



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102686230 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201080058900. 1

代理人 李中奎

(22) 申请日 2010. 09. 30

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

10-2009-0116247 2009. 11. 27 KR

10-2010-0033965 2010. 04. 13 KR

10-2010-0069145 2010. 07. 16 KR

A61K 36/28 (2006. 01)*A61P 17/00* (2006. 01)*A61P 29/00* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2010/006651 2010. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02011/065657 EN 2011. 06. 03

(71) 申请人 熊津豪威株式会社

地址 韩国忠清南道

申请人 庆熙大学校产学协力团

(72) 发明人 韩昌洙 金元泰 崔潮荣 咸仁惠

梁甲栻 方灿成

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

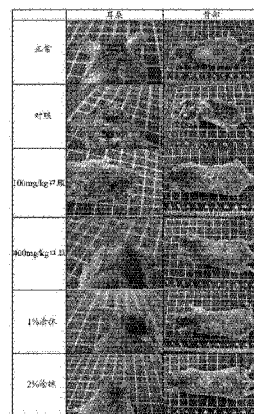
权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 28 页

(54) 发明名称

包括具有抗炎症活性的北野菊的提取物或馏分的混合物

(57) 摘要

本发明涉及一种具有抗炎症活性的组合物，该组合物包括北野菊的提取物或馏分。由于该组合物显示出在对特别是特应性皮炎的炎症性疾病上的预防和治疗作用，因此该组合物可以被用作药物组合物，并且还可以被应用到包括准药物、化妆品组合物、食品和水软化剂的多个领域。



1. 一种具有抗炎症活性的组合物,所述组合物包括北野菊的提取物或馏分。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述北野菊的提取物为北野菊的水提取物或北野菊的甲醇提取物。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述北野菊的提取物是通过热水抽提来抽提的。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述馏分为使用氯仿、乙醇、乙酸乙酯或其混合物中的任一个获得的馏分。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物是具有以下性质中的一个或多个性质的组合物:
 - 1) 减少红斑、水肿、表皮脱落、瘙痒、皮肤干燥、糜烂和苔藓样硬化;
 - 2) 减少耳肿胀;
 - 3) 减少抓挠行为;
 - 4) 降低血清免疫球蛋白 E (IgE)、干扰素- γ (IFN- γ) 或白介素-4 (IL-4) 的浓度;
 - 5) 减少胞内一氧化氮(NO) 表达;
 - 6) 减少胞内一氧化氮合酶(iNOS) 表达;
 - 7) 减少胞内前列腺素 E2 (PGE2) 的生成;
 - 8) 减少胞内 COX-2 的表达;
 - 9) 抑制 I κ B 磷酸化且降低 NF- κ B 核易位;以及
 - 10) 抑制成纤维细胞增殖、胶原蛋白层增生和溃疡,降低肥大细胞浸润,以及减轻由中性粒细胞浸润和淋巴细胞浸润引起的炎症。
6. 一种用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物,所述药物组合物包括作为活性成分的权利要求1到5中任一项所述的组合物。
7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中,所述炎症性疾病为过敏性炎症疾病。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中,所述过敏性炎症疾病为特应性皮炎。
9. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中,用于预防或治疗炎症性疾病的所述药物组合物具有药片、药丸、粉末、颗粒、胶囊、悬浮液、内用液体、乳液、糖浆、消毒的水性溶液、非水性溶液、冻干剂型和栓剂中的任一剂型。
10. 一种用于预防或减轻炎症性疾病的化妆品组合物,所述化妆品组合物包括作为活性成分的权利要求1到5中任一项所述的组合物。
11. 一种用于预防或减轻炎症性疾病的食品组合物,所述食品组合物包括作为活性成分的权利要求1到5中任一项所述的组合物。
12. 根据权利要求11所述的食品组合物,其中,所述食品组合物为肉、香肠、面包、巧克力、糖果、点心、饼干、比萨、日本拉面、口香糖、冰淇淋、汤、饮品、茶、功能水、饮料、酒精类饮料和复方维生素中的任一种。
13. 一种用于预防或减轻炎症性疾病的准药物组合物,所述准药物组合物包括作为活性成分的权利要求1到5中任一项权利要求的所述组合物。
14. 根据权利要求13所述的准药物组合物,其中,所述准药物组合物为除菌清洁剂、沐浴露、口腔清新剂、湿巾、清洁皂、洗手液、加湿器填料、面膜、药膏、涂抹剂或过滤填料中的任一种。

15. 一种用于预防或减轻炎症性疾病的水软化剂,所述水软化剂包括含作为活性成分的权利要求 1 到 5 中任一项所述的组合物的过滤填料。

16. 一种用于预防或治疗炎症性疾病的方法,所述方法是通过向患有炎症性疾病或处于炎症性疾病风险的患者给药权利要求 1 到 5 中任一项所述的组合物而进行的。

17. 根据权利要求 16 的所述方法,其中,所述组合物为口服给药或局部给药的。

18. 根据权利要求 16 的所述方法,其中,所述炎症性疾病为过敏性炎症疾病。

19. 根据权利要求 18 的所述方法,其中,所述过敏性炎症疾病为特应性皮炎。

包括具有抗炎症活性的北野菊的提取物或馏分的混合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有抗炎症活性的组合物,该组合物包括北野菊(*Chrysanthemum boreale* Makino)的提取物或馏分。

背景技术

[0002] 人类的皮肤由于多种内在因素和外在因素而随年龄经受变化。就内在因素而言,各种调节新陈代谢的荷尔蒙的分泌减少,以及免疫细胞的功能和细胞的活性降低,因此减少了生物体内所需的免疫蛋白和生物蛋白的生物合成。就外在因素而言,环境污染和紫外线导致包括皱纹增多、弹性变小、皮肤干燥和黄褐斑以及雀斑和老年斑增多的多种变化,导致皮肤变差。当今,因为大多数人希望看起来年轻漂亮,他们强烈需要防止或减轻由于例如紫外线和压力的外在因素和内在因素造成的皮肤老化。

[0003] 特应性皮炎(AD)为皮肤病之一,其为具有例如免疫、遗传、药理、生理和环境因素的多因素病因的皮肤病,该疾病特别通过感染、压力、季节和气候的变化、刺激和过敏源而产生。特应性皮炎是皮肤的慢性炎症,在婴儿到成人的所有年龄段的人中出现。

[0004] 通常,大约 80% 的特应性皮炎与免疫球蛋白 E (IgE)相关,以及可以将特应性皮炎分类成外在(IgE 介导)类型和内在(无 IgE 介导)类型。在具有特应性皮炎的患者中可观测到 IgE 应答增多和嗜酸性粒细胞增多,这反映出例如 IL (白介素)-4 和 IL-5 的 Th2 细胞因子的应答增加,同时伴随有 Th1 细胞因子、干扰素- γ (IFN- γ)生成减少。关于这一点,已经尝试了使用各种免疫调节药物,例如吡美莫司和他克莫司。特别地,近来已经知道存在能够直接抑制免疫反应的 CD4 细胞和 CD25 细胞以及调节 T 细胞(Treg 细胞)。Treg 细胞来自胸腺并且具有控制各种 T 淋巴细胞的活性的能力。此外,Treg 细胞通过在它们的表面上表达淋巴细胞抗原(CTLA4)、肿瘤坏死因子受体(GITR)、CD25 和淋巴细胞激活基因 3 (LAG3)来转录免疫抑制信号或抑制例如巨噬细胞或 B 细胞的免疫细胞之间的相互作用。Treg 细胞通过例如转化生长因子- β (TGF- β)和 IL-35 以及 IL-10 的细胞因子的产生来诱发免疫抑制。在特应性皮炎中,例如 IL-4 和 IL-5 的 Th2 细胞因子由于 Th2 细胞发育的缺陷而大量产生,然而例如 IFN- γ 的 Th1 细胞因子的产生得到抑制。近来,已经知道通过 TARC/CCL17、MDC/CCL22 和 CTACK/CCL2 表示的 Th2 趋化因子直接地影响 Th2 细胞的发育。

[0005] 细胞因子由各种细胞产生且具有不同的功能。具体而言,由于相同的细胞因子可发挥不同的作用,因此细胞因子非常难于分类。当 T 细胞识别出通过巨噬细胞提供的抗原并且被活化以诱发免疫反应时,大量的细胞因子涉及在该过程中。从抗原识别到效应子步骤,先天免疫和适应性免疫的每一步骤涉及各种细胞因子,以及一些细胞因子也涉及在淋巴细胞和其他血细胞的产生中。主要细胞因子的功能如下所示。

[0006] IL-1 (白介素 1)为通过活化的单核吞噬细胞、上皮细胞或内皮细胞产生的细胞因子并且介导炎症。IL-1 有 IL-1 α 和 IL-1 β 两种形式。少量的 IL-1 激活 CD4-T 细胞和 B 细胞,并且刺激炎症细胞。然而,过量的 IL-1 起到诱发发烧和急性期反应的荷尔蒙的作用。

[0007] IL-4 (白介素 4)是具有大约 20kDa (千道尔顿)大小的蛋白质,其通过 CD4T 细胞

和活化的肥大细胞产生,并且具有 B 细胞生长因子的功能。IL-4 也具有在 B 细胞中的免疫球蛋白类别转换中涉及的分化因子的功能,并且还可以激活 CD4T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞等。

[0008] IL-10 (白介素 10)通过与 IL-2 的协同效应诱发激活的 T 细胞分化成 CTL,并且还诱发天然杀伤细胞(NK 细胞)、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK 细胞)和激活的 T 细胞的增殖。

[0009] IFN- γ (干扰素- γ),也称为 II 型干扰素,由 CD4T 细胞或 CD8T 细胞产生以调节免疫反应,并且因此也被称为免疫干扰素。IFN- γ 对 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和内皮细胞起作用以激活它们,并且具有巨噬细胞激活因子的功能以增加 I 型 MHC 和 II 型 MHC 的表达。IFN- γ 还能够像其他干扰素一样抑制病毒复制。

[0010] NO (一氧化氮)在生理条件下具有血管舒张药的功能。然而,当炎症因子刺激巨噬细胞时,iNOS (诱导型一氧化氮合酶)产生的 NO 在病理情况下诱发炎症以增加 COX-2 (环氧化酶-2)的活性,借助花生四烯酸级联导致炎症扩增。

[0011] COX-2 是从花生四烯酸产生前列腺素的关键调节剂。COX-2 将花生四烯酸转变成 PGG₂。取决于酶,PGG₂ 转化为在体内发挥不同功能的 PGE₂、PGD₂、PGF₂、PGI₂ 或 TXA₂。代表性的 COX-2 抑制剂是阿司匹林。

[0012] 最近的研究趋势已经集中于通过免疫调节来上调或下调 IgE 生成,以及积极研究了临床可用的东方草药对具有特应性皮炎的患者的作用。然而,还没有人报道北野菊在特应性皮炎上的功效。

发明内容

[0013] 技术问题

[0014] 因此,本发明已经证实,北野菊的提取物或馏分具有降低血清 IgE 浓度的作用并且对在炎症疾病中发现的炎症相关的因子具有抑制作用。基于该研究,发现北野菊的提取物或馏分显示出对特别是特应性皮炎的各种炎症性疾病有预防和治疗作用,由此完成本发明。

[0015] 技术方案

[0016] 本发明的一目的是提供具有抗炎症活性的组合物,所述组合物包括北野菊的提取物或馏分。

[0017] 本发明的另一目的是提供用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物、用于预防或减轻炎症性疾病的化妆品组合物、食品组合物和准药物(quasi-drug)组合物,所述的组合物包括含有作为活性成分的北野菊的提取物或馏分的组合物。

[0018] 本发明的另一目的是提供用于预防或减轻炎症性疾病的水软化剂,其包括含有作为活性成分的北野菊的提取物或馏分的组合物的过滤填料(filter filler)。

[0019] 本发明的另一目的是提供用于通过对患有炎症性疾病或处于炎症性疾病风险的患者施用含有北野菊的提取物或馏分的所述组合物来预防或治疗炎症性疾病的方法。

[0020] 有益效果

[0021] 由于根据本发明的组合物具有抗炎症活性,故该组合物可以用于预防或治疗例如特应性皮炎的炎症性疾病,并且还可以被应用到包括准药物、化妆品、食品和水软化剂的多个领域。

附图说明

- [0022] 图 1 为示出制备北野菊的提取物和馏分的方法的流程图；
- [0023] 图 2 示出 DNCB（二硝基氯苯）处理的 NC/Nga 小鼠的敏化时间表；
- [0024] 图 3 根据药物治疗前后的分数示出 NC/Nga 小鼠模型的变化；
- [0025] 图 4 示出在北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花的提取物的治疗之后，诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的抓挠行为的变化；
- [0026] 图 5 示出在北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花的提取物的治疗之后，诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的临床评分的结果；
- [0027] 图 6 示出在北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花的提取物的治疗之后，诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的血清 IgE 浓度的变化；
- [0028] 图 7 根据使用北野菊的提取物治疗前后的分数，示出 NC/Nga 小鼠模型的过敏症状的变化；
- [0029] 图 8 示出在使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的临床评分的结果；
- [0030] 图 9 示出在使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的抓挠行为的结果；
- [0031] 图 10 示出使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的耳朵厚度（长度：mm）的测量结果；
- [0032] 图 11 示出使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的耳朵厚度（体积：%）的测量结果；
- [0033] 图 12（a）示出在口服给药北野菊的提取物之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的血清 IgE 浓度的测量结果；（b）示出在局部给药北野菊的提取物之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的血清 IgE 浓度的测量结果；
- [0034] 图 13 示出在使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的血清 IFN- γ 浓度的测量结果；
- [0035] 图 14 示出在使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的血清 IL-4 浓度的测量结果；
- [0036] 图 15 示出在使用北野菊的提取物治疗之后的诱导型特应性皮炎 NC/Nga 小鼠模型的耳朵组织切片的照片；
- [0037] 图 16 示出在使用北野菊的馏分治疗之后，RAW 264.7 细胞中的 LPS（脂多糖）诱导的细胞内一氧化氮的生成量；
- [0038] 图 17 示出在使用北野菊的馏分治疗之后，RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 iNOS（诱导型一氧化氮合酶）的生成量；
- [0039] 图 18 示出在使用北野菊的馏分治疗之后，RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 PGE2 的生成量；
- [0040] 图 19 示出在使用北野菊的馏分治疗之后，RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 COX-2 的生成量；
- [0041] 图 20 示出在使用北野菊的馏分治疗之后，RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内

I κ B 的生成量；

[0042] 图 21 示出在使用北野菊的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 P50 的生成量；

[0043] 图 22 示出在使用北野菊的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 P65 的生成量；

[0044] 图 23 示出在使用野菊花的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内一氧化氮的生成量；

[0045] 图 24 示出在使用野菊花的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 的生成量；

[0046] 图 25 示出在使用野菊花的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 PGE2 的生成量；

[0047] 图 26 示出在使用野菊花的馏分治疗之后在 RAW264.7 细胞中 LPS 诱导的细胞内 COX-2 的生成量；

[0048] 图 27 示出在使用野菊花的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 I κ B 的生成量；

[0049] 图 28 示出在使用野菊花的馏分治疗之后,RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的细胞内 P65 的生成量；

[0050] 图 29 示出针对北野菊的提取物和馏分的细胞毒性的 MTS 分析的结果。

具体实施方式

[0051] 为了实现上述目的,在一个方面中,本发明提供了一种具有抗炎症活性的组合物,所述组合物包括北野菊的提取物或馏分。

[0052] 本发明人已经选取了北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根(*Ilex cornuta* Lindl)和樱花(*Prunus yedoensis* Matsumura)的提取物,并检查了这些提取物在炎症疾病上的作用。结果发现北野菊的提取物具有最佳的效果。根据具体试验示例(示例 1),当用北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花的提取物治疗特应性皮炎诱发模型且随后进行临床评分时,发现与其他植物相比,记录的北野菊的提取物示出对于红斑、水肿、表皮脱落、瘙痒、皮肤干燥、糜烂和苔藓样硬化的低分值(见表 1 和表 2,以及图 4 和图 5),并且示出显著低的血清免疫球蛋白 E 浓度(见表 3 和图 6)。

[0053] 北野菊为多年生植物,该植物属菊科和桔梗目并且分布在韩国、日本、中国北部和西伯利亚,主要出现在山谷或田野中。该植物生长到 1m 到 1.5m。叶子为可互生(alternate)的,当开花时,底部的叶子落下。中间的叶子为椭圆形、卵形,且长 5cm 到 7cm 以及宽 4cm 到 6cm。底部的叶子有点像心形或末端平坦,分开的叶片具有类似的尺寸,并且为椭圆形、完整,以及在边缘为锋利叶状的锯齿形。叶柄为 1cm 到 2cm 长。边缘叶片为 2 对,并且在叶片、表面上的毛和反面的中部的毛之间具有大的间隙。该植物从 9 月到 10 月开花,并且花的直径为 1.5cm,花挂在枝和茎干的端部。总苞为 4mm 长且直径为 8mm。苞片为 3 排到 4 排,以及外苞片为直线型或椭圆形并且在其表面具有毛,以及内苞片为椭圆形且具有薄的边缘。花冠为 5mm 到 7mm 长、颜色为黄色,并且管状花冠的边缘被分成 5 部分。瘦果为倒椭圆形的且长度为 1mm,并且具有 5 排到 6 排以及没有冠毛,且在十月到十一月成熟。该植物的茎为 1m

到 1.5m 高并且具有多个具有短的白毛的分支。该植物的根长出并且小枝伸展开来。该植物在任何土壤中且尤其肥沃的土壤中生长的很好,并且比起潮湿的地方,更喜欢干燥的地方。

[0054] 本发明的北野菊为学名,并且可以从市场上可购买到的任何来源购买、从自然界收集或种植。此外,根据本发明的北野菊的提取物可以从天然植物、杂交植物或变异植物的各个器官抽提,例如根、茎、叶、花、新鲜果实和皮以及植物组织培养,并且最优选从北野菊的花中抽提。

[0055] 可通过用水、有机溶剂或它们的混合物抽提来获得根据本发明的北野菊的提取物。优选地,使北野菊干燥预定的时间并且将其粉碎,随后根据现有技术已知的例如热水抽提、冷水抽提、热抽提、超声抽提和冷抽提的常见方法抽提。抽提方法不特别受限并且可以在室温下或更高的温度下(前提条件是活性成分没有被破坏或该破坏程度被最小化)进行。优选地,通过使洗涤且干燥的北野菊粉碎而获得的北野菊的粉末可以用水、较低的 C_1-C_4 酒精或这些溶剂的混合物来抽提,更优选地,可以使用水或甲醇来抽提。

[0056] 可以通过以下步骤进行北野菊的热水抽提:用水加热北野菊,过滤北野菊,浓缩滤液,并且随后与赋形剂一起被粉化,并且用粘合剂将北野菊的粉末提取物制成片。

[0057] 所述赋形剂例如可以为淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖或明胶。

[0058] 此外,所述粘合剂可以例如为糊精、羟丙基纤维素、预胶凝淀粉、聚维酮(聚乙烯吡咯烷酮)、羧甲基纤维素、甲基纤维素或乙基纤维素。

[0059] 抽提时间不特别地受限,但可以为大约 2 小时到 5 小时,并且热水抽提可以在 70°C 到 100°C、优选地 80°C 到 100°C 下进行。基于北野菊的重量,10 倍到 30 倍,优选 15 倍到 25 倍,并且更优选地大约 20 倍体积的水可以用来制备北野菊的热水提取物。

[0060] 同时,可以通过北野菊的提取物进行分馏获得本发明的北野菊的馏分。为了获得馏分,可以使用本领域已知的各种溶剂,优选使用有机溶剂。例如,可以包括戊烷、己烷、2,2,4-三甲基戊烷、地卡因、环己烷、二硫化碳、四氯化碳、氯丁烷、二异丙醚、氯仿、丙酮、硝基丙烷、丁酮、二氯乙烷、吡啶、丙醇、甲醇和乙酸乙酯。优选的有机溶剂包括非极性有机溶剂,具体而言,这些非极性有机溶剂为氯仿、乙醇、乙酸乙酯或它们的溶剂混合物,但不限于此。在本发明的具体示例中,氯仿、乙醇或它们的溶剂混合物用来获得各种馏分,并且所有的馏分显示出活性。在这些馏分中,氯仿馏分显示出最高的抗炎症活性(表 8、表 9 和表 10)。

[0061] 本文中所使用的术语“抗炎症活性”意指抑制炎症,炎症是一种抵御一定刺激的人体内部防御机理,并且指产生三种变化(组织的改变、循环失调和分泌物以及组织的增殖)的复杂的机能障碍。更具体地,炎症为先天免疫的一部分,人类的先天免疫类似于其他动物,包括通过识别具体的细胞表面类型(pattern)获知病原体。吞噬细胞识别出异己的细胞来攻击病原体。如果病原体渗入人体的生理屏障,那么发生炎症。炎症为对损伤的部位的细菌产生不利的环境的非特定的防御。在炎症反应中,当损伤发生时或病原体侵入身体时,通过起始免疫反应涉及的白血球的募集来释放细胞因子。因此,胞内细胞因子浓度为炎症活性的指标。

[0062] 本发明人已经进行了北野菊的试验,并且证实北野菊的提取物和馏分具有抗炎症活性。在本发明的具体试验示例(示例 3)中,本发明人确认在使用北野菊的提取物或馏分治疗之后,在炎症疾病动物模型中,血清 IgE(血清免疫球蛋白 E)、IFN- γ (干扰素- γ)和 IL-4(白介素 4)浓度降低(图 12、图 13 和图 14);胞内 NO(一氧化氮)浓度降低(图 16);

iNOS (诱导一氧化氮合酶) 浓度降低(图 17); 胞内 PGE2 (前列腺素 E2) 的浓度降低(图 18); 胞内 COX-2 蛋白浓度降低(图 19); 以及抑制 I κ B 磷酸化和 NF- κ B 核易位降低(图 20、图 21 和图 22)。由于所有这些物质在炎症或过敏反应期间被高度表达, 故它们的表达浓度的降低表明北野菊的提取物具有抗炎活性。

[0063] 具体而言, 与野菊花(野菊花(*Chrysanthemi Indici Flos*) 为属菊科的多年生植物、60cm 到 90cm 长、具有暗红色的茎并且具有裂开的羽状叶和在十月到十一月盛开在枝头的芳香的黄色花) 对比, 发现北野菊(5 μ g/ml) 的甲醇(MeOH) 提取物、氯仿(CHCl_3) 馏分和乙酸乙酯(EtOAc) 馏分分别可将炎症疾病动物模型中的胞内一氧化氮(NO) 浓度降了大约 38%、78% 和 30% (示例 3 和示例 2), 而发现野菊花分别在 2.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 的浓度下, 野菊花的甲醇提取物将胞内一氧化氮浓度降低至 97.9%、89.0%、37.3% 和 17.8%, 以及野菊花的氯仿馏分将胞内一氧化氮浓度降低至 50.6%、19.2%、16.6% 和 7.5%(表 14)。该结果表明, 较少量的北野菊的提取物显示出与野菊花的效果相同或更好的效果。此外, 当比较 iNOS (诱导一氧化氮合酶) 浓度降低(图 24)、胞内 PGE2 (前列腺素 E2) 浓度降低(图 25)、胞内 COX-2 蛋白浓度降低(图 26)、以及抑制 I κ B 磷酸化和 NF- κ B 核易位降低(图 27 和图 28) 时, 尽管北野菊的含量较低, 但是北野菊的提取物和馏分显示出比野菊花更佳的效果。

