[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 1/00 (2006.01)
A61K 35/32 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98807088.X

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1288165C

[22] 申请日 1998.7.9 [21] 申请号 98807088.X
[30] 优先权
[32] 1997.7.11 [33] US [31] 60/052,233
[86] 国际申请 PCT/US1998/013591 1998.7.9
[87] 国际公布 WO1999/002548 英 1999.1.21
[85] 进入国家阶段日期 2000.1.11
[73] 专利权人 CV 技术公司
地址 加拿大艾伯塔
[72] 发明人 彼得·K·T·庞 杰奎琳·J·单 卡姆·W·丘
审查员 谢蓉

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司
代理人 樊卫民 杨青

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用于治疗与 PHF 过多或细胞内钙过多相关疾病的来自鲨软骨的制剂

[57] 摘要

已经发现鲨软骨提取物是甲状旁腺高血压因子(PHF)的拮抗剂。鉴于这一点，可用鲨软骨提取物来治疗与 PHF 活性过度有关的病症。这类疾病包括高血压和其它一些与细胞内钙增多有关的疾病。本文还公开了制备鲨软骨提取物的方法和给药该提取物的方法。

1. 一种具有抗甲状旁腺高血压因子活性的鲨软骨提取物，其中所述的鲨软骨提取物是由下列步骤制备的：

在 85-120℃对干净的、干燥的、粉状鲨软骨用水提取 2-4 小时，

将所得的悬浮液冷却至 40-60℃，

将冷却的悬浮液以 5200-5700rmp 离心，以将悬浮液分离成上清液 1 和沉淀，

将上清液 1 放置于 4-8℃的冷藏箱中，

于 95-120℃对上述沉淀用水再次提取 2-4 小时，

将所得的悬浮液冷却至 40-60℃，

将冷却的悬浮液以 5200-5700rpm 离心，以将悬浮液分离成上清液 2 和沉淀，

将上清液 1 和上清液 2 合并，以及

将合并的上清液喷雾干燥，以获得上述的鲨软骨提取物。

2. 根据权利要求 1 的提取物，其中所述的提取物含有 5-30%的蛋白质、15-80%的粘多糖和 1-20%的硫酸软骨素 C。

3. 权利要求 1 所述的鲨软骨提取物在制备治疗高血压的药物组合物中的应用。

4. 根据权利要求 3 的应用，其中所述的组合物产生的给用量为 0.1-20mg 鲨软骨提取物/kg 体重。

5. 权利要求 1 所述的鲨软骨提取物在制备治疗与甲状旁腺高血压因子过量有关的疾病的药物组合物中的应用。

6. 权利要求 1 所述的鲨软骨提取物在制备治疗与细胞内钙增多有关疾病的药物组合物中的应用。

7. 一种药物组合物，包含权利要求 1 所述的具有抗-甲状旁腺高血压因子活性的鲨软骨提取物和可药用载体。

8. 一种药物组合物，包含权利要求 1 所述的具有抗-甲状旁腺高血压因子活性的鲨软骨提取物、抗高血压的物质和药学上有效的载体。

9. 权利要求1所述的鲨软骨提取物在制备抵消甲状旁腺高血压因子活性的药物组合物中的应用。

10. 一种制备权利要求1所述的具有抗-甲状旁腺高血压因子活性的鲨软骨提取物的方法，包括如下步骤：

在 85-120℃对干净的、干燥的、粉状鲨软骨用水提取 2-4 小时，

将所得的悬浮液冷却至 40-60℃，

将冷却的悬浮液以 5200-5700rmp 离心，以将悬浮液分离成上清液 1 和沉淀，

将上清液 1 放置于 4-8℃的冷藏箱中，

于 95-120℃对上述沉淀用水再次提取 2-4 小时，

将所得的悬浮液冷却至 40-60℃，

将冷却的悬浮液以 5200-5700rpm 离心，以将悬浮液分离成上清液 2 和沉淀，

将上清液 1 和上清液 2 合并，以及

将合并的上清液喷雾干燥，以获得上述的鲨软骨提取物。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述的提取步骤是在 95℃下进行 2 小时。

12. 根据权利要求 10 的方法，其中在所述的离心步骤中使用沉降式离心机。

13. 根据权利要求 10 的方法，还包括将合并的上清液浓缩直至使固体含量达到 8-10%。

14. 权利要求 1 所述的鲨软骨提取物在制备抑制血管平滑肌细胞增殖的药物组合物中的应用。

用于治疗与 PHF 过多或细胞内钙过多相关疾病的来自鲨软骨的制剂

发明领域

本发明涉及来自鲨软骨的抗-甲状旁腺高血压因子（抗-PHF）。本发明的化合物可用于治疗高血压和其它一些与细胞内钙增多的疾病（如，非胰岛素依赖性糖尿病、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、癌症（包括乳腺癌、结肠癌、肾癌和白血病）、炎性肠疾病和哮喘）。

发明背景

高血压通常是指动脉收缩和/或舒张血压高于140/90mmHg的正常值水平。与高血压有关的疾病包括动脉粥样硬化、高血压性肾衰竭、中风、充血性心力衰竭和心肌梗塞。虽然人们已经找到了有效降低动脉血压的许多治疗方法，但是本质性高血压的病因仍然不十分清楚。遗传诱发导致高血压是被人们普遍接受的，但是许多已被发现对治疗高血压有效的各种药物和这些药物看起来是通过引发不同的药学反应来起作用这一事实，说明本质性高血压可能有不同的原发性病因。

许多研究已经提示，一种或多种循环因子在高血压的产生或维持方面可能起作用。[参见，Wright 等人，在自发性高血压大鼠的血液中发现的高血压物质，生命科学(Life Sci.)1984, 34:1521-1528; Dahl 等人，高血压的体液传递：来自异种共生的证据，循环研究(Circ. Res.)1969, 24/25(增刊 I): 21-23; Greenberg 等人，循环因子作为自发性高血压大鼠的静脉过度生长病因的证据，Am. J. Physiol. 1981, 241:H421-H430; Tobian 等人，患有盐高血压的 Dahl S 大鼠中的循环体液加压剂，临床科学(Clin. Sci.) 1979, 57:345s-347s; Zidek 等人，原发性高血压发病机理中的体液因子，Klin. Wochenschr. 1985, 63(增刊 II) D:94-96; Hirata 等人，在患有 Dahl 盐敏感性高血压的大鼠血清中的高血压产生因子，

高血压(Hypertension) 1984, 6:709-716]。例如，在异种共生和交叉循环试验中，通过使血压正常的动物的血液暴露于高血压动物的血液，可以诱导血压正常的动物的血压升高。对血压正常的 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠皮下注射来自自发性高血压大鼠(SHR)的红细胞-相关因子，可诱导 WKY 大鼠产生高血压，而且还可通过注射来自患有盐敏感性高血压的 Dahl 大鼠的血清，来诱导盐敏感性的血压正常的 Dahl 大鼠的血压升高。

还有一些有关患高血压大鼠和高血压病人中的循环因子的报道，所述循环因子使细胞内钙增多。[参见，Banos 等人，与本质性高血压患者的血小板对钙的吸收增加有关的两个因子，Clin. Exp. Hypertens. 1987, 9:1515-1530; Zidek 等人，来自高血压个体的血浆对人渗透性嗜中性白细胞中的钙运输的影响，《临术科学》，1988, 74:53-56; Linder 等人，患有本质性高血压的患者中的循环因子对正常血小板内胞内游离钙的影响，N. Eng. J. Med. 1987, 316: 509-513; Bruschi 等人，自发性高血压大鼠和本质性高血压病人的血小板内的胞浆游离钙的增多，《临床科学》 1985, 68:179-184; Wright 等人，具有高血压特性的自发性高血压大鼠红细胞提取物对主动脉组织的钙吸收的刺激，Can, J. Physiol. Pharmacol. 1986, 64:1515-1520]。既然血管的紧张受细胞内钙水平的影响，那么使血压升高的因子和使细胞内钙增多的因子间可能存在着关联。这方面已积累了一些证据，这些证据提示在某些形式的高血压中有钙调激素的参与[参见: L. M. Resnick, Am. J. Med. 82(增刊 IB), 16(1987)]。甲状旁腺素(PTH)是一种钙调激素。30%或更多的本质性高血压患者是一类其特征在于免疫反应性甲状旁腺素(ir-PTH)水平升高的高血压患者。[参见: Laragh 等人，Kidney Int. 34(增刊 35), S162 (1988)]。对于 SHR 大鼠，已有关于 PTH 水平升高的报道[参见: McCarron 等人，《高血压》, 3(增刊 1), 1162(1981)]，还已经观察到，甲状旁腺素过多的患者经常表现出高血压，其严重程度在大多数情况下可通过甲状旁腺切除术来减轻[参见: Hellstrom 等人, Brit. J. Urol. 30, 13 (1958)]。对于 SHR 大鼠也有有关甲状旁腺切除术类似结果的报道。

