



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111603473 A

(43)申请公布日 2020.09.01

(21)申请号 202010522305.4 *A61P 9/10*(2006.01)
(22)申请日 2020.06.10 *A61P 25/28*(2006.01)
(66)本国优先权数据 *A61P 25/16*(2006.01)
201910938162.2 2019.09.30 CN *A61K 35/65*(2015.01)
(71)申请人 上海和黄药业有限公司
地址 201401 上海市奉贤区肖业路388号
(72)发明人 张建革 詹常森 张培 周俊杰
汪飞云 姜鹏 林国强 张正光
(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382
代理人 曹津燕 丁磊
(51)Int.Cl.
A61K 31/585(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书20页 附图12页

(54)发明名称

一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物及其制剂和用途

(57)摘要

本发明提供一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物及其制剂和用途。本发明的组合物包含蟾毒配基类化合物,更具体地本发明的组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基。本发明还提供包含本发明的组合物的药物制剂及本发明的组合物或包含本发明组合物的药物制剂在制备用于治疗由神经细胞损伤引发的疾病的药物中的用途。

1. 一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物,所述组合物包含蟾毒配基类化合物;
优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基。
2. 根据权利要求1所述的组合物,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,其中,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中,所述神经细胞损伤是由缺氧导致的;进一步优选地,所述由神经细胞损伤引发的疾病选自:缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述组合物为复合物。
5. 一种药物制剂,其包含权利要求1-4中任一项所述的组合物。
6. 根据权利要求5所述的药物制剂,其中,所述组合物包含蟾毒配基类化合物;
优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基;
优选地,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1。
7. 根据权利要求5或6所述的药物制剂,其中所述药物制剂还可包括其它活性成分,该种其它活性成分可与本发明的组合物共同或协同用于对神经细胞损伤的保护;进一步优选地,所述其它活性成分选自依达拉奉、尼莫地平、桂哌齐特、天麻素、丹参多酚酸盐、维生素B1、维生素B6、维生素B12和甲钴胺;
优选地,所述药物制剂可进一步包含药学上可接受的载体。
8. 权利要求1-4中任一项所述的组合物或权利要求5-7中任一项所述的药物制剂在制备用于治疗由神经细胞损伤引发的疾病的药物中的用途。
9. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述神经细胞损伤方面的疾病是由缺氧导致的;所述由神经细胞损伤引发的疾病选自:缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森。

一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物及其制剂和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物及其制剂和用途。

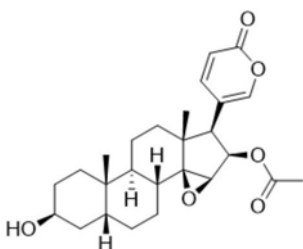
背景技术

[0002] 蟾酥一词源于《本草衍义》,属名贵中药,其是由蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液经加工干燥制成。蟾酥主要产于山东、河北、江苏、湖南、浙江、四川等地。

[0003] 根据2015版药典,蟾酥性味甘辛、温、有毒,归心经;功能与主治为解毒、止痛、开窍醒神,用于痈疽疔疮、咽喉肿痛、中暑神昏、痧胀腹痛吐泻。现代药理研究表明,蟾酥不仅可以镇痛、消炎、麻醉,还有抗癌、抗辐射、强心等多种生物活性。

[0004] 目前,关于蟾酥及蟾酥中的活性成分的研究很多,近几年的研究热点集中在其抗肿瘤活性方面。在现有的研究中,蟾蜍内酯和吲哚生物碱为研究最多的成分,而蟾蜍内酯类化合物根据配基母核上取代基不同又分为5类,其中的蟾毒配基类物质是蟾酥发挥药理活性的重要成分,其包括华蟾酥毒基和酯蟾毒配基。华蟾酥毒基难溶于水,体内半衰期短且分布广泛,并具有较强的毒性,其具有式I所示的结构:

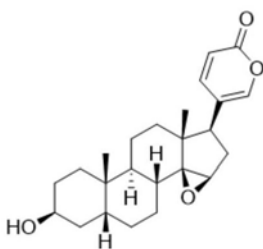
[0005]



式 I。

[0006] 酯蟾毒配基是蟾毒配基类中的另一种重要化合物,其几乎不溶于水,毒性与华蟾酥毒基相比较温和,并具有式II所示的结构:

[0007]



式 II。

[0008] 然而,对于蟾酥或蟾酥中的主要活性成分在对神经细胞损伤的保护方面的作用,现有技术未见报道。对于神经细胞损伤,目前已知的可能对神经细胞损伤具有保护或改善作用的物质包括:

[0009] 神经节苷脂类:单唾液酸四己糖神经节苷脂,其是哺乳类神经节苷脂的主要种类,

目前已广泛应用于临床。

[0010] 维生素类：(1) 维生素B1：维生素B1在体内以辅酶形式参与糖分解代谢，有保护神经系统的作用。(2) 维生素B6：维生素B6参与某些神经介质(5-羟色胺、牛磺酸、多巴胺、去甲肾上腺素和 γ -氨基丁酸)合成。(3) 维生素B12：维生素B12参与神经组织中一种脂蛋白的形成，是神经系统功能健全不可缺少的维生素，故有稳定神经细胞的功能。(4) 甲钴胺：易于进入神经元细胞器，参与脑细胞和脊髓神经元胸腺嘧啶核苷的合成，促进叶酸的利用和核酸代谢，且促进核酸和蛋白质合成；能促进轴突运输功能和轴突再生。

[0011] 神经保护剂类：(1) 二氢吡啶类钙拮抗剂：包括尼莫地平、尼卡地平、氟桂嗪，其作用受体为L型电压敏感性钙通道，此受体主要位于神经细胞胞体，二者结合使进入细胞内的 Ca^{2+} 减少，并且尼莫地平优先与局部缺血区结合，使神经细胞和血脑屏障损害明显改善，减轻脑水肿，增加脑血流量。(2) 脑保护剂或自由基清除剂：比如依达拉奉，可清除自由基，抑制脂质过氧化，从而抑制脑细胞、血管内皮细胞、神经细胞的氧化损伤。(3) 钙离子通道阻滞剂，如桂哌齐特，通过阻止 Ca^{2+} 跨膜进入血管平滑肌细胞内，使血管平滑肌松弛，脑血管、冠状血管和外周血管扩张，从而缓解血管痉挛、降低血管阻力、增加血流量。(4) 胞磷胆碱，为脑代谢激活剂，能够促进脑细胞呼吸，改善脑功能，增强上行网状结构激活系统的功能，促进苏醒，降低脑血管阻力。

