



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104661669 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201380044552. 6

代理人 程伟

(22) 申请日 2013. 07. 03

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

10-2012-0072394 2012. 07. 03 KR

A61K 36/904(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/005893 2013. 07. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/007537 KO 2014. 01. 09

(71) 申请人 庆熙大学校产学协力团

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金珍珠 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

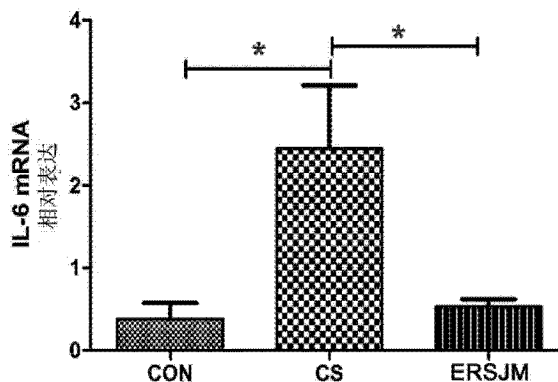
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

对于炎性肠疾病具有预防或治疗作用的包含百部提取物的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种药物组合物,其包含百部提取物,其用于预防和治疗由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的发生;涉及通过使用该组合物预防或治疗炎性肠疾病的发生的方法;涉及通过使用该组合物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发生的食品组合物,其包含百部提取物。根据本发明的包含百部提取物的药物组合物降低MMP12(已知其破坏伴随炎性肠疾病的炎性细胞因子IL-1 β 、TNF- α 、和IL-6、和弹性蛋白和胶原蛋白)的表达水平,且能够抑制肠内乳酸杆菌数量的减少,因此能够被广泛用于开发安全有效的炎性肠疾病治疗剂。



1. 一种用于预防或治疗炎性肠疾病的药物组合物,其包含百部提取物。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述百部提取物为百部的水提取物。
3. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述炎性肠疾病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。
4. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。
5. 一种用于预防或治疗炎性肠疾病的方法,其包括向具有炎性肠疾病患病风险或患有炎性肠疾病的受试者施用药学有效量的如权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物。
6. 一种抑制炎性细胞因子表达的方法,其包括向具有炎性细胞因子过表达的组织或细胞施用如权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述炎性细胞因子选自 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1 及其组合。
8. 一种用于预防或改善炎性肠疾病的食品组合物,其包含百部提取物。
9. 根据权利要求 8 所述的食品组合物,其中,以食品组合物的总重量计,百部提取物的含量范围为 0.01wt%至 100wt%。

对于炎性肠疾病具有预防或治疗作用的包含百部提取物的 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包含百部的药物组合物,更特别地,涉及包含百部提取物的药物组合物,其可以预防患有香烟烟雾所致的炎性肠疾病;涉及使用所述药物组合物预防或治疗炎性肠疾病的方法,使用所述药物组合物抑制炎症细胞因子过度表达的方法,以及包含百部提取物的食品组合物,其可以预防或改善由香烟烟雾所致的炎性肠疾病。

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的炎症,其从口腔到肛门的整个消化系统中发展溃疡、纤维化、狭窄和病变,并伴有如腹痛、慢性腹泻、发烧和营养不良的全身症状。

[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症病变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而且还引起如头痛、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] 本发的发明人在努力开发无副作用,衍生自天然物质的治疗剂的过程中,发现了包含百部(Stemonae Radix)提取物的组合物,其可以抑制MMP12(已知其破坏炎症细胞因子、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达,还能够抑制肠内乳酸杆菌数量的减少,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包含百部提取物的药物组合物。

[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症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包含百部提取物的食

品组合物。

[0011] 本发明的有益效果

[0012] 本发明的药物组合物包含百部提取物,其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-1 β 、TNF- α 、和 IL-6、弹性蛋白和胶原蛋白)的表达水平,还可以抑制肠内乳酸杆菌数量的减少,因此开发用于治疗炎性肠疾病的安全有效的治疗剂是非常有用的。

附图说明

[0013] 从以下结合附图的详细说明,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 1 是阐明百部提取物细胞毒性评价结果的图。

[0015] 图 2 是阐明百部提取物对 NO 生成的作用的评价结果的图。

[0016] 图 3a 是阐明百部提取物对 TNF- α 生成的作用的评价结果的图。

[0017] 图 3b 是阐明百部提取物对 IL-1 β 生成的作用的评价结果的图。

[0018] 图 3c 是阐明百部提取物对 IL-6 生成的作用的评价结果的图。

[0019] 图 3d 是阐明百部提取物对 MCP-1 生成的作用的评价结果的图。

[0020] 图 4a 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 IL-6mRNA 水平变化的图。

[0021] 图 4b 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 TNF- α mRNA 水平变化的图。

[0022] 图 4c 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 IL-1 β mRNA 水平变化的图。

[0023] 图 4d 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 MMP12mRNA 水平变化的图。

[0024] 图 5 是阐明通过本发明百部提取物的治疗乳酸杆菌数量变化的图。

[0025] 图 6 是阐明通过本发明百部提取物的治疗小鼠体重变化的图。

具体实施方式

[0026] 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,其包含百部提取物。

[0027] 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提取物上。结果,他们发现了百部提取物可以以浓度依赖方式抑制由 LPS 处理引起的一氧化氮(NO)的生成,且还可以以浓度依赖方式抑制各种炎性细胞因子的生成,而对鼠巨噬细胞来源的 RAW264.7 细胞系没有表现出任何毒性。此外,他们还发现了百部提取物可以减少 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,且还可以抑制肠内乳酸杆菌数量的减少,抑制由于炎性肠疾病所致的体重的减少。因此,本发明百部提取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。