[参见: Schleiffer 等人, Jap. Circ. J. 45, 1272 (1981)]。各位研究人员已经提示，PTH 与本质性高血压的发生有关，虽然外源给药 PTH 引起哺乳动物和其它脊椎动物的血压下降[参见: Pang 等人, Gen. Comp. Endocrinol. 41, 135 (1980)]。PTH 的血管舒张作用还与该分子的一个特定区域有关，所述特定区域不同于产生血钙过多效果的区域[参见: Pang 等人, Endocrinology, 112, 284 (1983)]。还已表明，PTH 抑制钙进入血管平滑肌[参见: Pang 等人，《生命科学》42, 1395 (1988)]，PTH 抑制钙通过 L-型钙通过进入血管平滑肌[Wang 等人，FEBS，第 282 卷，第 2 期，331-334 页(1991)]。这一反论还得到了伴有 PTH 水平升高的高血压患者也表现出血清离子钙水平减低这一事实的支持[参见: Resnick 等人，New Engl. J. Med., 309, 888(1983); Hvarfner 等人，Acta Med. Scand. 219, 461 (1986)]。可以预计，如果 PTH 水平原发性地升高了的话，血清离子钙水平将升高。

SHR 大鼠血液中存在循环因子得到了发表在 Am. J. Hypertens., 2, 26-31 (1989)上的研究报告的证实。这些研究表明，当将来自 SHR 大鼠的血浆注射进血压正常的大鼠(无论是通过输注还是通过丸剂注射)时，WKY 和 SD 大鼠的血压升高。另外，大鼠尾动脉切片还表明，随着在缓冲介质中的 SHR 血浆浓度的增高，大鼠尾动脉对 ^{45}Ca 的体外吸收还以剂量依赖的方式增高。这些试验的结果清楚地表明，血压的升高和细胞对钙吸收的增加是剂量依赖的方式，其幅度取决于在系统中存在的和该系统所能获得的 SHR 血浆的量。令人不解的是，这两个事件的发作被延迟了，而且是渐进式的，但已观察到已知的内源加压剂如去甲肾上腺素、血管紧张素 II 和后叶加压素在给药后很快地就使血压升高。已知的内源加压剂在给药后约 1-2 分钟就开始使血压升高和使细胞对钙的吸收增加，而甲状旁腺高血压因子在发挥这种作用前却有 20-30 分钟的延迟。在这些研究中观察到的另一个结果是当停止输注 SHR 血浆而代之以来自血压正常的大鼠的血浆时，血压很快地下降到基础水平。所观察到的下降排除了简单的体积效应。在一相关试验中，将来自高血压病人的透析过的血浆输注到血压正常的 SD 大鼠中，

结果显示出 SD 大鼠产生了高血压。来自那些病人的血浆也使大鼠尾动脉的体外钙吸收增加。来自血压正常的患者的经透析过的血浆没有使血压明显升高。

循环因子的来源尚不清楚，但高血压大鼠中 PTH 水平升高这一尚未被证实的报道提示我们可将甲状旁腺做为研究的目标。发现将 SHR 大鼠的甲状旁腺切除后使血压下降，并且来自其甲状旁腺已被切除的 SHR 大鼠的血浆并不能引起血压正常的大鼠的血压升高。相反，将 SHR 大鼠的甲状旁腺移植到血压正常的 Sprague-Dawley (SD)大鼠中，导致血压升高，并在血浆中出现了循环因子，如同将分离的血浆输注到其它血压正常的大鼠中显示的结果一样。[Pang 和 Lewanczuk, Amer. J. Hypertens. 2, 898 (1989)]。

在这些研究的基础上，人们确定了甲状旁腺就是循环因子的来源，人们建议用“甲状旁腺高血压因子”或 PHF 这一名词来表述引起血压升高的物质。

已在 SHR 大鼠和许多患有本质性高血压的病人中进行了循环因子的分离和纯化（所述循环因子来源于甲状旁腺），循环因子的分离和纯化也是 1990 年 11 月 21 日递交的相关专利申请 No. 603745 的主题，该申请又是于 1989 年 3 月 22 日提交的现已放弃的专利申请 No. 327,450 的部分后续申请。这些相关专利申请公开的内容，包括有关甲状旁腺高血压因子的纯化的教导，均在此引入本文做参考。

如在上述相关专利申请中所描述的，已表明 PHF 能调节胞外钙吸收，并可被饮食中的钙水平增高所抑制。PHF 已被分离出来，并且也有人描述了用抗 PHF 的抗体来筛选 PHF 的方法。PHF 的分子量大约为 2700 道尔吨，并且在对血压正常的大鼠给药 PHF 后，该 PHF 具有延迟血压升高的特性，血压的升高在时间上与由血管平滑肌对胞外钙的吸收增加有关。生物活检数据已经表明，来源于人和大鼠的该因子基

本上是类似的。

血管的过度生长与许多心血管疾病（包括本质性高血压）的病理生理学有关。血管平滑肌增生可能是血管过度生长以及血管紧张增加的原因。据报道，以不依赖于细胞内钙调节的机制，PHF 促使血管平滑肌细胞增殖(Shan 等人，国际高血压协会第 17 届科学大会摘要，阿姆斯特丹，1998 年 6 月 7-11 日)。

本发明的发明者已发现了 PHF 的拮抗剂。发明者们已出人意料地发现，鲨软骨可起 PHF 拮抗剂的作用，将引起血压下降并影响细胞内钙的调节。在本领域中已知鲨软骨中含有抑制肿瘤生成的物质(Lee 等人，科学，第 221 卷，1185-1187 页(1983))，并含有抗炎症成分(Schinitsky，美国专利 4,473,551)。本发明的发明者还发现，鲨软骨提取物抑制由 PHF 诱导的 SHR 大鼠或 WKY 大鼠中的 VSMC 增生。鉴于这一点，预期本发明的鲨软骨提取物可用于治疗高血压和其它一些与细胞内钙增多有关的疾病。

本发明的详细描述

本发明的发明者们已经发现从鲨软骨制备的提取物使血压下降。据信该鲨软骨提取物中含有甲状旁腺高血压因子拮抗剂，后者与甲状旁腺高血压因子位点结合但不激活甲状旁腺高血压因子的活性。

本发明的鲨软骨提取物可从市售的鲨软骨通过进一步的纯化而获得，首先将市售鲨软骨洗净、干燥并磨成细粉末。在 4-120℃（优选 95℃）下将磨细、干燥的鲨软骨粉先用水提取 2-4 小时（优选 2 小时）。溶质与溶剂的比例为 1:8-1:12。然后将所得的悬浮液冷却至 40-60℃(优选 50℃）并以约 5200-5700rpm 离心，以将悬浮液分离成上清液（#1）和沉淀。上清液（#1）中含有约 8%的固体，将该上清液保存在 4-8℃的冷藏箱中，同时对沉淀部分进行第二次提取。在第二次提取中，用水对沉淀于 4-120℃（优选 95℃）提取 2-4 小时（优选 2 小时）。溶质