[0012] 天然产物类：(1) 长春西汀：它可通过阻断 Na^{+} 和 Ca^{2+} 通道，防止缺氧性损伤；通过抑制腺苷摄取，增强腺苷活性保护神经元；抑制磷酸二酯酶(PDE)活性，改善血液循环，促进神经细胞的恢复和神经纤维的再生。(2) 天麻素：对神经损伤细胞的保护作用主要体现在增强神经细胞活力，减少乳酸脱氢酶(LDH)释放。由于由缺氧导致的神经细胞损伤的作用机理复杂且机制不清楚，因此造成了现有的药物治疗不能够进行精确给药。目前，现有用于神经细胞损伤的药物存在以下缺陷：①：由于血脑屏障的存在导致现有的大多数药物不能很好的穿透血脑屏障；②：作用靶点单一，面对复杂的多靶点的疾病时不能体现出较好的效果；③：受治疗时间窗的限制，不能有效地增加治疗时间；④：在体内的作用范围广，不能精确的锁定疾病的区域，效价降低。

发明内容

[0013] 本申请的发明人在对蟾酥进行研究的过程中，意外地发现其对由缺氧导致的神经细胞损伤具有保护作用。基于此意外的发现，申请人采用不同产地的蟾酥及其中不同活性成分的配伍进行了一系列的研究，得到了本发明的对神经细胞损伤具有保护作用的组合物。

[0014] 因此，一方面，本发明提供一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物；

[0015] 另一方面，本发明提供一种药物制剂，其包含上述组合物；

[0016] 再一方面，本发明提供一种上述组合物或上述药物制剂在制备用于治疗由神经细胞损伤引发的疾病的药物中的用途；

[0017] 又一方面，本发明提供一种治疗由神经细胞损伤引发的疾病的方法。实现本发明所采用的技术方案如下。

[0018] 本发明提供一种对神经细胞损伤具有保护作用的组合物，其中，所述组合物包含蟾毒配基类化合物；或者所述组合物的活性成分为蟾毒配基类化合物；

- [0019] 优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基;
- [0020] 优选地,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,或者所述组合物的活性成分为华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,其中所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1;
- [0021] 优选地,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.5:1、2:1、2.4:1、2.5:1、3:1;
- [0022] 优选地,所述神经细胞损伤是由缺氧导致的;
- [0023] 进一步优选地,所述由神经细胞损伤引发的疾病选自:缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森;
- [0024] 优选地,上述组合物为复合物。
- [0025] 本发明还提供一种药物制剂,其包含本发明的对神经细胞损伤具有保护作用的组合物;
- [0026] 优选地,所述组合物包含蟾毒配基类化合物;或者所述组合物的活性成分为蟾毒配基类化合物;
- [0027] 优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基;
- [0028] 优选地,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,或者所述组合物的活性成分为华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,其中所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1;
- [0029] 优选地,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.5:1、2:1、2.4:1、2.5:1、3:1;
- [0030] 优选地,所述神经细胞损伤是由缺氧导致的;
- [0031] 进一步优选地,所述由神经细胞损伤引发的疾病选自:缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森;
- [0032] 优选地,所述药物制剂还可包括其它活性成分,该种其它活性成分可与本发明的组合物共同或协同用于对神经细胞损伤进行保护;进一步优选地,所述其它活性成分选自依达拉奉、尼莫地平、桂哌齐特、天麻素、丹参多酚酸盐、维生素B1、维生素B6、维生素B12和甲钴胺;
- [0033] 优选地,所述药物制剂可进一步包含药学上可接受的载体;
- [0034] 优选地,上述组合物为复合物。
- [0035] 本发明还提供一种本发明的组合物或本发明的药物制剂在制备用于预防和/或治疗由神经细胞损伤引发的疾病的药物中的用途;
- [0036] 优选地,所述组合物包含蟾毒配基类化合物;或者所述组合物的活性成分为蟾毒配基类化合物;
- [0037] 优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基;
- [0038] 优选地,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,或者所述组合物的活性成分为华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,其中所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1;
- [0039] 优选地,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.5:1、2:1、2.4:1、2.5:1、3:1;

- [0040] 优选地,所述药物制剂包含本发明的组合物;
- [0041] 优选地,所述药物制剂还可包括其它活性成分,该种其它活性成分可与本发明的组合物共同或协同用于对神经细胞损伤进行保护;进一步优选地,所述其它活性成分选自依达拉奉、尼莫地平、桂哌齐特、天麻素、丹参多酚酸盐、维生素B1、维生素B6、维生素B12和甲钴胺;
- [0042] 优选地,所述药物制剂可进一步包含药学上可接受的载体;
- [0043] 优选地,所述神经细胞损伤方面的疾病是由缺氧导致的;进一步优选地,所述由神经细胞损伤引发的疾病选自缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森;
- [0044] 优选地,上述组合物为复合物。
- [0045] 本发明还提供一种治疗由神经细胞损伤引发的疾病的方法;
- [0046] 优选地,所述方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本发明的组合物或本发明的药物制剂的步骤;
- [0047] 优选地,所述组合物包含蟾毒配基类化合物;或者所述组合物的活性成分为蟾毒配基类化合物;
- [0048] 优选地,所述蟾毒配基类化合物选自华蟾酥毒基和酯蟾毒配基;
- [0049] 优选地,所述组合物包含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,或者所述组合物的活性成分为华蟾酥毒基和酯蟾毒配基,其中所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0-3:1,进一步优选地为0.9-2.5:1,更进一步优选地为1.0-2.0:1;
- [0050] 优选地,所述华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比为0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.5:1、2:1、2.4:1、2.5:1、3:1;
- [0051] 优选地,所述药物制剂包含本发明的组合物;
- [0052] 优选地,所述药物制剂还可包括其它活性成分,该种其它活性成分可与本发明的组合物共同或协同用于对神经细胞损伤的保护;进一步优选地,所述其它活性成分选自依达拉奉、尼莫地平、桂哌齐特、天麻素、丹参多酚酸盐、维生素B1、维生素B6、维生素B12和甲钴胺;
- [0053] 优选地,所述药物制剂可进一步包含药学上可接受的载体;
- [0054] 优选地,所述神经细胞损伤是由缺氧导致的;进一步优选地,所述由神经细胞损伤引发的疾病选自:缺血性脑卒中、新生儿缺氧缺血性疾病、阿尔兹海默症和帕金森。
- [0055] 本发明提供了不同于以往的对神经细胞损伤具有保护作用的化合物类型,即提供了蟾酥中主要起神经损伤保护作用的化合物类型及其配比范围。与现有技术相比,本发明的组合物可以为开拓新的神经损伤保护作用的药物提供新的途径。

附图说明

- [0056] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:
- [0057] 图1:图1示出了CHS系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响;其中CHS-1药物作用于缺氧PC12细胞,不存在显著性差异(图1A);CHS-2药物作用于缺氧PC12细胞,不存在显著性差异(图1B);CHS-3药物作用于缺氧PC-12细胞,40 μ g/ml浓度时存在显著性差异(图1C);CHS-4药物作用于缺氧PC12细胞,各浓度不存在显著性差异(图1D);CHS系列药物作

