覆花内酯的新医药用途，即旋覆花内酯在制备抗痴呆症药物制剂中的应用。本发明人经长期研究发现旋覆花内酯具有提高记忆力和认知能力的功能。鉴此发明了其在制备抗痴呆症药物制剂中的应用，它为临床治疗痴呆症提供了一种新的用药选择。



-
- 1、 旋覆花内酯在制备抗痴呆症药物制剂中的应用。

旋覆花内酯在制备抗痴呆症药物制剂中的应用

技术领域

本发明涉及植物提取物的医药用途，具体地说是一种旋覆花内酯的新医药用途。

背景技术

欧亚旋覆花，是一种传统的中草药，具有活血化瘀，抗炎止痛之功效。旋覆花内酯是从欧亚旋覆花提取出的一种结构上属于苯并呋喃酮衍生物的一组化合物。它主要包括大花旋覆花内酯、乙酰大花旋覆花内酯（1-O-Acetylbritannilactone）、二乙酰大花旋覆花内酯、土木香内酯，环醚大花旋覆花内酯。近年来，人们对旋覆花内酯的药理活性进行了广泛的研究。研究发现旋覆花内酯具有抑制一氧化氮合酶的活性和抗炎活性（详见参考文献：Je KH, Han AR, Lee HT, et al. The inhibitory principle of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from *Inula britannica* var. *chinensis*. Arch Pharm Res, 2004,27:83-85.）；同时也具有抑制白血病细胞毒活性和肝癌细胞毒活性（详见参考文献：Liu S, Liu H, Yan W, et al. Studies on 1-O-acetylbritannilactone and its derivative, (2-O-butyloxime-3-phenyl)-propi-only-1-O-acetylbritannilactone ester. Bioorg Med Chem Lett, 2004,14:1101-1104.）。目前人们正在继续研究探寻旋覆花内酯具有更多更好的医药新用途。

发明内容：

本发明的目的就是要提供一种旋覆花内酯的新医药用途。

本发明的目的是这样实现的：

本发明人经长期研究发现旋覆花内酯具有提高记忆力和认知能力的功能。鉴此发明了其在制备抗痴呆症药物制剂中的应用。

痴呆症主要包括有老年痴呆症和血管性痴呆症。老年性痴呆症（AD）是老年人的常见病之一，主要表现为记忆力减弱及识别能力障碍，是一种渐进性的神经功能退化性疾病。血管性痴呆症（VD）是由一系列脑血管因素导致脑组织损害而产生的痴呆症的总称，又称为多梗塞痴呆症。其占有痴呆症的30%左右。血管性痴呆症是以遇事善忘，不能定向，理解错误，计算能力差等为主要特征的精神障碍性疾病。AD的病因至今尚未明了，其发病机制有多种学说，其中以 β -

淀粉样蛋白学说, tau蛋白过度磷酸化学说和基因突变学说为主, 但这些均不能完整地解释AD的发生。对于痴呆症迄今还没有十分理想的药物。

本发明提供了旋覆花内酯的一种新的医药用途, 它为临床治疗痴呆症提供了一种新的药物选择。

本发明以旋覆花内酯为活性成分与药学上可以接受的载体组合制备成适于人体接受的各种药物制剂。

以上所述的药学上可以接受的载体是指药学领域常规的药物载体, 它包括有稀释剂(如水)、赋形剂(如淀粉), 黏合剂(如糊精、纤维素衍生物等)、崩解剂、湿润剂、吸收剂、缓释剂、甜味剂、芳香剂等等。

本发明化合物可经口服或不经口服给药, 施用量可根据给药途径、患者的年龄、体重、疾病的严重程度等情况的不同而各有不同, 对成年人来说, 每天50---1000mg比较合适。

本发明化合物用于口服给药时, 首先以该化合物为活性成分与常规的固体辅料如赋形剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等混合, 将其制成颗粒剂、胶囊剂、片剂等固体药物剂型; 制成口服液体制剂时, 可与水或糖浆制成口服液; 非经口服给药时可以注射液、输液剂或栓剂等形式给药。所有制备方法均可采用常规的药物制剂技术。