[0028] 如本文使用的,术语“百部”(蔓生百部(*Stemona japonica* Miquel)的根)是指蔓生百部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,而其外皮收缩到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。

[0029] 如本文使用的,术语“百部提取物”是指通过使用水或有机溶剂提取“百部”而获得的提取物。

[0030] 本发明百部提取物可以被用作预防、治疗或改善炎性肠疾病的组合物的活性成分。优选地,可以使用提取溶剂如水、C1-C6 醇、己烷、氯仿、乙酸甲酯、丁醇等获得百部提取物,更优选地,提取溶剂为水、C1-C6 醇或其组合,最优选地,为百部的热水或 70% 乙醇的提取物。

[0031] 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,其在从口腔到肛门的整个消化系统中发展溃疡、纤维化、狭窄和病变,并伴有如腹痛、慢性腹泻、发烧和营养不良等全身症状。

[0032] 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。

[0033] 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,降低由疾病所致的所有直接或间接的病理结果,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。

[0034] 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百部提取物的药物组合物治疗炎性肠疾病。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,通过使用水提取百部获得百部提取物 (实施例 1-1),且用 LPS 处理用百部提取物处理的 RAW264.7 细胞系,并检测细胞株生成的 NO 和各种炎性细胞因子的水平。结果,百部提取物对 RAW264.7 细胞系没有显示任何细胞毒性 (图 1),以浓度依赖方式降低 NO 水平 (图 2),还以浓度依赖方式降低由 LPS 处理而生成的各种炎性细胞因子的水平 (图 3a 至 3d)。此外,当口服施用百部提取物的小鼠暴露于香烟烟雾时,所述小鼠显示由香烟烟雾引起的炎性肠疾病症状的缓解 (图 4a 至 4d)、炎性肠疾病引起的肠内乳酸杆菌数量的减少 (图 5)、以及炎性肠疾病引起的体重的减少 (图 6)。

[0036] 同时,本发明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、栓剂和无菌注射溶液的形式。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。

[0037] 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,且除了简单的如水和液体石蜡的稀释剂外,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 (위템솔)、聚乙二醇、吐温 61、可可脂、月桂酸甘油酯(라우린지)、甘油明胶等。

[0038] 本发明的一个实施方案中,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百部提取物的量的范围可以从 0.0001wt% 至 50wt%,更优选地,0.01wt% 至 10wt%,但不特别限于此。

[0039] 本发明的药物组合物可以药理学有效量施用。如本文使用的,“药理学有效量”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施用的药物,以及在医药领域公知的其他因素。本发明药物组合物可以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。

[0040] 本发明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,本发明包含百部提取物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,优选从 1mg/kg/天至 10mg/kg/天。本发明药物组合物可以每天一次或者几次分剂量施用,但不特别限于此。

[0041] 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理学有效量的包含本发明百部提取物作为活性成分的药物组合物。

[0042] 如上所述,本发明百部提取物可以被用作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。

[0043] 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。本发明药物组合物的施用可以缓解或治疗受试者的炎性肠疾病。

[0044] 如本文使用的,术语“缓解”是指与通过施用本发明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。

[0045] 如本文使用的,所述术语“施用”是指用适当的方法向受试者引入本发明的药物组合物的活动,且药物组合物可以经由口服或肠胃外途径的各种途径施用,只要其能够将药物组合物递送至目标组织。

[0046] 关于用于治疗炎性肠疾病的方法,可以通过任何常规途径施用药组合物,只要其能够将药物组合物递送至目标组织。根据预期目的,可通过腹膜内施用、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意装置施用药物组合物。

[0047] 实现所述目的的本发明的再一方面,提供了用于预防或改善炎性肠疾病的食品组合物,其包含本发明的百部提取物。

[0048] 百部已经长期用作草药原材料,且也由此验证其安全性。因此,其可以作为食品组合物。

[0049] 以食品组合物的总重量计,本发明的百部提取物包含在 0.01wt% 至 100wt% 的范围内,优选为 1wt% 至 80wt%。当食品是饮料时,每 100ml 的食品组合物可以包含 1g 至 30g 提取物,优选 3g 至 20g。此外,所述组合物可以进一步包含在食品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,所述组合物可以进一步包含食品添加剂,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(谷氨酸钠(MSG)等)、甜味剂(甘素、环磷酸盐、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。食品添加剂可根据食品的种类选择,并以适当量使用。

[0050] 此外,可以使用包含百部的食品组合物制备用于预防或改善炎性肠疾病的功能性食品。

[0051] 特别地,可以使用食品组合物制备具有良好的货架期,带有应用于其中的农产品、畜产品或海产品的改进性质的加工食品。加工食品的实例可包括小甜点、饮料、酒精饮料、发酵食品、罐头食品、牛奶加工食品、肉类加工食品、面条等。小甜点的实例包括饼干、派、蛋糕、面包、糖果、果冻、口香糖、谷类食品(膳食替代品,如谷物薄片)。饮料的实例包括碳酸软饮料、功能性等渗饮料、果汁(例如,苹果的、梨的、葡萄的、芦荟的、橘子的、桃的、胡萝卜的、番茄的果汁等)、甜的米饮料等。酒精饮料的实例包括精制米酒、威士忌、烧酒(韩国蒸馏酒)、啤酒、烈酒、水果酒等。发酵食品的实例包括酱油、豆瓣酱、辣椒酱等。罐头食品的实例包括海产罐头食品(如罐头金枪鱼、鲑鱼、秋刀鱼、海螺等)、畜牧罐头食品(罐头牛肉、猪肉、鸡肉、火鸡等)、农产品罐头食品(罐头玉米、桃子、菠萝等)。牛奶加工食品的实例包括奶酪、黄油、酸奶等。肉类加工食品的实例包括猪肉饼、牛肉饼、鸡肉饼、香肠、咕嚕肉、鸡块、烤牛肉片等。面条的实例包括密封和包装的鲜面条。此外,组合物可用于制造甑煮食品、汤等。

