(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104918627 B
(45)授权公告日 2020.01.07

(21)申请号 201380039236.X

(22)申请日 2013.07.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104918627 A

(43)申请公布日 2015.09.16

(30)优先权数据
10-2012-0072390 2012.07.03 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2013/005892 2013.07.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/007536 KO 2014.01.09

(73)专利权人 庆熙大学校产学协力团
地址 韩国京畿道

(72)发明人 J·J·金 高恩贞 李宜庭

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟

(51)Int.Cl.
A61K 36/8965(2006.01)
A61K 36/539(2006.01)
A61K 36/79(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101288744 A,2008.10.22,
CN 101785835 A,2010.07.28,
詹菁等.中药直肠滴注治疗慢性溃疡性结肠炎30例.《湖北中医杂志》.1999,第21卷(第6期),

审查员 冯超

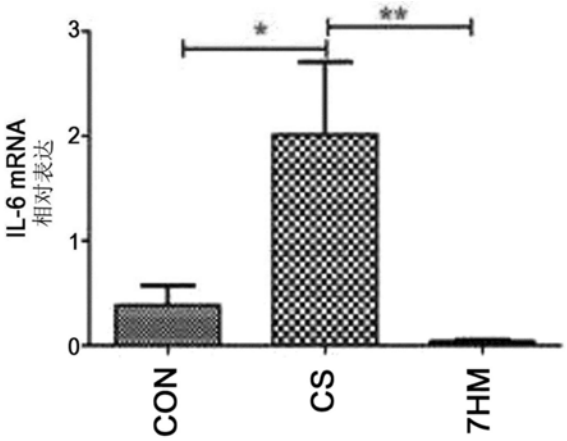
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

对于炎性肠疾病具有预防或治疗作用的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及一种药物组合物,其包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物,其用于抑制由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的发生;涉及通过使用所述组合物预防或治疗炎性肠疾病的方法,抑制炎性细胞因子表达的方法;并且涉及用于预防或改善由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的食品组合物,其包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物。根据本发明的药物组合物包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物,从而降低MMP12(已知其破坏伴随炎性肠疾病的炎性细胞因子IL-1β、TNF-α、IL-6和MCP-1、和弹性蛋白和胶原蛋白)的表达水平,并且因此能够被广泛用于开发安全有效的炎性肠疾病治疗剂。



CN 104918627 B

1.百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的水提取物混合物在制备用于预防或治疗炎性肠疾病的药物中的用途，其中所述水提取物混合物包含2至6重量份的百部提取物，6至10重量份的天门冬提取物，4至8重量份的黄芩提取物，6至10重量份的五味子提取物，14至18重量份的熟地黄提取物，4至8重量份的杏仁提取物和6至10重量份的牡丹皮提取物。

2.根据权利要求1所述的用途，其中所述炎性肠疾病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

3.根据权利要求1所述的用途，其中提取物混合物进一步包含药学上可接受的载体或赋形剂。

4.百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的水提取物混合物在制备用于预防或改善炎性肠疾病的组合物中的用途，其中水提取物混合物包含2至6重量份的百部提取物，6至10重量份的天门冬提取物，4至8重量份的黄芩提取物，6至10重量份的五味子提取物，14至18重量份的熟地黄提取物，4至8重量份的杏仁提取物和6至10重量份的牡丹皮提取物。

对于炎性肠疾病具有预防或治疗作用的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明总体涉及用于预防或治疗炎性肠疾病的药物组合物，更特别地，涉及包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物的药物组合物，其可以预防由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的发展；涉及使用所述组合物预防或治疗炎性肠疾病的方法，使用所述组合物抑制炎性细胞因子过度表达的方法，以及包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物的组合物，其可以预防或改善由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的发展。

背景技术

[0002] 如本领域众所周知的，炎性肠疾病(IBD)(其通常在青春期开始发展)在胃肠道中引起慢性炎症，并伴有如腹痛、发烧、腹泻和黑粪等症状。炎性肠疾病通常分为两种类型：溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)。溃疡性结肠炎是一种在结肠发生的病因不明的弥漫性非特异炎症，其主要入侵粘膜，经常引起腐烂或溃疡并伴有包括出血性腹泻的各种全身症状，而克罗恩氏病是一种病因不明的肉芽肿性炎症，其从口腔到肛门的整个消化系统中发展溃疡、纤维化、狭窄和病灶，并伴有如腹痛、慢性腹泻、发烧和营养不良等全身症状。

[0003] 虽然炎性肠疾病的确切病因尚未确定，据称它们似乎由免疫功能的病症导致发生，其中已知涉及例如先天免疫、细胞因子的产生、CD4的活化等因素。特别地，已知细胞因子在其中发挥重要作用，并在溃疡性结肠炎或克罗恩氏病患者的炎性病灶中观察到肿瘤坏死因子(TNF-α)，白介素(IL)-1，IL-6和IL-8的显著增加的水平。

[0004] 用于治疗炎性肠疾病的药物的实例包括类固醇免疫抑制剂、阻断前列腺素的产生的5-氨基水杨酸(5-ASA)类药物(例如，柳氮磺吡啶)、美沙拉嗪等。然而，它们具有很小的治疗效果并且还引起如头痛、皮疹、肝脏疾病、白细胞减少症、男性不育等严重的副作用，因此限制了这些药物的使用。

[0005] 就此而言，用于治疗炎性肠疾病而无副作用的治疗药物的开发对于安全有效治疗患病患者将是非常有用的，然而所述治疗药物的开发尚未完成。

发明内容

[0006] 本发明的发明人在努力开发无副作用的、衍生自天然物质的治疗剂的过程中，发现了包含百部(Stemonae Radix)、天门冬(Asparagi Tuber)、黄芩(Scutellariae Radix)、五味子(Schisandrae Fructus)、熟地黄(Rehmanniae Radix Preparata)、杏仁(Armeniacae Semen)和牡丹皮(Moutan Cortex Radicis)的提取物混合物的组合物可以抑制MMP12(已知其破坏炎性细胞因子、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达，因此可以被用于治疗炎性肠疾病，从而完成了本发明。