本发明所述的旋覆花内酯可以按照常规药物提取技术从欧亚旋覆花中提取。

提取旋覆花内酯的方法包括溶剂浸提法、溶剂回流法、渗漉法、溶剂超声法、溶剂微波提取法、水提醇沉法、醇提水沉法、透析法、盐析法、萃取法、水蒸汽蒸馏法、超滤法、聚酰胺吸附法、硅胶吸附法、多孔聚合物吸附法、大孔树脂吸附法、氧化铝吸附法、活性炭吸附法、醋酸纤维素吸附法、葡聚糖凝胶法和超临界萃取法中的一种方法或两种以上的方法相结合, 优选提溶剂浸提法、溶剂回流法、渗漉法、溶剂超声法、大孔树脂吸附法, 更优选大孔树脂吸附法。

旋覆花内酯(以下简称ABL)所具有的新的药理活性通过以下试验得到证实。

1 资料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠30只(由河北省实验动物中心提供)鼠龄10~12月龄, 体重 364.5 ± 15.0 g, 随机分为三组: 对照组(简称a组)、模型组(简称

b组)和药物处理组(简称c组),每组10只。

1.2 试剂与仪器 ABL由河北医科大学药学院提取物制备; $A\beta_{25\sim35}$ 购自Sigma公司; NF- κ B, COX-2抗体购自Santa Cruz公司; 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司; 脑立体定向仪:江湾I型C, 上海川沙花木农机厂制造。

1.3 $A\beta_{25\sim35}$ 的孵育 用无菌生理盐水将 $A\beta_{25\sim35}$ 稀释成 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 37°C 孵育72 h, 使其变为聚集状态的 $A\beta_{25\sim35}$, 放在 4°C 冰箱备用。

1.4 药物海马内注射步骤 大鼠用质量浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌拉坦 $0.3\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后, 固定于脑立体定向仪上。参照大鼠脑立体定位图谱^[2], 以前囟为零点, $AP = -3.5\text{ mm}$, $ML = 2.0\text{ mm}$, $DV = 3.0\text{ mm}$ 为穿刺点, 钻孔穿颅, 用微量注射器将 $A\beta_{25\sim35}$ 各 $1\text{ }\mu\text{l}$ ($10\text{ }\mu\text{g}$) 在5 min缓慢注入, 留针5 min, 对照组注射等量的生理盐水, 退针缝合伤口。

1.5 给药方法 术前3天及术后18天, 药物处理组给 ABL $26\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 分两次灌胃, 模型组给予等量溶剂。

1.6 大鼠空间学习记忆能力测试(Morris水迷宫) 参照Morris实验方法进行, 用于测量大鼠学习和记忆能力。本实验所用水迷宫为一直径120 cm、高55 cm的圆形水池, 水池内壁被漆为黑色, 水深42 cm, 距池壁35 cm处放置一高40 cm, 直径8 cm圆台。实验历时5 d, 第1天让大鼠自由游泳2 min, 从第2天起, 每天分上、下午两段, 每段训练4次。训练时随机选择一个入水点, 将大鼠面向池壁放入水中, 记录大鼠寻找并爬上平台时所需时间(即潜伏期), 每次训练间隔为60 s。如果大鼠在120 s内未找到平台, 须将其引至平台, 这时潜伏期记为120 s。在第5天最后一次训练后撤除水下平台, 在同一入水点将大鼠面向池壁放入水中, 测其在120 s内跨过原平台相应位置的次数。

1.7 免疫组化染色法检测NF- κ B和COX-2 参照使用说明书进行。切片常规脱蜡至水, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 浸入EDTA缓冲液($\text{Ph} = 8.0$), 电炉加热至 $92^\circ\text{C} \sim 98^\circ\text{C}$ 20分钟, 冷却后PBS洗涤1~2次。3%过氧化氢室温孵育5~10 min, PBS洗2 min×3次。滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育20 min, 甩去多余液体。加入用PBS稀释的NF- κ B抗体(1:100)或COX-2抗体(1:50), 4°C 过夜, PBS冲洗3 min×3次。滴加生物素标记二抗, 37°C 温育15 min。PBS洗2 min×3次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37°C 温育10 min~15 min, PBS洗2 min×3次。DAB室温显色, 镜下控制反应时间。苏木素复染20 s, 自来水洗涤。常规脱水、透