用于缺氧PC12细胞,在40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,CHS-3与模型组比较存在显著性差异(图1E)。

[0058] 图2:图2示出了混合物系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响;其中混合物1、2、3作用于缺氧PC12细胞,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时存在显著性差异(图2A、B、C);混合物4作用于缺氧PC12细胞,各浓度不存在显著性差异(图2D)。

[0059] 图3:图3示出了不同单体对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响;其中SHPL-1作用于缺氧PC12细胞,各浓度均存在显著性差异(图3A);SHPL-2作用于缺氧PC12细胞,各浓度均存在显著性差异(图3B);SHPL-1与SHPL-2作用于缺氧PC12细胞,在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,SHPL-2与模型组比较存在显著性差异(图3C)。

[0060] 图4:图4示出了1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下,混合物系列及不同单体对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响的比较;将混合物系列与SHPL-1、SHPL-2数据结果整合,实验结果表明:在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时混合物1、2、3以及SHPL-2与模型组比较存在显著性差异,混合物4以及SHPL-1不存在显著性差异。

[0061] 图5:图5示出了CHS系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞产生的LDH、NO和MDA的影响;40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CHS系列中药混合物作用于缺氧PC12细胞,CHS-3能够显著性减少LDH的产生(图5A);CHS-3能够显著性减少NO的产生(图5B);CHS系列中药混合物均能够显著性减少MDA的产生(图5C)。

[0062] 图6:不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响。

[0063] 图7:不同配比的SBP1和SBP4组合在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响。

[0064] 图8:SBP1和SBP4单体在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响。

[0065] 图9:图9A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响;图9B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响。

[0066] 图10:图10A为浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SBP1和SBP4单体以及浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响,图10B为浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SBP1和SBP4单体以及浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响。

[0067] 图11:图11A为不同配比的SBP1和SBP4组合在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响;图11B为不同配比的SBP1和SBP4组合在5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响。

[0068] 图12:图12A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响;图12B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下和浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响。

[0069] 图13:图13A为浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SBP1和SBP4单体以及浓度为160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响,图13B为浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SBP1和SBP4单体以及浓

度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响。

[0070] 图14:图14A为不同配比的SBP1和SBP4组合在1 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响;图14B为不同配比的SBP1和SBP4组合在5 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响。

[0071] 图15:图15A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响;图15B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响。

[0072] 图16:图16A为浓度为1 μ g/ml的SBP1和SBP4单体以及浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响,图16B为浓度为5 μ g/ml的SBP1和SBP4单体以及浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响。

[0073] 图17:图17A为不同配比的SBP1和SBP4组合在1 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响;图17B为不同配比的SBP1和SBP4组合在5 μ g/ml浓度下和浓度为160 μ g/ml的依达拉奉对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响。

[0074] 图18:图18A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 μ g/ml浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响;图18B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 μ g/ml浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响。

[0075] 图19:图19A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响,图19B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响。

[0076] 图20:图20A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响,图20B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响。

[0077] 图21:图21A为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响,图21B为不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在5 μ g/ml浓度对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响。

[0078] 图22:图22A为不同配伍的组合在1 μ g/ml的浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响,图22B为不同配伍的组合在5 μ g/ml的浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响。

具体实施方式

[0079] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0080] 1. 材料与方法

[0081] 细胞株:PC12细胞株,购自上海中桥新舟生物科技有限公司。

[0082] 连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$):国药集团,货号:20180316;

[0083] DMEM培养基:赛默飞世尔生物化学(北京)有限公司,货号:81119379;

[0084] 无糖RPMI1640:macgene,货号:12805020。

[0085] 1.1主要实验仪器及设备

名称	生产厂家
DK-500 型电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
OS-200 轨道式振荡器	杭州奥盛仪器有限公司
尼康显微镜	日本 Nikon 仪器有限公司
Thermo Multiskan GO 全波长酶标仪	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
ESCO CCL-170B-8 二氧化碳培养箱	上海百翱杰生物科技有限公司
低温冰箱	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
液氮罐	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
电子天平	岛津企业管理（中国）有限公司
干式恒温器	杭州奥盛仪器有限公司
高速离心机	赛默飞世尔科技（中国）有限公司

[0087] 1.2主要溶液及样品的配制

[0088] $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液：现配现用，浓度为10mM。

[0089] 给药组：PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理，其中：

[0090] 不同浓度的给药组的配置方法如下：将一定量的中药材/中药单体混合物/中药单体/组合物溶于一定量的DMSO中，然后用含10%胎牛血清的RPMI培养基稀释至所需的浓度。例如，浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CHS-1的配置方法为：将10 μg 的CHS-1溶于1 μL DMSO中，然后加入999 μL 10%胎牛血清的RPMI培养基，即得。例如，浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合物1的配置方法为：将1 μg 的混合物1溶于1 μL DMSO中，然后加入999 μL 10%胎牛血清的RPMI培养基，即得。

[0091] 所设置的给药组及各给药组的浓度如下：

[0092] (1) 配制不同浓度的中药材给药组 (CHS1、CHS2、CHS3、CHS4) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) : 10、20、40、80、160、320、640。

[0093] (2) 配制不同浓度的中药单体混合物给药组 (混合物1-4) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) : 1、5、10、20。

[0094] (3) 配制不同浓度的中药单体组给药组 (SHPL-1和SHPL-2单体) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) : 1、5、10、20。

[0095] (4) 不同浓度的SBP1 (日蟾毒它灵) 与SBP4 (蟾毒灵) 的混合物 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ;

[0096] (5) 不同浓度的SBP1 (日蟾毒它灵) 和SBP4 (蟾毒灵) 单体组给药组 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ;

[0097] (6) 不同浓度的依达拉奉 (ED) 组给药组 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ;

[0098] (7) 不同配比的、不同浓度的给药组 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 。

[0099] 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0100] 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0101] 空白组:指未加细胞的组。

[0102] 1.3药材及样品设置:

[0103] 蟾蜍药材由上海和黄药业有限公司提供,具体的信息编号如下(其中的含量为重量百分含量;含量比值为重量比):

样品 编号	样品批号	样品中	样品中	样品中	样 品 中	产地
		SHPL-1	SHPL-2	SHPL-1/S	SHPL-1/SH	
		的含量 (%)	的含量 (%)	HPL-2 的 含量比值	PL-2 的总 含量 (%)	
[0104]						
CHS-1	170714-1	1.73	4.86	0.36	6.59	
CHS-2	180702-1	3.65	4.44	0.82	8.09	桓仁基地
CHS-3	180423-1	0.65	7.24	0.09	7.89	敦化
CHS-4	180705-1	4.76	2.07	2.30	6.83	河南商丘