[0064] 一氧化氮(NO) 在生理条件下具有血管舒张药物的作用。然而, 当巨噬细胞受到炎症细胞因子刺激时, iNOS 产生的 NO 在病理状态下诱发炎症以提高 COX-2 (环氧酶-2) 的活性, 借助花生四烯酸级联导致炎症扩增。

[0065] IFN- γ 也被称为 II 型干扰素, 通过 CD4T 细胞或 CD8T 细胞产生以调节免疫反应, 并且由此被称为免疫干扰素。IFN- γ 对 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和内皮细胞起作用以激活它们, 并且具有巨噬细胞激活因子的功能以增加 I 型 MHC 和 II 型 MHC 的表达。IFN- γ 还像其他干扰素一样能够抑制病毒复制。

[0066] IL-4 为大约 20kDa 大小的蛋白质, 其通过 CD4T 细胞和活化的肥大细胞产生并且具有 B 细胞生长因子的功能。IL-4 还具有 B 细胞中的免疫球蛋白类别转换中涉及的分化因子的功能, 并且还可以激活 CD4T 细胞、肥大细胞和巨噬细胞。

[0067] 与上述结果一致, 根据本发明的北野菊的提取物或馏分在尤其是特应性皮炎的炎症疾病上具有优异的预防和治疗活性。

[0068] 北野菊的提取物和馏分不是人工合成的化合物, 而基于天然提取物获取的成分。因此, 北野菊的提取物和馏分是安全、无毒和没有副作用的, 并且可以长期使用。此外, 该组合物可以用于具有炎症疾病的动物, 包括猴、狗、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠、牛、绵羊、猪和山羊以及人。

[0069] 因此, 本发明可以用来制备用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物, 该药物组合物包含作为活性成分的北野菊的提取物或馏分, 并且通过施用该组合物可以预防或治疗炎症疾病。

[0070] 在本发明的另一方面中, 本发明涉及用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物, 该组合物包含作为活性成分的北野菊的提取物或馏分, 本发明还涉及一种用于预防或治疗炎症性疾病的方法, 所述方法通过对具有炎症性疾病或具有炎症性疾病风险的患者施用包含北野菊的提取物或馏分的所述组合物而进行的。

[0071] 炎症性疾病可以为过敏性炎症疾病,过敏性炎症疾病可以包括慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、风湿性关节炎、特应性皮炎和炎症性肠病。然而,可以包括通过炎症或过敏反应诱发的任一疾病而不受限制,并且优选包括特应性皮炎。

[0072] 本文中所使用的术语“预防”表示通过施用包含根据本发明的北野菊的提取物或馏分的组合物,疾病得到抑制或延缓的所有行为。

[0073] 本文中所使用的术语“治疗”表示通过施用包含根据本发明的北野菊的提取物或馏分的组合物,疾病大大好转或改善的所有行为。

[0074] 根据本发明的具体试验示例(示例2),本发明人确认:在使用北野菊的提取物治疗之后,在炎症性疾病动物模型中,1) 红斑、水肿、表皮脱落、瘙痒、皮肤干燥、糜烂和苔藓样硬化减轻(图7和图8);2) 耳肿胀减轻(图10和图11);3) 抓挠行为减少(图9);4) 抑制成纤维细胞增殖、胶原蛋白层增生和溃疡,降低肥大细胞浸润,以及减轻由中性粒细胞浸润和淋巴细胞浸润引发的炎症(图15),这表明对尤其特应性皮炎的炎症性疾病有治疗作用。

[0075] 用于预防或治疗炎症性疾病的包含根据本发明的北野菊的提取物或馏分的药物组合物可以经各种途径向哺乳类动物给药,所述哺乳类动物包括大鼠、小鼠、家畜和人。考虑所有给药方式,例如,给药可以以口服、直肠给药、或通过静脉注射、肌肉注射、皮下注射、硬膜外注射或侧脑室注射而进行。优选地,该组合物可以应用到皮肤,并且最优选地口服给药。

[0076] 本发明的用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物以药学上有效的量被给药。本文所使用的术语“药学上有效的量”指足以治疗疾病的量,该量与应用于医疗的适当的获益/风险比相称。可以根据对象和疾病的严重程度、年龄、性别、感染病毒的类型、药物活性、病人的药物敏感性、给药时间、给药途径、排出率、治疗持续时间、同时使用的药物和医学领域中知道的其他因素来确定该组合物的有效剂量。本领域技术人员可以理解,有效量根据给药途径、赋形剂用量和与其他活性剂共同使用而不同。

[0077] 本发明的用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物可以以该药物组合物的药学上可接受的盐的形式使用,并且还可以单独使用或结合其他的药学上的活性化合物使用。

[0078] 可以使用本领域已知的方法将本发明的用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物制备成药物制剂以便在对哺乳动物给药后提供活性成分的快速、延长或延迟释放。在制剂的制备中,优选地,活性成分可以与载体混合或用载体稀释,或装在容器类型的载体中。

[0079] 因此,本发明的用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物可以根据常见的方法被制成用于口服的剂型,例如粉末、颗粒、药片、胶囊、悬浮剂、乳剂、糖浆、气雾剂等,或者用于外敷的剂型、栓剂和灭菌注射溶液。还可以包括组合物的制备中通常使用的合适的载体、赋形剂和稀释剂。

[0080] 本发明的药物组合物中可包括的载体、赋形剂和稀释剂的示例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、北露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、海藻酸盐、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、甲基羟苯甲酸酯、丙基羟苯甲酸酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。在制备期间,通常所用的填料、增量剂(extender)、粘合剂、润湿剂、崩解剂(disintegrant)、表面活性剂等被用作稀释剂或赋形剂。

[0081] 用于口服给药的固体剂型包括药片、药丸、粉末、颗粒等。通过将所述提取物与例

如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等的至少一种赋形剂混合来制备固体剂型。此外,除了赋形剂之外,还可以使用例如硬脂酸镁和滑石的润滑剂。

[0082] 用于口服给药的液体剂型包括悬浮剂、用于内用的液体、乳剂、糖浆等。除了例如水和液态石蜡的常用的简单稀释剂以外,还可以包括例如润湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等多种赋形剂。

[0083] 肠胃外给药的剂型包括无菌水溶液、非水性溶液、悬浮液、乳液、冷干制剂和栓剂。非水性溶液或悬浮液可包括丙二醇、聚乙二醇、例如橄榄油的蔬菜油、例如油酸乙酯的可注射酯等。栓剂的基料可以为 witepsol、聚乙二醇、吐温 61 (Tween61)、可可油、月桂油和北油凝胶等。

[0084] 在另一方面中,本发明提供用于减轻炎症性疾病的食品组合物,该组合物包含作为活性成分的北野菊的提取物或馏分。

[0085] 可以以药丸、粉末、颗粒、浸剂、药片、胶囊或饮料的形式制备本发明的食品组合物,并且本发明的食品组合物可以加入到例如饮料、口香糖、茶、复方维生素、保健食品等的各种食品中。

[0086] 除了作为必要成分的北野菊的提取物或馏分之外,本发明的食品组合物可包括其他成分而不受特别限制,并且可以以常规食品的相同方式包括各种草药提取物、食品添加剂或天然糖类。

[0087] 该食品组合物还可包括选自北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花的一种或多种草药提取物。

[0088] 此外,还可以包括食品补充添加剂,食品添加剂包括本领域熟知的香味剂、调味剂、着色剂、填料、稳定剂等。

[0089] 天然糖类的示例包括:常规的糖,例如单糖(例如,葡萄糖和果糖等);二糖(例如麦芽糖和蔗糖等);多糖(例如糊精和环糊精等);和糖醇,例如木糖醇、山梨糖醇和赤藓糖醇。此外,可以恰当地使用例如奇异果甜蛋白、甜叶菊提取物(例如莱苞迪忒 A 和北草酸等)的天然香味剂和例如糖精和天冬甜素的合成香味剂等作为香味剂。

[0090] 此外,本发明的食品组合物可包含各种营养素、维生素、矿物质(电解质)、调味剂(例如合成调味剂和天然调味剂等)、着色剂、增量剂(奶酪和巧克力等)、果胶酸和果胶酸盐、海藻酸和海藻酸盐、有机酸、保护胶体的增稠剂、酸碱性调节剂、稳定剂、防腐剂、北油、乙醇、用于碳酸饮料的碳酸化剂等。此外,本发明的食品组合物可包含可以用于制备天然果汁、果汁饮料和蔬菜饮料的果肉。上述各成分可以单独使用或组合使用。

[0091] 此外,可应用的食物没有限制,这些食物例如有肉、香肠、面包、巧克力、糖果、点心、饼干、比萨、日本拉面、口香糖、冰淇淋、汤、饮品、茶、功能水、饮料、酒精类饮料和复方维生素。

[0092] 在另一方面中,本发明涉及一种化妆品组合物,该化妆品组合物包括作为活性成分的北野菊的提取物或馏分。

[0093] 根据本发明的化妆品组合物可被制成化妆水、凝胶、可溶于水的粉末、可溶于油的粉末、可溶于水的液体、面霜、香精等,如果必要的话,使用常规方法加入控制酸碱度的物质、香料、乳化剂和防腐剂。

[0094] 在另一方面中,本发明涉及一种准药物组合物,该准药物组合物包括作为活性成

分的北野菊的提取物或馏分。换言之,本发明的所述组合物可以加入到准药物组合物中以预防或减轻炎症疾病。

[0095] 当本发明的北野菊的提取物或馏分被用作准药物添加剂时,该提取物或馏分可以未加改变地添加或根据通常的方法可以结合其他的准药物或准药物成分使用。活性成分的混入量可以根据使用目的(预防、保健或医疗)而适当地确定。优选地,在除菌清洁剂、沐浴露、口腔清新剂、湿巾、清洁皂、洗手液、加湿器填料、面膜、药膏、涂抹剂或过滤填料的制备中可以使用该准药物组合物。包括根据本发明的过滤填料的过滤器可以被应用到各个领域,且用在本领域已知的任一过滤设备中。

[0096] 因此,在另一方面中,本发明提供了一种用于预防或治疗炎症性疾病的水软化剂组合物,该水软化剂组合物包括过滤填料。

[0097] 本文所使用的术语“水软化剂”为设计成用来从硬水去除例如钙和镁的阳离子的装置,并且还被称为硬水软化剂。除了水软化功能以外,该水软化剂可包括空气清洁的功能和水纯化功能。本发明的该水软化剂包括含有所述组合物的过滤填料,所述组合物包含作为活性成分的北野菊的提取物或馏分,由此对于预防和减轻特别是特应性皮炎的炎症疾病是有效的。除了北野菊的提取物或馏分之外,本发明的水软化剂还可包含例如根据目的而定的东方草药的多种成分。

[0098] 本发明的方式

[0099] 在下文中,将结合示例更详细地描述本发明。然而,以下示例仅用于例证目的,并且本发明不限于这些示例。

[0100] 示例 1 样本提取和筛选

[0101] (1) 候选药物的抽提

[0102] 使用 100% 甲醇(MeOH)作为溶剂,在 110℃的提取器中对 100g 的北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花各抽提三次,在减压条件下使用旋转式蒸发器浓缩,并且随后冷干以获得各 100% 的甲醇提取物。

[0103] (2) NC/Nga 小鼠模型的介绍

[0104] NC/Nga 小鼠被称为自发特应性皮炎小鼠模型,由于因 JAK3 激酶过磷酸化而 IgE 生成增多而产生。近来,据报道,特应性皮炎也在剔除 STAT6 的 NC/Nga 小鼠中自发地诱发,其中,STAT6 对于 IgE 和 Th2 细胞因子的产生是重要的,这表明皮炎通过其他未预想到的机理诱发(J. I. 1999, 162 :1056-63)。尽管具有这些优点,但自发性皮炎诱发的比率低并且诱发型皮炎的严重程度不同。实际上,小鼠模型对于评估是不可靠的模型。因此,在日本,使用半抗原和三硝基氯苯通过人工诱发皮炎解决该问题。然而,三硝基氯苯在韩国为禁用的,因此在本文中使用结构上类似于三硝基氯苯的 DNCB (1- 氯 2, 4- 二硝基苯,西格玛 23732-9)来进行试验,以便获得类似的结果。

[0105] 在该模型中,特应性皮炎的主要症状(瘙痒、IgE 生成增加和皮肤发炎)全部被观测到,并且此外,这些症状完全通过局部用类固醇或口服环孢菌素来治疗,所述类固醇和环孢菌素对于特应性皮炎是公知治疗药剂。因此,NC/Nga 小鼠模型被作为体内模型引入,以对用于特应性皮炎的治疗药剂作疗效评价。

[0106] (3) 通过使用 NC/Nga 小鼠的筛选方法

[0107] 自发特应性皮炎小鼠模型即 NC/Nga 小鼠用于诱发特应性皮炎,并且随后以下述

方式进行评估以筛选最有效的药物。使用以下试验组进行药物筛选：正常组，不用 DNCB 处理以免患特应性皮炎；对照组，用 DNCB 处理以患特应性皮炎；口服给药组，用北野菊的提取物（100mg/kg, 400mg/kg）治疗；和局部给药组，用北野菊的提取物（200 μ l : 1% 的稀释液，2% 的稀释液）治疗。

[0108] A. 临床评分

[0109] 进行两次临床评分，在 DNCB（西格玛 23732-9）处理之后进行一次，和用候选治疗剂（各 100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花）治疗之后进行一次。通过两个或两个之上的有经验的研究者执行和评估特应性皮炎的临床评分。具体而言，在完成药物治疗之后拍照并且存储照片。视觉评估结果用下面的五项的单独评分的总和表示。评估项包括红斑、瘙痒和皮肤干燥、水肿和表皮脱落、糜烂、以及苔藓样硬化，这些项按如下单独评分：无（0）、轻微（1）、中度（2）和严重（3）。因此，评分范围为从 0 到 15。将药物治疗前后的评分进行比较以确定减少率，将该减少率与载体治疗组的减少率进行比较以用于显著性试验。

[0110] B. 抓挠行为评估

[0111] 紧接着药物给药之后，检查达 30 分钟的发痒和抓挠行为的指标。用后肢抓挠被计作一次抓挠行为，以及在 1 秒内的快速且频率高的抓挠行为也被计作一次抓挠行为。

[0112] C. 血清 IgE 浓度

[0113] 在用候选治疗药物（各 100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊、蒲公英、黄柏、石菖蒲、枸骨根和樱花）治疗 DNCB（西格玛 23732-9）诱发的皮炎之后，通过 ELISA 来测定血清 IgE 浓度。将药物治疗前后的血清 IgE 浓度对比以测定减少率，将该减少率与赋形剂治疗组的减少率对比以用于显著性试验。

[0114] A. 药物治疗组：[治疗之前的 IgE（药物）- 治疗之后的 IgE（药物）]/ 治疗之前的 IgE（药物）

[0115] B. 赋形剂治疗组：[治疗之前的 IgE（载体）- 治疗之后的 IgE（载体）]/ 治疗之前的 IgE（载体）

[0116] (4) 结果

[0117] A. 临床评分结果

[0118] 就临床评分结果而言，与其他候选药物对比，针对北野菊记录的分值较低，并且该分值接近于正常组的分值。此外，表 1 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的临床评分（图 5）。

[0119] 表 1

[0120] [表 1]

[0121]

(mg/kg)	1 天	5 天	8 天	15 天	22 天	25 天	27 天
正常组	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.3 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 1.5
对照组	0 $\pm$ 0	6.2 $\pm$ 0.8	11.3 $\pm$ 1.5	11.3 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.8
北野菊 100- 治疗组	0 $\pm$ 0	5.5 $\pm$ 2.1	10.0 $\pm$ 3.3	9.8 $\pm$ 2.4	6.8 $\pm$ 1.2	5.5 $\pm$ 2.3	4.2 $\pm$ 1.8

北野菊 400- 治疗组	0±0	5.5±1.1	10.7±2.1	10.2±1.7	7.8±1.5	4.7±1.0	3.4±2.1
蒲公英 100- 治疗组	0±0	5.1±1.5	9.6±2.7	9.1±2.2	7.5±1.6	6.3±0.5	3.8±1.5
蒲公英 400- 治疗组	0±0	5.1±1.2	10.0±2.5	9.6±1.8	7.1±1.7	5.0±2.1	4.0±1.6
黄柏 100- 治疗组	0±0	5.5±1.6	10.5±3.1	10.6±2.9	6.8±1.8	5.5±2.2	4.1±1.8
黄柏 400- 治疗组	0±0	6.0±1.6	11.3±3.1	11.6±2.9	8.5±1.8	7.0±2.2	3.3±1.8
石菖蒲 100- 治疗组	0±0	5.6±1.0	10.6±2.6	10.6±1.9	8.3±0.8	6.5±0.8	4.3±1.2
石菖蒲 400- 治疗组	0±0	6.5±0.5	12.3±0.8	12.3±0.8	9.5±0.5	6.5±0.5	5.0±0.6
枸骨根 100- 治疗组	0±0	5.1±0.9	10.3±1.9	10.3±1.2	7.5±1.5	4.5±2.0	3.6±1.6
枸骨根 400- 治疗组	0±0	5.5±1.3	10.3±2.8	10.1±2.4	8.3±1.8	6.3±1.0	5.1±1.6
樱花 100- 治疗组	0±0	4.7±0.5	9.2±0.9	8.7±1.2	6.7±1.2	5.0±1.6	3.7±1.2

[0122] B. 抓挠行为的结果

[0123] 表 2 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的抓挠行为的变化。当检查发痒和抓挠行为的指标时,100 (mg/kg)和 400 (mg/kg)的北野菊分别被评分为 30.4±1.1 (分)和 21.8±2.8 (分)。该结果表明这些分值明显低于其他药物的分值(图 4)。

[0124] 表 2

[0125] [表 2]

[0126]

(mg/kg)	抓挠行为(次数)
正常组	32.2±1.4
对照组	63.0±2.9
北野菊 100- 治疗组	30.4±1.1
北野菊 400- 治疗组	21.8±2.8
蒲公英 100- 治疗组	48.4±2.1
蒲公英 400- 治疗组	38.0±3.4
黄柏 100- 治疗组	60.4±2.7
黄柏 400- 治疗组	61.8±1.5
石菖蒲 100- 治疗组	59.6±3.1

石菖蒲 400- 治疗组	54.8±3.1
枸骨根 100- 治疗组	52.6±2.4
枸骨根 400- 治疗组	68.2±2.4
樱花 100- 治疗组	29.0±1.9

[0127] C. 血清 IgE 浓度的结果

[0128] 就血清 IgE 浓度而言,与其他候选药物对比,北野菊记录的分值较低。100(mg/kg)和 400 (mg/kg) 的北野菊分别被评分为 63.46±16.92 (ng/ml) 和 46.99±8.88 (ng/ml)。表 3 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的血清 IgE 浓度的变化(图 6)。

[0129] 表 3

[0130] [表 3]

[0131]

(mg/kg)	IgE (ng/ml)
正常组	77.35±6.62
对照组	106.82±13.36
北野菊 100- 治疗组	63.46±16.92
北野菊 400- 治疗组	46.99±8.88
蒲公英 100- 治疗组	87.91±10.97
蒲公英 400- 治疗组	71.42±12.83
黄柏 100- 治疗组	98.08±11.42
黄柏 400- 治疗组	101.13±23.74
石菖蒲 100- 治疗组	97.73±18.07
石菖蒲 400- 治疗组	91.75±6.65
枸骨根 100- 治疗组	92.88±7.79
枸骨根 400- 治疗组	113.83±12.91
樱花 100- 治疗组	60.68±9.44

[0132] 因此,可以看出,根据临床评分、抓挠行为和血清 IgE 浓度的结果,候选药物中的北野菊显示出对诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型有最明显的效果。因此,基于上述结果进一步研究了北野菊。试验的详细描述和结果如下。

[0133] 示例 2. 特应性皮炎的测试 :NC/Nga 小鼠测试

[0134] 2-1. 试验方法

[0135] (1) NC/Nga 小鼠模型的介绍

[0136] NC/Nga 小鼠用于测试北野菊的提取物和馏分对特应性皮炎的主要症状(瘙痒和 IgE 生成增多等)的作用。

[0137] (2) 北野菊的提取物和馏分

[0138] 使用 100% 甲醇(MeOH)作为溶剂,在 110℃的提取器中抽提三次 100g 的北野菊,使用旋转式蒸发器在减压条件下浓缩,并且随后冷干以获得 100% 的甲醇提取物。将北野菊的 32.3g 的 100% 甲醇提取物溶解在热水中,并随后使用氯仿和乙酸乙酯分馏。然后,将各馏分浓缩以获得 4.3g 的水馏分、2.7g 的氯仿馏分和 0.56g 的乙酸乙酯馏分(图 1)。

[0139] (3) 反应剂和仪器

[0140] 1) 反应剂

[0141] -DNCB (西格玛 23732-9)

[0142] - 橄榄油(Shinyo Chemical 912193)

[0143] -NC/Nga 小鼠(Central Lab. animal Inc., 韩国)

[0144] - 小鼠 IgE 酶联免疫(ELISA)试剂盒(SHIBAYAGI Co., Ltd, 日本)

[0145] -IL-4 (R&D 系统, Quantikine 免疫试剂盒, 明尼苏达州(MN.) 美国)

[0146] -IFN- γ (R&D 系统, Quantikine 免疫试剂盒, MN. 美国)

[0147] - 分色剂(哈里斯氏苏木精染剂(Harris' hematoxylin), MUTO, 日本)

[0148] - 曙红(MUTO, 日本)

[0149] - 加拿大香脂(JUNSEI, 日本)

[0150] 2) 仪器

[0151] -ELISA 板式读数器:酶标仪(Molecular Devices Co., 美国)

[0152] - 板式振荡仪:REO ROTOR (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.)