[0052] 如本文使用的,具有与术语“特殊保健用(FoSHU)”相同的含义的术语“功能性食品”是指在医药和医学治疗上高效地,调节以有效地发挥身体调节功能,以及提供养分的食品。功能性食品可以被制备成各种形式,包括片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、液体剂、丸剂等,以获得对于预防或改善炎性肠疾病有用的效果。

[0053] 实现所述目的的本发明的又一方面,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。

[0054] 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-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1 等,但不限于此。

[0055] 根据本发明的一个实施方案,炎性肠疾病发生在暴露于香烟烟雾的小鼠中,因此增加炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达水平。但是,当对小鼠施用本发明的药物组合物时,抑制了炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达水平的增加(图 4a 至 4c)。此外,MMP12(已知其破坏弹性蛋白和胶原蛋白)的 mRNA 水平显示了相同的模式(图 4d)

[0056] 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。

[0057] 实施例 1:百部提取物对细胞系的作用

[0058] 实施例 1-1:材料的制备

[0059] 首先,将购自 SUN TEN(台北,台湾)的百部热水提取物的干燥粉末溶解于水中,并过滤获得百部液体提取物(蔓生百部根的提取物,ERSJM)。

[0060] 同时,将购自韩国细胞系库(KCLB)的 RAW264.7 细胞系在 DMEM 培养基中(10% FBS, 1% 生理盐水)孵育,并在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中培养。

[0061] 实施例 1-2:百部提取物细胞毒性评价

[0062] 实施例 1 中培养的 RAW264.7 细胞系以 2×10^5 细胞/孔的浓度等分至 96 孔板中,加入 DMEM 培养基,并在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中培养。然后,从培养的细胞中去除培养基,以包含 0、1、10 或 100 μ g/mL 浓度的百部提取物且不含 FBS 的 DMEM 培养基补充,并在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中再培养 24 小时。培养完成后,在每个孔中加入 50 μ L MTT 溶液(2mg/mL),使其在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中反应 4 小时,从每个孔中去除培养基,加入 200 μ L DMSO,并使用 ELISA 酶标仪测定它们各自的吸光度。比较由此获得的吸光度以评价百部提取物的细胞毒性(图 1)。

[0063] 图 1 是阐明百部提取物细胞毒性评价结果的图。如图 1 所示,即使以高浓度百部提取物(蔓生百部的提取物,ERSJM)处理时,也未观察到细胞毒性。因此,其证实了百部提取物是安全无细胞毒性的材料。

[0064] 实施例 1-3:百部提取物对一氧化氮(NO)生成的作用

[0065] 已知炎性肠疾病(例如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)病人血浆中的一氧化氮(NO)的浓度显著增加。就此而言,检验了百部提取物对 LPS 处理以人工地增加 NO 生成的细胞系的作用。

[0066] 具体而言,实施例 1 中培养的 RAW264.7 细胞系以 1×10^6 细胞/孔的浓度等分至 96 孔板中,加入 DMEM 培养基,并在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中培养。然后,从培养的细胞中去除培养基,分别以包含 0、1、10 或 100 μ g/mL 浓度的百部提取物且不含 FBS 的 DMEM 培养基补充,并在具有 5% CO₂且保持在 37℃ 的培养箱中再培养。两小时后在每个孔中加入 LPS 至终浓度为 1 μ g/mL 并培养 24 小时。培养完成后,收集每个孔中的上清液,并在其中加入格里斯试剂。检测、比较每个孔中所得的 NO 生成水平,并且评价百部提取物对 NO 生成的作用(图 2)。特别地,用作对照组的细胞系未进行任何处理,而用作比较组的细胞系只用 LPS 而未用百部提取物处理。

[0067] 图 2 是阐明百部提取物对 NO 生成作用的评价结果的图。如图 2 所示,相比于对照

组 (con), 在以 LPS 处理的比较组中 (lps), NO 的水平迅速增加, 但是 NO 的水平随着百部提取物 (ERSJM) 处理浓度的增加而减少。

[0068] 因此, 其证实了百部提取物对由 NO 生成所致的细胞损伤有抑制作用。

[0069] 实施例 1-4: 百部提取物对炎性细胞因子生成的作用

[0070] 检验了百部提取物对实施例 1-3 中制备的以 LPS 处理的各自 RAW264.7 细胞系中炎性细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、或 MCP-1) 生成水平的作用。

[0071] 首先, 将对应于各个炎性细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 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, 并以实施例 1-3 制备的 LPS 处理的各个 RAW264.7 细胞系获得的培养上清液进行处理, 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, 通过应用 ELISA 酶标仪测定所得的底物的吸光度, 并进行相互比较 (图 3a 至 3d)。

[0072] 图 3a 是阐明百部提取物对 TNF- α 生成作用的评价结果的图; 图 3b 是阐明百部提取物对 IL-1 β 生成作用的评价结果的图; 图 3c 是阐明百部提取物对 IL-6 生成作用的评价结果的图; 图 3d 是阐明百部提取物对 MCP-1 生成作用的评价结果的图。

[0073] 如图 3a 至 3d 所示, 在 RAW264.7 细胞系中, 相比于对照组 (con), 在以 LPS 处理的比较组中 (lps) 炎性细胞因子的水平迅速增加, 但是炎性细胞因子的水平随着百部提取物 (ERSJM) 处理浓度的增加而降低。