[0105] 其中SHPL-1代表华蟾酥毒基单体,SHPL-2代表酯蟾毒配基单体。

[0106] 另外还设置了以下四种具有不同单体配比的SHPL-1和SHPL-2的混合物。

样品编号	SHPL-1/SHPL-2 比值 (重量比)
混合物 1	2/5(0.4)
[0107] 混合物 2	4/5(0.8)
混合物 3	1/10(0.1)
混合物 4	12/5(2.4)

[0108] 其中SHPL-1代表华蟾酥毒基单体,SHPL-2代表酯蟾毒配基单体。

[0109] 实施例1PC12细胞培养

[0110] PC12细胞用含10%胎牛血清的RPMI培养基培养,在37℃、5%CO₂的条件下,细胞贴壁生长,细胞接种到培养皿中,取对数生长期的PC12细胞进行各指标的观察。

[0111] 1.1细胞复苏

[0112] 准备工作:打开37℃恒温水浴预热,配制含10%FBS和1×双抗的RPMI培养基备用。

细胞复苏以快速融化为原则,细胞冻存管顶端置于预热过的37℃水浴锅中,快速来回摇动,直至细胞冻存液融化为止。待管内冻存液融化后,将细胞悬液转移至事先配好的含10%FBS培养基的离心管中,1000rpm离心5min。离心过后弃除上清液,加入10%FBS的RPMI培养基3ml,重悬细胞,用移液器吹打混匀后将细胞悬液移至培养瓶中,置于37℃培养箱中培养。

[0113] 1.2细胞传代

[0114] 观察培养瓶中细胞生长情况,选取处在对数期生长且长势良好、密度达到90%及以上的细胞,弃去培养皿内培养基,用1×PBS洗涤;加入0.25%含EDTA的蛋白酶消化液2ml,置于37℃培养箱内消化1min,在显微镜下观察细胞形态,若细胞间隙变大,形态变圆,弃去胰酶消化液,向培养皿内加入3ml培养基终止消化用1ml移液器吹打细胞,直至制成单细胞悬液。取10μl进行细胞计数,其余按1:3,加入新鲜培养基补足8ml,混匀后置于37℃培养箱中培养。

[0115] 1.3细胞计数

[0116] 取无菌细胞计数板,用10μl移液器将细胞悬液从盖玻片一侧滴加,倒置显微镜下观察计数,采用计上不计下,计左不计右的原则,计算细胞计数板四个大格中的细胞总数,计数公式:细胞个数/ml = (四大格细胞数/4) × 10⁴ × 稀释倍数。

[0117] 实施例2:缺氧损伤模型的建立

[0118] PC12细胞(5×10⁴/ml)接种于96孔板中,每孔100μl。采用含Na₂S₂O₄的培养基造成PC12细胞缺氧4h,之后更换为正常培养基复氧24h,以细胞形态变化和细胞活力(CCK8法)作为评价指标,筛选出细胞活力为50%时含Na₂S₂O₄培养基的作用时间以及Na₂S₂O₄的作用浓度,建立稳定的PC12细胞缺氧损伤模型。

[0119] 实施例3:对由缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响(CCK8法)

[0120] 3.1实验组设置

[0121] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0122] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0123] (3) 空白组:指未加细胞的组。

[0124] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中:

[0125] CHS系列给药组:配制不同浓度的中药材给药组(CHS1-4)(μg/ml):10、20、40、80、160、320、640;

[0126] 混合物系列给药组:配制不同浓度的中药单体混合物给药组(混合物1-4)(μg/ml):1、5、10、20;

[0127] 单体给药组:配制不同浓度的中药单体组给药组(SHPL-1和SHPL-2单体)(μg/ml):1、5、10、20。

[0128] 3.2实验过程

[0129] PC12细胞接种于96孔板中,5×10⁴个细胞/ml,每孔100μl。各实验组经处理后,在37℃、5%CO₂培养箱中培养24小时,每孔加入10μl CCK8后,放入37℃、5%CO₂培养箱中孵育3小时。用酶标仪在450nm波长处测定吸光度(A值)。用下面公式计算细胞损伤率(%):细胞活力 = [(各实验组的A₄₅₀-空白组的A₄₅₀)/(对照组的A₄₅₀-空白组的A₄₅₀值)] × 100%。

[0130] 3.3数据处理

[0131] 用GraphPrism7进行单因素方差分析(one-way analysis of variance),结果以

均数±标准差(mean±Standard Error of Mean)表示,以及T-test,Two-tailed检验, $P<0.05$ 则表示具有显著的统计学差异,使用GraphPrism7软件进行图形制作。

[0132] 3.4实验结果

[0133] 3.4.1CHS系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响

[0134] 如图1所示,与对照组相比,模型组能够显著降低PC12细胞的IC50值,使细胞的活力明显降低($48\pm 1.77\%$, $P<0.001$);与模型组相比,CHS-3在40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下处理的细胞活力显著提高, ($56\pm 2.86\%$, $P<0.01$,图1C、E),CHS-1、CHS-2、CHS-4在相同浓度时不具有统计学意义,没有显著性差异(图1A、B、D)。这表明CHS-3在40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能够明显改善缺氧诱导的PC12细胞损伤,具有一定的保护作用,具有统计学意义。

[0135] 3.4.2混合物系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响

[0136] 如图2所示,与对照组相比,模型组能够显著降低PC12细胞的IC50值,使细胞的活力明显降低($48\pm 1.77\%$, $P<0.001$);与模型组相比,混合物1、2、3处理的细胞其活力显著提高,具有浓度依赖性,在相同浓度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(分别为 $69\pm 1.24\%$, $70.51\pm 8.56\%$, $72.11\pm 5.563\%$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$,图2A,2B,2C)具有更好的保护作用。混合物4不具有统计学意义,没有显著性差异(图2D)。说明混合物1、2、3在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能够明显改善缺氧诱导的PC12细胞损伤,具有一定的保护作用,具有统计学意义,实验结果表明混合物3在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时具有更好的保护作用,细胞生存率更高。

[0137] 3.4.3不同单体对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响

[0138] 如图3所示,与对照组相比,模型组能够显著性降低PC12细胞的IC50值,使细胞的活力明显降低($48\pm 1.77\%$, $P<0.001$);与模型组相比,SHPL-1与SHPL-2处理的细胞的活力显著提高,具有浓度依赖性,在相同浓度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(分别为 $57\pm 6.62\%$, $66\pm 3.58\%$, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$,图3A,3B,3C)具有更好的保护作用。说明SHPL-1与SHPL-2在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能够明显改善缺氧诱导的PC12细胞损伤,具有一定的保护作用,具有统计学意义,实验结果表明SHPL-2在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时具有更好的保护作用,细胞生存率更高。