[0153] - 千分尺(IP65coolant proof, #293-240, 三丰公司, 日本)

[0154] - 超薄切片机(HM325)

[0155] - 剪切器(JC-4005, JOAS Elec. 公司, 韩国)

[0156] (4) 特应性皮炎的诱发和样本处理

[0157] 1) 试验动物

[0158] 用作试验动物的 5 周大的 NC/Nga 小鼠由 Animal Inc. 公司的 Jung Ang 试验室提供,以及在试验设备中适应 1 周之后,测量它们的体重($22 \pm 3g$)。6 到 8 个小鼠用于试验中的每一组。在试验期间,动物被保持在 $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温度和 $50 \pm 5\%$ 的湿度下,自由获得固体供食和水。在试验的前一天,使用剪切器(JC-4005, JOAS Elec. CO., 韩国)修剪各个动物的背部(从耳朵的下部到尾巴的顶端)以完全去除毛发。所有的试验动物步骤根据试验动物的护理和使用指南(the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)进行并得到韩国庆熙大学动物伦理委员会的批准。

[0159] 2) 特应性皮炎的诱发和样本处理。

[0160] 在为了诱发特应性皮炎而修剪 Nc/Nga 小鼠的背部 24 小时之后,将 $200 \mu\text{l}$ 的 0.5%DNCB (西格玛 23732-9)溶液(丙酮:橄榄油 =3:1)施用到已修剪的皮肤上,每天施用且

持续两周以免疫。在样本给药开始之后的 3 周中,将 200 μ l 的 0.5%DNCB 溶液一周三次地施加到已修剪的皮肤以诱发特应性皮炎。用 DNCB 处理每个小鼠的已修剪的背部皮肤达 2 周以诱发特应性皮炎,并且随后样本被每天给药且持续 4 周(口服给药和局部给药)。口服给药 100mg/kg 和 400mg/kg 的样本,以及局部给药 200 μ l 的各为 1% 和 2% 的稀释液。在图 2 中示出了针对 DNCB 处理的 NC/Nga 小鼠的特应性皮炎的诱发和样本处理步骤。

[0161] (5) 评估方法

[0162] A. 临床评分

[0163] NC/Nga 小鼠的特应性皮炎通过通常使用的临床视觉评估方法来评估。在 DNCB 处理之前、在 DNCB 处理期间、在药物治疗之前、在药物治疗期间、在药物治疗结束之后分别立即执行临床评分。特应性皮炎的临床评分通过两个或两个之上的有经验的研究者来执行和评估。具体而言,在完成药物治疗之后进行了拍照并存储照片。视觉评估的结果用下面的五项的单独评分的总和表达。评估项包括红斑、瘙痒和皮肤干燥、水肿和表皮脱落、糜烂、以及苔藓样硬化,这些项按照如下单独评分:无(0)、轻微(1)、中度(2)和严重(3)。因此,这些评分的范围为从 0 到 15。特应性皮炎的临床评分通过两个或两个之上的有经验的研究者来执行和评估。具体而言,在完成药物治疗之后进行了拍照并存储照片。

[0164] B. 抓挠行为评估

[0165] 紧接着药物给药之后,检查发痒和抓挠行为的指标达 30 分钟。用后肢抓挠被计作一次抓挠行为,以及在 1 秒内的快速和频率高的抓挠行为也被计作一次抓挠行为。

[0166] C. 耳朵厚度的测量

[0167] 使用千分尺(IP65coolant proof, #293-240, 三丰公司, 日本)测量了在右耳的中部的耳朵厚度。

[0168] D. 血清 IgE、IFN- γ 和 IL-4 的浓度的测定

[0169] 在试验完成的当天,从小鼠的心脏采集血液,且随后以 5000rpm、4°C 下离心分离达 3 分钟以分离出血清。在 -70°C 的深冷冻箱中存储该血清,以及在使用之前解冻。Nc/Nga 小鼠的血清 IgE、IL-4 和 IFN- γ 的浓度分别使用小鼠 IgE 酶联免疫(ELISA)试剂盒(SHIBAYAGI Co., Ltd, 日本)、IL-4 (R&D 系统, Quantikine 免疫试剂盒, MN. 美国)和 IFN- γ (R&D 系统, 免疫试剂盒, MN. 美国)来测定。

[0170] 根据 IgE 小鼠 ELISA 试剂盒(SHIBAYAGI Co., Ltd, 日本)的步骤来测定 IgE 浓度。在室温下制备所有的试剂并且直接使用所述试剂。

[0171] 使用洗涤缓冲液对板洗涤 3 次,以及将 50 μ l 的 IgE 标准溶液或样本溶液(样本 5 μ l + 缓冲液 45 μ l)等分到各个孔,并且使用微板振荡仪缓慢混合。该板在室温(20°C 到 25°C)下培养 2 小时,且随后用缓冲溶液洗涤三次。将 50 μ l 的生物素标记的抗 IgE 抗体等分到各个孔,并且使用微板振荡仪缓慢混合。该板在室温下培养 2 小时,且随后用缓冲溶液洗涤三次。将 50 μ l 的辣根过氧化物酶标记亲和素(HRP-avidin)溶液等分到各个孔,并且使用微板振荡仪缓慢混合。该板在室温下培养 1 小时。随后,将 50 μ l 的产色基质溶液等分到各个孔,并且使用微板振荡仪缓慢混合。该板在室温下培养 20 分钟。随后,将 50 μ l 的反应停止剂添加到各个孔且搅匀以停止进一步产色,以及在 30 分钟内测量了 450nm 的吸光度。

[0172] 根据 IL-4 (R&D 系统, Quantikine 免疫试剂盒, MN. 美国)和 IFN- γ (R&D 系统,

Quantikine 免疫试剂盒, MN. 美国) 的步骤测定 IL-4 浓度和 IFN- γ 浓度。

[0173] 根据指示, 制备了所有的试剂和样本, 以及所有的试剂溶液保持在室温下, 以及试验被重复两次。将 50 μ l 的试剂稀释液 (assay diluent) RD1-18 (IL-4) 或 RD1-21 (IFN- γ) 加入到各个孔。50 μ l 的正常组、对照组和样本都被添加到各个孔, 以及轻柔敲击背面区域达 1 分钟以混合均匀。该板被覆盖且在室温下持续培养 2 小时。使用抽吸器, 该溶液从各个孔被完全取出并且被洗涤。该过程被重复五次。将 100 μ l 的 IL-4 (小鼠 IL-4 铈合物) 或 IFN- γ (IFN- γ 铈合物) 添加到各个孔。该板用新的粘合盖板覆盖, 在室温下培养 2 小时, 且随后被洗涤五次。将 100 μ l 的基质溶液添加到各个孔, 且在室温下在黑暗中培养 30 分钟。将 100 μ l 的终止液添加到各个孔, 轻柔敲击该板以完全混合。在 30 分钟内, 通过 540nm (或 570nm) 的校正, 测量每个孔的 450nm 的吸光度。

[0174] E. 组织染色和评估

[0175] 在该试验完成之后, 牺牲小鼠, 取走后背组织和耳朵组织并且将所述组织固定在 10% 的中性福尔马林中。将该组织嵌入石蜡中以制备石蜡嵌块。使用超薄切片机 (Microm-HM325) 将石蜡块剪切成 10 μ m 的剪切厚度, 且随后将组织切片切割成 3 μ m 到 4 μ m 的厚度。获得的组织切片在二甲苯中被脱除石蜡、浸泡 [100% 酒精 (3min) $\rightarrow$ 90% 酒精 (3min) $\rightarrow$ 80% 酒精 (3min) $\rightarrow$ 70% 酒精 (3min) $\rightarrow$ D.W (3min)], 并且被染色 [哈里斯氏苏木精 (4min) $\rightarrow$ 洗涤 $\rightarrow$ 1% HCl 酒精 (一次) $\rightarrow$ 洗涤 (10min) $\rightarrow$ 曙红 (10-20 秒)], 且随后被脱水 [70% 酒精 (浸渍) $\rightarrow$ 80% 酒精 (浸渍) $\rightarrow$ 95% 酒精 (浸渍) $\rightarrow$ 100% 酒精 (浸渍) $\rightarrow$ 100% 酒精 (浸渍)] 以及被脱色 [二甲苯 (3min) $\rightarrow$ 二甲苯 (3min)], 随后密封。

[0176] 此外, 为了评估炎症程度, 执行组织学检查以研究诱发的特应性皮炎的皮肤的表皮厚度、肥大细胞浸润、嗜曙红细胞浸润、中性白细胞和淋巴细胞的浸润以及成纤维细胞增殖和胶原层增生。用阿尔新蓝对肥大细胞染色并且检查。

[0177] F. 统计分析

[0178] 执行配对 T- 检验以对比试验前后的平均值。P<0.05, 换言之, 小于 5% 在统计学上被视为显著的。

[0179] 2-2. 试验结果

[0180] A. 临床评分结果

[0181] 在总共 6 组中, 即正常组、DNCB 诱发的特应性皮炎对照组、口服给药组 (100mg/mL 和 400mg/mL 的北野菊提取物) 和局部给药组 (200 μ l 的 1% 和 2% 的北野菊提取物), 以一周的间隔对小鼠的背部和耳朵中出现的过敏症状检查五次。图 3 用作临床评分的参考指标。

[0182] 正常组具有健康的皮肤, 对照组发展成明显的例如红斑、水肿、表皮剥落、鳞屑和苔藓样硬化的过敏症状。在口服给药组和局部给药组中, 发现与对照组对比, 过敏性症状被明显抑制, 但是通过视觉检查发现, 口服给药组比局部给药组更快地改善特应性皮炎 (图 7)。

[0183] 在诱发特应性皮炎 1 周之后, 可以发现, 临床评分在对照组中记录为 6.2 ± 0.8 , 在口服给药组 (100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物) 中分别记录为 5.5 ± 2.1 和 5.5 ± 1.1 , 以及在局部给药组 (1% 和 2% 的北野菊提取物) 中分别记录为 5.2 ± 1.0 和 5.5 ± 1.4 , 这表明在上述所有组中诱发了特应性皮炎。

[0184] 在诱发特应性皮炎 2 周之后, 可以发现, 临床评分在对照组中的记录为

11.3±1.5,在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 10.0±3.3 和 10.7±2.1,以及在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中分别为 10.3±2.0 和 10.3±2.8,这表明北野菊提取物还没有显示出其作用。

[0185] 在诱发特应性皮炎 4 周之后,换言之,在药物治疗 2 周之后,发现临床评分在对照组中的记录为 7.3±0.8,在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 4.7±1.3 和 5.2±1.3,这表明北野菊提取物开始显示出其作用并且特应性皮炎得到显著改善。然而,在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中的临床评分分别为 7.5±1.5 和 8.3±1.9,这表明没有改善特应性皮炎。

[0186] 在诱发特应性皮炎 6 周之后,换言之,在药物治疗 4 周之后,发现临床评分在对照组中的记录为 7.3±0.8,在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 3.4±2.1 和 3.3±0.5,以及在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中分别为 4.5±2.1 和 6.3±1.0,这表明通过北野菊提取物改善了特应性皮炎。

[0187] 根据试验结果,正常组具有健康的皮肤,诱发型特应性皮炎的对照组发展成明显的例如红斑、水肿、表皮剥落、鳞屑和苔藓样硬化的过敏症状。在口服给药组和局部给药组中,发现与诱发型特应性皮炎的对照组对比,过敏性症状被明显抑制。但是在特应性皮炎诱发 4 周之后,在口服给药组中发现特应性皮炎的改善,以及在特应性皮炎诱发 6 周之后,在局部给药组中发现特应性皮炎的改善,这表明口服给药组比局部给药组更快地改善了特应性皮炎(图 8)。换言之,口服给药组显示出了比局部给药组有效的对特应性皮炎的改善。

[0188] 在下表中,NOR 表示正常组,CON 表示对照组,CBP1 表示口服给药组(100mg/kg 的北野菊提取物),CBP4 表示口服给药组(400mg/kg 的北野菊提取物),CBS1 表示局部给药组(200 μ l 的 1% 的北野菊提取物),以及 CBS2 表示局部给药组(200 μ l 的 2% 的北野菊提取物)。表 4 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的临床评分的结果。

[0189] 表 4

[0190] [表 4]

[0191]

临床评分	剂量	0 天	7 天	14 天	28 天	42 天
NOR		0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.5	0.8±1.3	1.0±1.6
CON		0.0±0.0	6.2±0.8 ^{##}	11.3±1.5 ^{##}	7.3±0.8 ^{##}	7.3±0.8 ^{##}
CBP1 口服给药	100mg/kg	0.0±0.0	5.5±2.1	10.0±3.3	4.7±1.3 ^{**}	3.4±2.1 ^{**}
CBP4 口服给药	400mg/kg	0.0±0.0	5.5±1.1	10.7±2.1	5.2±1.3 ^{**}	3.3±0.5 ^{**}
CBS1 局部给药	1%	0.0±0.0	5.2±1.0	10.3±2.0	7.5±1.5	4.5±2.1 ^{**}
CBS2 局部给药	2%	0.0±0.0	5.5±1.4	10.3±2.8	8.3±1.9	6.3±1.0 [*]

[0192] 所有的数据表示成平均值 ±SD (N=5)

[0193] ^{##} :p<0.01,与正常组对比

[0194] * :p<0. 05, ** :p<0. 01, 与对照组对比

[0195] B. 抓挠行为的结果

[0196] 在对照组中观测到每 30 分钟 63. 0±2. 9 次的抓挠行为, 在口服给药组 (100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物) 中分别观测到每 30 分钟 30. 4±1. 4 次和每 30 分钟 21. 8±2. 9 次的抓挠行为, 以及在局部给药组 (1% 和 2% 的北野菊提取物) 中分别观测到每 30 分钟 45. 4±2. 7 次和每 30 分钟 45. 0±3. 4 次的抓挠行为。

[0197] 在所有被治疗的组中观测到抓挠行为减少, 以及在口服给药组和局部给药组中抓挠行为得到抑制的比例分别为约 51%-65% 和 28%-29% (图 9)。图 5 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的抓挠行为的结果。

[0198] 表 5

[0199] [表 5]

[0200]

		剂量	抓挠行为 (次数)
正常	-	-	32.2±1.5
对照	-	-	63.0±2.9 ^{##}
CBP1	口服给药	100mg/kg	30.4±1.4 ^{**}
CBP4	口服给药	400mg/kg	21.8±2.9 ^{**}
CBS1	局部给药	1%	45.4±2.74 ^{**}
CBS2	局部给药	2%	45.0±3.4 ^{**}

[0201] 所有的数据表示成平均值 ±SD (N=5)

[0202] ## :p<0. 01, 与正常组对比

[0203] * :p<0. 05, ** :p<0. 01, 与对照组对比

[0204] C. 诱发特应性皮炎的组织的表皮厚度结果 - 对耳肿胀的作用

[0205] 为了测量水肿, 在试验开始之后直到试验结束时, 每周检测小鼠的耳朵厚度。正常组的耳朵厚度没有变化, 但是在诱发型特应性皮炎的对照组中发现耳朵厚度有明显的增加。在北野菊的口服给药组和局部给药组中观测到耳肿胀得到抑制。具体而言, 在口服给药组中观测到显著地抑制耳肿胀。表 6 (上表和下表) 示出诱发型特应性皮炎的 NC/Nga 小鼠模型的测量结果 (图 10 和图 11)。

[0206] 表 6

[0207] [表 6]

[0208]

耳朵厚度	剂量	0 天 (mm)	7 天 (mm)	14 天 (mm)	28 天 (mm)	42 天 (mm)
NOR		0.22±0.02	0.23±0.02	0.24±0.02	0.25±0.03	0.26±0.01
CON		0.22±0.02	0.31±0.03 ^{##}	0.80±0.01 ^{##}	0.97±0.06 ^{##}	1.16±0.06 ^{##}
CBP1 口服给药	100mg/kg	0.22±0.03	0.27±0.02 [*]	0.59±0.03 ^{**}	0.68±0.04 ^{**}	0.80±0.05 ^{**}
CBP4 口服给药	400mg/kg	0.22±0.03	0.29±0.03	0.55±0.02 ^{**}	0.64±0.04 ^{**}	0.78±0.05 ^{**}
CBS1 局部给药	1%	0.20±0.02	0.29±0.03	0.74±0.08	0.85±0.05 ^{**}	0.92±0.04 ^{**}
CBS2 局部给药	2%	0.21±0.02	0.29±0.03	0.74±0.07	0.85±0.07 [*]	0.93±0.04 ^{**}

耳朵厚度	剂量	0 天 (%)	7 天 (%)	14 天 (%)	28 天 (%)	42 天 (%)
NOR		19.0±1.9	19.0±1.9	20.8±1.6	21.4±2.3	22.1±0.9
CON		19.0±1.4	27.2±2.2 ^{##}	69.4±1.1 ^{##}	83.9±5.3 ^{##}	100.0±5.1 ^{##}
CBP1 口服给药	100mg/kg	19.0±2.2	23.5±1.7 [*]	50.9±3.3 ^{**}	58.7±3.5 ^{**}	69.6±4.0 ^{**}
CBP4 口服给药	400mg/kg	19.4±2.3	24.7±2.5	47.8±2.1 ^{**}	55.4±3.6 ^{**}	67.3±4.5 ^{**}
CBS1 局部给药	1%	17.3±1.4	25.4±2.6	64.4±6.7	73.9±4.4 ^{**}	79.6±3.5 ^{**}
CBS2 局部给药	2%	18.0±1.4	25.1±2.9	63.8±6.1	73.5±6.0 [*]	80.4±3.3 ^{**}

[0209]

[0210] 所有的数据表示成平均值 ±SD (N=5)

[0211] ^{##}:p<0.01, 与正常组对比

[0212] ^{*}:p<0.05, ^{**}:p<0.01, 与对照组对比

[0213] D. 血清 IgE、IFN-γ 和 IL-4 浓度的结果

[0214] 表 7 示出 ELISA 的结果以测定通过 DNCB 致敏作用和攻击引起的诱发型特异性皮炎的小鼠中血清 IgE、IFN-γ 和 IL-4 浓度。

[0215] ①血清 IgE 浓度的测定

[0216] 在口服给药试验中,血清 IgE 的浓度在对照组中为 106.8±13.4ng/ml,在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 63.5±16.9ng/ml 和 47.6±8.9ng/ml,这表明浓度明显降低(P=0.001)(图 12(a))。在局部给药试验中,血清 IgE 浓度在对照组中为 61.6±9.3ng/ml,在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中分别为 37.2±6.6ng/ml

ml 和 46.7 ± 7.1 ng/ml, 这表明浓度降低(图 12 (b))。

[0217] ②血清 IFN- γ 浓度的测定

[0218] 血清 IFN- γ 浓度在对照组中为 46.7 ± 21.5 pg/ml, 在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 3.3 ± 0.4 pg/ml 和 3.5 ± 0.5 ng/ml, 以及在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中分别为 3.5 ± 0.4 pg/ml 和 3.6 ± 0.4 pg/ml, 这表明血清 IFN- γ 浓度明显降低(图 13)。

[0219] ③血清 IL-4 浓度的测定

[0220] 血清 IL-4 浓度在对照组中为 5.4 ± 0.7 pg/ml, 在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)中分别为 1.8 ± 1.0 pg/ml 和 2.3 ± 1.0 pg/ml, 以及在局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中分别为 1.7 ± 0.5 pg/ml 和 1.8 ± 1.1 pg/ml, 这表明血清 IL-4 浓度明显降低(图 14)。表 7 示出血清 IgE、IFN- γ 和 IL-4 浓度的测定的结果。

[0221] 表 7

[0222] [表 7]

[0223]

剂量			IgE (ng/ml)		IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
正常组	-	-	77.4 $\pm$ 6.6	24.6 $\pm$ 6.6	0.0 $\pm$ 0.9	3.4.1 $\pm$ 0.5
对照组	-	-	106.8 $\pm$ 13.4 ^{##}	61.6 $\pm$ 9.3 ^{##}	5.4 $\pm$ 0.7 ^{##}	46.7 $\pm$ 21.5 [#]
CBP1	100mg/kg	口服给药	63.5 $\pm$ 16.9 ^{**}	-	1.8 $\pm$ 1.0 ^{**}	3.3 $\pm$ 0.4 [*]
CBP4	400mg/kg	口服给药	47.6 $\pm$ 8.9 ^{**}	-	2.3 $\pm$ 1.0 ^{**}	3.5 $\pm$ 0.5 [*]
CBS1	1%	局部给药	-	37.2 $\pm$ 6.6 ^{**}	1.7 $\pm$ 0.5 ^{**}	3.5 $\pm$ 0.4 [*]
CBS2	2%	局部给药	-	46.7 $\pm$ 7.1 [*]	1.8 $\pm$ 1.1 ^{**}	3.6 $\pm$ 0.4 [*]

[0224] 所有的数据表示成平均值 $\pm$ SD (N=5)

[0225] ^{##}: p<0.01, 与正常组对比

[0226] ^{*}: p<0.05, ^{**}: p<0.01, 与对照组对比

[0227] E. 组织检查

[0228] 在试验结束之后, 牺牲在试验中所使用的小鼠, 并且随后取出耳朵组织并将所述耳朵组织固定在 10% 的福尔马林溶液中。该组织被嵌入石蜡中, 并且随后被切割成 3 μ m 到 4 μ m 的厚度, 之后通过 H&E (苏木精和曙红) 染色。然后, 研究溃疡形成、诱导型特异性皮炎组织的表皮厚度、肥大细胞浸润、嗜曙红细胞浸润、中性白细胞和淋巴细胞的浸润以及成纤维细胞的增殖和胶原层增生。

[0229] 在正常组的耳朵组织照片中, 耳朵软骨组织均匀地排列, 以及皮下层、真皮和表皮都均匀排列, 并且没有观察到溃疡、出血或炎症(图 15)。

[0230] 在对照组的耳朵组织照片中, 观察到严重的溃疡和出血, 由中性白细胞浸润引起的炎症被扩散到整个组织, 通过由于中性白细胞浸润引起的炎症, 耳朵软骨组织被部分破坏, 以及还观察到进入皮肤的中性白细胞浸润。观察到严重的成纤维细胞的增殖和胶原层增生, 以及还观察到由于菌群引起的化脓性炎症(图 15)。

[0231] 在局部给药组(1%的北野菊提取物)的耳朵组织照片中,观察到由于进入皮肤的中性白细胞浸润引起的轻微出血和轻微炎症,以及还观察到胶原层增生,但是与对照组的症状对比,所述症状得到改善(图15)。

[0232] 在局部给药组(2%的北野菊提取物)的耳朵组织照片中,观察到轻微的中性白细胞浸润,以及在一些对象中还观察到轻微溃疡和出血,但是与对照组的症状对比,所述症状得到改善(图 15)。

[0233] 在口服给药组(100mg/kg 的北野菊提取物)的耳朵组织照片中,没有观察到溃疡和出血,以及在在在一些对象中观察到由于胶原层增生导致的皮肤层的炎症和成纤维细胞的增殖,但是与对照组的症状对比,所述症状得到改善(图 15)。

[0234] 在口服给药组(400mg/kg 的北野菊提取物)的耳朵组织照片中,没有观察到溃疡、出血以及由于胶原层增生导致的炎症和成纤维细胞增殖,这表明与对照组的症状对比,所述症状得到显著地改善(图 15)。

[0235] 因此,在正常组中没有观察到溃疡,但是在对照组中观察到严重的溃疡。在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)和局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中的大多数没有观察到溃疡。

[0236] 在正常组中没有观察到中性白细胞和淋巴细胞的浸润,在对照组中观察到严重中性白细胞和淋巴细胞的浸润。在口服给药组(100mg/kg 和 400mg/kg 的北野菊提取物)和局部给药组(1% 和 2% 的北野菊提取物)中的大多数观察到轻微的中性白细胞和淋巴细胞的浸润,但是与对照组的症状对比,所述症状得到改善。

[0237] 在正常组中没有观察到成纤维细胞的增殖和胶原层增生,但是在对照组中观察到严重的成纤维细胞的增殖和胶原层增生。在口服给药组(400mg/kg的北野菊提取物)和局部给药组(2%的北野菊提取物)中没有观察到成纤维细胞的增殖和胶原层增生,但是在口服给药组(100mg/kg的北野菊提取物)和局部给药组(1%的北野菊提取物)的一些对象中观察到不同阶段的成纤维细胞的增殖和胶原层增生,但是与对照组的症状对比,该症状得到改善。

[0238] 此外,当在 400 倍放大率的显微镜下计可视的肥大细胞的数量时,在正常组中观察到 2.35 个肥大细胞,以及在诱发型特应性皮炎组中观察到 7.65 个肥大细胞,这表明在对照组中肥大细胞的数量增加。在局部给药组(1% 的北野菊提取物)中观察到 8.5 个肥大细胞,在局部给药组(2% 的北野菊提取物)中观察到 8.85 个肥大细胞,在口服给药组(100mg/kg 的北野菊提取物)中观察到 7.15 个肥大细胞,在口服给药组(400mg/kg 的北野菊提取物)中观察到 6.265 个肥大细胞,这表明,与对照组相比,在口服给药组(400mg/kg 的北野菊提取物)中肥大细胞的数量得到改善。