[0074] 因此, 其证实了百部提取物对炎性细胞因子的生成具有抑制作用。

[0075] 实施例 2: 百部提取物对小鼠的作用

[0076] 实施例 2-1: 以香烟烟雾处理的炎性肠疾病 (IBD) 的诱发

[0077] 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。

[0078] 首先, 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。

[0079] 以 100mg/kg 的剂量将实施例 1-1 获得的百部液体提取物口服施用由此饲养的小鼠, 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), 并将它们用作为实验组。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, 但未用百部液体提取物处理的小鼠作为比较组 (CS), 并且分配给对照组和比较组的各个组的小鼠的数目分别为三只, 且用于实验组 (ERSJM) 为两只。

[0080] 实施例 2-2: 炎性细胞因子和 MMP12 表达水平的比较

[0081] 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。使用 RNeasy Mini 试剂盒 (QIAGEN, 美国) 从由此收集的结直肠组织中获得总 RNA。具体而言, 向每个结直肠组织中加入 600 μ L 的 RLT 缓冲液以破坏细胞, 进一步加入 600 μ L 70% 乙醇, 将其混合。将 700 μ L 的混合物加入至 RNeasy Mini 试剂盒的 RNeasy 迷你柱, 并以 8000 $\times$ g 离心 15 秒后, 向残留溶液中加入 700 μ L 包含在上述试剂盒中的 RW1 缓冲液, 以 8000 $\times$ g 离心 15 秒, 收集残留溶液。然后, 向残留溶液中加入 500 μ L 包含在上述试剂盒中的 RPE 缓冲液, 以 8000 $\times$ g 离心 15 秒, 收集残留溶液。向得到的残留溶液中加入

入 50 μ L 无 RNA 酶的水,以 8000 $\times$ 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) 由此得到的总 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。

[0082] 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 2 μ g 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 $^{\circ}$ C:15 秒, 60 $^{\circ}$ C: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 、和 IL-1 β 、和弹性蛋白和胶原蛋白) 的 mRNA 水平 (图 4a 至图 4d)。

[0083] 图 4a 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 IL-6mRNA 水平变化的图; 图 4b 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 TNF- α mRNA 水平变化的图; 图 4c 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 IL-1 β mRNA 水平变化的图; 图 4d 是阐明通过本发明百部提取物的治疗 MMP12mRNA 水平变化的图。

[0084] 如图 4a 至 4d 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-1 β 和 MMP12, 而只用香烟烟雾处理的比较组 (CS) 显示 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MMP12 的 mRNA 水平的急剧增加, 而在暴露于香烟烟雾之前施用百部提取物 (ERSJM) 的实验组, 显示了香烟烟雾诱发的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MMP12mRNA 水平增加的抑制。

[0085] 从前述事项证实了本发明提供的百部提取物对由香烟烟雾所致的炎性肠疾病的发生具有抑制作用。

[0086] 实施例 2-3 : 乳酸杆菌总数的比较

[0087] 已知炎性肠疾病的发生可以减少肠内微生物的数量。就此而言, 检验了百部液体提取物对肠内乳酸杆菌数量的作用。

[0088] 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盲肠组织。将 1g 由此收集的盲肠组织和 9mL 生理盐水混合并进行物理粉碎。分别通过加入 10 体积的生理盐水溶液稀释粉碎的产物。将各个由此获得的 100 μ L 稀释溶液铺板于培养乳酸杆菌的固体培养基上 (MRS 琼脂平板), 于 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时, 对固体培养基上形成的乳酸杆菌菌落总数进行计数和比较 (图 5)。

[0089] 图 5 是阐明用百部提取物处理后乳酸杆菌数量变化的图。

[0090] 如图 5 所示, 未用香烟烟雾处理的对照组 (CON) 显示高数量的乳酸杆菌, 而仅用香烟烟雾处理的比较组 (CS) 显示了乳酸杆菌数量的迅速减少, 而在暴露于香烟烟雾之前施用百部提取物 (ERSJM) 的实验组显示了香烟烟雾诱发的乳酸杆菌数量减少的抑制。

[0091] 从前述事项证实了本发明提供的百部提取物对香烟烟雾所致的引起乳酸杆菌数量减少的炎性肠疾病的发生具有抑制作用。

[0092] 实施例 3-3 体重变化的比较

[0093] 已知患有炎性肠疾病的动物体重减轻。就此而言, 检验了百部液体提取物对炎性肠疾病体重变化方面的作用。

[0094] 即, 在测试起始日 (第 0 天) 用精密线纹尺 E06120 测量实施例 2-1 获得的对照组、比较组和实验组中的小鼠的体重, 此后每隔两天测量一次并对其进行比较 (图 6)。

[0095] 图 6 是阐明用百部提取物处理的小鼠体重变化的图。

[0096] 如图 6 所示,未用香烟烟雾处理的对照组 (CON) 显示维持高的体重,而仅用香烟烟雾处理并由此发展为炎性肠疾病的比较组 (CS) 显示它们的体重迅速下降,而在暴露于香烟烟雾之前施用了百部提取物 (ERSJM) 的实验组显示了对由香烟烟雾诱发的体重下降的抑制。