与溶剂的比例为 1:4-1:6（以原料计）。然后将所得的悬液冷却至 40-60℃（优选 50℃），并在约 5200-5700rpm 下离心，以将之分离成上清液和沉淀部分。将该上清液与第一次提取得到的上清液合并，并对之进行喷雾干燥，以获得本发明经纯化的鲨软骨提取物。所述的提取步骤是在 95℃下进行 2 小时，其中在所述的离心步骤中使用沉降式离心机。该方法还包括将合并的上清液浓缩直至使固体含量达到 8-10%。

本发明的提取物含有 5-30%的蛋白质、15-80%的粘多糖和 1-20%的硫酸软骨素 C。在包含鲨软骨提取物的治疗高血压药物组合物中，所述组合物产生的给用量为 0.1-20mg 鲨软骨提取物/kg 体重。

可将本发明的提取物通过胃肠外、局部、口服或直肠途径或通过吸入方式而给药至需要此治疗的温血动物中。通过将提取物与常规的载体、赋形剂、粘合剂、防腐剂、稳定剂、着色剂等制药实践所接受的物质一起复合，可将提取物配制成胃肠外或口服的剂型。

对于胃肠外给药，每天可进行 1-10ml 的静脉内、肌肉内或皮下注射 1-4 次。所用注射液可含有溶解在等渗无菌水溶液中的本发明鲨软骨提取物，或是含有或不含防腐剂如苯酚或加溶剂如乙二胺四乙酸(EDTA)的悬浮液。那些可以使用的可药用载体和溶剂是水、Ringer's 溶液和等渗 NaCl 溶液。此外，无菌的固定油类通常被用作溶剂或悬浮介质。发现合成的甘油单酯、甘油二酯、脂肪酸(如油酸)可在制备可注射制剂时用作固定油类。

对于直肠给药，通过与适当的无刺激性赋形剂如可可脂或聚乙二醇混合，可将提取物配制成栓剂的形式。

对于局部应用，可将提取物配制成油膏、凝胶、溶液、悬浮液或皮肤粘贴剂。

在粉状气雾剂中的提取物可用Fisons公司(Bedford, Massachusetts)产的 Spinhaler turbo-吸入器给药，比例为约 0.1-50mg/胶囊，对于一般的人来讲，每天给药 1-8 个胶囊。在液体气雾剂中的提取物可以约 100-1000mg/puff 的比例给药，或用标准体积的推进剂活化释放。液体气雾剂可以每天 1-8 个 puff 的量给药，并可根据被治疗的病症的严重性、患者的体重、气雾剂中颗粒尺寸的分布等来改变剂量。氟化烃或异丁烷可用作液体气雾剂的推进剂。

依赖于具体化合物的活性、被治疗的个体的年龄、体重、性别和病症、病症的类型和严重程度、给药的频率和途径，给药的日剂量为约 0.01-200mg/kg 体重（优选 1-10mg/kg 体重）。正如人们所熟知的，可与载体材料混合的制备单剂的活性成分的量依被治疗的宿主和具体给药方式的不同而不同。

本发明的鲨软骨提取物也可和已知的治疗所述病症有效的药物联合。例如，对于治疗高血压，可将鲨软骨提取物与已知的抗高血压药如钙通道封闭剂（例如，戊脉安、硝苯吡啶和硫氮䓬酮）联合。

除了对本质性高血压的治疗外，本发明的提取物也可用于治疗其它疾病（这些疾病包括有高血压症状，但高血压不必是其主要症状）。例如，非胰岛素依赖性糖尿病经常伴发高血压。反过来，高血压患者也经常表现出糖耐受损害。因此，预期鲨软骨提取物可用于治疗高血压和与细胞内钙水平升高有关的其它疾病。

本发明包括鲨软骨提取物的活性成分的分离、鉴定和合成制备。

用下列实施说明本发明，但并不意味着本发明受这些实施例的限制。在不背离本发明范围的前提下，对本领域的普通技术人员而言可进行各种修改。

实施例 1

鲨软骨的提取

购买干净、干燥、粉状的鲨软骨。先用水在 85-90℃下对所购得的干粉状鲨软骨提取 2 小时，溶质与溶剂的比例为 1:8。然后将所得的悬浮液冷却至 50℃，并以 5200rpm(3245g)离心，以将悬浮液分离成上清液和沉淀。将含有约 8%固体的上清液放置在 4℃的冷藏箱中，同时对所得沉淀进行第二次提取。在第二次提取中，用水对沉淀于 95℃提取 3 小时。以原料计，溶质与溶剂的比例为 1:4.8。接着，将所得悬浮液冷却至 50℃并于 5200rpm(3245g)下离心，将悬浮液分离成上清液和沉淀。将含有约 3%固体的此次上清液与第一次提取所得的上清液合并，并进行喷雾干燥，以获得本发明的经纯化的鲨软骨提取物。

实施例 2

对 SHR 和 SD 大鼠注射鲨软骨提取物浓缩药团(1mg/kg)的效果

对 6 只自发性高血压大鼠(SHR)和 3 只 Sprague-Dawley(SD)大鼠静脉注射被命名为 DF I-40 的鲨软骨提取物浓缩药团。对 5 只自发性高血压大鼠(SHR)和 3 只 Sprague-Dawley 大鼠静脉注射被命名为 DF II-40 的鲨软骨提取物浓缩药团。该鲨软骨提取物的给药剂量为 40mg/kg 体重。注射后 90 分钟测量血压，如图 1 所示，鲨软骨提取物对 SD 大鼠无影响，但使 SHR 大鼠的血压下降。

实施例 3

以管饲法施用鲨软骨提取物对 SHR 和 SD 大鼠的影响

对三组 SHR 以管饲法饲喂被命名为 DF II-53 的三个不同剂量的鲨软骨提取物(10、20 和 40mg/kg)。11 只大鼠给药 10mg/kg 体重的鲨软骨提取物，4 只大鼠给药 20mg/ml 体重的鲨软骨提取物，4 只大鼠给药 40mg/kg 体重的鲨软骨提取物。90 分钟后测量血压。如图 2、2a 和 2b 所示，所有的大鼠均表现出血压降低，而且是剂量相关性的。在饲喂了较高剂量的大鼠中(20-40mg/kg 体重)，血压下降的速率较高，其最大下降在约 50~60 分钟时出现（图 2a）。在 50~60 分钟后，血压出现

波动，这可能是由于大鼠的血压调节机制所致。

实施例 4

在有或没有鲨软骨提取物存在下，PHF 对 SD 大鼠血压的影响

对 7 只 SD 大鼠通过静脉内药团注射而给药 1ml 当量的 PHF。对 6 只 SD 大鼠在经静脉内药团注射给药 1ml 当量的 PHF 后 10 分钟，再给药 40mg/kg 体重的鲨软骨提取物(DF II-53)。注射完后 90 分钟时测量血压，如图 3 所示，PHF 产生了一延迟的血压升高，而鲨软骨提取物抵消了此反应。

实施例 5

在有或没有鲨软骨提取物存在下，PHF 对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响。

将雄性 West Kyoto (WKY)大鼠和自发性高血压大鼠(SHR)(100-200g 体重)的尾动脉解剖出来并浸入冷的不含 Ca 和 Mg 的 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)(Gibco, Grand Island, NY)中。将尾动脉用 HBSS 酶溶液 I 和 II 相继消化两次。每次消化持续 1 小时。HBSS 酶溶液 I 含有 $CaCl_2$ (0.2mM)、胶原酶/分散酶(1.5mg/ml) (Boehringer Mannheim GmbH, West Germany)、弹性蛋白酶(I 型，0.5mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、胰蛋白酶抑制剂(I 型, 1mg/ml) (Sigma Chemical Co.)和牛血清白蛋白(BSA)(不含脂肪酸, 2mg/ml) (Sigma Chemical Co.)。HBSS 酶溶液 II 含有胶原酶(II 型, 1mg/ml)(Sigma Chemical Co.)、胰蛋白酶抑制剂(0.3mg/ml)和 BSA(2mg/ml)。然后将细胞悬浮液接种在装有 DMEM 培养基的 96 孔平底组织培养板上(所述 DMEM 中补加有 10%的 FCS)，并在 37℃、于 5% CO_2 的湿润空气中培养 36 小时，以使细胞附着在培养板的底部。将培养基更换为含有 0.4% FCS 的 DMEM，以使细胞静止 2-4 天。这一步骤使细胞均处在 G_0-G_1 交界期。将 PHF 和鲨软骨提取物溶解在含有 10% FCS 的 DMEM 中。将 PHF 单独地或与鲨软骨提取物一起加入到静止期的细胞中。温育 36 小时后，将细胞用 ^3H-胸腺