[0007] 因此，本发明已经考虑到现有技术中出现的上述问题，并且本发明的一个目的是提供一种用于预防或治疗炎性肠疾病的药物组合物。

[0008] 本发明的另一个目的是提供使用所述药物组合物预防或治疗炎性肠疾病的方法。

[0009] 本发明的又一个目的是提供使用所述药物组合物抑制炎性细胞因子表达的方法。

[0010] 本发明的再一个目的是提供用于预防或改善炎性肠疾病的组合物。

[0011] 本发明的有益效果

[0012] 本发明的药物组合物包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物，因此可以降低伴随炎性肠疾病的MMP12(已知其破坏炎性细胞因子如IL-1β、TNF-α、IL-6和MCP-1、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达水平，因此其在开发用于治疗炎性肠疾病的安全有效的治疗剂中是非常有用的。

附图说明

[0013] 从以下结合附图的详细说明中，将更清晰地理解本发明前文提到的以及其它的目的、特征和其它优点，其中：

[0014] 图1a是阐明通过本发明组合物的治疗IL-6mRNA水平变化的图。

[0015] 图1b是阐明通过本发明组合物的治疗TNF-αmRNA水平变化的图。

[0016] 图1c是阐明通过本发明组合物的治疗IL-1βmRNA水平变化的图。

[0017] 图1d是阐明通过本发明组合物的治疗MCP-1mRNA水平变化的图。

[0018] 图1e是阐明通过本发明组合物的治疗MMP12mRNA水平变化的图。

[0019] 图2a是阐明通过本发明组合物的治疗TNF-α蛋白水平变化的图。

[0020] 图2b是阐明通过本发明组合物的治疗IL-6蛋白水平变化的图。

[0021] 图2c是阐明通过本发明组合物的治疗IL-1β蛋白水平变化的图。

[0022] 图2d是阐明通过本发明组合物的治疗MCP-1蛋白水平变化的图。

具体实施方式

[0023] 在实现上述目的的本发明的一个方面中，本发明提供用于预防或治疗炎性肠疾病药物组合物，其包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物。

[0024] 在进行研究以开发使用各种天然物质提取物用于治疗炎性肠疾病的无副作用的衍生自天然物质的治疗剂的过程中，本发明人将其注意力投入到百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物上。结果，他们发现了提取物混合物可以减少MMP12(已知其破坏炎性细胞因子、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达量，其水平随着由小鼠在香烟烟雾中的暴露而诱发的炎性肠疾病的发作而增长。因此，本发明的提取物混合物可被用作预防或治疗炎性肠疾病的药物组合物的活性成分。

[0025] 如本文使用的，术语“百部”是指蔓生百部(Stermona japonica Miquel)或相同种植物的块状根，其在形态学上是直的或稍微弯曲的不透水型，两端细小，外表面具有黄白色褶皱，以及不规则垂直褶皱。其坚硬且容易破碎，其破碎表面是角质且白色的，而其外皮收缩至它的中心且是黄色的。其药理作用包括镇咳作用、咳痰作用、杀虫作用、抗菌作用等。在草药领域，其对严重咳嗽、感冒、咳嗽、和由结核所致的百日咳的治疗具有疗效，具有止血作用、杀虫作用，并已被用于治疗荨麻疹、皮炎、疥疮等。

[0026] 如本文使用的，术语“天门冬”是指在海滨生长的多年生单子叶植物且属于帘蛤科帘蛤目，其在形态学上具有短根茎，许多根具有尖锐圆柱形端部伸出向所有方向，茎的下部有卵形鳞片，1-2m长的绿藤茎和叶状枝，其1-3枝捆绑成一组并弯曲像弓。其药理作用包括

镇咳作用、利尿作用、滋补作用等。

[0027] 如本文使用的，术语“黄芩”是指在山上生长的多年生双子叶植物且属于唇形科管状花目，其在形态学上具有丛状萌发的茎，有毛且枝是分开的。所述植物具有对生的披针形叶且有一个钝边。在草药领域，其根用作解热剂、利尿剂、止泻剂、利胆剂、抗炎剂等。

[0028] 如本文使用的，术语“五味子”是指五味子植物的果实，其在形态学上形状为直径约1cm的厚的红球，其中内含红色的果汁和1-2个红棕色的种子，且包含五味子素、戈米辛、柠檬醛、苹果酸等。在草药领域，其果实用作滋补剂或强心剂。此外，由于其可以增强肺的功能，并具有镇咳和咳痰作用，因此可用于治疗咳嗽或口渴等。

[0029] 如本文使用的，术语“熟地黄”是指通过蒸制随后干燥地黄根而制备的草药原料。在草药领域，已知其具有带有苦味感觉的甜味和暖身特性，因此其被用于治疗腰膝寒及其疼痛、月经失调、头晕和乌发。

[0030] 如本文使用的，术语“杏仁”是指杏树的种子，其相对富含柠檬酸和苹果酸，且还具有高含量的维生素A，因此已知其调节新陈代谢。在草药领域，其药理作用包括镇咳作用、利尿作用、利尿作用、滋补作用、治疗便秘等。

[0031] 如本文使用的，术语“牡丹皮”是指使用属于芍药科牡丹的根皮制备的草药，其在形态学上是管状的皮块，皮块的外表面呈现出带有紫色色调的深褐色或褐色，并具有很长的垂直椭圆形标记的侧根和水平褶皱，其中内表面是平的且呈现出浅灰褐色或暗紫色的颜色，并且其破碎表面粗糙，且内表面和破碎表面常常附着白色晶体。牡丹皮的药理作用包括镇痛作用、镇静作用、清热作用、抗惊厥作用、抗炎作用、抗血栓作用、抗过敏作用、胃液分泌的抑制、子宫内膜充血、抗菌作用等。在草药领域，牡丹皮被用于治疗由血热痛经所致的月经不调、跌打损伤、咯血、鼻衄、斑疹、由劳热所致的骨骼疼痛、血压升高、淤血、挫伤、疖以及早期阑尾炎，并用于消炎镇痛治疗。

[0032] 如本文使用的，术语“提取物”可以指用于本发明的用常规的提取方法从百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮中获得的产品，或者商业购买的同样的产品。优选地，所述提取物可以使用提取溶剂如水、C1-C6醇、正己烷、氯仿、乙酸甲酯、丁醇等获得，更优选地，可以使用如水、C1-C6醇、或其组合的提取溶剂，最优选地，使用热水或70％乙醇。