[0097] 从前述事项证实了本发明百部提取物能够抑制由香烟烟雾所致的炎性肠疾病。

[0098] 尽管出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。

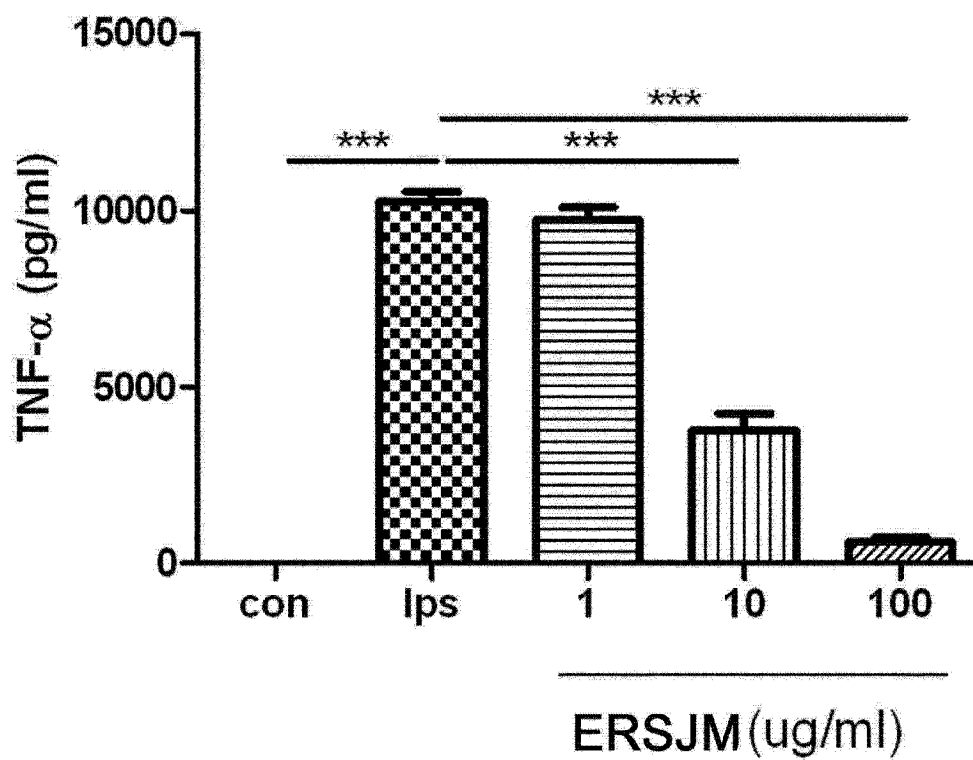