[0239] 示例 3. 细胞炎症因子的测量

[0240] 3-1. 试验方法

[0241] (1) 试验方法

[0242] A. 细胞培养

[0243] 在本试验中,从韩国细胞株银行(韩国)获取鼠类巨噬细胞 RAW264.7 细胞株以执行试验。RAW264.7 细胞在细胞培养基(DMEM)中生长。RAW264.7 细胞以 2×10^5 个细胞 /ml 的密度被接种到方瓶(T-flask)中并且在加湿的 CO₂ 培养器(5% 的 CO₂, 95% 的空气)中且在 37℃ 下持续培养 24 小时。随后,用稀释在不含 FBS (胎牛血清)的培养基中的 LPS ($10 \mu\text{g} /$

ml)持续处理这些细胞 24 小时,并且用稀释在不含 FBS 的培养基中的药物(1mg/ml)再次处理所述细胞。在 24 小时之后,这些细胞可用于试验。

[0244] B. 亚硝酸盐的测定

[0245] 通过测定 NO (一氧化氮)生成来测量诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性。对于 RAW264.7 细胞中的 NO (一氧化氮)生成的测定,硝酸盐 / 亚硝酸盐比色测定试剂盒用于测量细胞质的 NO²⁻。根据制造商(Cayman Chemical 公司)的说明书使用格里斯试剂来执行该试验。

[0246] C. iNOS (诱导型一氧化氮合酶)表达的蛋白质印迹分析

[0247] 执行蛋白印迹以确认北野菊的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 iNOS(诱导型一氧化氮合酶)表达的作用。

[0248] 采收用北野菊的提取物和馏分处理的细胞和对照组,并且用 PBS 洗涤两次。将 100 μ l 的 Pro-prepTM (Intron, 韩国)试剂加入到其中,并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下、以 12000rpm 执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液用 Pro-measureTM (Intron, 韩国)溶液来量化,并且将 50 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中、在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下,用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 iNOS 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液(TBST)在 5 分钟内对该膜洗涤三次,并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下持续培养 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟期间对该膜洗涤三次,并且使该膜与 ECL 免疫印迹底物(PIERCE, #3216)溶液反应 1 小时,随后形成 X 射线胶片(Kodak)。

[0249] D. COX-2 抑制的蛋白质印迹分析

[0250] 为了检验北野菊的提取物和馏分对产生 PGE2 的 COX-2 的表达的作用,执行蛋白质印迹分析。采收用北野菊的提取物处理的细胞和对照组,并且用 PBS 洗涤两次。将 100 μ l 的 Pro-prepTM 试剂加入到其中,并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下、以 12000rpm 执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液使用 Pro-measureTM 溶液来量化,以及将 50 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中、在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下,用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 COX-2 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液(TBST)在 5 分钟内对该膜洗涤三次,并且随后用抗小鼠且抗山羊二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内对该膜洗涤三次,并且与 ECL 免疫印迹底物(PIERCE, #3216)溶液反应 1 小时,随后形成 X 射线胶片(Kodak)。

[0251] E. PGE2 生成的测定

[0252] 为了检验在北野菊的提取物和馏分的环境下的 COX-2 活性,测定胞内 PGE2 的浓度。以与 NO 测定相同的方式来执行该试验,以及采用细胞质溶液来根据 PGE2EIA 系统的协议(安玛西亚, RPN222)检验 PGE2 释放物的浓度。

[0253] F. I κ B 的磷酸化和降解(蛋白质印迹)

[0254] 为了检验北野菊的提取物和馏分对 LPS 诱导型 I κ B 的磷酸化和降解的作用,进行

了蛋白质印迹分析。

[0255] 采收每一被处理的样本细胞和对照组,并且用 PBS (磷酸盐缓冲液)洗涤它们两次。100 μ l 的 Pro-prep™ 试剂被加入到其中,并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下,以 12000rpm 执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液使用 Pro-measure™ (Intron)溶液量化,以及将 50 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中、在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下,用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 I κ B α 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液 (TBST) 在 5 分钟内对该膜洗涤三次,并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内对该膜洗涤三次,随后用 BCIP-NBT 溶液 (Nakanai Tesque, 日本) 显色。

[0256] G. 细胞质和细胞核的 NF- κ B 表达

[0257] 为了检验北野菊的提取物和馏分对 LPS 诱导型 NF- κ B 的核易位的作用,细胞质 NF- κ B 和细胞核 NF- κ B (p50, p65) 被分离来进行蛋白质印迹分析。

[0258] 采收每一被处理的试验组和对照组,并且用 PBS 洗涤两次。0.4ml 的细胞裂解缓冲液 (10mM 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) (pH7.9), 10mM 的 KCl, 0.1mM 的 EDTA, 0.1mM 的 EGTA, 1mM 的 DTT, 0.5mM 的 PMSF, 2.0 μ g/ μ l 抑肽酶) 被加入到其中,并且在 4℃ 下放置 15 分钟。随后 25 μ l 的 10% 的 NP40 加入到其中,并且在漩涡混合器 (vortex) 中大力混合 10 秒。在 4℃ 下,以 1300rpm 执行 2 分钟的离心分离该反应物以获得含有细胞质蛋白的上层清液。50 μ l 的冰冷核提取缓冲液 (含有 20mM 的 HEPES (pH 7.9)、0.4M 的 NaCl、1mM 的 EDTA、1mM 的 EGTA、1mM 的 DTT、1mM 的 PMSF、2.0 μ g/ μ l 亮抑酶肽和 2.0 μ g/ μ l 抑肽酶) 加入到小球中,在 4℃ 下伴随间歇搅拌来培养 15 分钟。随后,在 4℃ 下,以 1300rpm 执行 2 分钟的离心分离该样本以获得含有细胞核蛋白的上层清液。获得的细胞质溶液和细胞核溶液使用 Pro-measure™ 溶液来量化,以及 30 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 NF- κ B p65 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液 (TBST) 在 5 分钟内洗涤该膜三次,并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内洗涤该膜三次,随后用 BCIP-NBT 溶液 (Nakanai Tesque, 日本) 显色。

[0259] (2) 试剂和仪器

[0260] -DMEM 培养基 (Gibco BRL 公司, 美国)

[0261] -RPMI 1604 培养基 (Gibco BRL 公司, 美国)

[0262] -胎牛血清 (FBS, Gibco BRL 公司, 美国)

[0263] -盘尼西林 (Gibco BRL 公司, 美国)

[0264] -链霉素 (Gibco BRL 公司, 美国)

[0265] -硝酸盐 / 亚硝酸盐比色测定试剂盒 (Cayman Chemical 公司, 美国)

[0266] -脂多糖 (西格玛公司, 美国)

[0267] -Pro-prep™ 蛋白提取溶液 (中晶生物技术公司 (Intron Biotechnology Co.), 韩

国)

[0268] -Pro-measure™ 蛋白测试液(中晶生物技术公司,韩国)

[0269] -COX-2 单克隆抗体(圣克鲁斯生物技术公司,美国)

[0270] -抗山羊抗体(Zymed 公司,美国)

[0271] -甲醇(MeOH)(德山化学公司(Duksan Chemical Co.),韩国)

[0272] -氯仿(德山化学公司,韩国)

[0273] -酶标仪:Versamax(分子仪器公司(Molecular Devices Co.),美国)

[0274] -FT-03(Grass 牌,美国)

[0275] 3-2. 试验结果

[0276] A. 亚硝酸盐测定的结果

[0277] 为了测量 RAW 264.7 细胞中由 LPS 诱发的 NO 生成,使用硝酸盐 / 亚硝酸盐比色测定试剂盒测量了细胞质的亚硝酸盐。根据制造商(Cayman 化学公司)的说明书使用格里斯试剂来执行该试验。因此,与对照组相比,在浓度为 5 μ g/ml 的甲醇(MeOH)提取物、氯仿(CHCl_3)馏分和乙酸乙酯(EtOAc)馏分中的亚硝酸盐生成分别减少了约 38%、78% 和 30% (图 16)。表 8 示出北野菊的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱发的 NO 生成的作用。

[0278] 表 8

[0279] [表 8]

[0280]

样本	浓度 (μ g/ml)	生成 (%)
正常组		16.7 $\pm$ 0.2
对照组		100.0 $\pm$ 1.5
MeOH 提取物	1.25	83.1 $\pm$ 0.6
	2.5	82.3 $\pm$ 0.3
	5	62.1 $\pm$ 0.5
	10	52.0 $\pm$ 1.1
	20	21.8 $\pm$ 0.2
氯仿馏分	1.25	49.2 $\pm$ 0.4
	2.5	34.5 $\pm$ 0.2
	5	21.8 $\pm$ 0.6
	10	11.7 $\pm$ 0.0
	20	13.8 $\pm$ 0.3
EtOAc 的馏分	1.25	73.6 $\pm$ 0.8
	2.5	73.9 $\pm$ 1.1
	5	69.8 $\pm$ 0.7
	10	49.7 $\pm$ 3.0
	20	15.6 $\pm$ 0.3

[0281]

[0282] B. iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 表达的蛋白质印迹分析

[0283] 通过蛋白质印迹分析确认北野菊对 RAW 264.7 细胞中的 iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 表达的作用。结果是, 与对照组相比, 在甲醇 (MeOH) 提取物、氯仿 (CHCl₃) 馏分和乙酸乙酯 (EtOAc) 馏分中的 iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 表达分别减少了约 19%、98% 和 0.5% (图 17)。表 9 示出北野菊的提取物和馏分的对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱发的 iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 表达上的作用。

[0284] 表 9

[0285] [表 9]

[0286]

样本	样本浓度 (μg/ml)	表达浓度 (%/ 对照)
正常组		1.0
对照组		100.0
MeOH 提取物	5	80.7
氯仿馏分	5	1.9
EtOAc 的馏分	5	99.5

[0287] C. PGE2 测量的结果

[0288] 为了检验在北野菊的提取物的环境下的 COX-2 的活性, 测定了胞内 PGE2 的浓度。因此, 与对照组相比, 在甲醇提取物、氯仿 (CHCl₃) 馏分和乙酸乙酯 (EtOAc) 馏分中的 PGE2 生成分别减少了约 24%、88% 和 10% (图 18)。表 10 示出北野菊的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的 PGE2 表达的作用。

[0289] 表 10

[0290] [表 10]

[0291]

样本	样本浓度 (μg/ml)	PGE2 表达水平 (pg/ml)
正常组		1.0 ± 1.2
对照组		3603.9 ± 180.6
MeOH 提取物	5	2750.0 ± 130.9
氯仿馏分	5	423.3 ± 86.3
EtOAc 馏分	5	3167.3 ± 41.2

[0292]

[0293] D. COX-2 表达的蛋白质印迹分析

[0294] 通过蛋白质印迹分析确认北野菊对 RAW 264.7 细胞的 COX-2 表达的作用。因此,

与对照组相比,在氯仿(CHCl_3)馏分和乙酸乙酯(EtOAc)馏分中的 COX-2 表达分别减少了约 37% 和约 23%,但是在甲醇(MeOH)的提取物中 COX-2 表达提高了约 26% (图 19)。表 11 示出北野菊的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞的 LPS 诱发的 COX-2 表达的作用。

[0295] 表 11

[0296] [表 11]

[0297]

样本	样本浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	COX-2 表达水平 (%/对照)
正常组		0.3
对照组		100.0
MeOH 提取物	5	126.1
氯仿馏分	5	62.9
EtOAc 馏分	5	76.9

[0298] E. I κ B 表达的蛋白质印迹分析

[0299] 为了检验在北野菊的提取物的环境下的 P50/P65 的活性,测定了 P50/P65 抑制剂 I κ B 的浓度。因此,与对照组相比,在 MeOH 提取物、 CHCl_3 馏分和 EtOAc 馏分中的该浓度分别增加约 61%、65% 和 39.6% (图 20)。表 12 示出北野菊的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱发的 I κ B 表达的作用。

[0300] 表 12

[0301] [表 12]

[0302]

样本	样本浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	I κ B 表达水平 (%/对照)
正常组		100.0
对照组		60.8
MeOH 提取物	5	98.1
CHCl_3 馏分	5	100.6
EtOAc 馏分	5	84.9

[0303]

[0304] F. NF- κ B (P50, P65) 表达的蛋白质印迹分析

[0305] 确认了北野菊对 P50/P65 的活性的作用。因此,与对照组相比,在 MeOH 提取物、 CHCl_3 馏分和 EtOAc 馏分中,P50 表达分别减少了约 28%、42% 和 36%(图 21),以及在 MeOH 提取物、 CHCl_3 馏分和 EtOAc 馏分中,P65 表达分别减少了约 18%、22% 和 20% (图 22)。表 13 示出北野菊的提取物和馏分对 RAW264.7 细胞中的 LPS 诱发的 NF- κ B (P50,P65)表达的作用。

[0306] 表 13

[0307] [表 13]

[0308]

样本	样本浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	P50 表达水平 (%/对照)	P65 表达水平 (%/对照)
正常组		40.9	50.7
对照组		100.0	100.0
MeOH 提取物	5	72.2	82.4
CHCl_3 的馏分	5	58.5	78.4
EtOAc 的馏分	5	63.8	80.3

[0309] 3-3. 比较例 - 野菊花

[0310] (1) 样本提取

[0311] 1) 物料

[0312] 在本试验中使用的野菊花(学名)为韩国黄春菊,也称为雪北菊、金北菊或黄北菊,其种植在釜山省北部的永春,并且在2007年10月3日收集了该野菊花。一部分草药被存储在韩国庆熙大学的东方医药学院的草药系。

[0313] 2) 样本提取和分馏

[0314] ①样本提取

[0315] 使用100%甲醇(MeOH)作为溶剂,在110℃的提取器中对100g的野菊花抽提三次,在减压条件下使用旋转式蒸发器浓缩以获取32.5g的100%的甲醇提取物。

[0316] ②分馏

[0317] 将32.5g的野菊花的甲醇提取物溶解在蒸馏水中,并且随后使用氯仿(CHCl_3)分馏以获取12.9g的水(H_2O)馏分和2.9g的氯仿馏分。

[0318] 3) 试剂和仪器

[0319] -DMEM 培养基(Hyclone,美国)

[0320] -胎牛血清(FBS, Gibco BRL 公司,美国)

[0321] -盘尼西林(Gibco BRL 公司,美国)

[0322] -链霉素(Gibco BRL 公司,美国)

[0323] -Cell Titer 96 (Promega 公司,美国)

[0324] -硝酸盐 / 亚硝酸盐比色测定试剂盒(Cayman Chemical 公司,美国)

[0325] -脂多糖(西格玛公司,美国)

[0326] -Pro-prep™ 蛋白提取溶液(中晶生物技术公司,韩国)

[0327] -Pro-measure™ 蛋白测试液(中晶生物技术公司,韩国)

[0328] -COX-2 单克隆抗体(圣克鲁斯生物技术公司,美国)

[0329] -iNOS 单克隆抗体(BD Bioscience Pharmingen 公司,美国)

[0330] -抗小鼠抗体(cell signalling 公司,美国)

[0331] -前列腺素 E2biotrak ELISA 系统(Prostaglandin E2biotrak ELISA system) (BD Bioscience Pharmingen 公司,美国)

[0332] -ECL 免疫印迹底物(PIERCE, #3216, 罗科福德,美国)

[0333] -RayBio 小鼠炎症因子抗体芯片 I (RayBio mouse Inflammation Antibody Array I) (AAM-INF-1-8, RayBiotech, 诺克罗斯, 总代理, 美国)

[0334] - 酶标仪:Versamax (分子仪器公司(molecular Devices CO.),美国)

[0335] -UV/VIS 分光光度计(Gilson 公司,美国)

[0336] (2) 试验方法

[0337] 1) 亚硝酸盐的测定

[0338] 通过测定 NO (一氧化氮) 生成来测量诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 的活性。对于 RAW 264.7 细胞中的 NO (一氧化氮) 生成的测定, 硝酸盐 / 亚硝酸盐比色测定试剂盒用于测量细胞质的 NO。根据制造商(Cayman 化学公司) 的说明书执行该试验。所有的值以平均值 ± SD (标准偏差) 表示。学生 T- 检验(student T-test) 用于测定显著性。所有的试验重复三次。

[0339] 2) iNOS 表达的测定

[0340] 执行蛋白质印迹分析来确认野菊花的提取物和馏分对 iNOS 表达的作用, iNOS 是一种诱导 NO 产生的酶。

[0341] 采收野菊花的提取物处理的细胞和对照组, 并且用 PBS 洗涤两次。将 100 μl 的 Pro-prep™ (Intron 公司, 韩国) 试剂加入到其中, 并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下, 以 12000rpm 下执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液使用 Pro-measure™ (Intron 公司, 韩国) 溶液来量化, 并且将 50 μg 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟, 并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳, 并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后, 该膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温下封闭放置 1 小时, 并且在 4℃ 下, 用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 iNOS 一级抗体来整夜培养。次日, 用洗膜缓冲液(TBST) 在 5 分钟内洗涤该膜三次, 并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后, 用 TBST 在 10 分钟内洗涤该膜三次, 并且与 ECL 免疫印迹底物(PIERCE, #3216) 溶液反应 1 小时, 随后形成 X 射线胶片(Kodak)。

[0342] 3) PGE2 生成的测定

[0343] 为了检验在野菊花的提取物和馏分的环境下的 COX-2 活性, 测定了胞内的 PGE2 (前列腺素 E2) 的浓度。以与 NO 测定相同的方式来执行该试验, 以及采用细胞质溶液根据前列腺素 E2 酶免疫 Biotrak (EIA) 系统(Prostaglandin E2 Enzyme immunoassay Biotrak (EIA) system) (安玛西亚公司, RPN222) 的协议来检验 PGE2 释放物的浓度。

[0344] 4) COX-2 表达的测定。

[0345] 为了检验野菊花的提取物和馏分对产生 PGE2 的 COX-2 的表达的作用, 执行蛋白质印迹分析。

[0346] 采收每一被样本处理的细胞和对照组, 并且用 PBS 洗涤两次。将 100 μl 的 Pro-prep™ 试剂加入到其中, 并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下, 以 12000rpm 执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液使用 Pro-measure™ 溶液来量化, 以及将 50 μg 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟, 并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳, 并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后, 该膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温下封闭放置 1 小时, 并且在 4℃ 下, 用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 COX-2 一级抗体整夜培养。次日, 用洗膜缓冲液(TBST) 在 5 分钟内洗涤该膜三次, 并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养

持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内洗涤该膜三次,并且与 ECL 免疫印迹底物(PIERCE, #3216)溶液反应 1 小时,随后形成 X 射线胶片(Kodak)。

[0347] 5) I κ B 的磷酸化和降解的测定

[0348] 为了检验野菊花的提取物和馏分对 LPS 诱导的 I κ B 的磷酸化和降解的作用,进行了蛋白质印迹分析。

[0349] 采收每一被样本处理的细胞组和对照组,并且用 PBS 洗涤两次。将 100 μ l 的 Pro-prep™ 试剂加入到其中,并且在 -20℃ 下放置 10 分钟。随后在 4℃ 下,以 12000rpm 执行 10 分钟的离心分离以获得上层清液。获得的蛋白质溶液使用 Pro-measure™ 溶液来量化,以及将 50 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下,用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 I κ B α 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液(TBST)在 5 分钟内洗涤该膜三次,并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内洗涤该膜三次,随后用 BCIP-NBT 溶液(Nakanai Tesque, 日本)显色。

[0350] 6) 细胞质和细胞核的 NF- κ B 表达的测定

[0351] 为了检验野菊花的提取物和馏分对 LPS 诱导型 NF- κ B 的核易位的作用,将细胞质蛋白和细胞核蛋白分开以进行蛋白质印迹分析。

[0352] 采收每一被样本处理的细胞和对照组,并且用 PBS 洗涤两次。将 0.4ml 的细胞裂解缓冲液(10mM 的羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) (pH7.9), 10mM 的 KCl, 0.1mM 的 EDTA, 0.1mM 的 EGTA, 1mM 的 DTT, 0.5mM 的 PMSF, 2.0 μ g/ μ l 抑肽酶)加入到其中,并且在 4℃ 下放置 15 分钟。随后 25 μ l 的 10% 的 NP40 被加入到其中,并且在漩涡混合器(vortex)中大力混合 10 秒。在 4℃ 下,以 1300rpm 下执行 2 分钟的离心分离该反应物以获得含有细胞质蛋白的上层清液。将 50 μ l 的冷冻核提取缓冲液(含有 20mM 的 HEPES (pH 7.9)、0.4M 的 NaCl、1mM 的 EDTA、1mM 的 EGTA、1mM 的 DTT、1mM 的 PMSF、2.0 μ g/ μ l 亮抑酶肽和 2.0 μ g/ μ l 抑肽酶)加入到小球中,在 4℃ 下伴随间歇搅拌来培养 15 分钟。随后,在 4℃ 下,以 1300rpm 执行 2 分钟的离心分离该样本以获得含有细胞核蛋白的上层清液。获得的细胞质溶液和细胞核溶液使用 Pro-measure™ 溶液来量化,以及将 30 μ g 的蛋白质与该样本缓冲液混合。该混合物在 95℃ 下加热 5 分钟,并且随后在 -20℃ 下储存。制备的样本在 12% 的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶上经过电泳,并且随后被转移到聚偏二氟乙烯膜上。此后,该膜在 5% 的脱脂牛奶中在室温下封闭放置 1 小时,并且在 4℃ 下,用在 5% 的脱脂牛奶中被稀释成预定比例的 NF- κ Bp65 一级抗体整夜培养。次日,用洗膜缓冲液(TBST)在 5 分钟内洗涤该膜三次,并且随后用抗小鼠二级抗体在室温下培养持续 1 小时。随后,用 TBST 在 10 分钟内洗涤该膜三次,随后用 BCIP-NBT 溶液(Nakanai Tesque, 日本)显色。

[0353] (3) 试验结果

[0354] 1) 亚硝酸盐测定的结果

[0355] 作为测定亚硝酸盐的表达式,与对照组相比,在样本浓度为 12.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 时,在甲醇提取物中的亚硝酸盐的生成分别为 97.9%、89.0%、37.3% 和 17.8%,以及在氯仿馏分中的亚硝酸盐的生成分别为 50.6%、19.2%、16.6% 和

7.5%。换言之,可以看出,在等于或大于 50 $\mu\text{g/ml}$ 的甲醇馏分下,以及在等于或大于 25 $\mu\text{g/ml}$ 的氯仿馏分下,亚硝酸盐表达被抑制了 50% 或大于 50%。表 14 示出野菊花的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞的 LPS 诱发的亚硝酸盐生成的作用。

[0356] 表 14

[0357]

样本	样本浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	NO 生成 (%)
正常组		10.3 $\pm$ 0.7
对照组		100.0 $\pm$ 5.7 [#]
MeOH 提取物	12.5	97.9 $\pm$ 1.9
	25	89.0 $\pm$ 0.9
	50	37.3 $\pm$ 1.0 ^{**}
	100	17.8 $\pm$ 0.8 ^{**}
氯仿馏分	12.5	50.6 $\pm$ 2.1 ^{**}
	25	19.2 $\pm$ 0.5 ^{**}
	50	16.6 $\pm$ 0.5 ^{**}
	100	7.5 $\pm$ 0.1 ^{**}
水馏分	12.5	107.6 $\pm$ 1.5
	25	92.8 $\pm$ 14.5
	50	85.2 $\pm$ 2.3 [*]
	100	53.2 $\pm$ 1.5 ^{**}

[0358] [#]: $p<0.05$,与正常组对比

[0359] ^{*}: $p<0.05$,^{**}: $p<0.01$,与对照组对比

[0360] 所有的数据被表示成平均值 $\pm$ SD (N=3)

[0361] 一并考虑,在等于或大于 50 $\mu\text{g/ml}$ 的甲醇提取物以及在等于或大于 25 $\mu\text{g/ml}$ 的氯仿馏分下,野菊花的提取物将亚硝酸盐生成抑制了 50% 或大于 50%,但是北野菊的提取物(示例 3 和示例 2)在等于或大于 10 $\mu\text{g/ml}$ 的甲醇提取物以及在等于或大于 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 的氯仿馏分下,将亚硝酸盐生成抑制了 50% 或大于 50%,这表明,量少得多的北野菊的提取物和馏分显示出的对亚硝酸盐生成的抑制作用大于或等于野菊花的抑制作用。