[0033] 如本文使用的，术语“提取物混合物”是指组合百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮各个单独提取物而获得的最终产物，或者由提取包含所有上述成分的混合物获得的最终产物。

[0034] 在本发明中，提取物混合物可以指组合百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮各个单独提取物而获得的最终产物，并且提取物混合物可被用作预防、治疗、或改善炎性肠疾病的组合物的活性成分。

[0035] 如本文使用的，术语“炎性肠疾病(IBD)”是指在胃肠道中引起炎症并伴有如腹痛、发烧、腹泻和黑粪等症状的疾病。炎性肠疾病通常分为两种类型：溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)。溃疡性结肠炎是一种在结肠发生的病因不明的弥漫性非特异炎症，其主要入侵粘膜，经常引起腐烂或溃疡并伴有包括出血性腹泻的各种全身症状，而克罗恩氏病是一种病因不明的肉芽肿性炎症，其在从口腔至肛门的整个消化系统中发展溃疡、纤维化、狭窄和病灶，并伴有如腹痛、慢性腹泻、发烧和营养不良等全身症状。

[0036] 如本文使用的，术语“预防”是指与通过施用本发明的药物组合物抑制或延迟炎性

肠疾病相关的所有活动。

[0037] 如本文使用的，术语“治疗”是指与改变待治疗个体或细胞的一个或多个自然过程为目的的临床干预相关的所有活动，其可以在临床病理状态仍在发展中进行，或预防相同情况的发生。疗效的目标用途的实例可以包括预防给定疾病的发生或复发，缓解由此而来的症状，降低所有直接或间接的由所述疾病所致的病理结果，预防转移，减少疾病的发展，降低或暂时缓解并改善疾病，或改善疾病的预后。

[0038] 在本发明中，优选地，上述的治疗应被理解为使用包含本发明的提取物混合物的药物组合物治疗炎性肠疾病。

[0039] 本发明中提供的本发明的药物组合物可以包含含有百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮各个单独提取物的提取物混合物。优选地，包含在提取物混合物中各个提取物的量可以分别是，但不限于此，2至6重量份的百部提取物，6至10重量份的天门冬提取物，4至8重量份的黄芩提取物，6至10重量份的五味子提取物，14至18重量份的熟地黄提取物，4至8重量份的杏仁提取物，和6至10重量份的牡丹皮提取物；更优选地，4重量份的百部提取物，8重量份的天门冬提取物，6重量份的黄芩提取物，8重量份的五味子提取物，16重量份的熟地黄提取物，6重量份的杏仁提取物，和8重量份的牡丹皮提取物。此外，本发明的药物组合物能够减少MMP12(已知其破坏炎性细胞因子、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达量，其水平随着由小鼠在香烟烟雾中的暴露而诱发的炎性肠疾病的发作而增长。

[0040] 在本发明的一个实施方案中，百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的混合物经历热水提取以获得草药组合物(实施例1)，并且施用了草药组合物的小鼠暴露于香烟烟雾，结果是，IL-6、TNF-α、IL-1β和MCP-1(其是由香烟烟雾所致产生的炎性细胞因子)的mRNA水平降低(图1a至1d)，MMP12(已知其破坏弹性蛋白和胶原蛋白)的mRNA水平降低(图1e)，而且各个炎性细胞因子蛋白的水平也降低(图2a至2d)。

[0041] 同时，本发明的药物组合物可进一步包括合适的常规用于药物组合物生产的载体、赋形剂或稀释剂。特别地，药物组合物可以按照常规方法被制备成口服制剂形式如粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂，以及气雾剂、外用制剂、栓剂和无菌注射剂的形式。在本发明中，包含在药物组合物中的载体、赋形剂、或稀释剂的实例为乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇，甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酯、羟苯丙酯、滑石、硬脂酸镁、和基础油。

[0042] 对于制剂，可以加入常用的填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂、稀释剂或赋形剂。用于口服施用的固体制剂的实例为片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等，并且所述制剂是通过混合至少一种赋形剂例如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等与其提取物或一部分制备。此外，除简单的赋形剂外，还可使用如硬脂酸镁和滑石等的润滑剂。用于口服施用的液体制剂的实例为混悬剂、内用液体药物、乳剂、糖浆剂等，且除了简单的稀释剂如水和液体石蜡外，还可以加入各种赋形剂如润湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等。用于肠胃外施用的制剂的实例为无菌水溶液、非水性溶剂、混悬剂、乳剂、冻干剂和栓剂。非水溶剂和混悬剂的实例可以包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、可注射酯如油酸乙酯等。用于栓剂的基质的实例可以包括witepsol(위텝솔)、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂酸甘

油酯(라우린지)、甘油明胶等。

[0043] 根据本发明的一个实施方案,以最终组合物的总重量计,包含在药物组合物中的提取物混合物的量的范围可以为0.0001wt%至50wt%,更优选地,0.01wt%至10wt%,但不特别限于此。

[0044] 本发明的药物组合物可以药学上有效量施用。如本文使用的,"药学上有效量"是指以适用于医疗治疗合理的利益/风险比,用于疾病治疗的足够的量,且有效剂量的水平可以由多种因素决定,所述因素包括疾病的严重程度、药物活性、年龄、体重、健康状况、受试者的药物敏感性、施用时间、施用途径和溶解速率、本发明药物组合物治疗时间的长短,与本发明的药物组合物同时或者联合使用的药物,以及在医药领域公知的其他因素。本发明的药物组合物可作为单独的治疗剂施用,或与其他治疗剂联合施用,并且还可以与常规的治疗剂依次或同时施用。此外,本发明的药物组合物可以以单剂量或以多次分剂量施用。此外,重要的是,考虑上述所有因素,施用能够达到最大效果而无任何副作用的最少量。

[0045] 本发明的药物组合物的剂量可以由本领域技术人员考虑预期用途、疾病的严重程度、年龄、体重、性别和受试者的既往病历,或作为活性成分的成分的种类等来确定。例如,本发明的药物组合物可以以约1mg/kg/天至约20mg/kg/天施用于包括人类的哺乳动物,优选1mg/kg/天至10mg/kg/天。本发明的药物组合物可以每天一次或者在几次分剂量施用,但施用不特别限于此。