嘧啶(0.2/孔)脉冲标记，并继续温育 24 小时。然后弃去培养基，用 HBSS 将细胞洗涤两次，接着与 0.1%胰蛋白酶于室温下温育 15-30 分钟。然后用细胞收获器将细胞收集在滤纸上。用液体闪烁计数器测定掺入到细胞中的放射活性的量。如图 4 所示，PHF 刺激 WKY 大鼠中的 VSMC 的细胞增殖。图 5 表明，PHF 对 WKY 大鼠的 VSMC 的刺激效果可被鲨软骨提取物抑制。图 6 表明，鲨软骨提取物抑制 SHR 大鼠的 VSMC 增殖。

实施例 6 鲨软骨提取物的化学组成

（1）蛋白含量的测定

采用 BCA 法来确定总蛋白含量。从 PIRRCE 购买 BCA 蛋白测定试剂。采用 BCA 蛋白测定试剂盒提供的 BSA（牛血清蛋白）标准溶液来绘制已知浓度的标准蛋白的标准曲线。将 24 个玻璃管排成三排七列，用于装标准样品，将另外四管用于分光光度计的校正。向第一排的各管中分别加入 95、90、80、70、60、50、40 和 30μl 的 0.9%的 NaCl 溶液。对于第二排和第三排的各管重复相同的步骤。向含有 0.9% NaCl 的第一排各管中分别加入 5、10、20、30、40、50、60 和 70μl 的标准蛋白（由试剂盒提供，其浓度为 2mg/ml）。对第二排和第三排重复该相同的步骤。然后向各管中加入 2 毫升的工作试剂，后者是 50 份的试剂 A 和 1 份的试剂 B 的混合物。将所有的样品充分混合，并于 37℃温育 30 分钟。通过用分光光度计（PU 8620UV/VIS/NIR 型，Philips）在 562nm 处测光吸收，来确定蛋白质的量。计算各标准浓度的平均值，并用 Analysis of the Regression Line No.5 （药学计算系统-4.2A 版）来绘制标准曲线。用该标准曲线来确定各未知样品的蛋白质浓度。

用双蒸（DD）水来制备鲨软骨提取物的 1%的溶液。用标准曲线来计算样品的蛋白质浓度（mg/ml），并按照下面的计算公式算出鲨软骨蛋白的百分含量：

$$\text{蛋白质\%(w/w)} = \frac{\text{样品蛋白浓度(mg/ml)} \times \text{稀释因子(2.5)}}{\text{样品浓度(10mg/ml)} \times 100}$$

为获得标准曲线和鲨软骨样品的精确数据，构建标准曲线的步骤和测定鲨软骨提取物蛋白含量的步骤同时进行，将工作试剂最后加入标准蛋白样品和鲨软骨样品的各管中。

在总数为 16 批次的鲨软骨提取物中，蛋白含量为 15.11(2.79%)。

（2）粘多糖的测定

采用对 P.Whiteman (Biochem. J. 131:351-357, 1973)和 E. Gold (Analytical Biochemistry 99:183-188, 1979)的方法加以调整后的方法。从 Sigma Chemical. Co. 购买标准样品硫酸软骨素 C，编号为 No.C-4384, Lot No. 21H0103。将 10mg 硫酸软骨素 C 或鲨软骨提取物溶解在 50ml DD 水中，以此制备标准或样品。将 20mg Aleian Blue 8GX 溶解在 20ml 缓冲液(在 500ml 水中含有 5.07g $MgCl_2$ 和 3.4g 乙酸钠)和 0.2ml 乙酸中，以此来制备反应试剂。将在 1 ml 中含有 40-200μg 鲨软骨提取物的一系列样品分别加入 50ml 塑料管中。向这些管中加入 1ml 的反应试剂。将混合物在室温搅拌下平衡 2 小时。加入 20ml 95℃的乙醇，然后离心。倾去上清液后，向沉淀中加 3ml 0.2M 的 $CaCl_2$。通过测量沉淀的 $CaCl_2$ 溶液在 620nm 处的光吸收来确定粘多糖的含量。

在总共 6 个批次的鲨软骨提取物中，粘多糖含量为 50.33(2.25%)。

（3）软骨素 C 的分离和确定

采用对 L. Roden 等人(酶学方法(Methods in Enzymology)(1972)，第 28 期，碳水化合物复合体，B 部分，由 V. Ginsburg 编辑)的方法加以调整后的方法。从 Sigma Chemical Co.购买 Amberlite IR-120^+，其编号为 IR-120^+。通过将 1.2 升的 DD 水加入 62.5 克的乙酸钙中，再用 35.5ml 冰乙酸调节 pH 至 4.5，以此来制备乙酸钙缓冲液。将 2 克的鲨软骨提取物加入装在 2 升玻璃烧瓶中的 400ml 乙酸钙缓冲液中，将样品溶液用 37℃的水浴加热 20 分钟，然后冷却至室温。于室温向样品溶

液中极慢地加入乙醇（100%, 116.25ml），加乙醇的同时对溶液进行剧烈搅拌。将烧瓶置于 4℃浴中 3 小时，然后以 11000rpm(19000g)于 4℃离心 15 分钟，并将沉淀溶解在 DD 水中，并冻干。使上清液升温至室温，并在剧烈搅拌下向其中慢慢加入 80ml(100%)乙醇。将烧瓶再次置于 4℃浴中过夜，同时缓慢搅拌。将溶液于 4℃离心(11000rpm)离心 15 分钟。将第二次的沉淀溶解在 DD 水中并冻干。将上清液升温至室温并在剧烈搅拌下缓慢加入 100ml 乙醇。再次将烧瓶放入 4℃浴中过夜，同时进行缓缓地搅拌。然后在 11000rpm 离心 15 分钟。向第三次沉淀中加入 DD 水 125ml，并上样到 Amberlite IR-120^{+}(Na^{+}型)柱(2.5×16cm，约 60g 的 Amberlite IR-120^{+})上。用 75ml 的 DD 水洗涤该柱。在加入 1.168g NaCl 使溶液为 0.1M 后，在剧烈搅拌下用 3 体积(600ml)的无水乙醇洗脱。再次，将烧瓶置于 4℃浴中过夜，然后以 11000rpm 在 4℃离心 15 分钟，将最后一次的沉淀溶解在 DD 水中，并冻干。最后一次沉淀的重量就代表硫酸软骨素 C 的量。

在 2 批次的鲨软骨提取物中，硫酸软骨素 C 的含量为 5.9(1.98%)。

附图简述

图 1 表示给 SHR 和 SD 大鼠静脉注射鲨软骨提取物浓缩药团后的结果。如图 1 所示，鲨软骨提取物对 SD 大鼠没有产生效果，但使 SHR 大鼠的血压下降了。

图 2 表示以管饲法给 SHR 大鼠饲喂鲨软骨提取物后的结果。如图 2 所示，鲨软骨提取物使所有大鼠的血压下降。

图 2a 和 2b 表示血压以剂量相关的方式下降并在约 50-60 分钟时下降到最低值。

图 3 表示 PHF 延迟血压的升高，并且鲨软骨提取物能抵消这一反应。

图 4 显示 PHF 以剂量依赖的方式刺激 WKY 大鼠的 VSMC 的增殖。在 0.625×10^{-3}、1.25×10^{-3} 和 2.5×10^{-3} 吸收单位的剂量下，PHF 使细胞增殖分别增加了 120(8.5%, $P<0.05$, n=16)、137.91(12%, $P<0.01$, n=16)