[0139] 3.4.4 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下,混合物系列及不同单体对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞活力的影响的比较

[0140] 如图4所示,与对照组相比,模型组能够显著性降低PC12细胞的吸光度值,使细胞的活力明显降低($48\pm 1.77\%$, $P<0.001$);与模型组相比,混合物1、2、3以及SHPL-2处理的细胞的活力显著提高,具有浓度依赖性,在相同浓度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(分别为 $69\pm 1.24\%$, $70\pm 8.56\%$, $72\pm 5.56\%$, $66\pm 3.58\%$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)具有更好的保护作用。实验结果表明:在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时混合物3与SHPL-2能够明显改善缺氧诱导的PC12细胞损伤,具有一定的神经保护作用,具有统计学意义。

[0141] 实施例4:对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞产生的乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)和脂质氧化终产物丙二醛(MDA)的影响

[0142] 4.1实验组设置

[0143] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0144] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0145] (3) 空白组:指未加细胞的组。

[0146] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中:

[0147] CHS系列给药组:配制40 μ g/ml的不同的中药材给药组(CHS1-4)。

[0148] 4.2实验过程

[0149] 给药组处理24h后,分别将各组细胞进行离心,同时取上清液进行LDH的测定,下层细胞进行蛋白裂解进行NO、MDA的测定,测定过程具体如下:

[0150] 4.2.1:LDH检测操作流程:

[0151] 试剂盒的准备工作:

[0152] a. INT溶液 (1X) 的配置:根据所需的INT溶液 (1X) 的量,取适量INT溶液 (10X) 用INT稀释液稀释至1X。例如,取20 μ l INT溶液 (10X),加入180 μ l INT稀释液,混匀后即配置为200 μ l INT溶液 (1X)。INT溶液 (1X) 宜现配现用,配置后4 $^{\circ}$ C保存可于当天使用,不宜配置后冻存。

[0153] b. LDH检测工作液的配制:根据待测定的样品数(含对照),参考下表在临检测前新鲜配制适量的检测工作液。

[0154]	检测次数	1次	10次	20次	50次
	乳酸溶液	20 μ l	200 μ l	400 μ l	1ml
	INT溶液 (1X)	20 μ l	200 μ l	400 μ l	1ml
	酶溶液	20 μ l	200 μ l	400 μ l	1ml
	总体积	60 μ l	600 μ l	1.2ml	3ml

[0155] 样品测定:

[0156] a. 各孔分别加入60 μ l LDH检测工作液。

[0157] b. 混匀,室温(约25 $^{\circ}$ C)避光孵育30min(可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动)。然后在490nm处测定吸光度。使用600nm或大于600nm的任一波长作为参考波长进行双波长测定。

[0158] c. 计算(测得的各组吸光度均应减去背景空白对照孔吸光度)。

[0159] 4.2.2:NO检测操作流程:

[0160] 稀释标准品:

[0161] 用制备或稀释样品时所使用的溶液把1M NaNO₂稀释成2、5、10、20、40、60、80 μ M/L。稀释的标准品宜现配现用,不宜冻存后使用。

[0162] 试剂的准备:

[0163] a. 加约1ml双蒸水或Milli-Q级纯水至5mg NADPH中,颠倒混匀溶解后,再用双蒸水或Milli-Q级纯水定容至3ml,配制成2mM NADPH,除立即使用的部分外,其余NADPH溶液必须立即分装后-70 $^{\circ}$ C冻存。

[0164] b. FAD已经配制在适当溶液中。FAD可以适当分装后-20 $^{\circ}$ C或-70 $^{\circ}$ C保存。

[0165] c. Nitrate Reductase和LDH在临用前取出,并放置在冰浴上使用,试剂盒中的其余各种试剂在溶解后保存在冰浴上。Griess Reagent I和Griess Reagent II在使用前需达到室温。

[0166] 参考下表依次加入标准品、样品和检测试剂并进行相应检测:

[0167]

	空白对照	标准品	样品
标准品	—	60微升	—
样品	—	—	x微升
用于样品稀释的	60微升	—	(60-x) 微升
NADPH (2mM)	5微升	5微升	5微升
FAD	10微升	10微升	10微升
硝酸还原酶	5微升	5微升	5微升
混匀后, 37℃孵育30分钟			
LDH 缓冲液	10微升	10微升	10微升
LDH	10微升	10微升	10微升
混匀后, 37℃孵育30分钟			
Griess 试剂 I	50微升	50微升	50微升
Griess 试剂 II	50微升	50微升	50微升
混匀后, 室温(20-30℃)孵育10分钟后测定A540			

[0168] 根据标准品曲线计算出样品中一氧化氮的浓度。

[0169] 4.2.3: 脂质氧化终产物丙二醛 (MDA) 检测操作流程:

[0170] 试剂盒的准备工作:

[0171] a. TBA储存液的配制: 称取适量TBA, 用TBA配制液配制成浓度为0.37%的TBA储存液。配制好的TBA储存液室温避光保存。

[0172] b. MDA检测工作液的配制: 根据待测定的样品数(含对照), 参考下表在临检测前新鲜配制适量的MDA检测工作液。

[0173]

检测次数	1次	10次	20次	50次
TBA稀释液	150μl	1500μl	3000μl	7500μl
TBA储存液	50μl	500μl	1000μl	2500μl
抗氧化剂	3μl	30μl	60μl	150μl

[0174] c. 标准品的稀释: 取适量标准品用蒸馏水稀释至1、2、5、10、20、50μM, 用于后续制作标准曲线。如果样品中MDA的浓度很高, 可以增加100、150和200μM的标准品浓度。

[0175] 样品测定:

[0176] a. 在离心管或其它适当容器内加入0.1ml匀浆液、裂解液或PBS等适当溶液作为空白对照, 加入0.1ml上述不同浓度标准品用于制作标准曲线, 加入0.1ml样品用于测定; 随后加入0.2ml MDA检测工作液。可参考下表设置检测反应体系:

[0177]

	空白对照	标准品	样品
匀浆液、裂解液或PBS	0.1ml	—	—
	—	0.1ml	—
待测样品	—	—	0.1ml
MDA检测工作液	0.2ml	0.2ml	0.2ml

[0178] b. 混匀后, 100℃或沸水浴加热15分钟。

[0179] c. 水浴冷却至室温, 1000g室温离心10分钟。取200微升上清加入到96孔板中, 随后用酶标仪在532nm测定吸光度。可以设定450nm为参考波长进行双波长测定。