[0046] 实现所述目的的本发明另一方面,提供用于预防或治疗炎性肠疾病的方法,其包括向具有发展炎性肠疾病风险或具有炎性肠疾病的受试者施用药学有效量的包含本发明的提取物混合物作为活性成分的药物组合物。

[0047] 如上所述,本发明的提取物混合物能用作用于预防或治疗炎性肠疾病的药物组合物的活性成分,因此其能被用于预防或治疗炎性肠疾病。

[0048] 如本文使用的,术语"受试者"是指具有炎性肠疾病风险或具有炎性肠疾病的包括人类的各种动物。本发明的药物组合物的施用可以缓解或治疗受试者的炎性肠疾病。

[0049] 如本文使用的,术语"缓解"是指与通过施用本发明的药物组合物改善或有利地改变炎性肠疾病状态相关的所有种类的活动。

[0050] 如本文使用的,术语"施用"是指通过适当的方法向受试者引入本发明的药物组合物的活动,且所述药物组合物可以经由口服或肠胃外途径的各种途径施用,只要其能够递送药物组合物至目标组织。

[0051] 关于治疗炎性肠疾病的方法,可以通过任何常规途径施用药物组合物,只要其能够递送药物组合物至目标组织。根据预期目的,可以通过腹膜内施用、静脉内施用、肌内施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、鼻内施用、肺内施用、和直肠内施用来施用本发明的药物组合物,但不特别限于此。此外,可以通过能够输送活性成分至目标细胞的任何装置施用药物组合物。

[0052] 实现所述目的的本发明的再一方面,提供用于抑制炎性细胞因子表达的方法,其包括以本发明的药物组合物治疗具有炎性细胞因子过表达的组织或细胞。

[0053] 如本文使用的,术语"炎性细胞因子"是指在体内诱发炎症反应的细胞因子,且炎性细胞因子可以包括IL-1β、TNF-α、IL-6、MCP-1等,但不限于此。

[0054] 实现所述目的的本发明的又一方面,提供用于预防或改善炎性肠疾病的组合物,

其包含百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物。

[0055] 包含在提取物混合物中的百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮已经长期用作草药原材料，且也由此验证其安全性。因此，其可以作为组合物。

[0056] 以组合物的总重量计，百部、天门冬、黄芩、五味子、熟地黄、杏仁和牡丹皮的提取物混合物可以在0.01wt％至100wt％范围内，优选为1wt％至80wt％。此外，所述组合物可以进一步包含在组合物中常规使用的附加成分以改善嗅觉、味觉、视觉等，例如，维生素A、C、D、E、B1、B2、B6、B12、烟酸、生物素、叶酸、泛酸等。此外，所述组合物可以进一步包含矿物质，如锌、铁、钙、铬、镁、锰、铜等。此外，所述组合物可以进一步包含氨基酸，如赖氨酸、色氨酸、半胱氨酸、缬氨酸等。此外，所述组合物进一步包含添加剂，如防腐剂(山梨酸钾、苯甲酸钠、水杨酸、脱氢乙酸钠等)、消毒剂(漂白粉、高效漂白粉、次氯酸钠等)、抗氧化剂(丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)等)、着色剂(焦油色等)、显色剂(亚硝酸钠等)、漂白剂(亚硫酸钠)、调味料(谷氨酸单钠(MSG)等)、甜味剂(甘素、环磺酸盐、糖精钠等)、调味剂(香草精、内酯等)、膨化剂(明矾、D-酒石酸氢钾等)、强化剂、乳化剂、增稠剂(粘合剂、糊剂)、成膜剂、胶基剂、消泡剂、溶剂，改良剂等。

[0057] 以下，通过如下文所列的以下实施例更详细地解释本发明，但它们公开仅用于说明用途，并且不应当被解释为限制本发明的范围。

[0058] 实施例1样品的制备

[0059] 将购自SUN TEN(台北，台湾)的4g百部热水提取物的干燥粉末，8g天门冬的干燥粉末，6g黄芩热水提取物的干燥粉末，8g五味子热水提取物的干燥粉末，16g熟地黄、杏仁热水提取物的干燥粉末，和6g牡丹皮热水提取物的干燥粉末的混合物溶解于水中，并过滤获得用作口服施用于小鼠的样品的所得的液体组合物。

[0060] 实施例2以香烟烟雾处理的炎性肠疾病(IBD)的诱发

[0061] 已知香烟诱发炎性肠疾病(IBD)(Gareth A O Thomas等人，Postgrad.Med.J.，76(895)：273-279，2000年5月)，因此将小鼠暴露于香烟烟雾中以诱发小鼠炎性肠疾病。

[0062] 第一，使六周龄体重20g至25g的雌性C57BL/6小鼠自由接近食物和水，将饲养室温度设定为21℃至24℃，湿度为40％至60％，并且在12小时间隔控制光-暗循环。

[0063] 以100mg/kg的剂量将实施例1获得的液体组合物口服施用于由此饲养的小鼠，将其放入烟雾室中，通过吸烟3支参照香烟3R4F(肯塔基大学，列克星敦市，肯塔基州)而暴露于香烟烟雾中30分钟，在从中除去香烟烟雾后在其中保持30分钟，香烟烟雾处理过程重复4次，整个香烟烟雾处理过程以每日1次，每周5次，进行三周，由此诱发小鼠炎性肠疾病(IBD)，并将它们作为实验组。特别地，未用香烟烟雾处理的小鼠用作对照组(CON)，暴露于香烟烟雾，但未用实施例1制备的液体组合物处理的小鼠作为比较组(CS)，而分配给用于对照和比较组的各个组的小鼠的数目为三只，且用于实验组(7HM)为两只。

[0064] 实施例3：药物组合物对炎性肠疾病的影响

[0065] 实施例3-1：药物组合物在mRNA水平影响的评价

[0066] 首先，处死实施例2中获得的对照组、比较组和实验组中的小鼠，并从各组的小鼠中收集结直肠组织。使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN公司，美国)从由此收集的结直肠组织中获得总RNA。具体而言，向每个结直肠组织加入600μL的RLT缓冲液以破坏细胞，然后进一步加入600μL 70％乙醇，将得到的溶液混合。将700μL的混合物加入至RNeasy Mini试剂盒