明、封片,镜检。

1.8 Western blot检测NF- κ B和COX-2蛋白 分别取20 μ g和200 μ g总蛋白提取物与5 \times SDS上样缓冲液混合均匀,100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟,冰上冷却,上样于PAGE凝胶加样孔内,120V恒压电泳至溴酚蓝至凝胶底部。20V恒压分别20 min和50 min将凝胶上蛋白转移至PVDF膜,置于质量浓度为50 g \cdot L $^{-1}$ 的牛奶于37 $^{\circ}$ C封闭1 h。将膜分别浸入兔多抗NF- κ B (1: 400)、羊多抗COX-2 (1: 250)溶液,4 $^{\circ}$ C结合过夜。TTBS溶液洗膜,将膜浸入辣根过氧化物酶标记的二抗溶液 (1: 10000),37 $^{\circ}$ C反应1 h,TTBS溶液洗膜,化学发光法显色。

1.9 图像处理及统计学分析 采用美国Kodak公司数码成像分析软件对Western印记显色区带的信号强度进行相对定量分析。数据采用SPSS13.0软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间资料应用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2、实验结果

2.1 旋覆花内酯对大鼠学习记忆行为的影响 随着训练时段的增加,所有动物寻找站台的潜伏期越来越短,表明三组大鼠通过学习,均可对水下的站台产生空间定位记忆。训练第1天,模型组大鼠和药物处理组大鼠差别不具有统计学意义($P>0.05$),对照组大鼠与其两组大鼠比较,差别有统计学意义($P<0.05$);训练第2、3、4天,模型组大鼠平均潜伏期明显延长与其他两组比较差别具有统计学意义($P<0.05$),而药物处理组与对照组比较,两者之间的差异不具有统计学意义($P>0.05$);于训练第5天,三组大鼠达稳定水平,差别均无统计学意义($P>0.05$, Fig 1)。模型组大鼠最后一次跨平台次数 (7.6 ± 1.78),较对照组(12.4 ± 2.73) 药物处理组 (9.8 ± 2.23) 减少($P<0.05$),提示ABL对 $A\beta_{25-35}$ 所致AD 大鼠模型空间学习记忆能力障碍有明显的改善作用。实验结果: 详见图1。

2.2 旋覆花内酯对大鼠海马COX-2表达的影响 免疫组化染色阳性反应物为棕黄色,位于细胞膜和胞质,细胞核不着色;对照组表达量低,几乎不着色,模型组着色细胞数量多,染色深;药物处理组介于二者之间(详见图2a)。Western blot显示,对照组COX-2表达量低,模型组表达量明显增高,是对照组2.8倍($P<0.05$),旋覆花内酯处理后,表达明显下降,与模型组相比统计学差异具有显著性($P<0.05$),详见图2b。

2.3 旋覆花内酯抑制大鼠海马NF- κ B表达 免疫组化染色阳性反应物为棕

黄色，胞质与胞核均着色。对照组表达量低，模型组染色细胞数量多，染色深，旋覆花内酯药物处理组介于二者之间（详见图3a）。Western blot显示，对照组NF- κ B表达量低，模型组表达量增高，是对照组1.6倍（ $P<0.05$ ），旋覆花内酯处理后，表达明显下降，与模型组相比统计学差异具有显著性（ $P<0.05$ ）（详见图3b）。

附图说明

图1：对大鼠学习记忆行为的影响曲线图，其中横坐标上的数字为试验天数，纵坐标上的数字为潜伏期（秒）。图中的“—▲—”为对照组的曲线图。“—★—”为药物组的曲线图。“—■—”为模型组的曲线图。