[0180] d.MDA含量的计算:对于血浆、血清或尿液等样品可以直接根据标准曲线计算获得MDA的摩尔浓度,对于细胞、或组织样品,计算出样品溶液中的MDA含量后,可以通过单位重量的蛋白含量或组织重量等来表示最初样品中的MDA含量,例如 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白或 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 组织。

[0181] 4.3数据处理

[0182] 用GraphPrism7进行单因素方差分析(one-way analysis of variance),结果以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ Standard Error of Mean)表示,以及T-test,Two-tailed检验, $P<0.05$ 则表示具有显著的统计学差异,使用GraphPrism7软件进行图形制作。

[0183] 4.4实验结果

[0184] 4.4.1CHS系列对缺氧诱导的PC12细胞损伤后细胞产生的LDH、NO和MDA的影响

[0185] 如图5A所示,与对照组相比,模型组的LDH水平显著性增加,其中CHS-3有效地抑制了LDH水平,CHS-3与CHS-4存在显著性差别。如图5B所示,与对照组相比,模型组的NO水平显著性增加,在NO的检测中发现与模型组相比,CHS-3显著性减少NO的释放。如图5C所示,与对照组相比,模型组的MDA水平显著性增加,在测定MDA的含量之后,同样也发现CHS系列中CHS-1、CHS-2、CHS-3都能减少MDA的表达量,减少MDA的释放。

[0186] 实施例5:不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响

[0187] 5.1实验组设置

[0188] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0189] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0190] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的如下配比的组合物:

[0191] 华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比分别为0.1:1、0.4:1、1:1、1.5:1、2:1。

[0192] 5.2实验过程

[0193] 1) 铺板:使用DMEM,10%胎牛血清,1%双抗(青霉素-链霉素)混合的完全培养液,按每孔6000个PC12神经细胞进行96孔板铺板,每孔100 μL 细胞悬液,过夜培养。

[0194] 2) 第二天弃去孔内液体,加入配好的10mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液200 μL (用无糖RPMI1640配制),放入细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2)1.5h。

[0195] 3) 1.5h后弃去孔中液体,对照组和模型组每孔加200 μL 完全培养液,给药组每孔加200 μL 化合物液体,放入细胞培养箱中24h。

[0196] 4) 24h后弃去孔中液体,每孔加20 μL 5mg/ml MTT,放入细胞培养箱中4h。

[0197] 5) 4h后弃去孔中液体,每孔加入150 μL DMSO,置于摇床上10min,

[0198] 使用酶标仪在570nm处测定各孔的吸光度。

[0199] 6) 计算细胞活力,细胞活力(%)=OD模型组/OD对照组*100和细胞活力(%)=OD给药组/OD对照组*100,数据表示为平均值 $\pm$ SD,*** $P<0.001$ vs模型,T检验,双尾。

[0200] 结果如图6所示,从图6可以看出,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合物在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下对神经细胞缺氧损伤后细胞有保护作用,与模型组比有显著性差异;在 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 时SHPL-1与SHPL-2比值为1和1.5对神经细胞损伤后细胞活力有保护作用,与模型组比有显著性差异。

[0201] 实施例6:不同配比的SBP1(日蟾毒它灵)和SBP4(蟾毒灵)组合物对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响

[0202] 6.1实验组设置

[0203] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0204] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0205] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的如下配比的SBP1和SBP4组合物:

[0206] SBP1与SBP4的重量份数比分别为0.1:1、0.4:1、1:1、1.5:1、2:1。

[0207] 6.2实验过程

[0208] 参照实施例5的5.2部分的描述进行。

[0209] 实验结果如图7所示,结果表明不同配比的SBP1和SBP4的组合物在1 μ g/ml和5 μ g/ml浓度下对神经细胞缺氧损伤没有保护作用,与模型组比无有显著性差异。

[0210] 实施例7:SBP1和SBP4单体对神经细胞缺氧损伤后细胞活力的影响

[0211] 7.1实验组设置

[0212] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0213] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0214] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的SBP1或SBP4单体。

[0215] 7.2实验过程

[0216] 参照实施例5的5.2部分的描述进行。

[0217] 实验结果如图8所示,其中SBP1和SBP4单体在1 μ g/ml和5 μ g/ml浓度下对神经细胞缺氧损伤细胞没有保护作用,与模型组比无有显著性差异。

[0218] 实施例8:不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响

[0219] 8.1实验组设置

[0220] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0221] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0222] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的如下配比的组合物:

[0223] 华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比分别为0.1:1、0.4:1、1:1、1.5:1、2:1;或

[0224] 采用浓度为160 μ g/ml的依达拉奉。

[0225] 8.2实验过程

[0226] 1) 铺板:使用DMEM,10%胎牛血清,1%双抗(青霉素-链霉素)混合的完全培养液,按每孔6000个PC12神经细胞进行96孔板铺板。如8.1所述设置对照组、模型组和给药组,每组每孔加入100 μ l细胞悬液,培养过夜。

[0227] 2) 第二天弃去孔内液体,对照组每孔加入200 μ L DMEM,模型组和给药组组每孔加入200 μ L 10mmol/L Na₂S₂O₄溶液,放入细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂)1.5h。

[0228] 3) 1.5h后弃去孔中液体,对照组和模型组每孔加200 μ L DMEM完全培养液,给药组每孔加入200 μ L不同浓度的组合物(组合物用生物级DMSO和DMEM完全培养液配制,DMSO含量

不超过千分之一),放入细胞培养箱中24h。

[0229] 4) 24h后将细胞培养板400g离心5min,分别吸取上清液120μL加入到一个新的96孔板相应孔中,随即进行样品测定。

[0230] 5) 配制LDH检测工作液:根据待测样品个数配制不同体积的LDH检测工作液,如下表。

[0231]	检测次数	1 次
	乳酸溶液	20μL
[0232]	INT 溶液 (1X)	20μL
	酶溶液	20μL
	总体积	60μL

[0233] 6) 各孔分别加入60μL LDH检测工作液。

[0234] 7) 混匀后用铝箔包裹后置于水平摇床上缓慢摇动30min,在490nm处测定吸光度。数据表示为平均值±SEM,***P<0.001vs模型,###p<0.001vs ED 160μg/ml,T检验,双尾。

[0235] 结果示于图9A和图9B,从上述结果可以看出与对照组相比,模型组的神经细胞的LDH释放明显升高;与模型组相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1μg/ml和5μg/ml时均能明显降低缺氧后神经细胞产生的LDH,而依达拉奉在160μg/ml时也能降低缺氧后神经细胞产生的LDH,具有显著性差异。与依达拉奉(ED)相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合在1μg/ml和5μg/ml时降低LDH的释放作用较强,说明不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合对神经细胞缺氧损伤的保护强于依达拉奉,具有显著性差异。

[0236] 实施例9:SBP1(日蟾毒它灵)和SBP4(蟾毒灵)单体对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的影响