图 3a

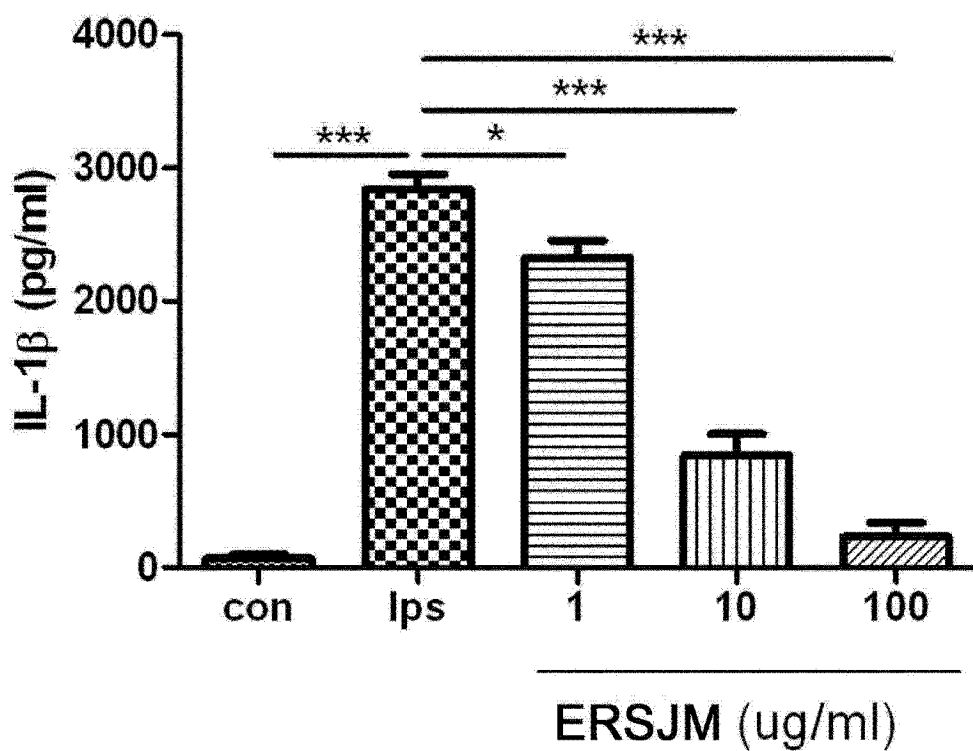


图 3b

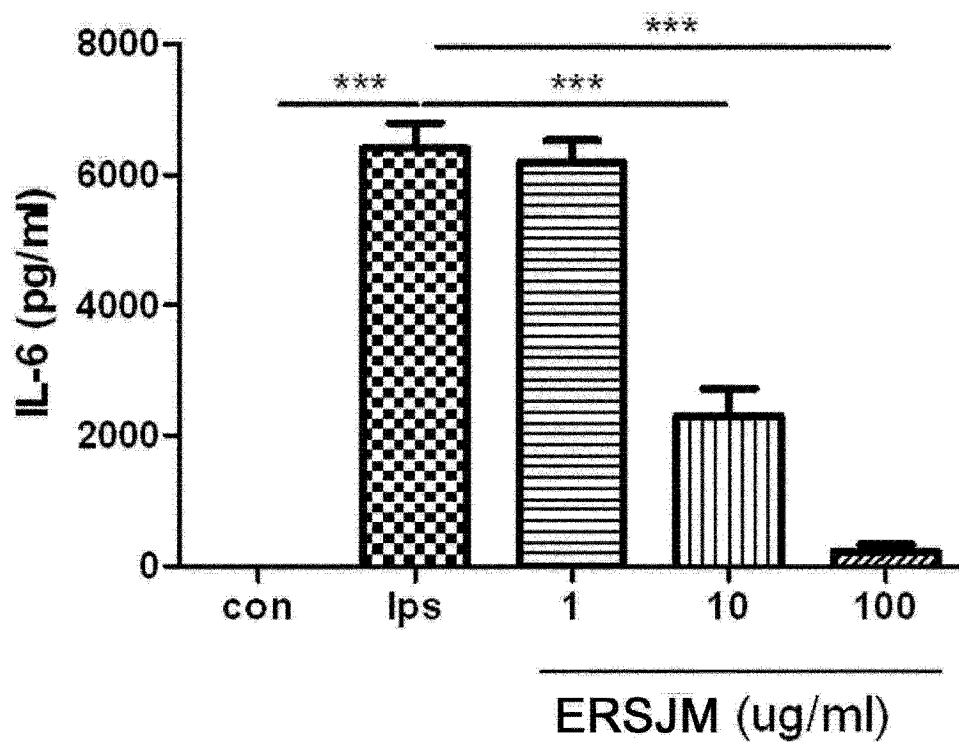


图 3c

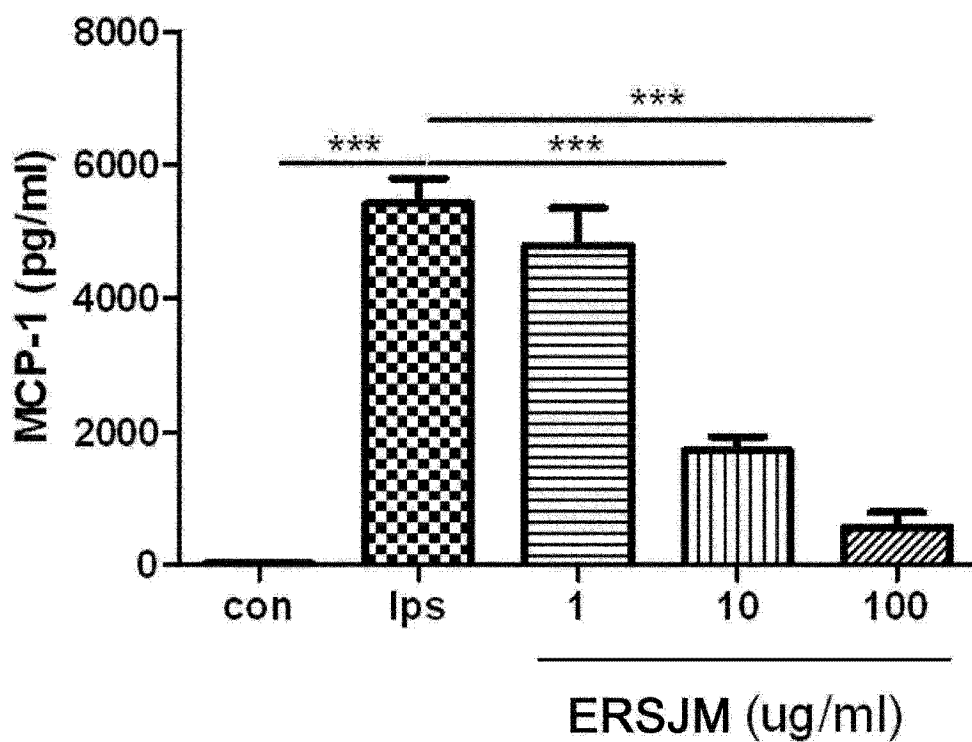