图2a：大鼠海马COX-2表达的染色切片对照图。

图2b：大鼠海马COX-2表达的对照图。

图3a：大鼠海马NF- κ B表达的染色切片对照图。

图3b：抑制大鼠海马NF- κ B表达的对照图。

具体实施方式

实施例1 旋覆花内酯的提取制备

a、将欧亚旋覆花粉碎，50-95%乙醇提取，提取液减压浓缩至膏状；依次用石油醚，氯仿，乙酸乙酯和正丁醇萃取膏状物，取氯仿萃取物；

b、取a步骤中的氯仿萃取物进行加压硅胶柱层析，用氯仿-乙酸乙酯（10：1—0：10）进行梯度洗脱；将洗脱液依次等量分成3部分，浓缩；第1部分用30-95%乙醇重结晶得到二氧-二乙酰基大旋覆花内酯；第2部分用30-95%乙醇重结晶得到1-氧-乙酰基大旋覆花内酯；第3部分再经硅胶柱层析得到1-羟基-大旋覆花内酯。

c、收集合并上述提取物，获旋覆花内酯。

实施例2

旋覆花内酯口服液：

将250mg旋覆花内酯，溶于1000ml水中，制成0.25%浓度的水溶液，加热溶解，混合均匀，装入20ml药瓶中，封口、消毒。