的RNeasy迷你柱，并以8000×g离心15秒后，向残留溶液中加入700μL包含在上述试剂盒中的RW1缓冲液，以8000×g离心15秒，收集残留溶液。然后，向残留溶液中加入500μL包含在上述试剂盒中的RPE缓冲液，以8000×g离心15秒，收集残留溶液。向得到的残留溶液中加入50μL的无RNA酶的水，以8000×g离心1分钟以最终获得总RNA。通过分光光度计定量(ND-1000，NanoDrop Technologies公司，美国)定量由此获得的总RNA，在1％琼脂糖凝胶上进行电泳，并用溴化乙锭(ET-BR，Sigma-Aldrich，美国)染色以评价其状态。

[0067] 同时，通过实时RT-PCR分析由此获得的总RNA。对于上述分析，使用2μg由此获得的总RNA、SYBR Green I Master Mix(Applied Biosystems，福斯特城，加利福尼亚州，美国)以及引物(Genotech公司，韩国)通过RT-PCR(95℃：15秒，60℃：1分钟，40个循环)获得cDNA。通过将由此获得的cDNA应用至Applied Biosystems 7300实时PCR系统进行实时PCR，并且比较对照组、比较组和实验组小鼠的MMP12(已知其破坏炎性细胞因子如IL-6、TNF-α、IL-1β和MCP-1、和弹性蛋白和胶原蛋白)的mRNA水平(图1a至图1e)。

[0068] 图1a是阐明通过本发明组合物的治疗IL-6mRNA水平变化的图；图1b是阐明通过本发明组合物的治疗TNF-αmRNA水平变化的图；图1c是阐明通过本发明组合物的治疗IL-1βmRNA水平变化的图；图1d是阐明通过本发明组合物的治疗MCP-1mRNA水平变化的图；图1e是阐明通过本发明组合物的治疗MMP12mRNA水平变化的图；图2a是阐明通过本发明组合物的治疗TNF-α蛋白水平变化的图；图2b是阐明通过本发明组合物的治疗IL-6蛋白水平变化的图；图2c是阐明通过本发明组合物的治疗IL-1β蛋白水平变化的图；图2d是阐明通过本发明组合物的治疗MCP-1蛋白水平变化的图。

[0069] 如图1a至1e所示，未用香烟烟雾处理的对照组(CON)显示了低mRNA水平的IL-6、TNF-α、IL-1β、MCP-1和MMP12，而只用香烟烟雾处理的比较组(CS)显示IL-6、TNF-α、IL-1β、MCP-1和MMP12的mRNA水平的急剧增加，而在暴露于香烟烟雾之前施用本发明的药物组合物的实验组(7HM)，显示了香烟烟雾诱发的IL-6、TNF-α、IL-1β、MCP-1和MMP12mRNA水平增加的抑制。

[0070] 例3-2：在蛋白质水平上药物组合物影响的评价

[0071] 首先，处死实施例2获得的对照组、比较组和实验组中的小鼠，并从各组的小鼠中收集结直肠组织。然后，在结直肠组织中加入500μL组织总蛋白抽提试剂，并用匀质机破坏细胞。将匀化细胞在冰上放置15分钟，然后涡旋15秒，上述整个过程重复4次，所得物于4℃、14000×g离心20分钟，由此获得各组上清液。

[0072] 同时，将对应于各个炎性细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-1β或MCP-1)的各自的抗体包覆在ELISA试剂盒的底物上，并将其放置在4℃过夜。然后，通过向其上加入分析稀释剂封闭各个底物，并以各组的上清液进行处理，加入ELISA试剂盒的检测抗体，加入ELISA试剂盒的TMB溶液以诱发显色反应。然后，通过将其应用于ELISA读数器测定所得的底物的吸光度，并进行相互比较(图2a至2d)。

[0073] 图2a是阐明通过本发明组合物的治疗TNF-α蛋白水平变化的图；图2b是阐明通过本发明组合物的治疗IL-6蛋白水平变化的图；图2c是阐明通过本发明组合物的治疗IL-1β蛋白水平变化的图；图2d是阐明通过本发明组合物的治疗MCP-1蛋白水平变化的图。

[0074] 如图2a至2d所示，与对照组(CON)相比，当以LPS处理时，比较组(CS)显示了RAW264.7细胞系中所有的炎性细胞因子水平的快速增加，而当以提取物混合物(7HM)处理

时所有的炎性细胞因子水平降低。

[0075] 因此，基于实施例3-1和3-2的结果，可以确认，本发明提供的提取物混合物具有对由香烟烟雾诱发的炎性细胞因子的产生的抑制作用，因此其具有预防或治疗炎性肠疾病的治疗效果。