和 181.9(14.3%, P<0.05, n=16)。

图 5 表示在鲨软骨提取物存在下，PHF 对 WKY 大鼠的 VSMC 增殖的作用。在 50g/ml 的剂量下，鲨软骨提取物明显抑制由 PHF 诱导的 VSMC 增殖。

图 6 表示鲨软骨提取物对 SHR 大鼠的 VSMC 的作用。在 5、50 和 500g/ml 的剂量下，鲨软骨提取物以剂量依赖的方式抑制 VSMC 增殖。

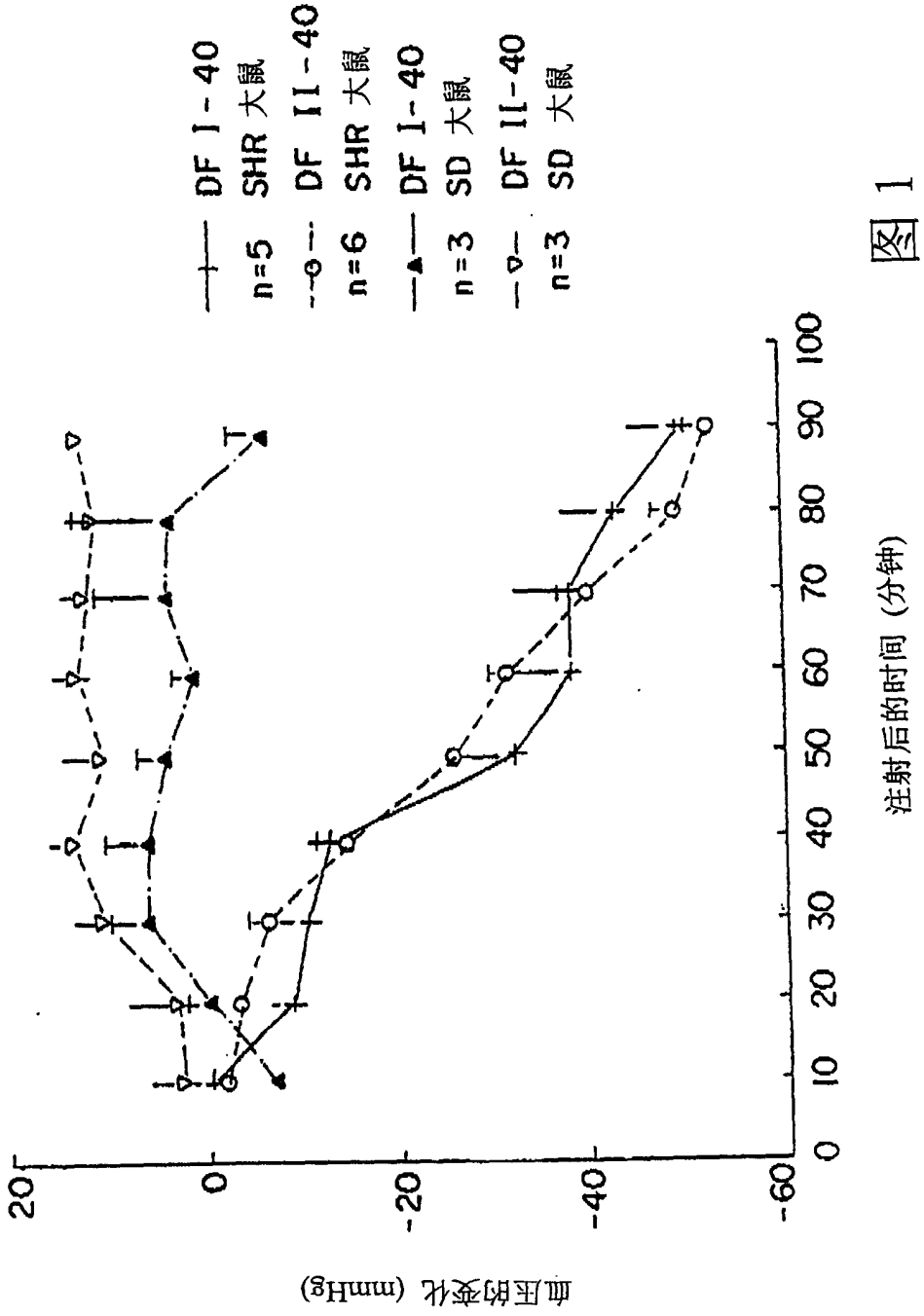

DF I-40
n=5 SHR 大鼠
DF II-40
n=6 SHR 大鼠
DF I-40
n=3 SD 大鼠
DF II-40
n=3 SD 大鼠
20
0
-20
-40
-60
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
注射后的时间 (分钟)
血压的变化 (mmHg)

图 1

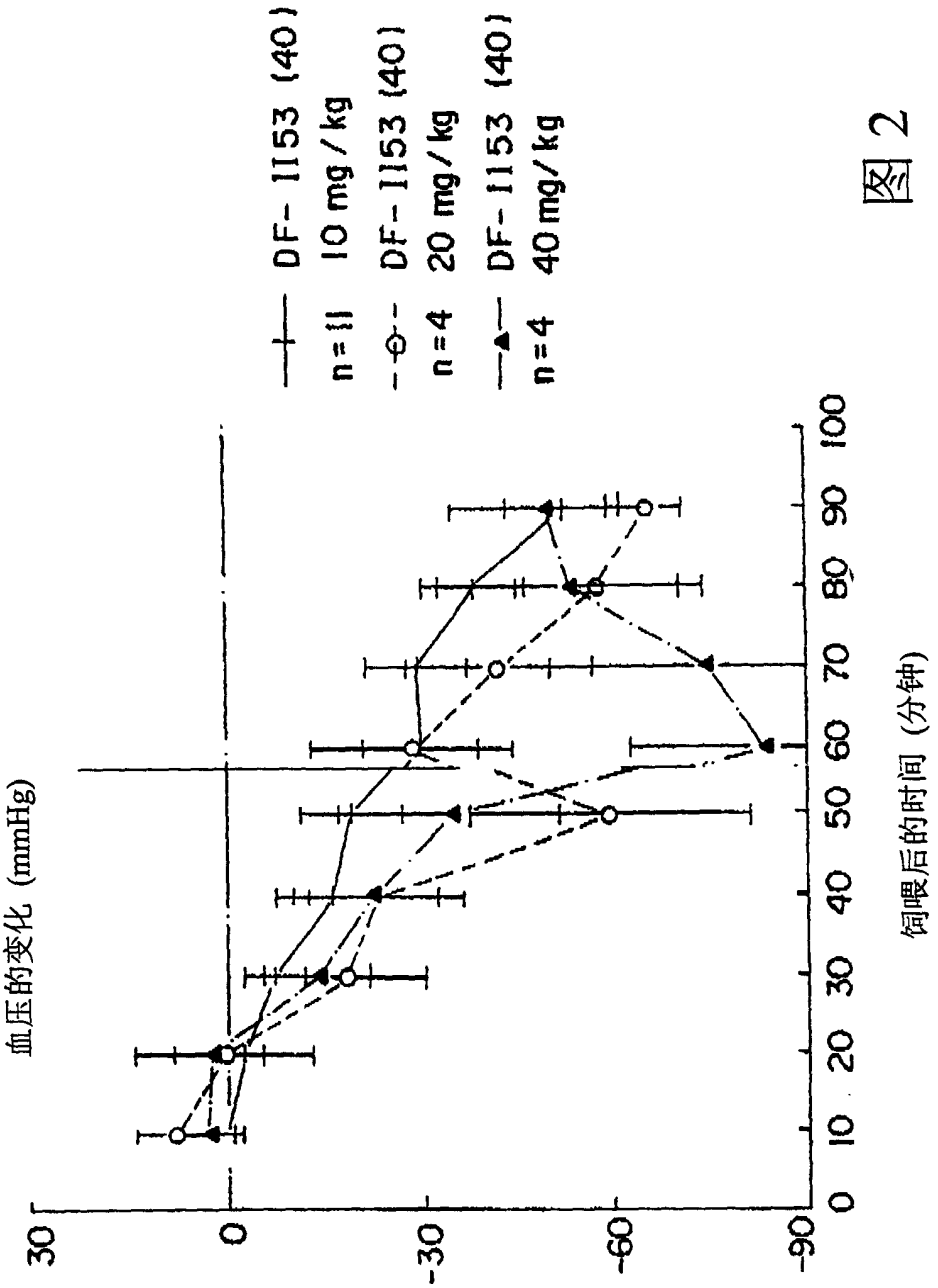

DF-1153 (40)
n=11 10 mg/kg
DF-1153 (40)
n=4 20 mg/kg
DF-1153 (40)
n=4 40 mg/kg
血压的变化 (mmHg)
30
0
-30
-60
-90
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
饲喂后的时间 (分钟)