[0362] 3) iNOS 测定的结果

[0363] 结合野菊花的提取物和馏分的亚硝酸盐生成结果和细胞毒性,在 25 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下确定 iNOS 表达。通过蛋白质印迹分析来确认 RAW 264.7 细胞的 iNOS 表达。

[0364] 在甲醇的提取物和氯仿的提取物中,iNOS 表达分别为 74.9% 和 0.0%,这表明减少率分别为 25.1% 和 100.0%,以及 iNOS 表达在水馏分中为 69.7%,这显示出减少率为 30.3% (图 24)。表 15 示出野菊花的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱发的 iNOS 表达的作用。

[0365] 表 15

[0366] [表 15]

[0367]

样本	浓度 (μg/ml)	iNOS 表达水平 (%/对照)
正常组		0.1
对照组		100.0
MeOH 提取物	25	74.9
氯仿馏分	25	0.0
水馏分	25	69.7

[0368] 3) PGE2 测定的结果

[0369] 为了检验在野菊花的提取物的环境下的 COX-2 的活性,测定了胞内 PGE2 的浓度。

[0370] 在样本浓度为 25 μg/ml 的甲醇提取物中, PGE2 生成为 3250.3±22.8pg/ml, 这表明与对照组的 3425.1±239.6pg/ml 对比,减少率为 5.1%。在水馏分中, PGE2 生成为 3439.5±159.3pg/ml, 而在氯仿馏分中为 612.0±85.4pg/ml, 这表明减少率为 82.1% (图 25)。表 16 示出野菊花的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 LPS 诱导的 PGE2 表达的作用。

[0371] 表 16

[0372] [表 16]

[0373]

样本	浓度 (μg/ml)	PGE2 表达水平 (pg/ml)	产率
正常组		0.0	0.0
对照组		3425.1±239.6	100.0
MeOH 提取物	25	3250.3±22.8	94.9
CHCl ₃ 的馏分	25	612.0±85.4	17.9
水馏分	25	3439.5±159.3	100.4

[0374] 4) COX-2 测定的结果

[0375] 通过蛋白质印迹分析,确认野菊花对 RAW 264.7 细胞的 COX-2 表达的作用。以 25 μg/ml 的野菊花的提取物执行该试验。根据与对照组相比,在甲醇提取物中, COX-2 表达为 127.0%, 这表明增大率为 27.0%, 在氯仿馏分中 COX-2 表达为 94.7%, 这表明减小率为 5.3%, 以及在水馏分中为 136.3%, 这表明增大率为 36.3% (图 26)。表 17 示出野菊花的提取物和馏分对 RAW 264.7 细胞中的 COX-2 表达的作用。

[0376] 表 17

[0377] [表 17]

[0378]

样本	浓度 (μg/ml)	COX-2 表达水平 (%/对照)
正常组		23.2
对照组		100.0
MeOH 提取物	25	127.0
CHCl ₃ 馏分	25	94.7
水馏分	25	136.3

[0379] 5) IκB 的磷酸化和降解的结果

[0380] 在 RAW 264.7 巨噬细胞株中确认野菊花的提取物对 LPS 诱导型 IκB 的磷酸化和降解的抑制作用。该试验以野菊花的 25 μg/ml 的提取物进行。在甲醇提取物和氯仿提取物中 IκB 表达分别为 12.6% 和 49.6%，这表明减少率分别为 87.4% 和 50.4%，以及在水馏分中 IκB 表达为 28.9%，示出减少率为 71.1%，表明野菊花的提取物对 LPS 诱导型 IκB 的磷酸化和降解具有抑制作用(图 27)。表 18 示出野菊花的提取物对 RAW264.7 细胞中的 LPS 诱导型 IκB 的磷酸化和降解上作用。

[0381] 表 18

[0382] [表 18]

[0383]

样本	浓度 (μg/ml)	IκB 表达 (%)
正常组		100.0
对照组		0.0
MeOH 提取物	25	12.6
CHCl ₃ 的馏分	25	49.6
水馏分	25	28.9

[0384] 6) 细胞质和细胞核的 NF-κB 表达

[0385] 在 RAW 264.7 巨噬细胞株中, 确认野菊花的提取物对从 IκB 释放之后的 NF-κB 的由 LPS 诱导的核易位的抑制作用。

[0386] 与对照组相比, 在 25 μg/ml 的野菊花的提取物时, 在甲醇提取物和氯仿馏分中, p65 表达水平分别为 71.6% 和 87.9%, 显示出减少率分别为 28.4% 和 12.1%, 以及在水馏分中 p65 表达为 86.1%, 这表明减少率为 13.9%。同样地, 野菊花的提取物显示出对 NF-κB 核易位的抑制作用, 即, 在 NF-κB 核易位明显减小(图 28)。表 19 示出野菊花的提取物和馏分对 LPS 诱发型细胞质和细胞核的 NF-κB 表达的作用。

[0387] 表 19

[0388] [表 19]

[0389]

样本	浓度 (μg/ml)	P65 表达 (%)
正常组		58.5
对照组		100.0
MeOH 提取物	25	71.6
CHCl ₃ 的馏分	25	87.9
水馏分	25	86.1

[0390]

[0391] 示例 4. MTS 分析结果

[0392] 为了确认北野菊的提取物和馏分的细胞毒性,使用 MTS/PMS (Cell Titer96™ 非放射性细胞增殖检测试剂盒, Cat. G5421-Promega) 在 RAW 264.7 细胞中执行 MTS 分析。RAW 264.7 细胞以 5×10^4 个细胞 /ml 的密度接种到 96 孔的板中,并且培养 24 小时。细胞在不含血清且含有浓度为 1.25 μg/ml、2.50 μg/ml 和 5.00 μg/ml 的北野菊的提取物的 DMEM 培养基中培养 24 小时。在 24 之后,用 20 :1 的混合比例的 MTS 与 PMS 处理这些细胞,并且持续培养 3 小时。随后,酶标仪 (Versamax, 分子仪器公司 (Molecular Devices Co.), 美国) 用于测量 490nm 的吸光度。

[0393] 如图 29 所示,发现甲醇提取物、乙酸乙酯馏分和氯仿馏分在任何浓度下几乎不影响 RAW 264.7 的细胞存活率,这表明北野菊的提取物和馏分没有细胞毒性 (图 29)。

[0394] 工业实用性

[0395] 由于根据本发明的组合物具有抗炎症活性,故该组合物可以用于例如特应性皮炎的炎症疾病的预防或治疗,并且还可以应用到包括准药物、化妆品组合物、食品和水软化剂的多个领域。