[0237] 9.1实验组设置

[0238] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0239] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0240] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1μg/ml或5μg/ml的SBP1或SBP4单体或采用浓度为160μg/ml的依达拉奉。

[0241] 9.2实验过程

[0242] 参照实施例8的8.2部分的描述进行。数据表示为平均值±SEM,***P<0.001vs模型,T检验,双尾。

[0243] 结果示于图10A和图10B,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的LDH明显升高;与模型组相比,SBP1在1μg/ml和5μg/ml时均能明显降低缺氧后神经细胞产生的LDH,具有显著性差异;SBP4在1μg/ml时能降低缺氧后神经细胞的LDH释放,但是在5μg/ml时不具有显著性差异;依达拉奉在160μg/ml时能降低缺氧后神经细胞的LDH释放,具有显著性差异。在1μg/ml时SBP1、SBP4和依达拉奉三者相比,它们在降低缺氧后神经细胞的LDH释放方面的作用相当,与模型组相比均具有显著性差异。

[0244] 实施例10:不同配比的SBP1与SBP4的组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的LDH的

影响

[0245] 10.1实验组设置

[0246] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0247] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0248] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的如下配比的组合物:

[0249] SBP1与SBP4的重量份数比分别为0.1:1、0.4:1、1:1、1.5:1、2:1;或

[0250] 采用160 μ g/ml的依达拉奉进行给药处理。

[0251] 10.2实验过程

[0252] 参照实施例8的8.2部分的描述进行。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,***P<0.001vs模型,###p<0.001vs ED 160 μ g/ml,T检验,双尾。

[0253] 结果如图11A和图11B所示,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的LDH明显升高;与模型组相比,不同配比的SBP1和SBP4组合物在1 μ g/ml和5 μ g/ml时均不能降低缺氧后神经细胞产生的LDH,而依达拉奉在160 μ g/ml时能降低缺氧后神经细胞产生的LDH,具有显著性差异。与依达拉奉相比,当浓度为5 μ g/ml时,SBP1和SBP4配比为1.5和2的组合物降低缺氧后神经细胞LDH的释放作用弱,与依达拉奉相比有显著性差异,说明不同配比的SBP1和SBP4组合物对神经细胞缺氧损伤的保护作用弱于依达拉奉。

[0254] 实施例11:不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响

[0255] 11.1实验组设置

[0256] 参照实施例8的8.1部分设置。

[0257] 11.2实验过程

[0258] 1) 铺板:使用DMEM,10%胎牛血清,1%双抗(青霉素-链霉素)混合的完全培养液,按每皿60万个PC12神经细胞进行60mm小皿铺板。设置对照组、模型组和给药组,每皿加入5mL细胞悬液,培养过夜。

[0259] 2) 第二天弃去皿内液体,对照组每皿加入5mL DMEM,模型组和给药组每皿加入3mL 10mmol/L Na₂S₂O₄溶液,放入细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂) 1.5h。

[0260] 3) 1.5h后弃去皿中液体,对照组和模型组每皿加3mL DMEM完全培养液,给药组每皿加入3mL不同浓度的组合物(组合物用生物级DMSO和DMEM完全培养液配制,DMSO含量不超过千分之一),放入细胞培养箱中24h。

[0261] 4) 24h后弃去皿内液体,每皿加入1mL DPBS,用细胞刮刀将细胞刮下,并将细胞悬液转移至1.5mL EP管中。

[0262] 5) 1000转/分离心10min,弃去上清液,加MDA试剂盒中的试剂五(提取液)190 μ L,混匀2min,取样100 μ L于1.5mL EP管中。

[0263] 6) 按下表加入液体。

[0264]

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇(μ L)	100		
10nmol/ml标准品(μ L)		100	
测试样品(μ L)			100

工作液(μL)	1000	1000	1000
---------	------	------	------

[0265] 其中,按试剂一(澄清剂):试剂二(贮备液):试剂三(显色剂)=0.2:3:1的比例进行配制工作液。

[0266] 7) 涡旋混匀液体,用注射器针头在管盖上刺一个小孔,100℃加热40min。

[0267] 8) 取出后冷却,4000转/分离心10min,吸取液体250μL到96孔板中,530nm测定吸光度。

[0268] 9) 用BCA试剂盒测定样品蛋白浓度。

[0269] 数据表示为平均值±SEM,***P<0.001vs模型,T检验,双尾。

[0270] 结果如图12A和图12B所示,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的MDA明显升高;与模型组相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基在1μg/ml和5μg/ml时明显降低缺氧后神经细胞产生的MDA,依达拉奉在160μg/ml时也明显降低缺氧后神经细胞产生的MDA,具有显著性差异。与依达拉奉相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合降低缺氧后神经细胞的MDA释放作用相当,没有显著性差异,说明不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合对神经细胞缺氧损伤的保护作用与依达拉奉相当。

[0271] 实施例12:SBP1(日蟾毒它灵)和SBP4(蟾毒灵)单体对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响

[0272] 12.1实验组设置

[0273] 参照实施例9的9.1部分设置。

[0274] 12.2实验过程

[0275] 参照实施例11的11.2部分进行。

[0276] 结果如图13A和13B所示,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的MDA明显升高;与模型组相比,SBP1和SBP4在1μg/ml和5μg/ml时不能降低缺氧后神经细胞产生的MDA,依达拉奉在160μg/ml时明显降低缺氧后神经细胞产生的MDA,具有显著性差异。与依达拉奉相比,SBP1和SBP4对降低缺氧后神经细胞MDA的释放作用弱,说明SBP1和SBP4对神经细胞缺氧损伤的保护作用弱于依达拉奉。

[0277] 实施例13:不同配比的SBP1(日蟾毒它灵)与SBP4(蟾毒灵)的组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的MDA的影响

[0278] 13.1实验组设置

[0279] 参照实施例10的10.1部分设置。

[0280] 13.2实验过程

[0281] 参照实施例11的11.2部分的描述进行。数据表示为平均值±SEM,***P<0.001vs模型,###p<0.001vs ED 160μg/ml,T检验,双尾。

[0282] 结果如图14A和图14B所示,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞的MDA释放明显升高;与模型组相比,不同配比的SBP1和SBP4组合物在1μg/ml和5μg/ml时降低缺氧后神经细胞的MDA释放作用弱,没有显著性差异。依达拉奉在160μg/ml时明显降低缺氧后神经细胞产生的MDA,具有显著性差异。与依达拉奉相比,不同配比的SBP1和SBP4组合物对降低缺氧后神经细胞的MDA释放作用弱。