图 2

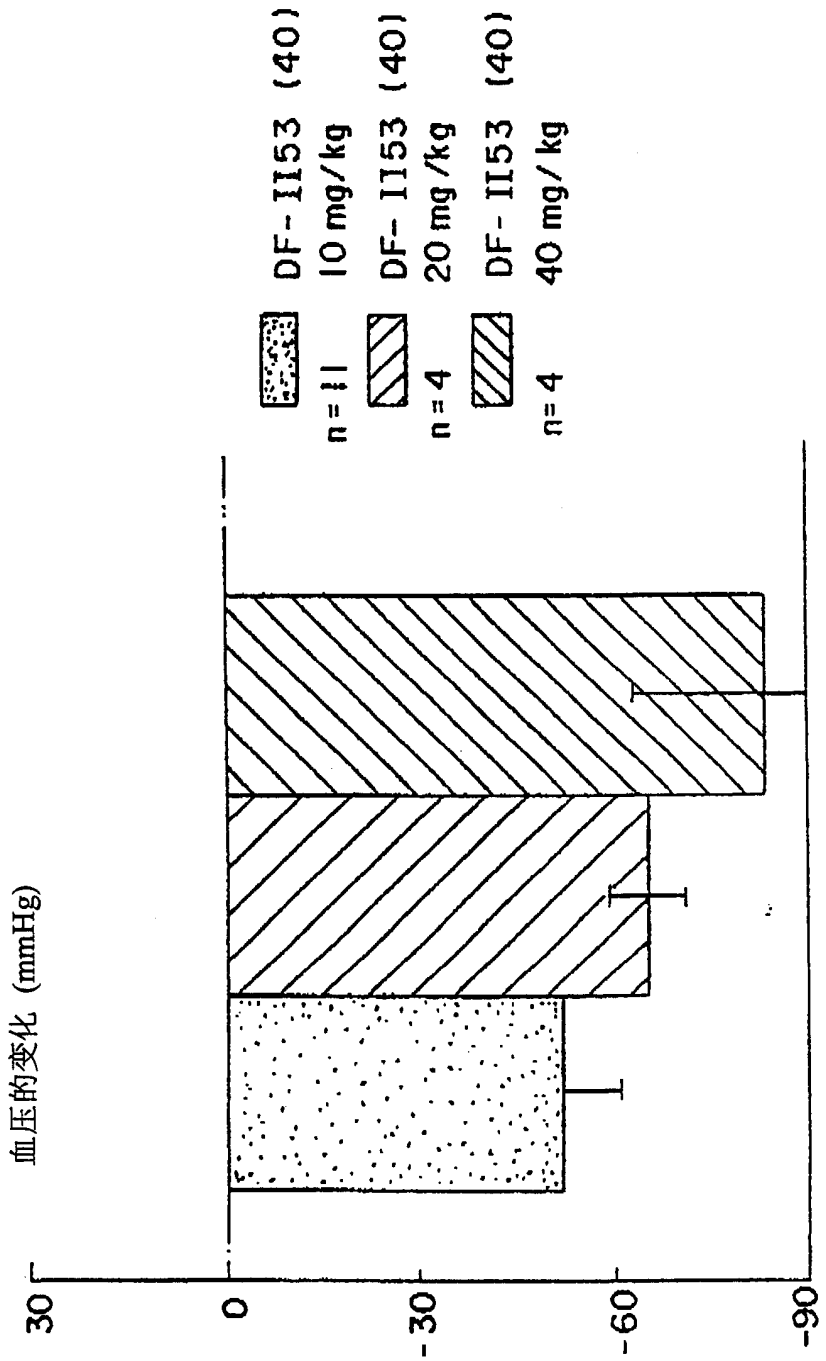

DF-II53 (40)
10 mg/kg
n=11
DF-II53 (40)
20 mg/kg
n=4
DF-II53 (40)
40 mg/kg
n=4
血压的变化 (mmHg)
30
0
-30
-60
-90
90
90
60
饲喂后的时间 (分钟)

图 2a

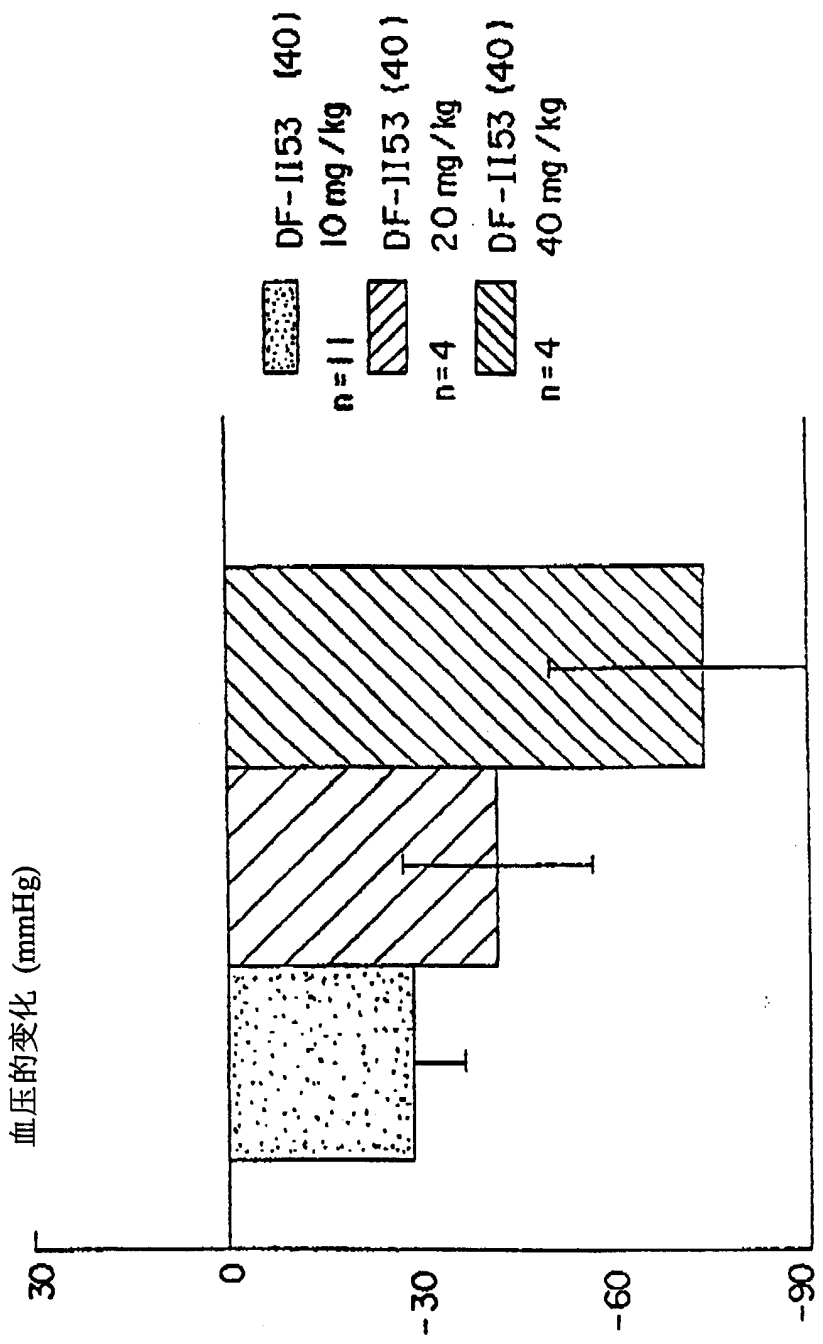

DF-1153 (40)
10 mg/kg
n=11
DF-1153 (40)
20 mg/kg
n=4
DF-1153 (40)
40 mg/kg
n=4
血压的变化 (mmHg)
30
0
-30
-60
-90
70
饲喂后的时间 (分钟)