图 3d

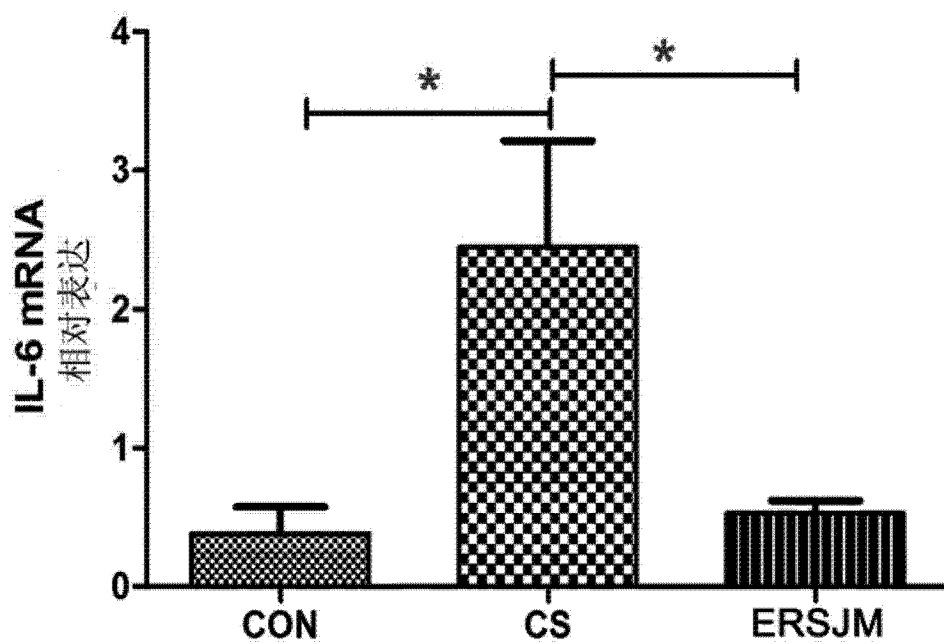


图 4a

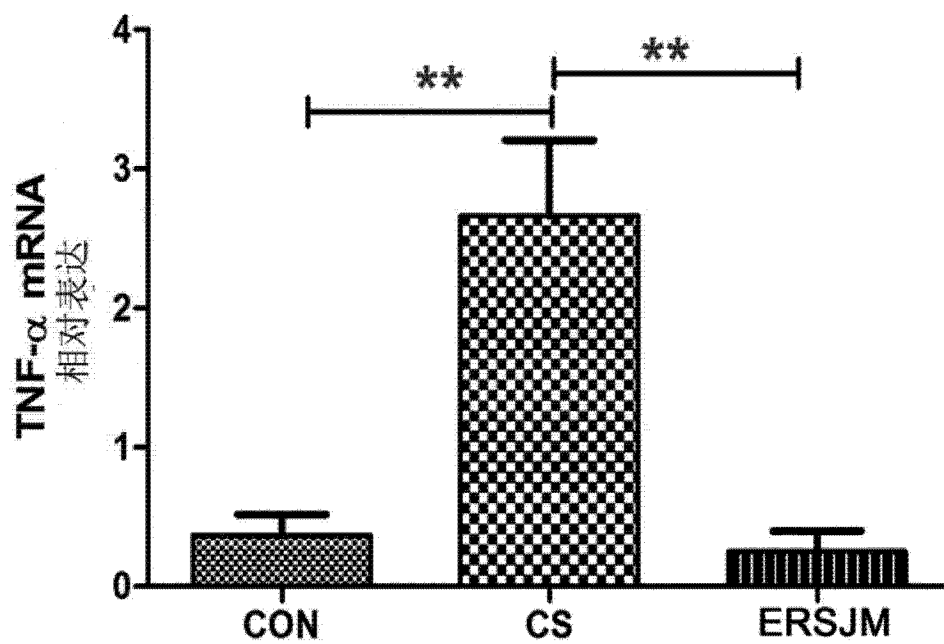


图 4b

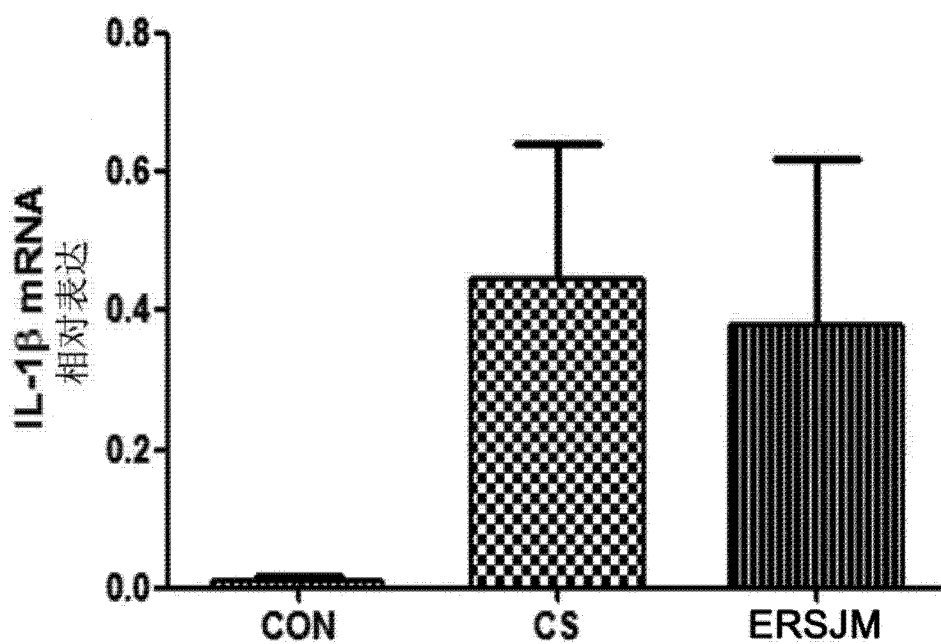