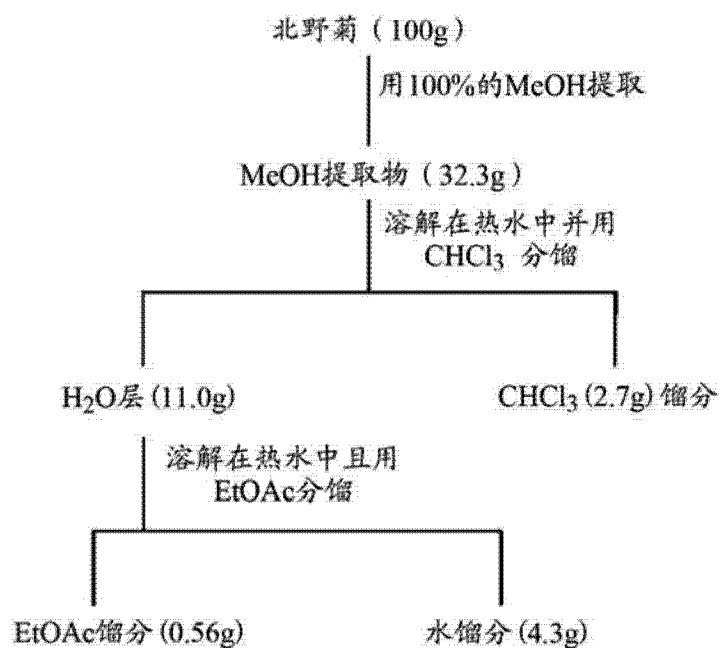


图 1

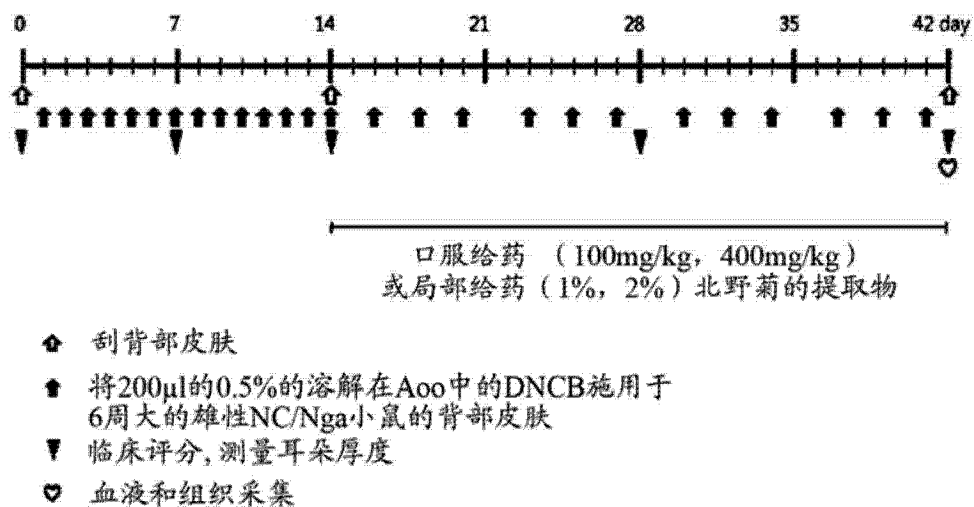


图 2

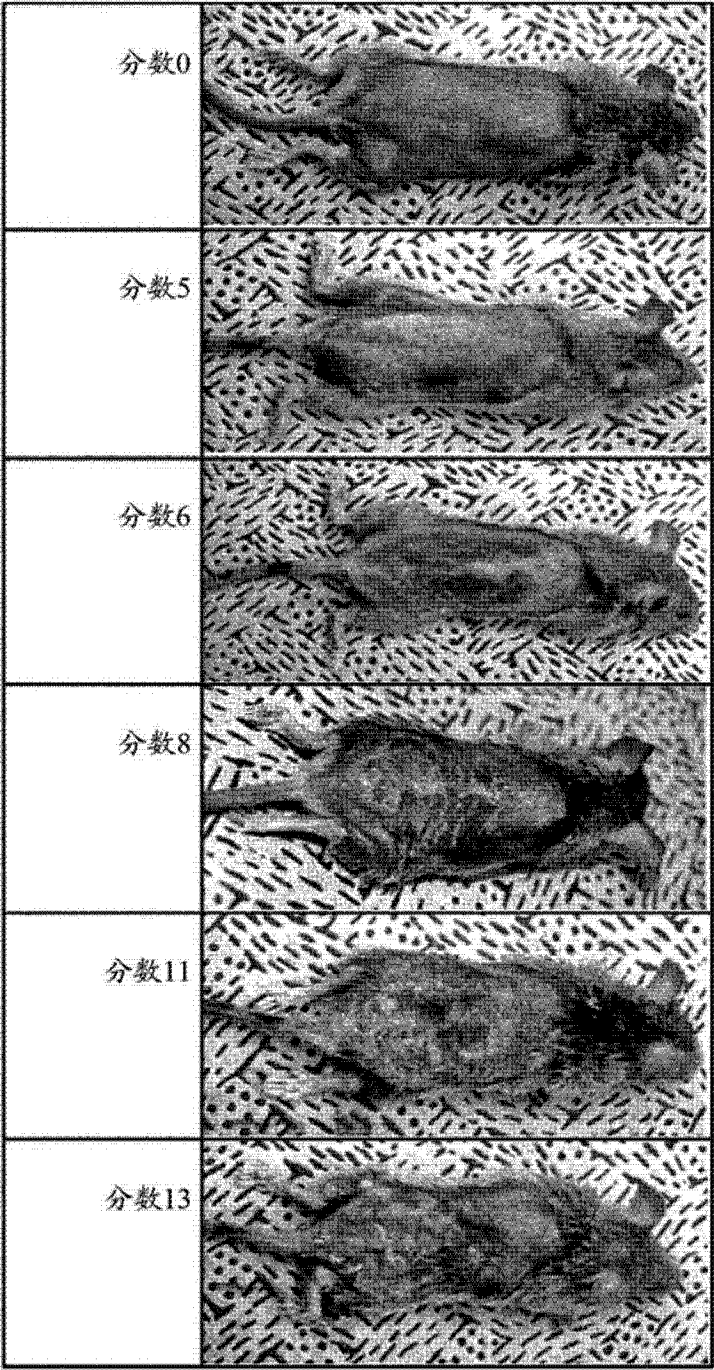


图 3

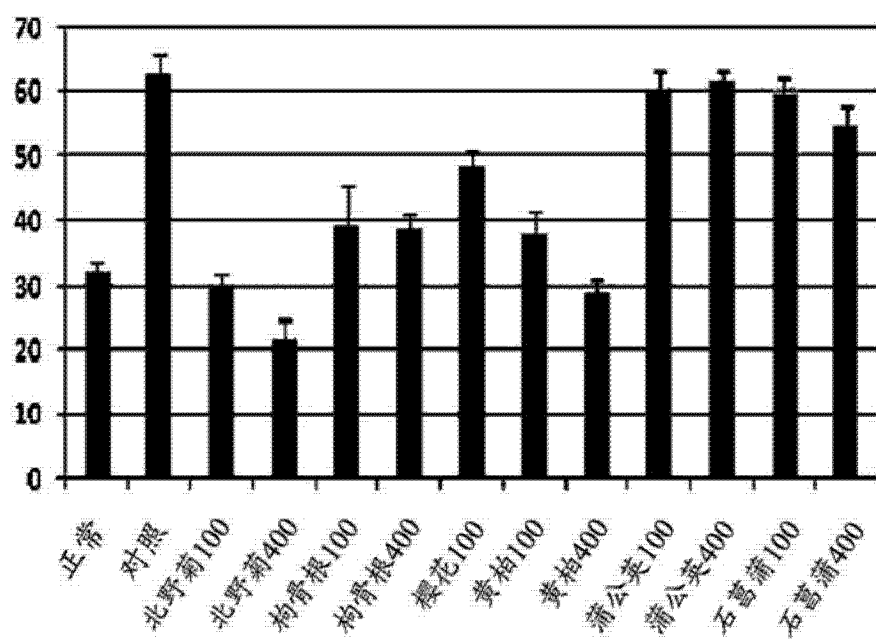


图 4

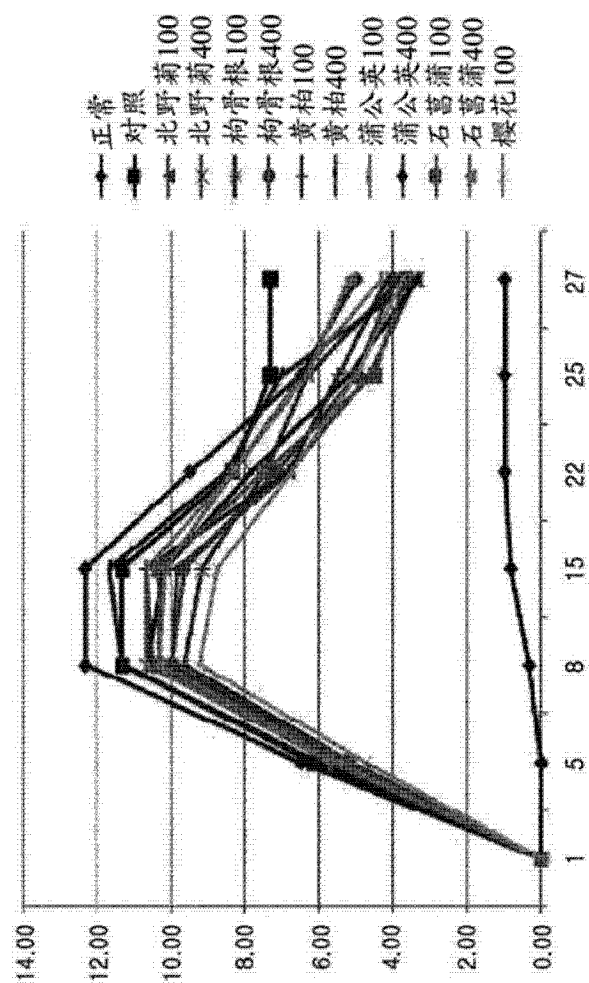


图 5

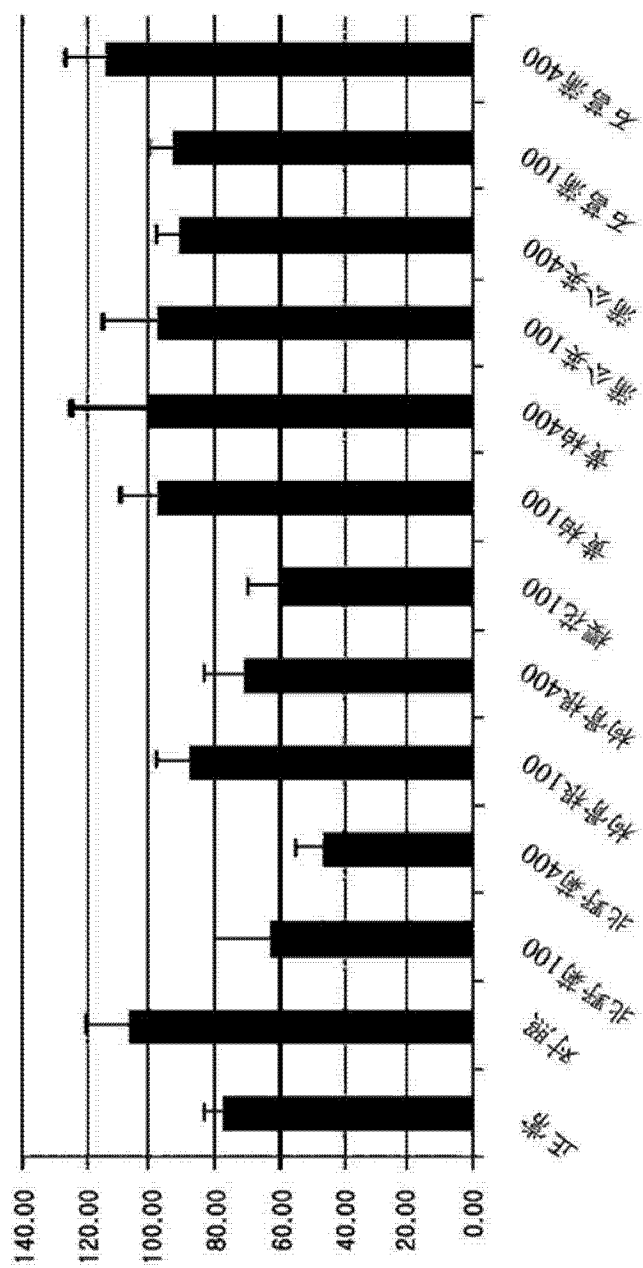


图 6

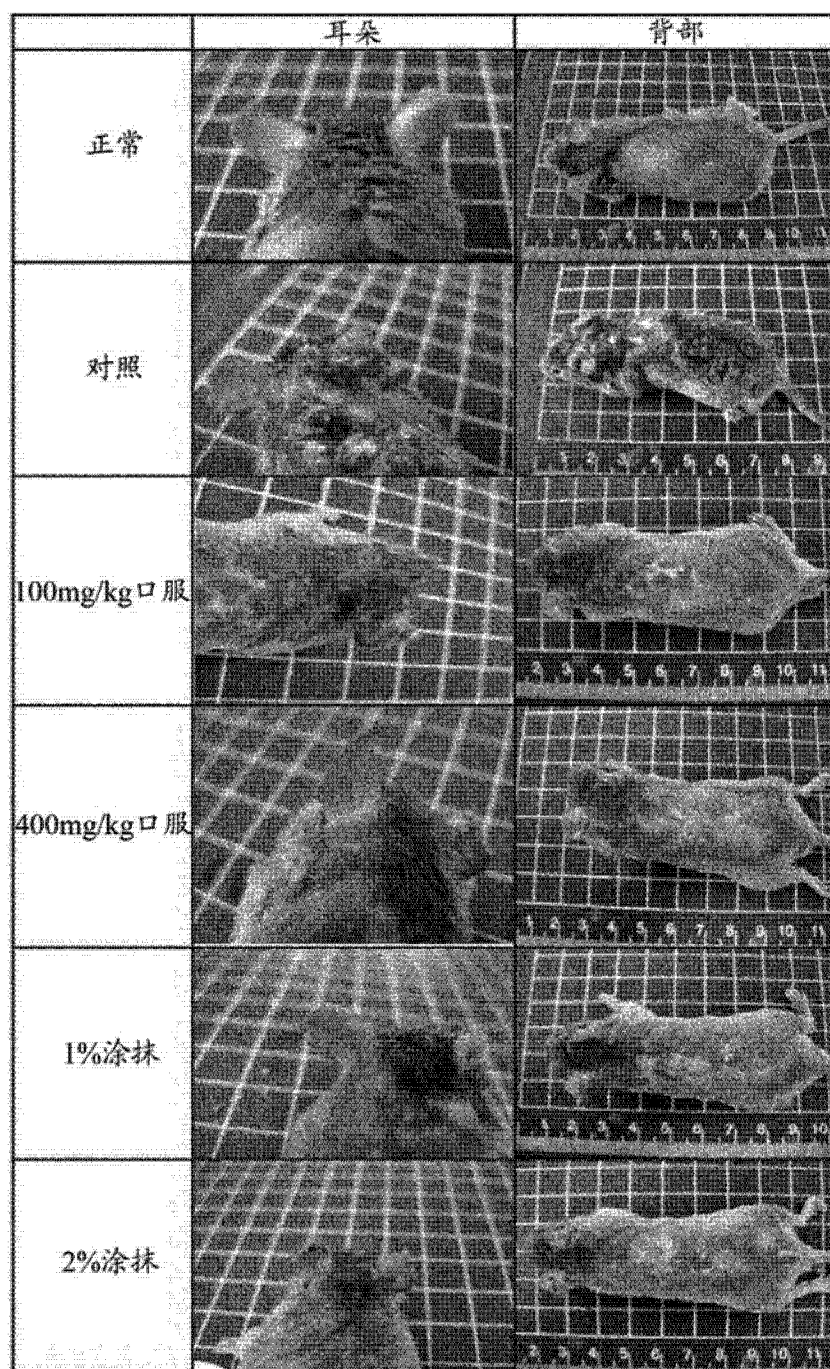


图 7

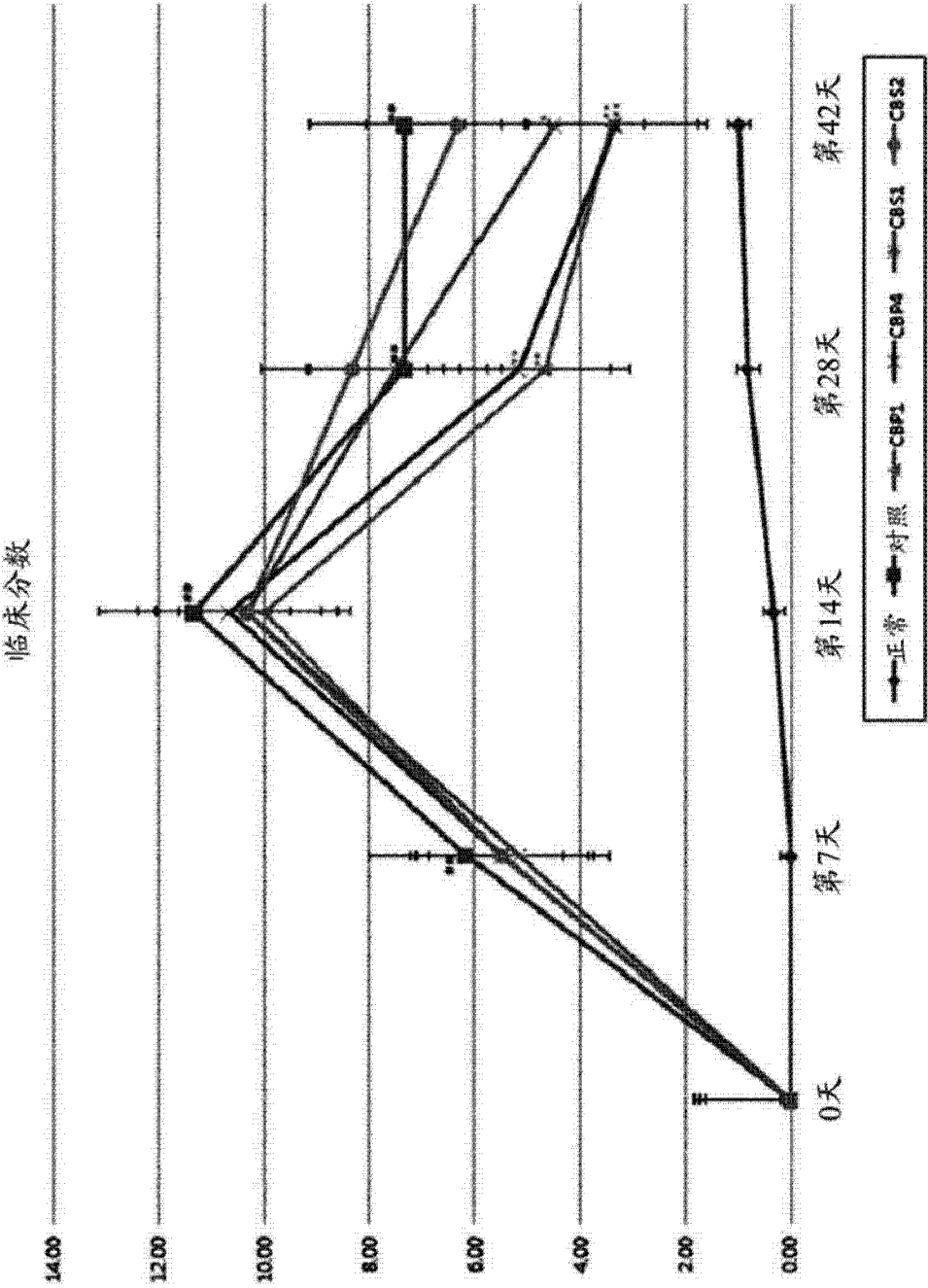


图 8

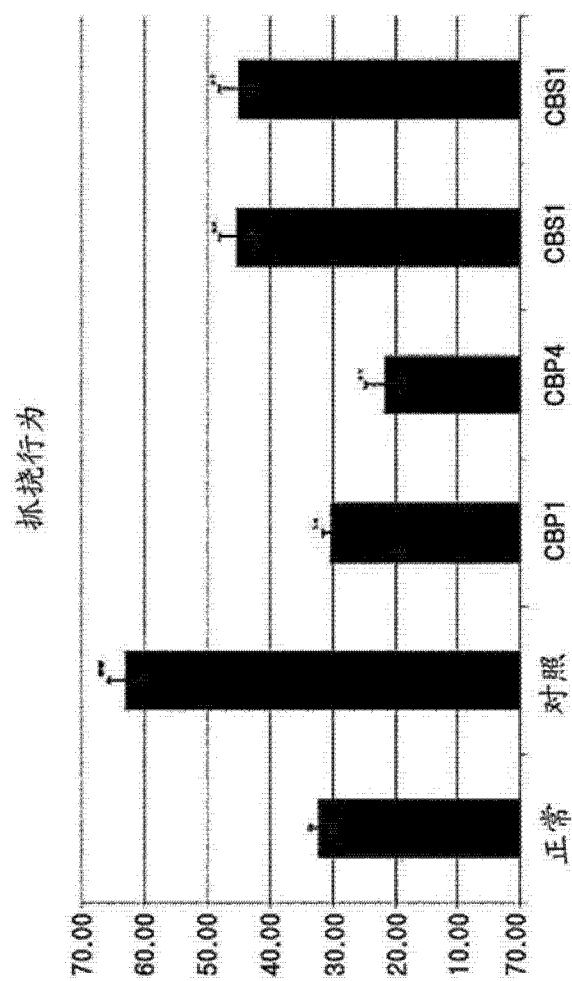


图 9

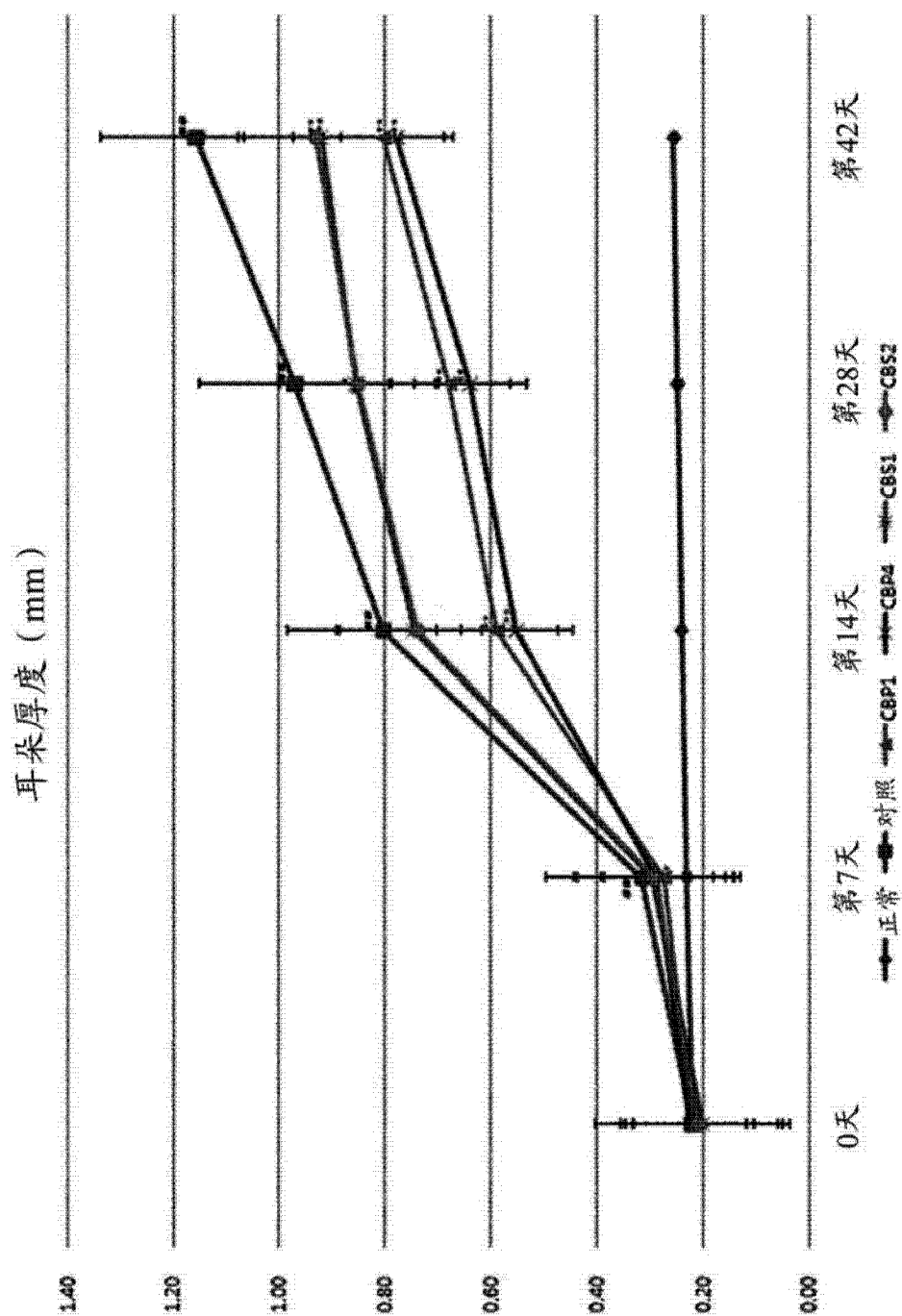


图 10

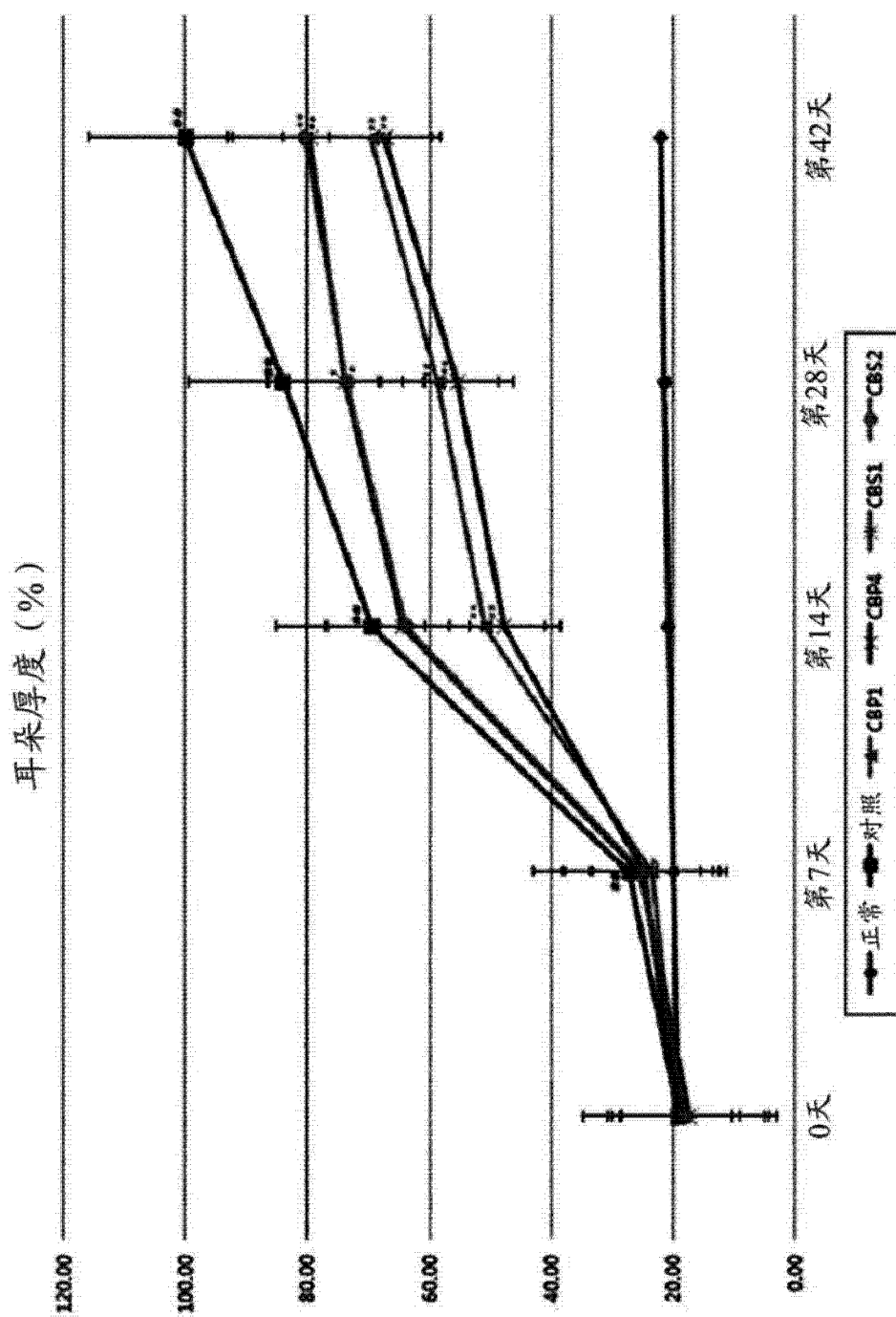


图 11

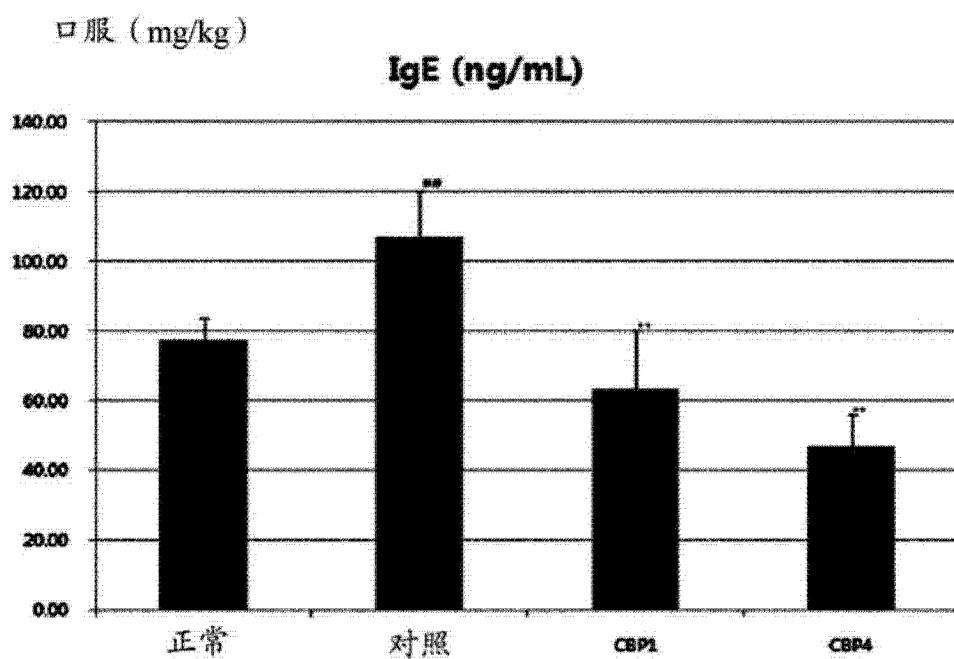


图 12(a)

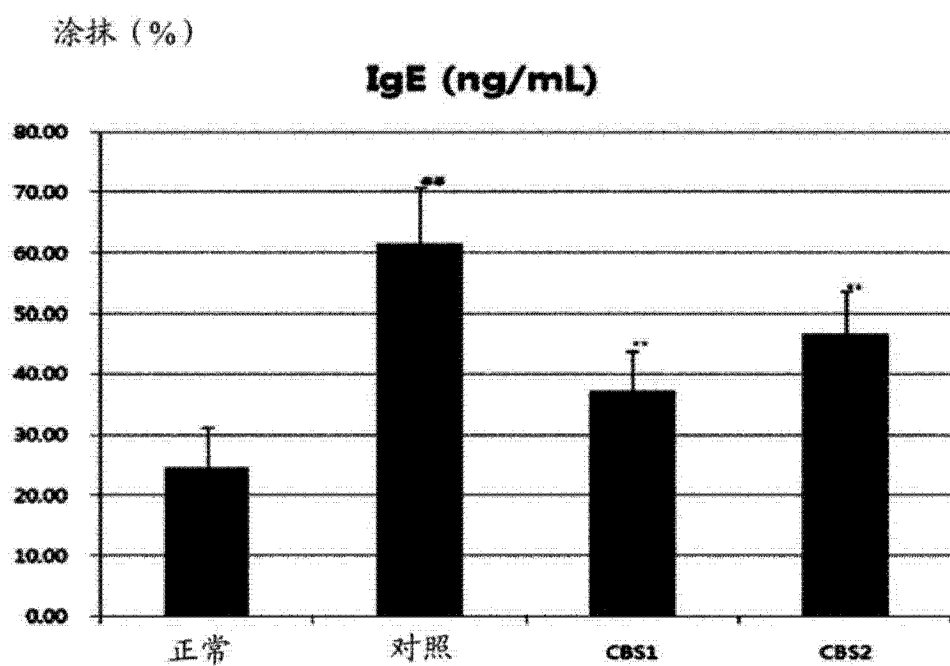


图 12(b)