图 2b

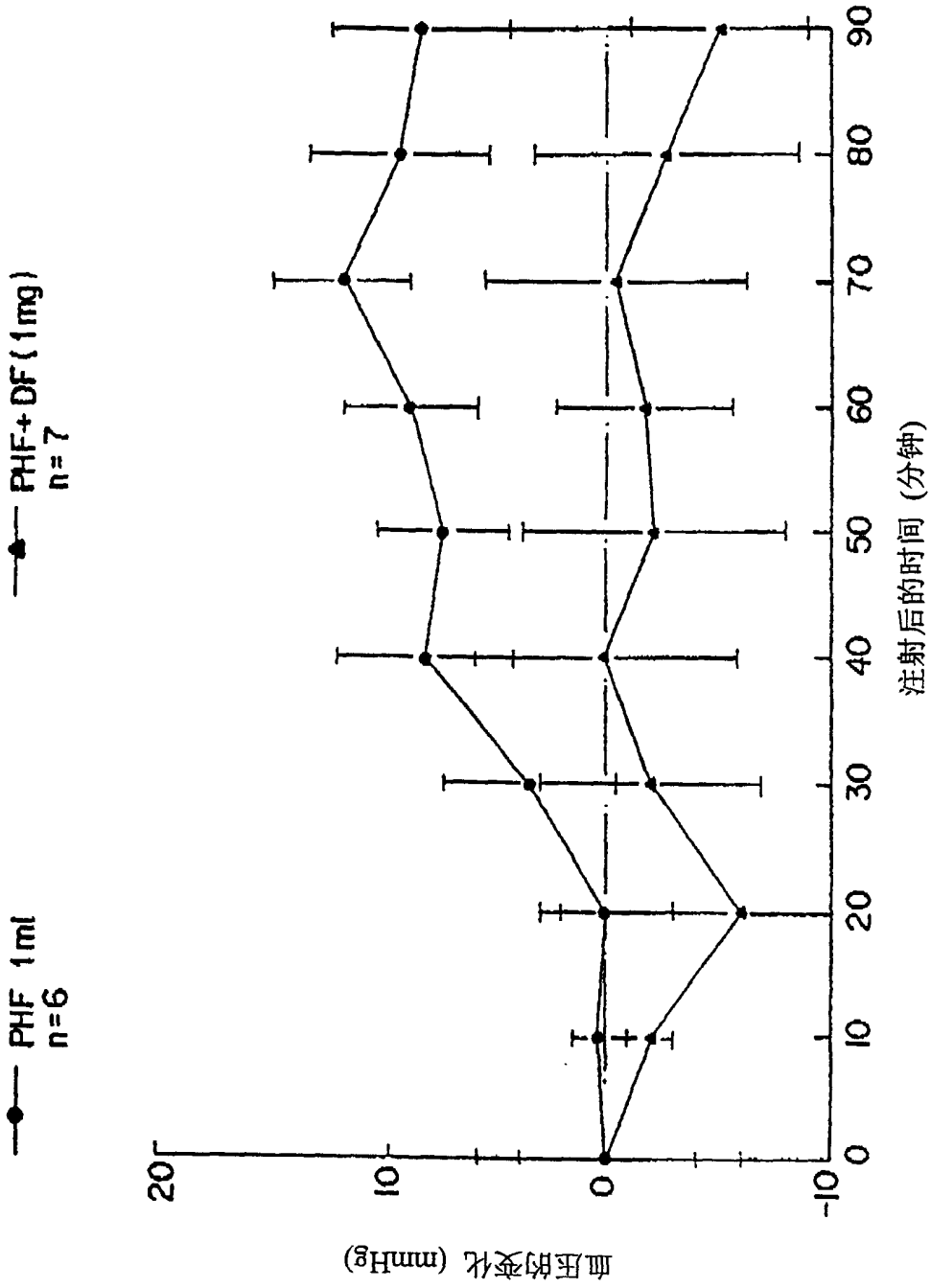

PHF 1ml
n=6
PHF+DF(1mg)
n=7
血压的变化 (mmHg)
20
10
0
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
注射后的时间 (分钟)

图 3

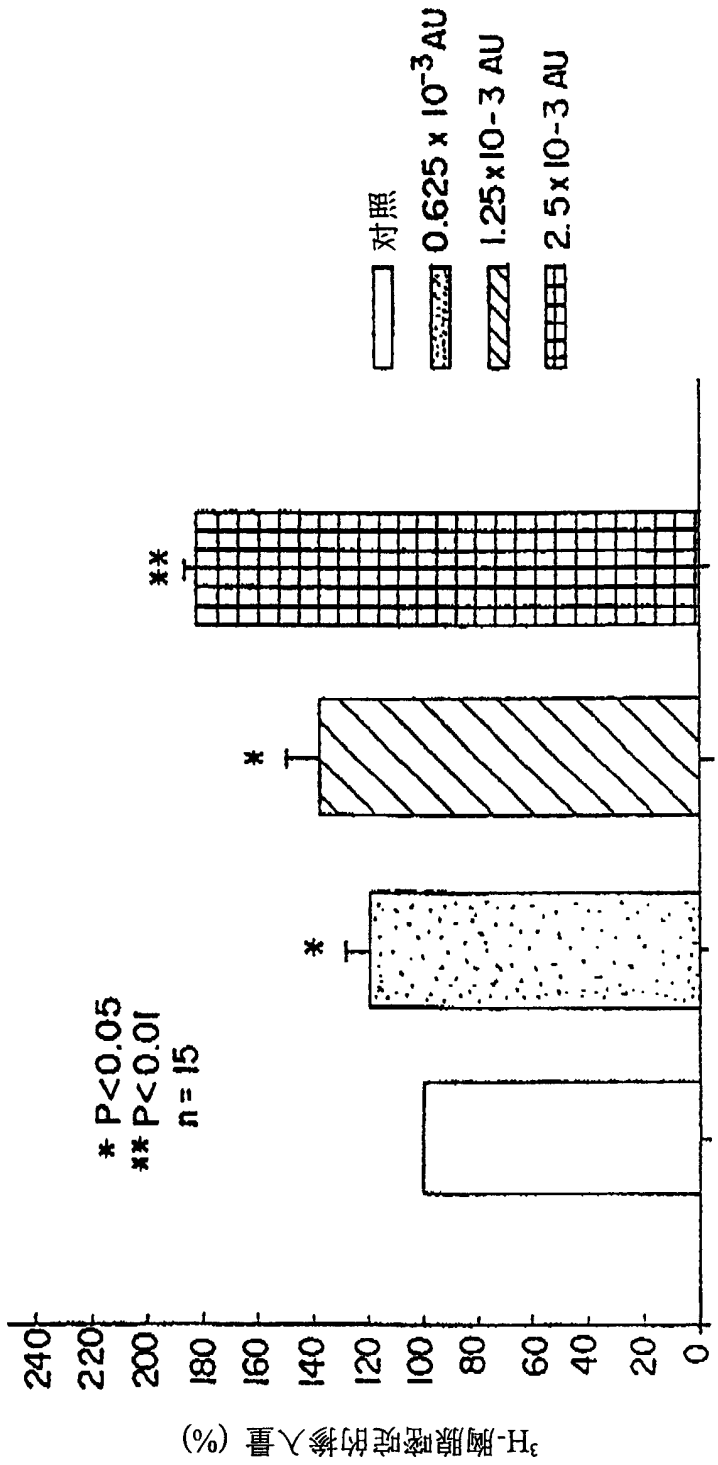

对照
0.625 x 10⁻³ AU
1.25x10-3 AU
2.5x10-3 AU
* P<0.05
** P<0.01
n = 15
*
*
**
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
³H-胸腺嘧啶的掺入量 (%)