图 4c

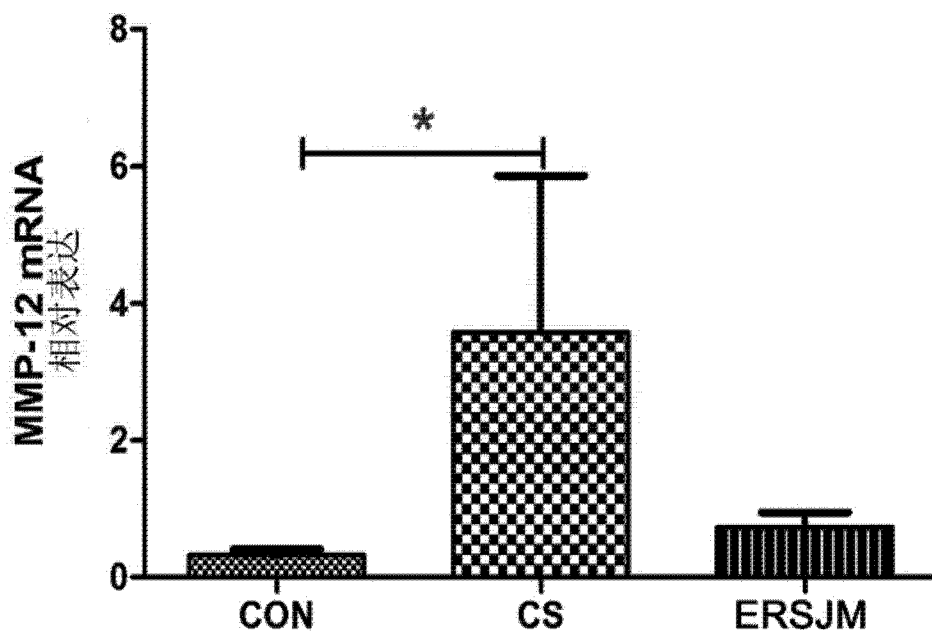


图 4d

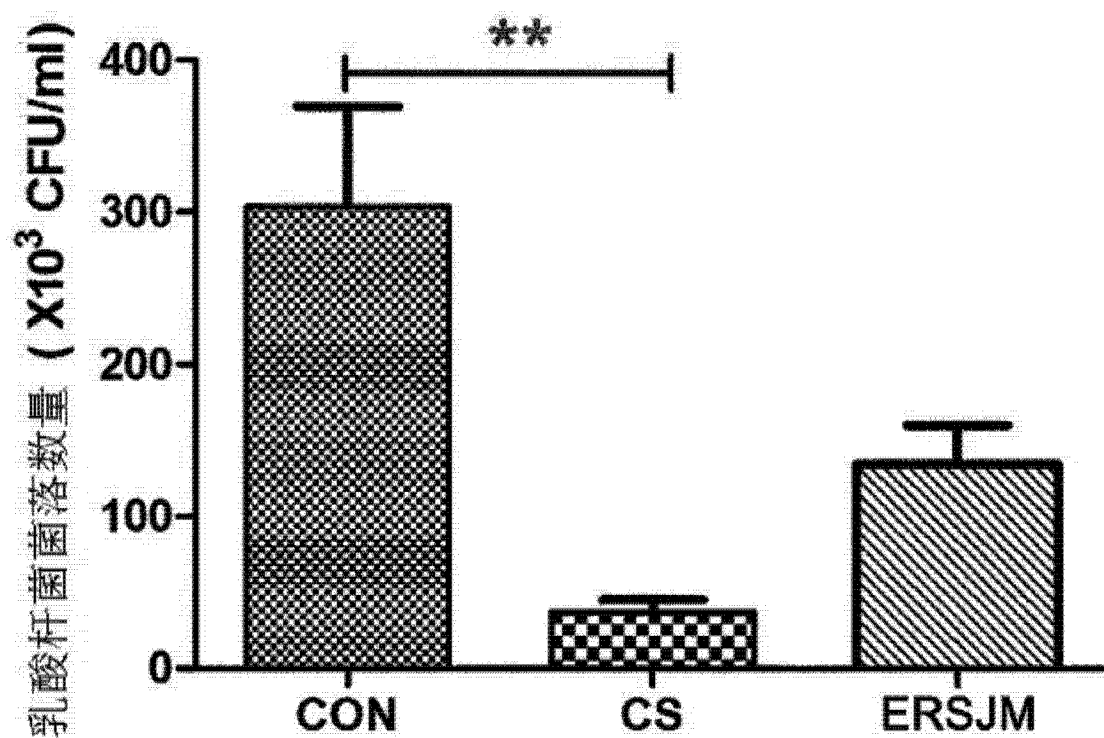


图 5

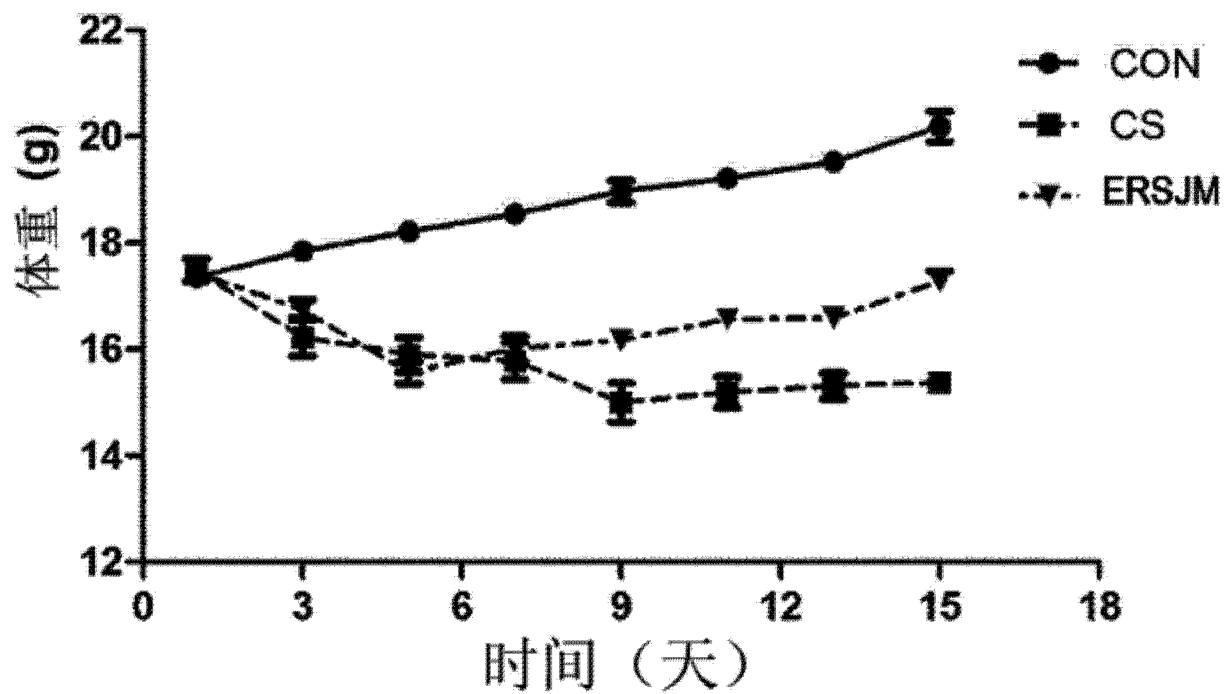


图 6