[0076] 尽管处于阐述目的公开了本发明的优选实施方案，但本领域技术人员将理解，各种修饰、增加和替换均是可能的，而不脱离本发明所附权利要求所公开的范围和精神。

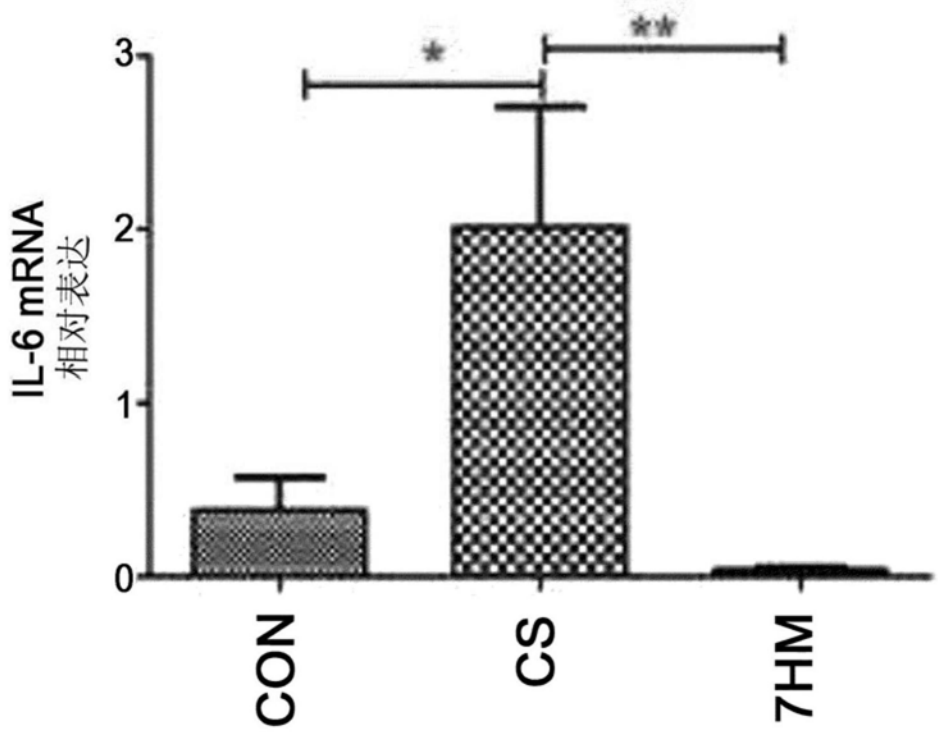


图1a

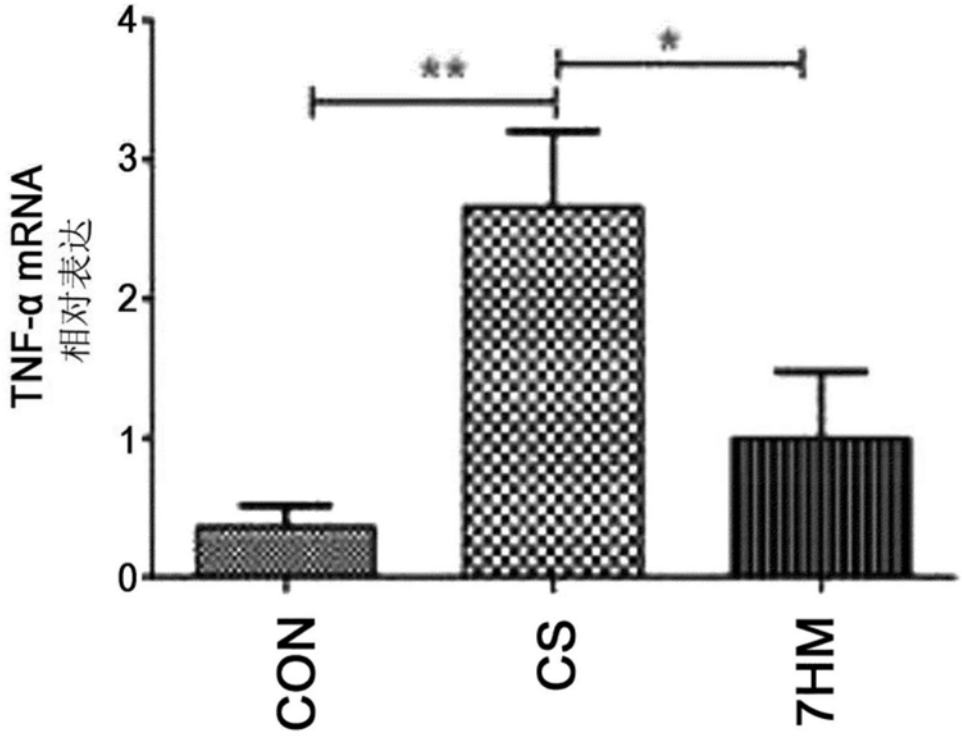


图1b

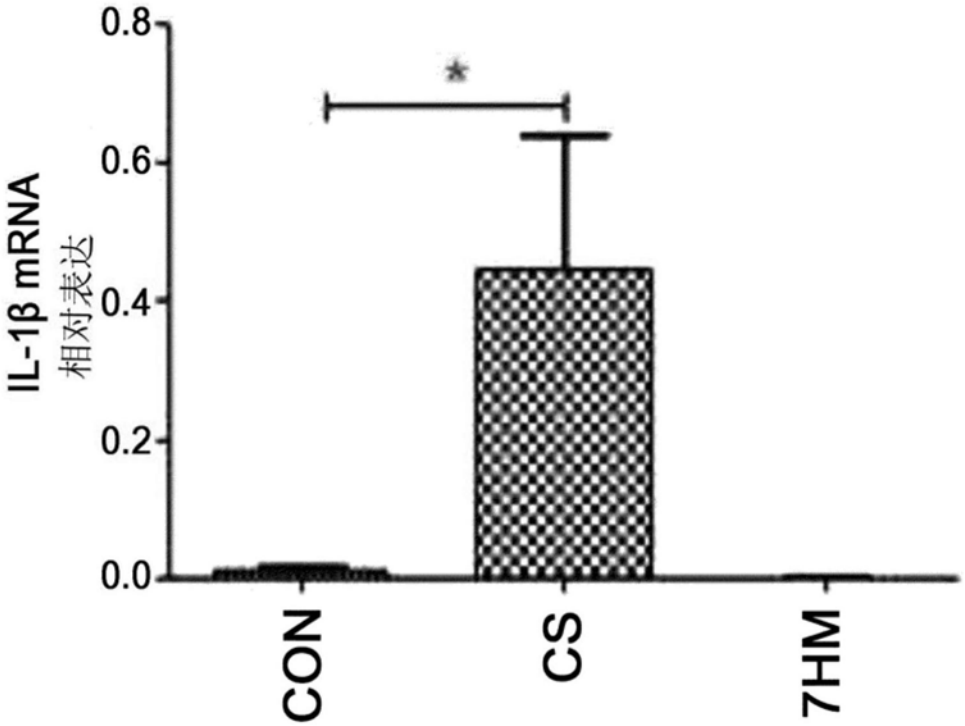

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IL-1β mRNA
相对表达
*
CON
CS
7HM