图 4

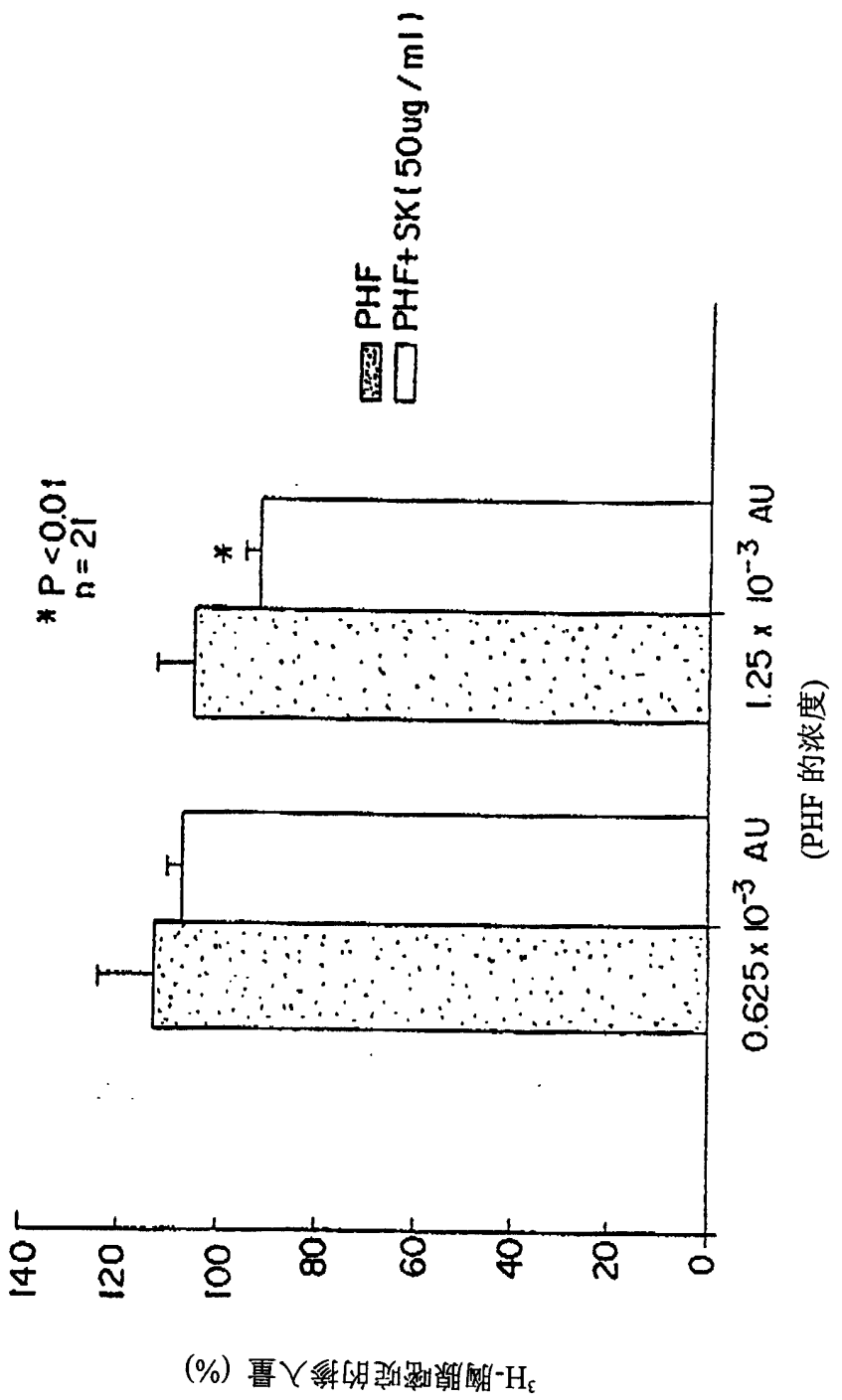

PHF
PHF+SK(50ug/ml)
* P<0.01
n=21
*
0.625x10⁻³ AU
1.25 x 10⁻³ AU
(PHF 的浓度)
³H-胸腺嘧啶的掺入量 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140

图 5

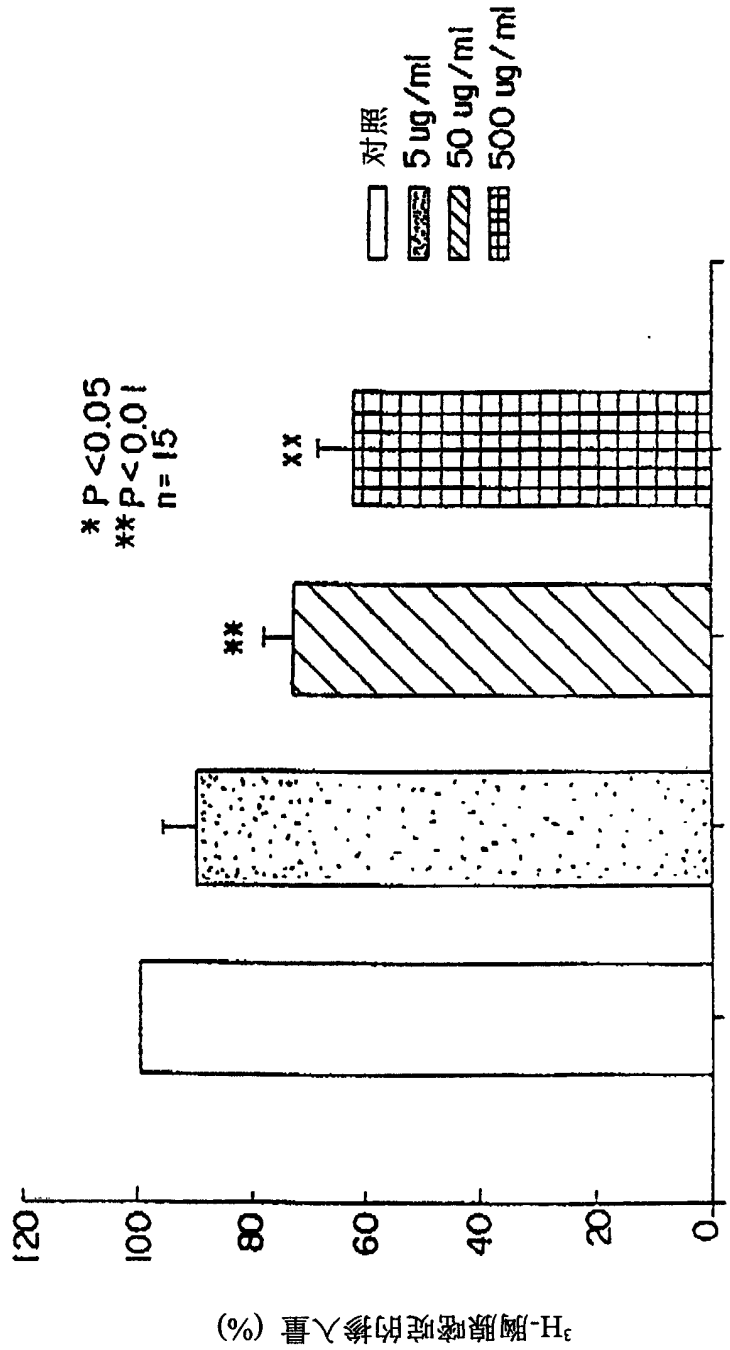

对照
5 ug/ml
50 ug/ml
500 ug/ml
* P <0.05
** P <0.01
n= 15
**
**
120
100
80
60
40
20
0
^{3}H-胸腺嘧啶的掺入量 (%)

图 6