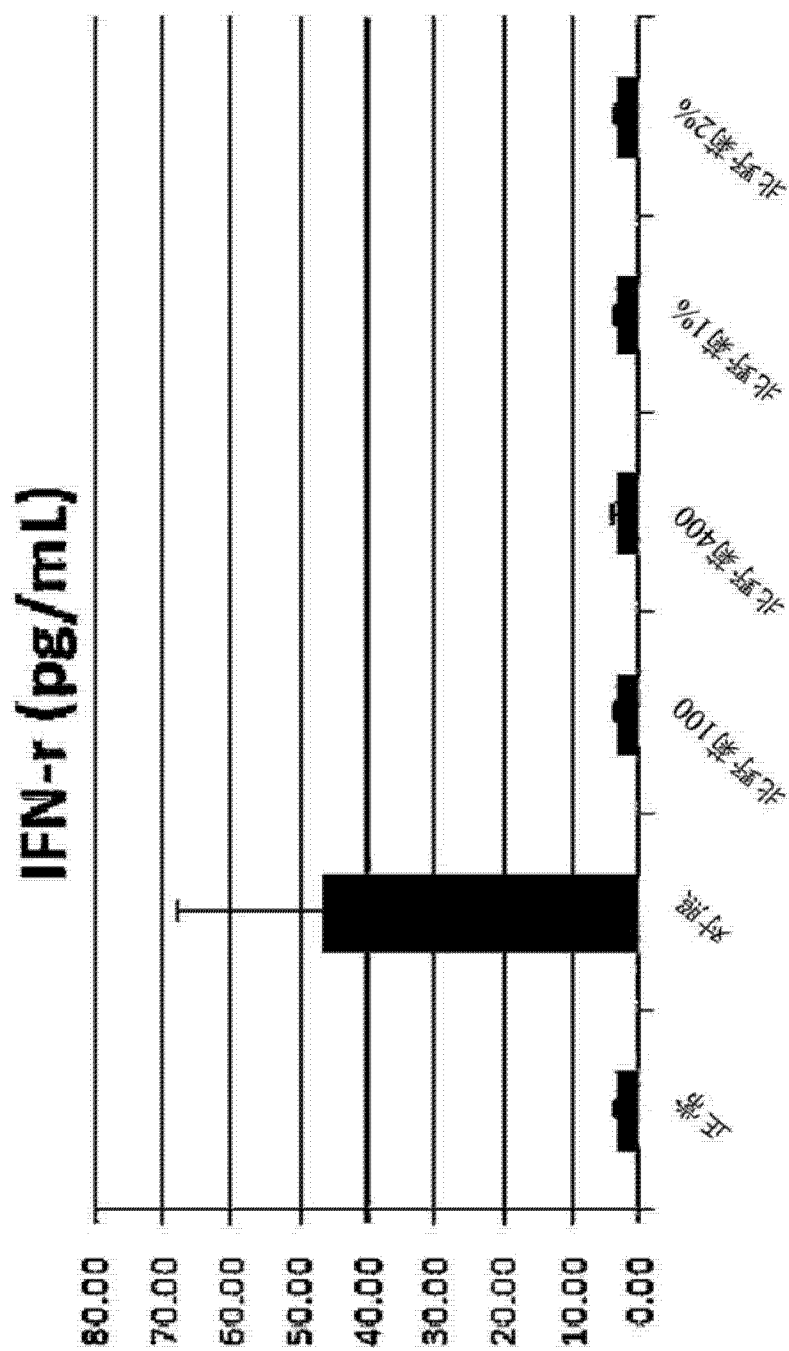


图 13

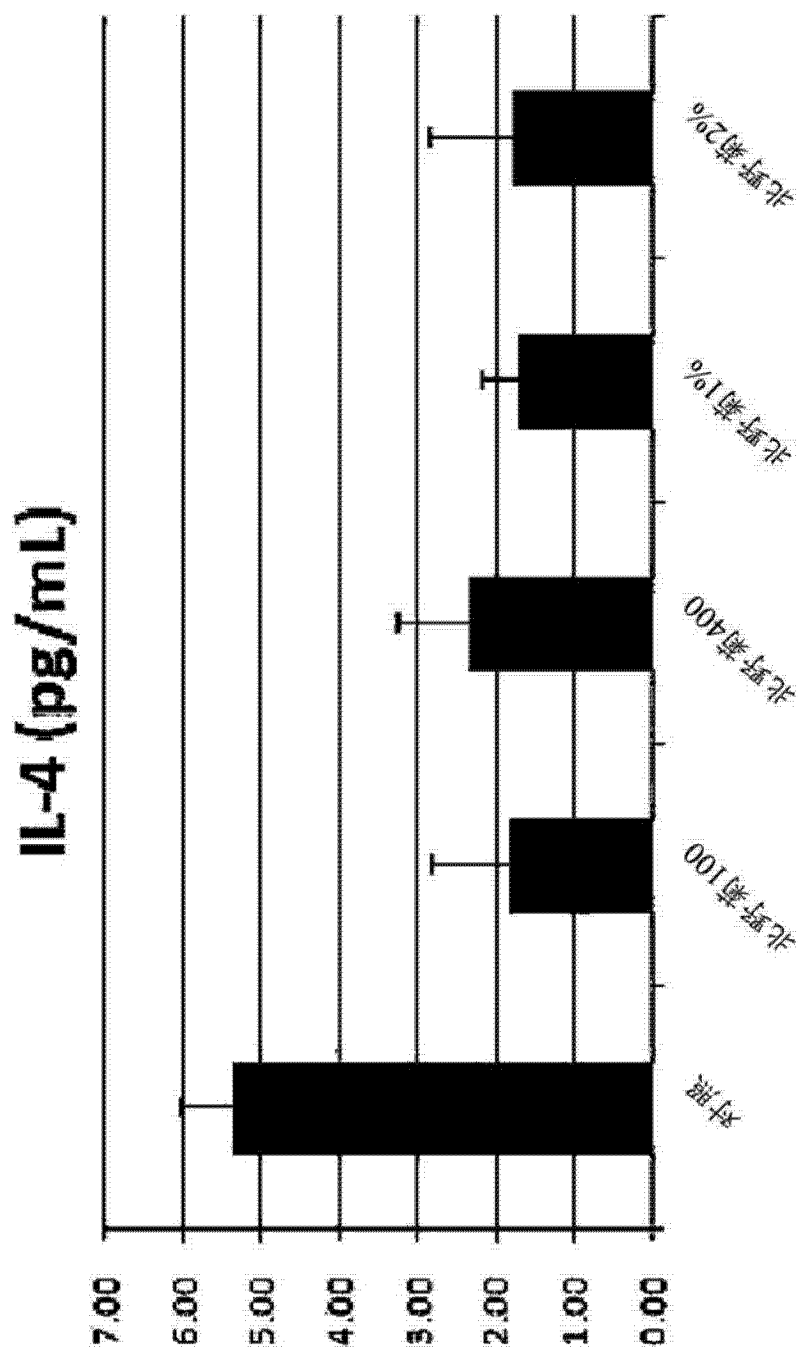


图 14

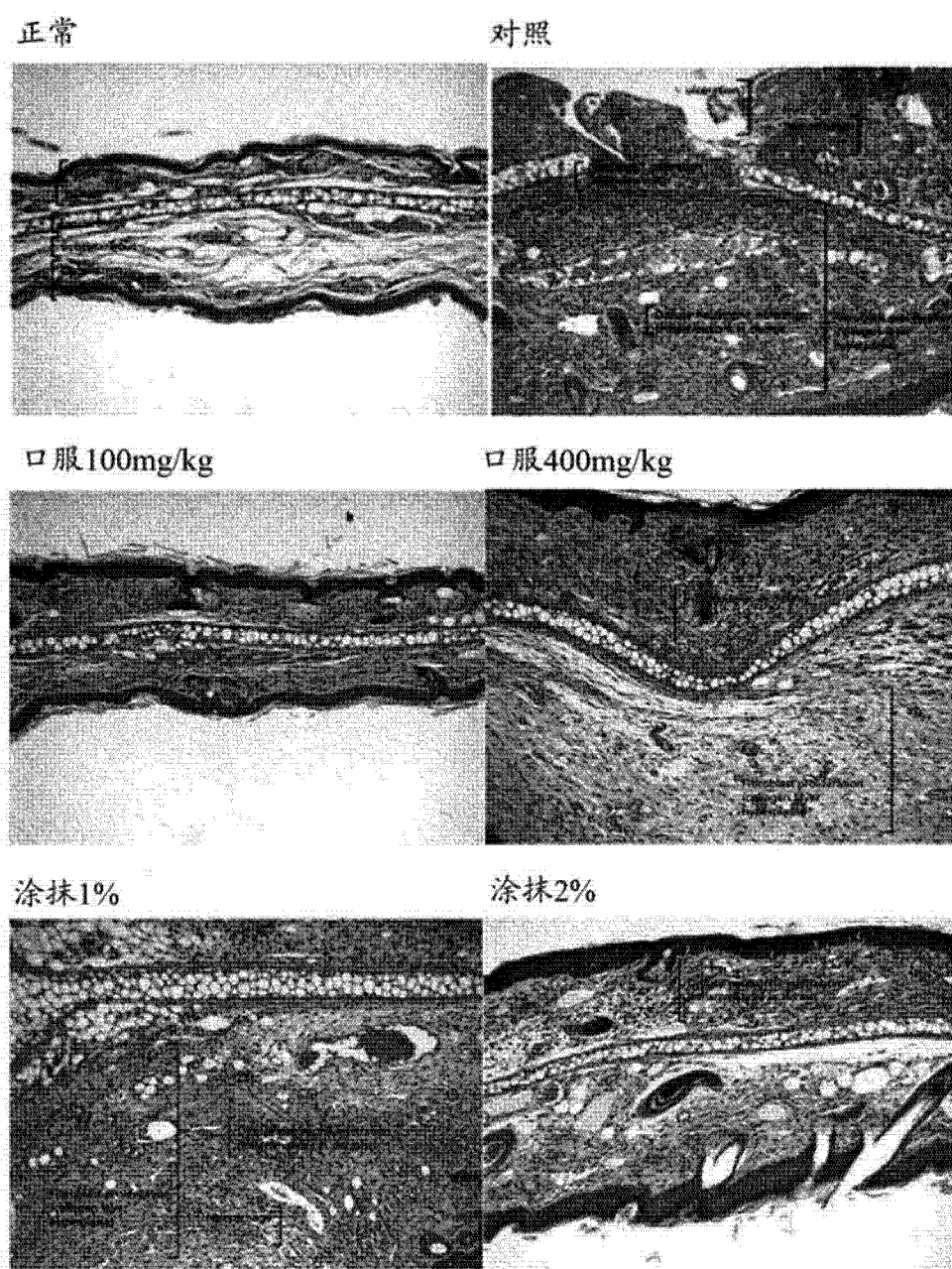


图 15

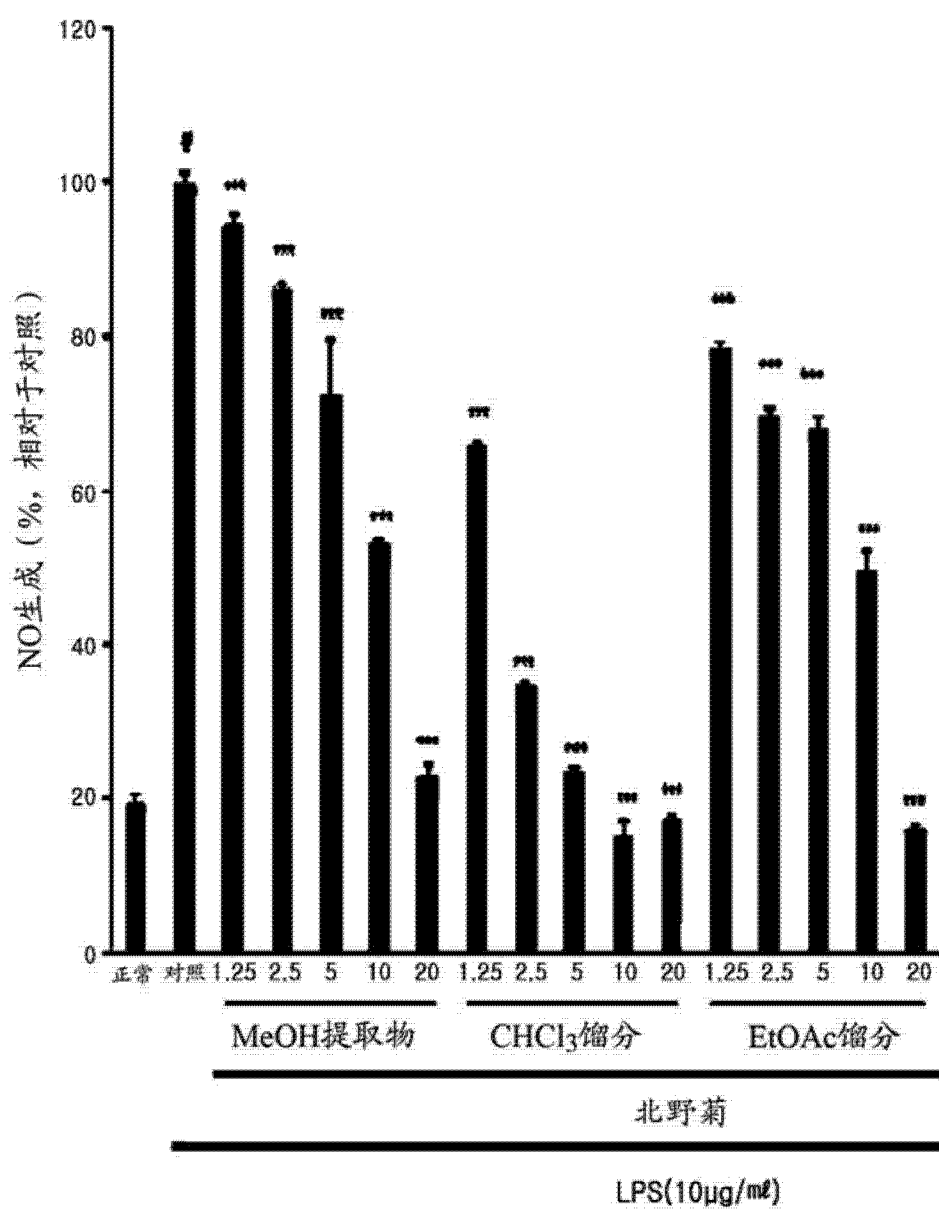


图 16

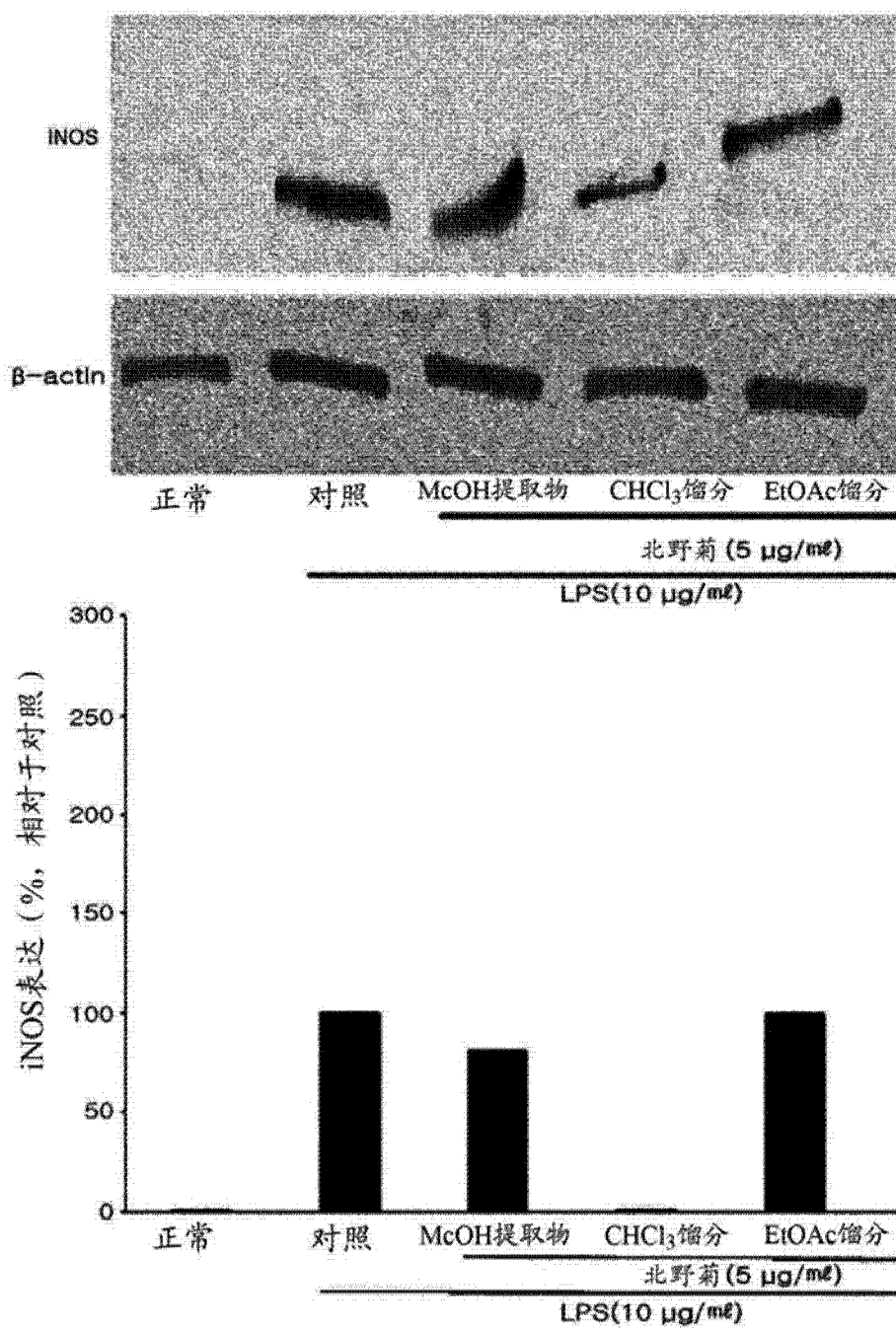


图 17

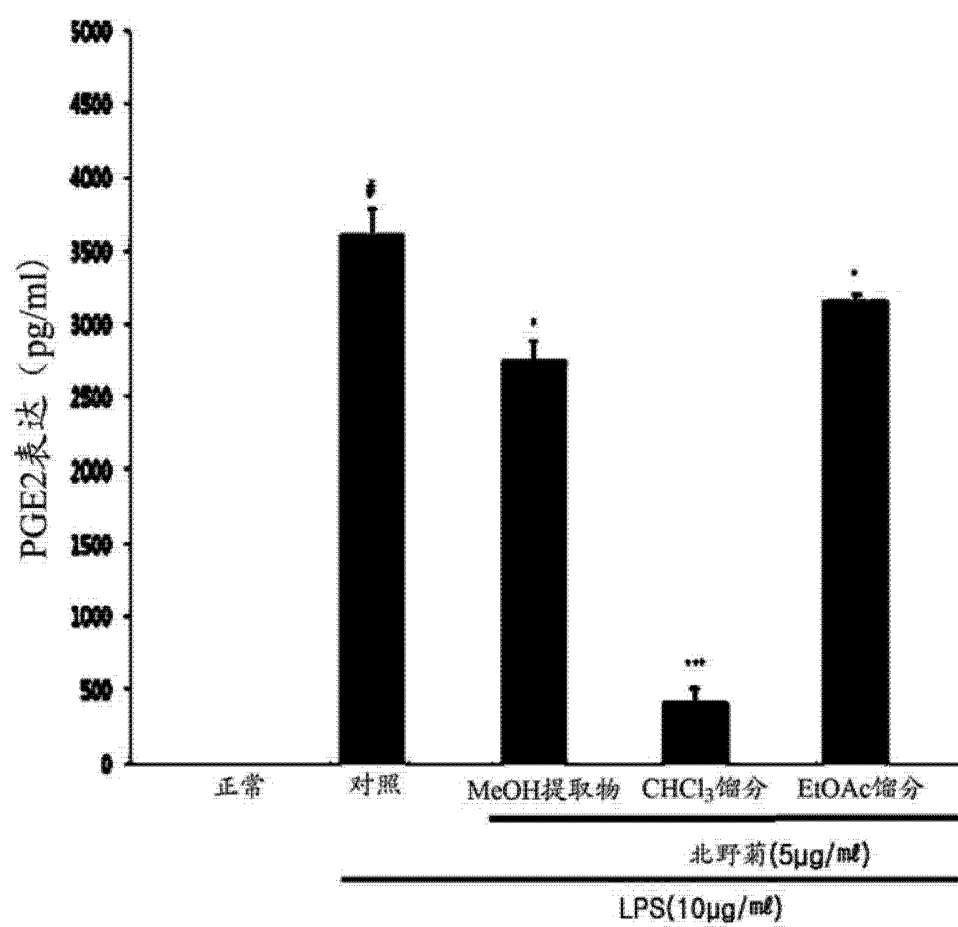


图 18

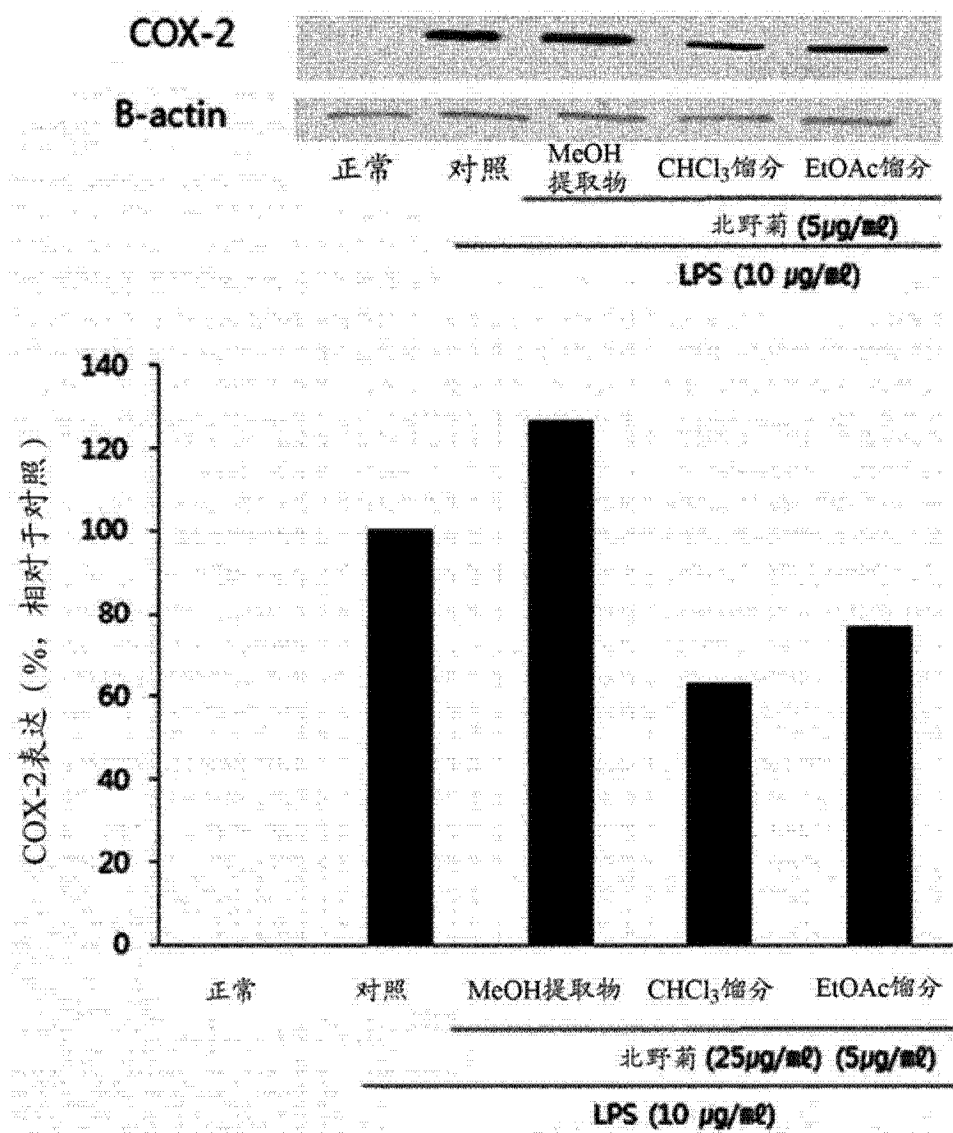


图 19

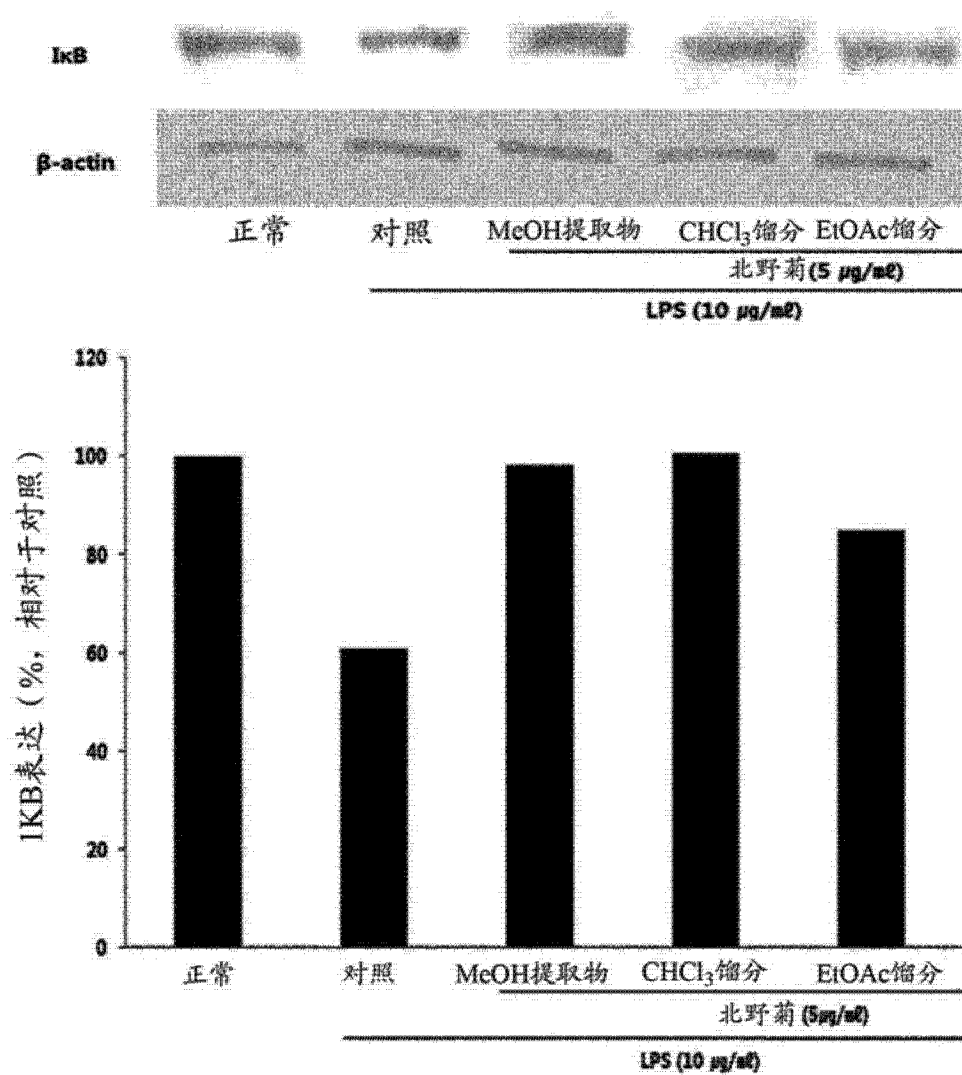


图 20

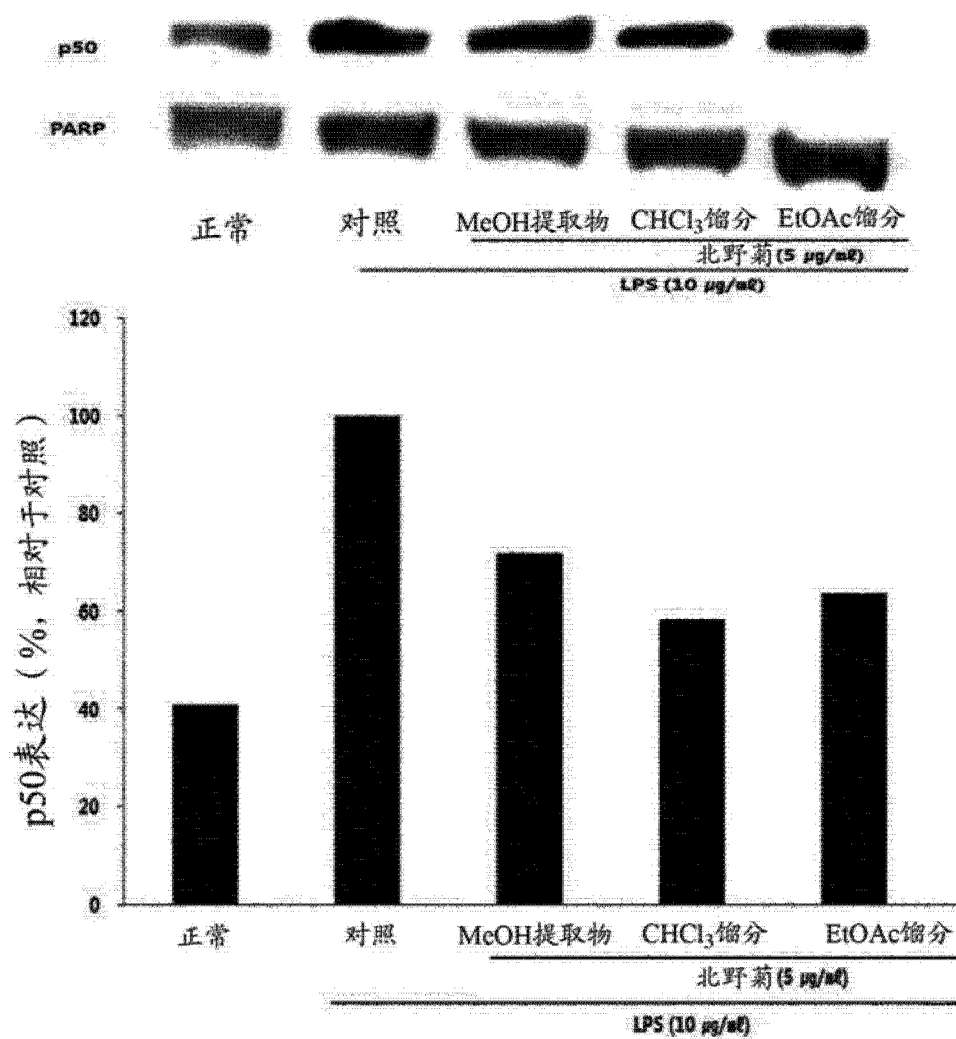