实施例3旋覆花内酯

取旋覆花内酯2000mg，按注射剂常规制备方法，制成4mg/2ml/支浓度的注

射液，蒸汽流通灭菌30分钟。

实施例4

旋覆花内酯片剂：

取旋覆花内酯2000mg，按常规片剂制备方法，加入淀粉，糊精、硬酯酸镁等，混合制成湿粒，机器冲压成片，每片含旋覆花内酯25mg。

本发明的药物剂型不完全限于此，它可以制备成更多的剂型，如滴丸、胶囊剂、软胶囊剂、缓控释制剂等等。

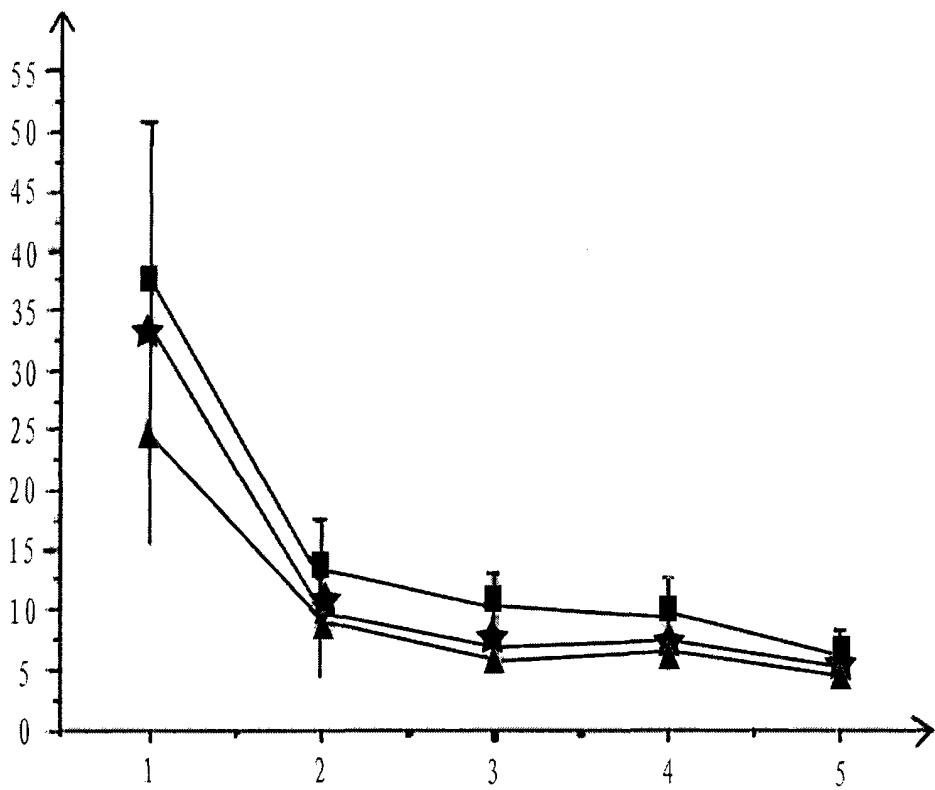


图 1

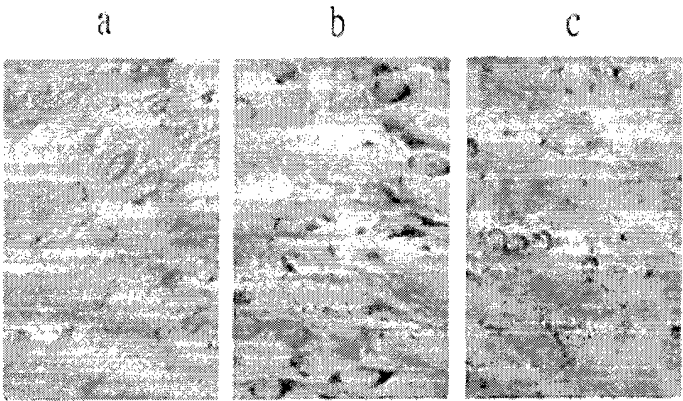


图2a

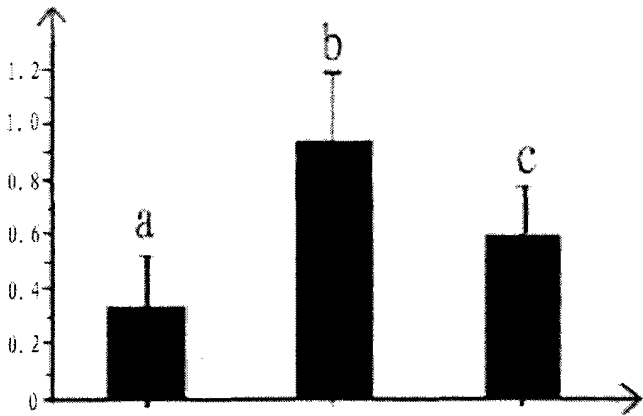


图2b

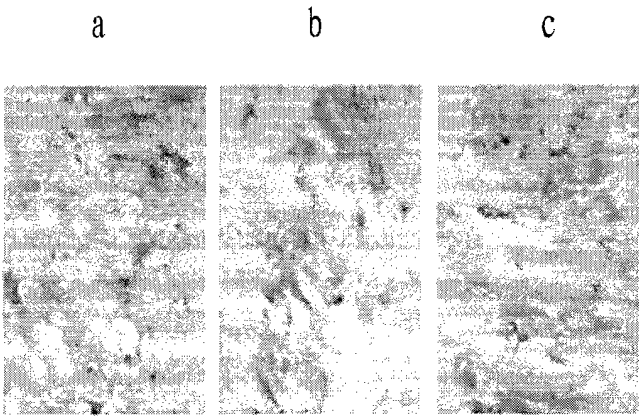


图3a

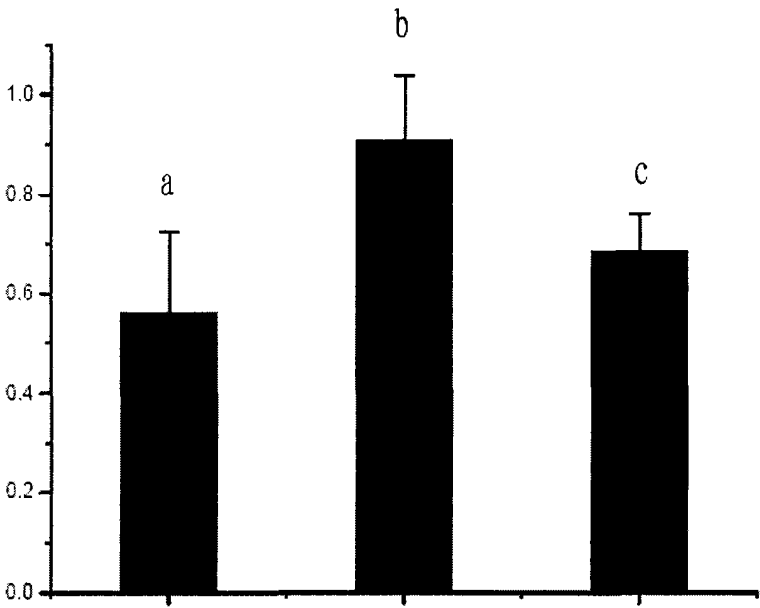


图3b