图1c

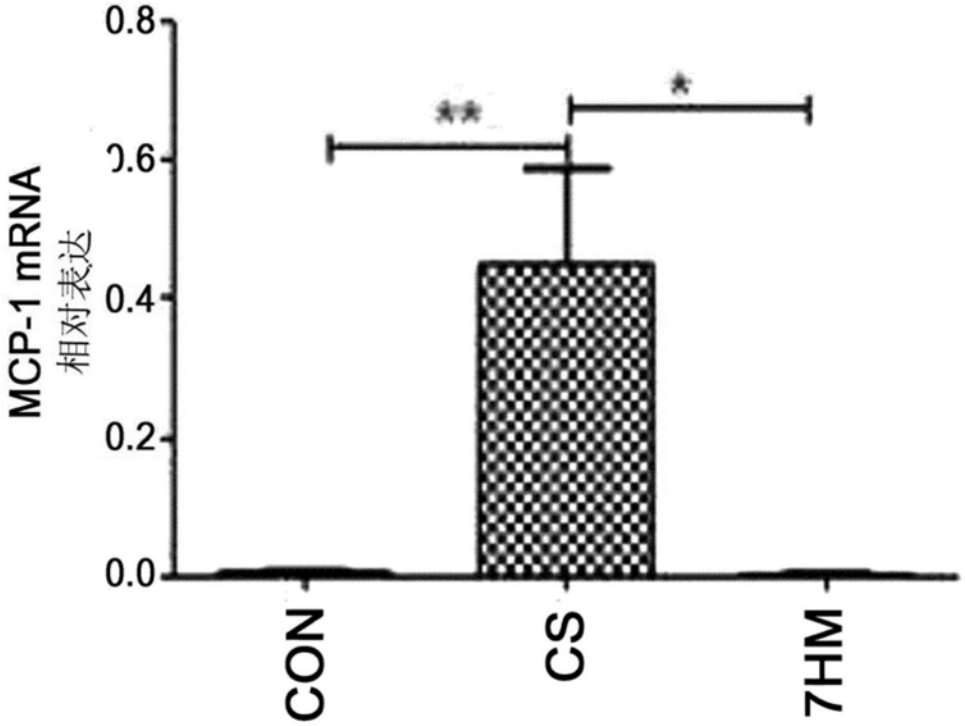

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MCP-1 mRNA
相对表达
**
*
CON
CS
7HM