图 21

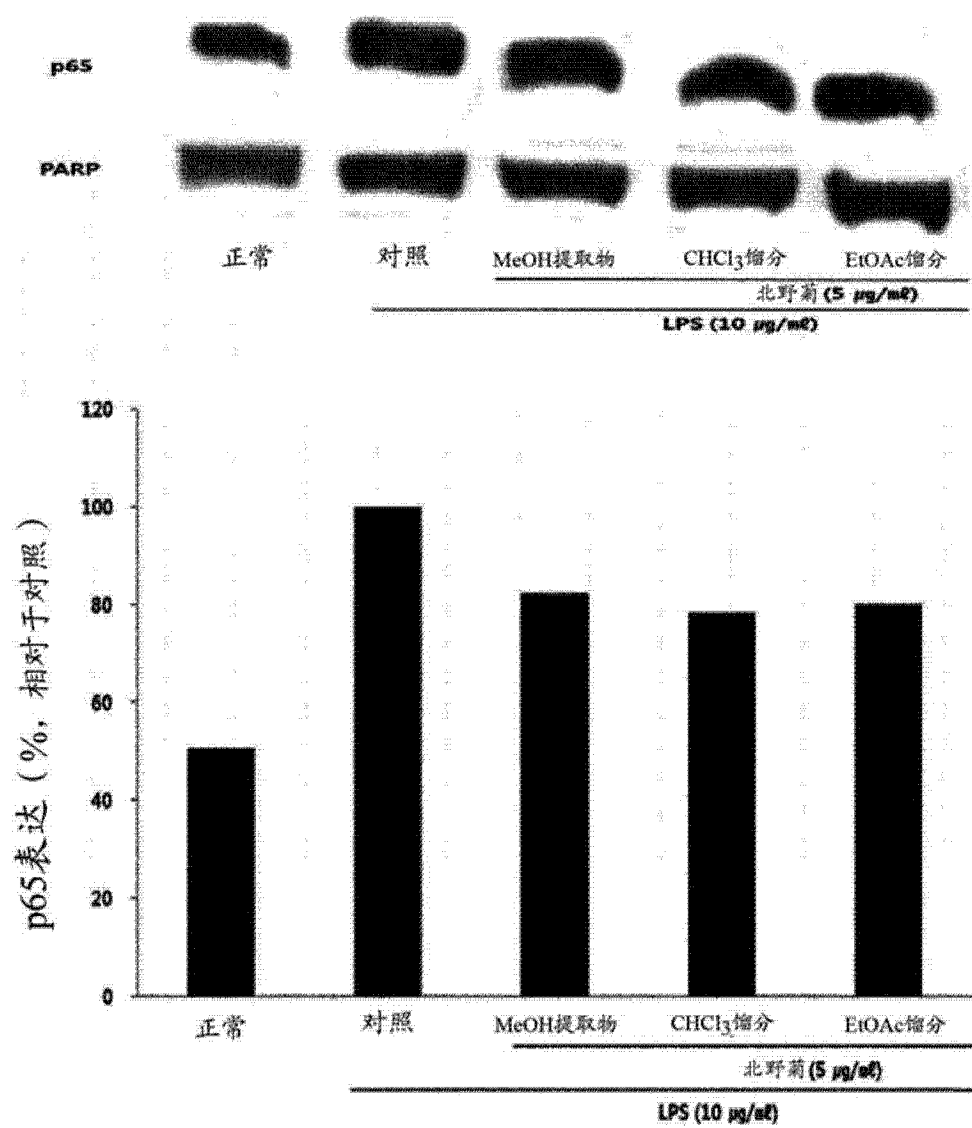


图 22

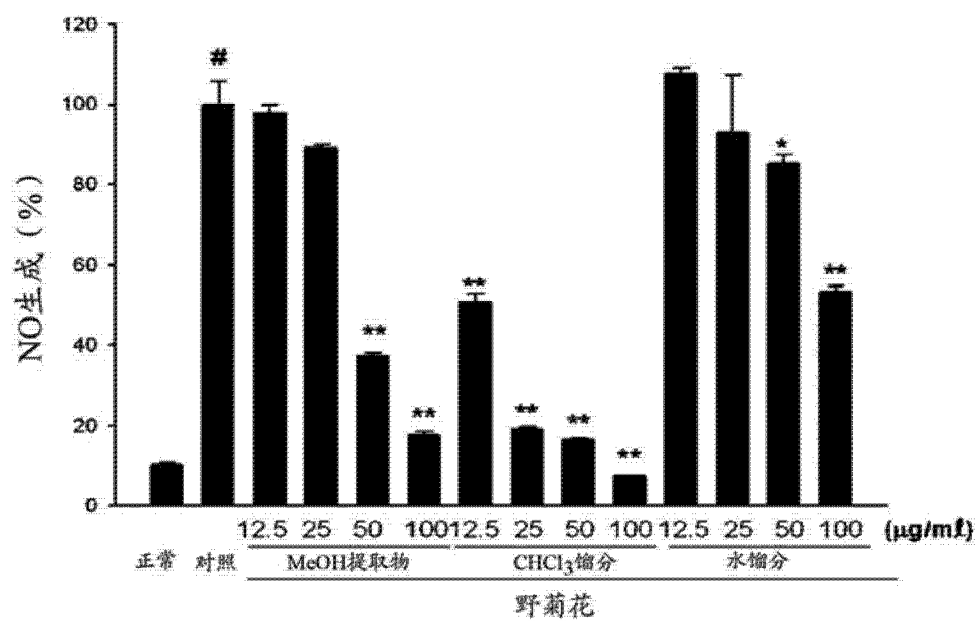


图 23

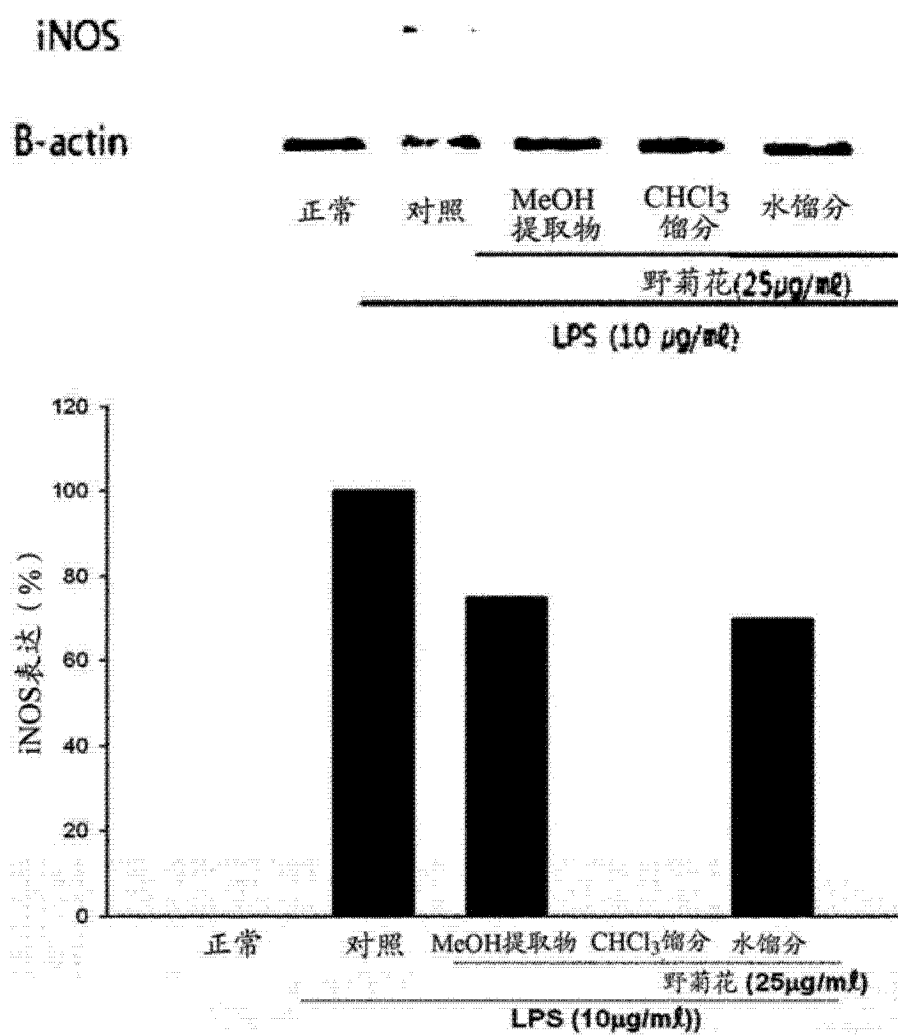


图 24

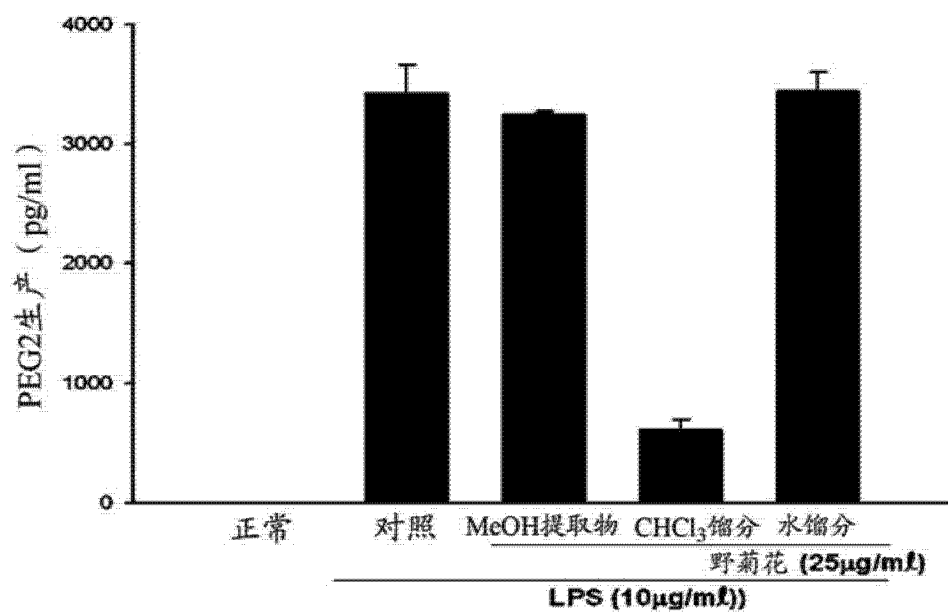


图 25

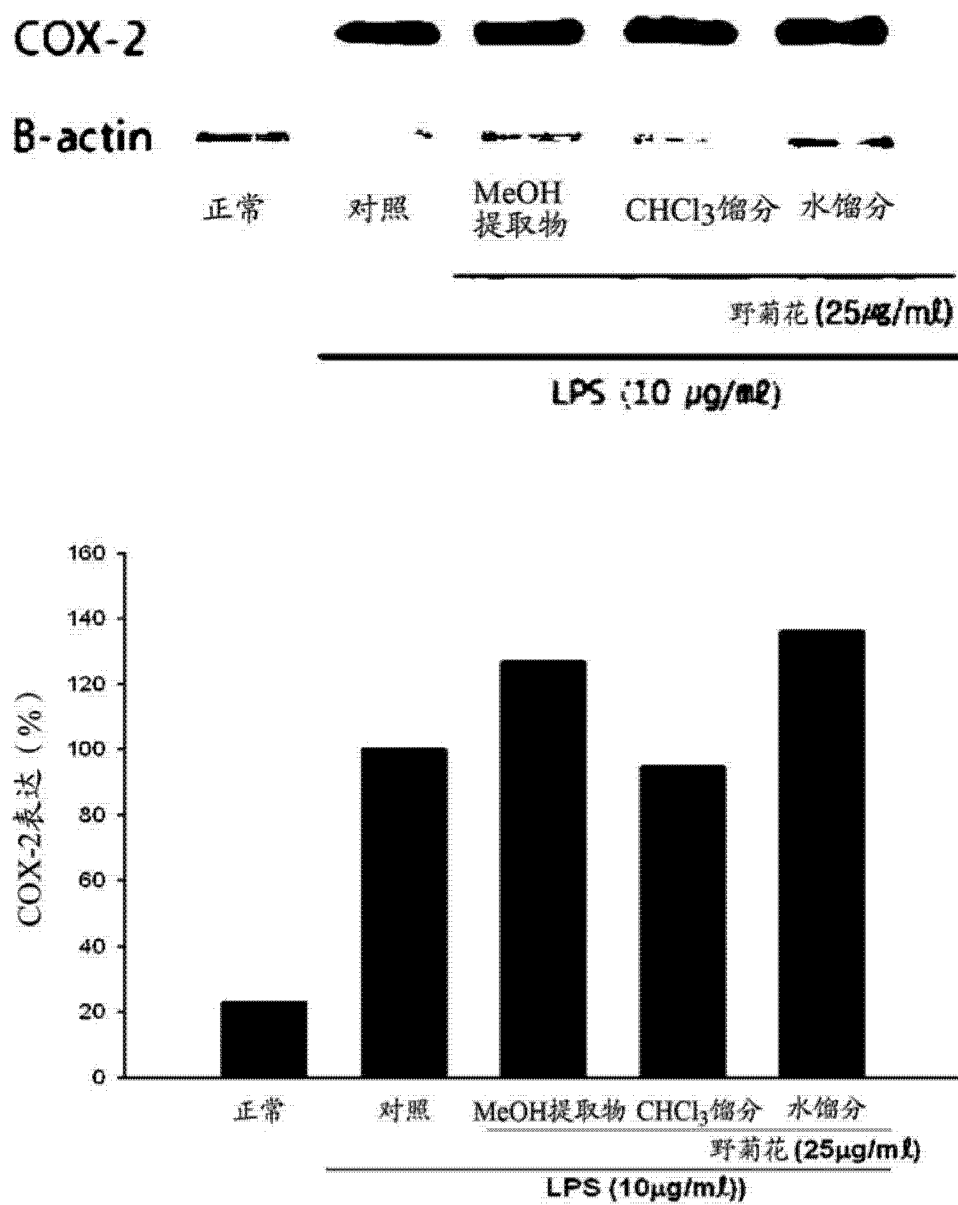


图 26

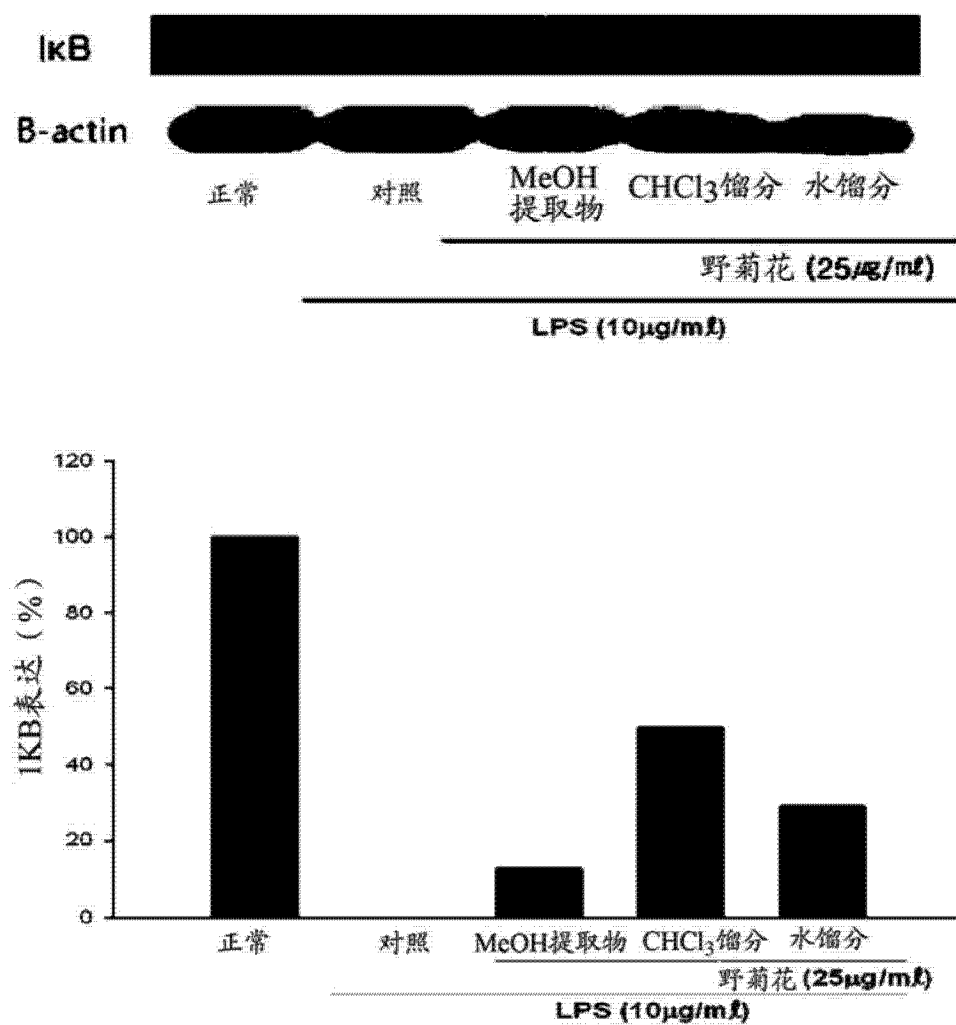


图 27

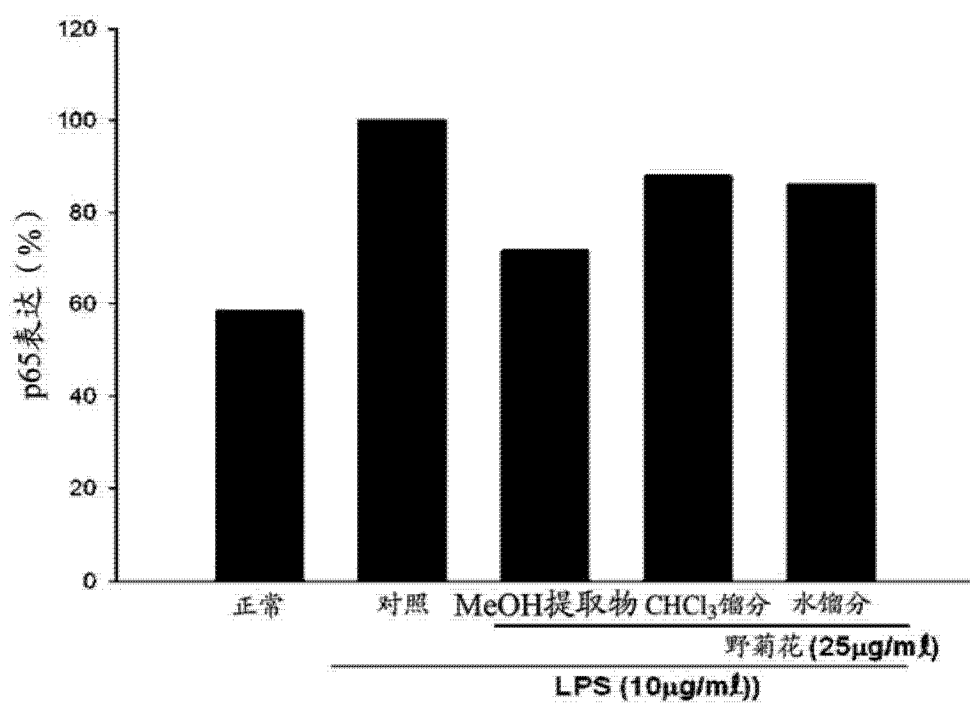
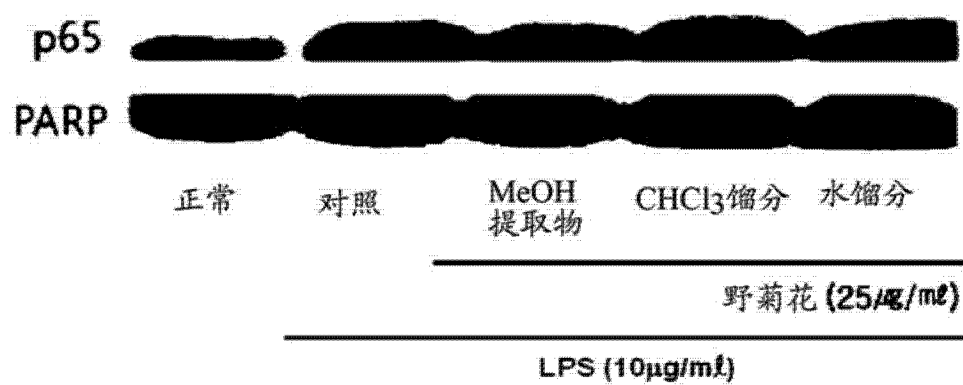


图 28

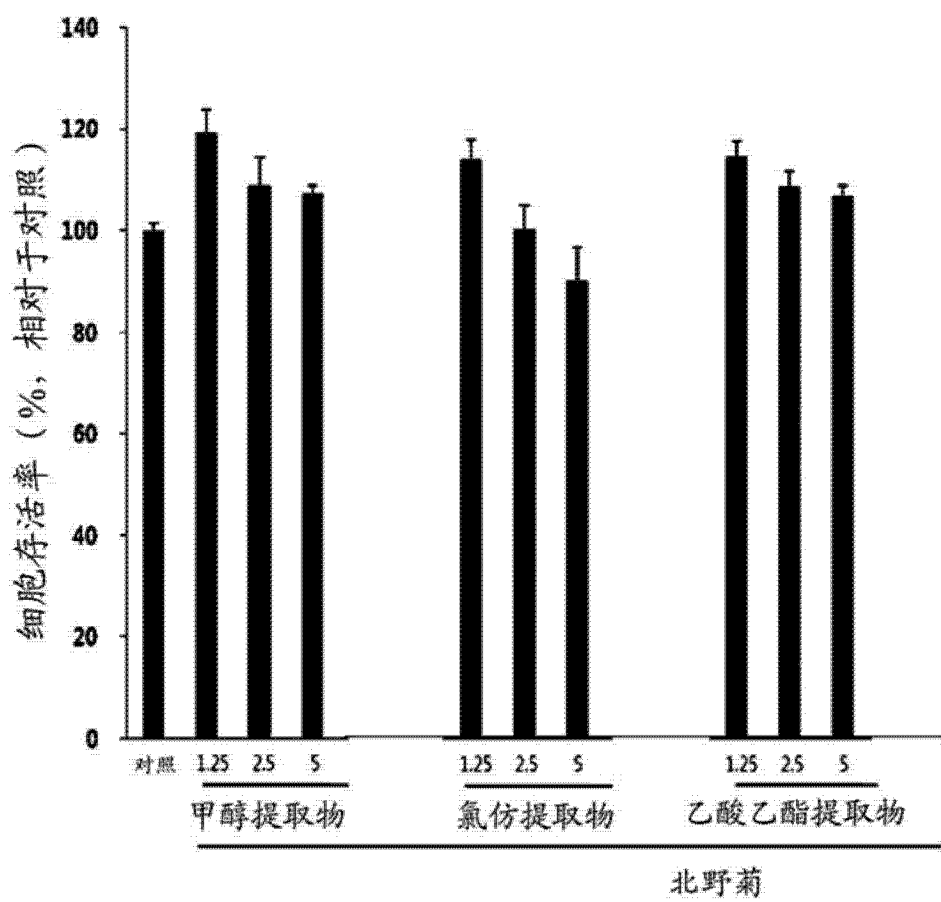


图 29