图1d

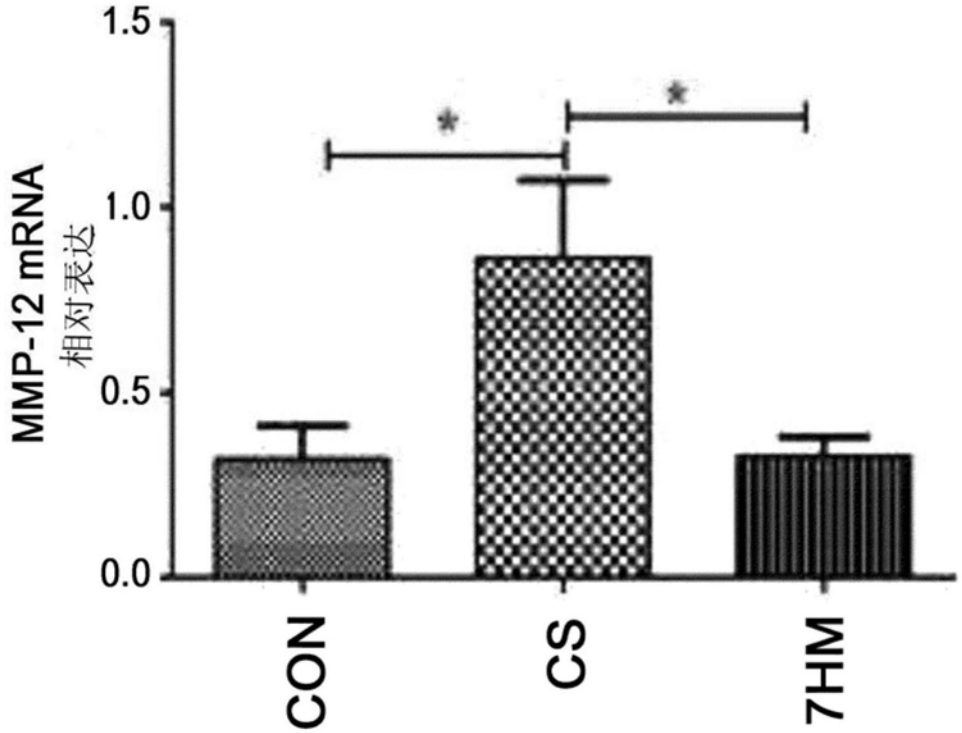

1.5
1.0
0.5
0.0
MMP-12 mRNA
相对表达
*
*
CON
CS
7HM

图1e

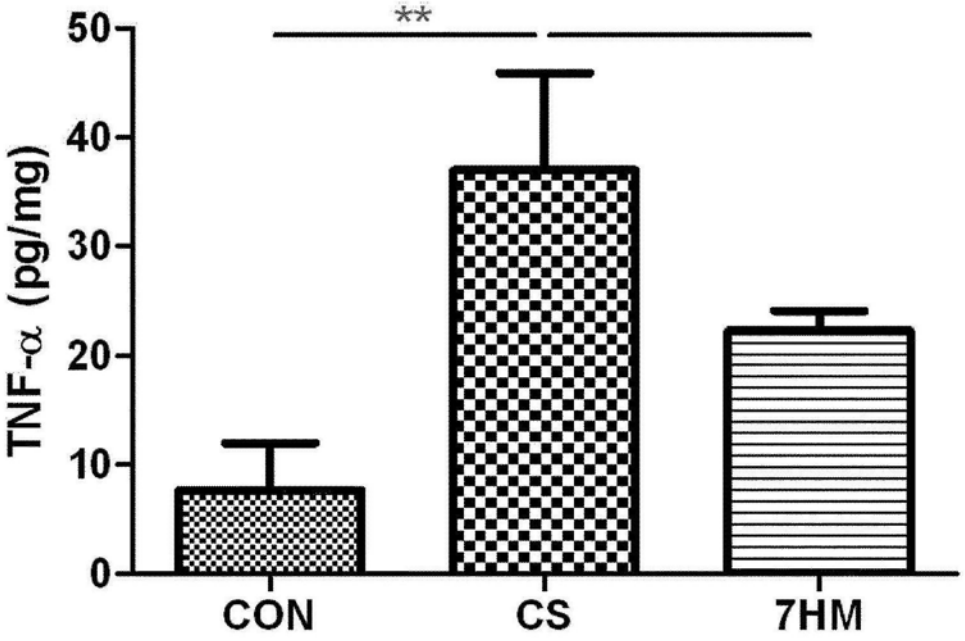

50
40
30
20
10
0
TNF-α (pg/mg)
**
CON
CS
7HM

图2a

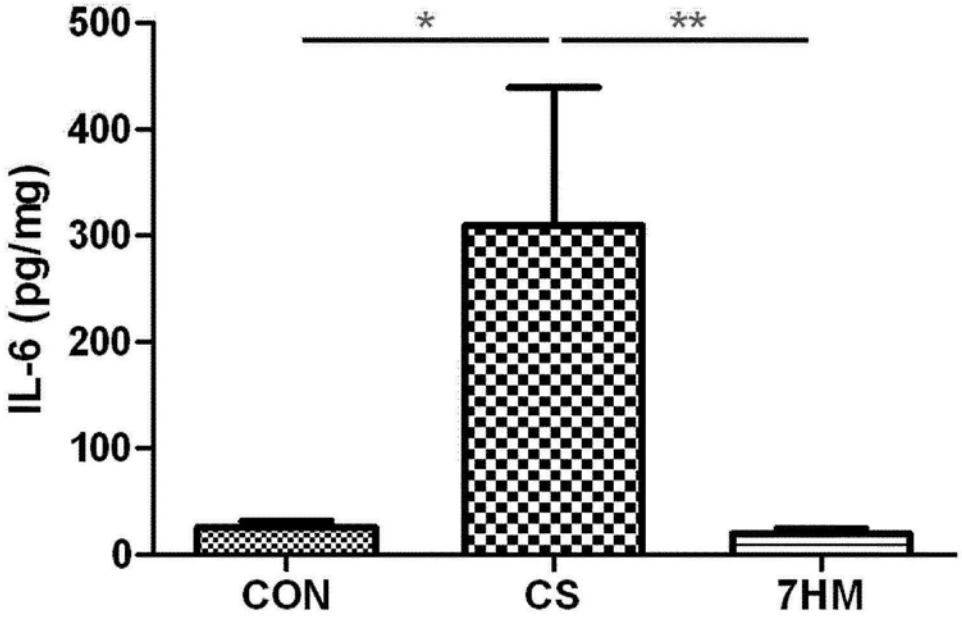

500
400
300
200
100
0
IL-6 (pg/mg)
*
**
CON
CS
7HM

图2b

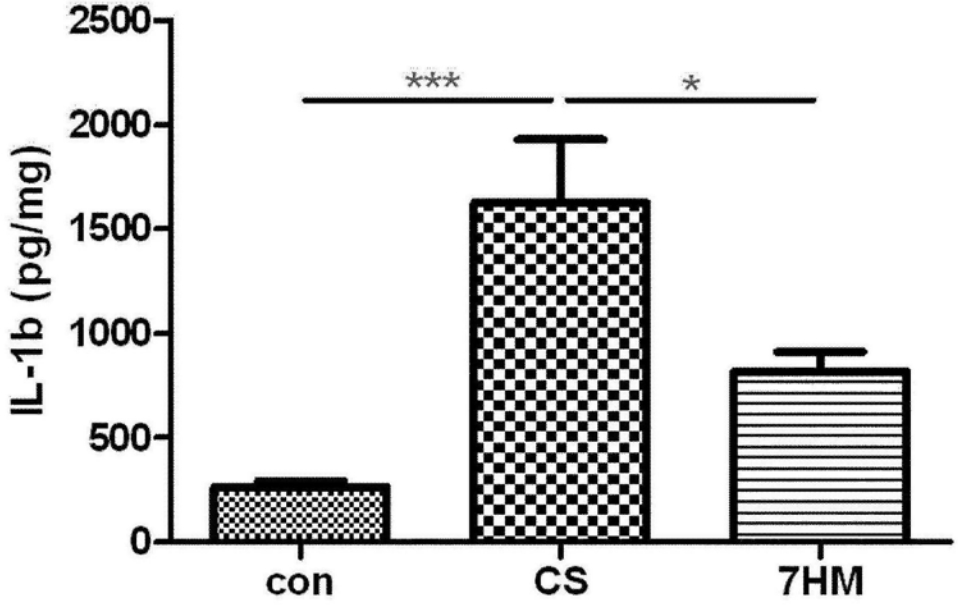

2500
2000
1500
1000
500
0
IL-1b (pg/mg)
***
*
con
CS
7HM

图2c

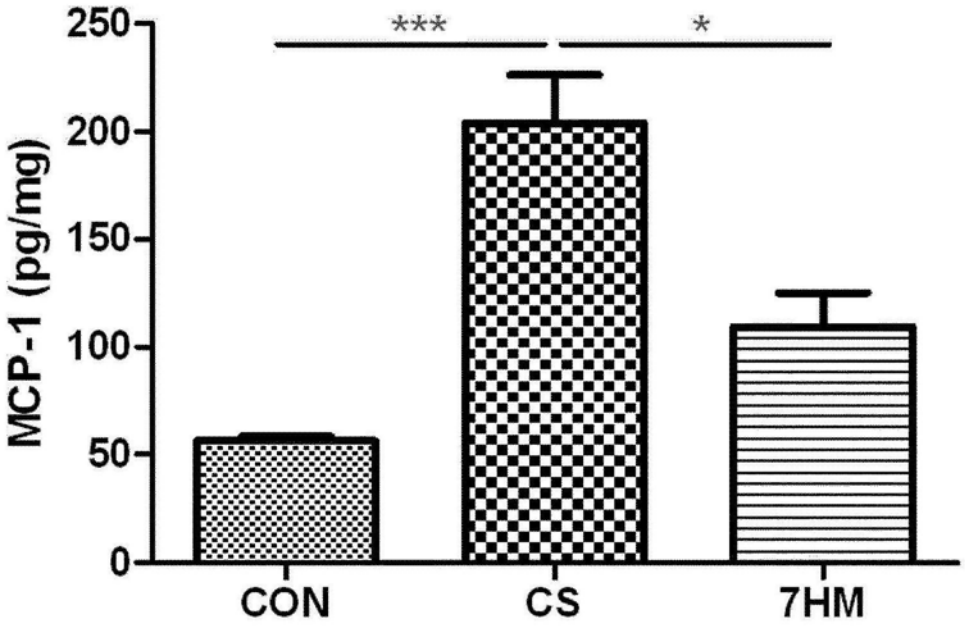


图2d