[0283] 实施例14:不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响

[0284] 14.1实验组设置

[0285] 参照实施例8的8.1部分设置。

[0286] 14.2实验过程

[0287] 1) 铺板:使用DMEM,10%胎牛血清,1%双抗(青霉素-链霉素)混合的完全培养液,按每皿60万个PC12神经细胞进行60mm小皿铺板。设置对照组、模型组和给药组,每皿加入3mL细胞悬液,培养过夜。

[0288] 2) 第二天弃去皿内液体,对照组每皿加入3mL DMEM,模型组和给药组每皿加入3mL的5mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液,放入细胞培养箱(37℃,5% CO_2)1.5h。

[0289] 3) 1.5h后弃去皿中液体,对照组和模型组每皿加3mL DMEM完全培养液,给药组组每皿加入3mL不同浓度的化合物(化合物用生物级DMSO和DMEM完全培养液配制,DMSO含量不超过千分之一),放入细胞培养箱中24h。

[0290] 4) 24h后弃去皿内液体,每皿加入1mL DPBS,用细胞刮刀将细胞刮下,并将细胞悬液转移至1.5mL EP管中。

[0291] 5) 1000转/分离心10min,弃去上清液,加组织裂解液190 μL ,吹打混匀使细胞裂解。

[0292] 6) 按下表加入液体。

[0293]

	空白对照	标准品	样品
标准品(μL)		60	
样品(μL)			60
用于稀释样品的液体(μL)	60		
NADPH(2mM)(μL)	5	5	5
FAD(μL)	10	10	10
硝酸还原酶(μL)	5	5	5

[0294] 7) 涡旋混匀液体,37℃孵育30min。

[0295] 8) 每管再加入以下液体,涡旋混匀液体,37℃孵育30min。

[0296]

	空白对照	标准品	样品
LDH缓冲液(μL)	10	10	10
LDH(μL)	10	10	10

[0297] 9) 每管再加入以下液体,涡旋混匀液体,室温(20-30℃)孵育10min,540nm处测定吸光度。

[0298]

	空白对照	标准品	样品
Griess试剂I(μL)	50	50	50
Griess试剂II(μL)	50	50	50

[0299] 10) 用BCA试剂盒测定样品蛋白浓度。

[0300] 结果如图15A和15B所示,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的NO明显升高;与模型组相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配组合物在1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时明显降低缺氧后神经细胞的NO释放,具有显著性差异;在5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能够降低缺氧后神经细胞的NO释放,但是只有配比为0.4和1具有显著性差异。依达拉奉在160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能明显降低缺氧后神经细胞NO的释放,具有显著性差异。与依达拉奉相比,不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配

基组合物在降低NO释放的方面的作用相当,不具有显著性差异,说明不同配比的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基组合物对神经细胞缺氧损伤的保护与依达拉奉相当。

[0301] 实施例15:SBP1(日蟾毒它灵)和SBP4(蟾毒灵)单体对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响

[0302] 15.1实验组设置

[0303] 参照实施例9的9.1部分设置。

[0304] 15.2实验过程

[0305] 参照实施例14的14.2部分进行。

[0306] 结果示于图16A和16B,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的NO明显升高;与模型组相比,SBP1和SBP4在1 μ g/ml和5 μ g/ml时不能降低缺氧后神经细胞的产生NO。依达拉奉在160 μ g/ml时能明显降低缺氧后神经细胞产生的NO,具有显著性差异。与依达拉奉相比,SBP1和SBP4降低NO释放方面的作用弱,但是不具有显著性差异,说明SBP1和SBP4对神经细胞缺氧损伤的保护弱于依达拉奉。

[0307] 实施例16:不同配比的SBP1和SBP4组合物对神经细胞缺氧损伤后产生的NO的影响

[0308] 16.1实验组设置

[0309] 参照实施例10的10.1部分设置。

[0310] 16.2实验过程

[0311] 参照实施例14的14.2部分进行。

[0312] 结果示于图17A和17B,从图中可以看出与对照组相比,模型组神经细胞产生的NO明显升高;与模型组相比,不同配比的SBP1和SBP4组合物在1 μ g/ml和5 μ g/ml时不能降低缺氧后神经细胞产生的NO。依达拉奉在160 μ g/ml时能明显降低缺氧后神经细胞产生的NO,具有显著性差异。与依达拉奉相比,不同配比的SBP1和SBP4组合物在降低NO释放方面的作用弱,但是不具有显著性差异,说明不同配比的SBP1和SBP4对神经细胞缺氧损伤的保护弱于依达拉奉。

[0313] 实施例17:本发明的组合物的筛选实验

[0314] 17.1实验组设置

[0315] (1) 对照组:PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0316] (2) 模型组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0317] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的如下配比的组合物:

[0318] 华蟾酥毒基与酯蟾毒配基的重量份数比分别为2.4:1、3:1、3.5:1、4:1。

[0319] 17.2实验过程和结果

[0320] 参照实施例5的5.2部分的描述进行细胞活力测定,结果示于图18A和18B;参照实施例8的8.2部分进行LDH测定,结果示于图19A和19B;参照实施例11的11.2部分的描述进行MDA测定,结果示于图20A和20B;参照实施例14的14.2部分的描述进行NO测定,结果示于图21A和21B。

[0321] 从图18-图21中可以看出,当SHPL1与SHPL2的重量份数比为2.4:1、3:1、3.5:1和4:1时,其未使神经细胞PC12缺氧损伤后的活力增加,与模型组相比没有显著区别。SHPL1与SHPL2的重量份数比为3、3.5和4时,对神经细胞PC12缺氧损伤后产生的LDH、MDA、NO没有显

著影响,与模型组相比,没有显著性区别。然而,重量份数比为2.4:1的组合物在5 μ g/ml时,能够使神经细胞PC12缺氧损伤后产生的MDA、NO减少,与模型组相比具有显著性差异。

[0322] 实施例18:本发明的组合物的筛选

[0323] 18.1实验组设置

[0324] (1) 对照组,PC12细胞不进行缺氧缺糖处理,也不进行给药处理。

[0325] (2) 模型组,PC12细胞进行缺氧缺糖处理,但不进行给药处理。

[0326] (4) 给药组:PC12细胞进行缺氧缺糖处理后进行相应浓度的给药处理,其中采用浓度为1 μ g/ml或5 μ g/ml的重量份数比为1:1的下列组合物:

[0327] SHPL1与ED的组合物、SHPL2与ED的组合物、SHPL1与SBP1的组合物、SHPL2与SBP1的组合物、SHPL1与SBP4的组合物、SHPL2与SBP4的组合物、SBP1与ED的组合物、SBP4与ED的组合物。

[0328] 18.2实验过程

[0329] 参照实施例5的5.2部分的描述进行细胞活力测定,结果示于图22A和22B。

[0330] 从图22中可以看出,上述不同组合物没有使神经细胞PC12缺氧损伤的活力增加,与模型组相比,没有显著性区别。

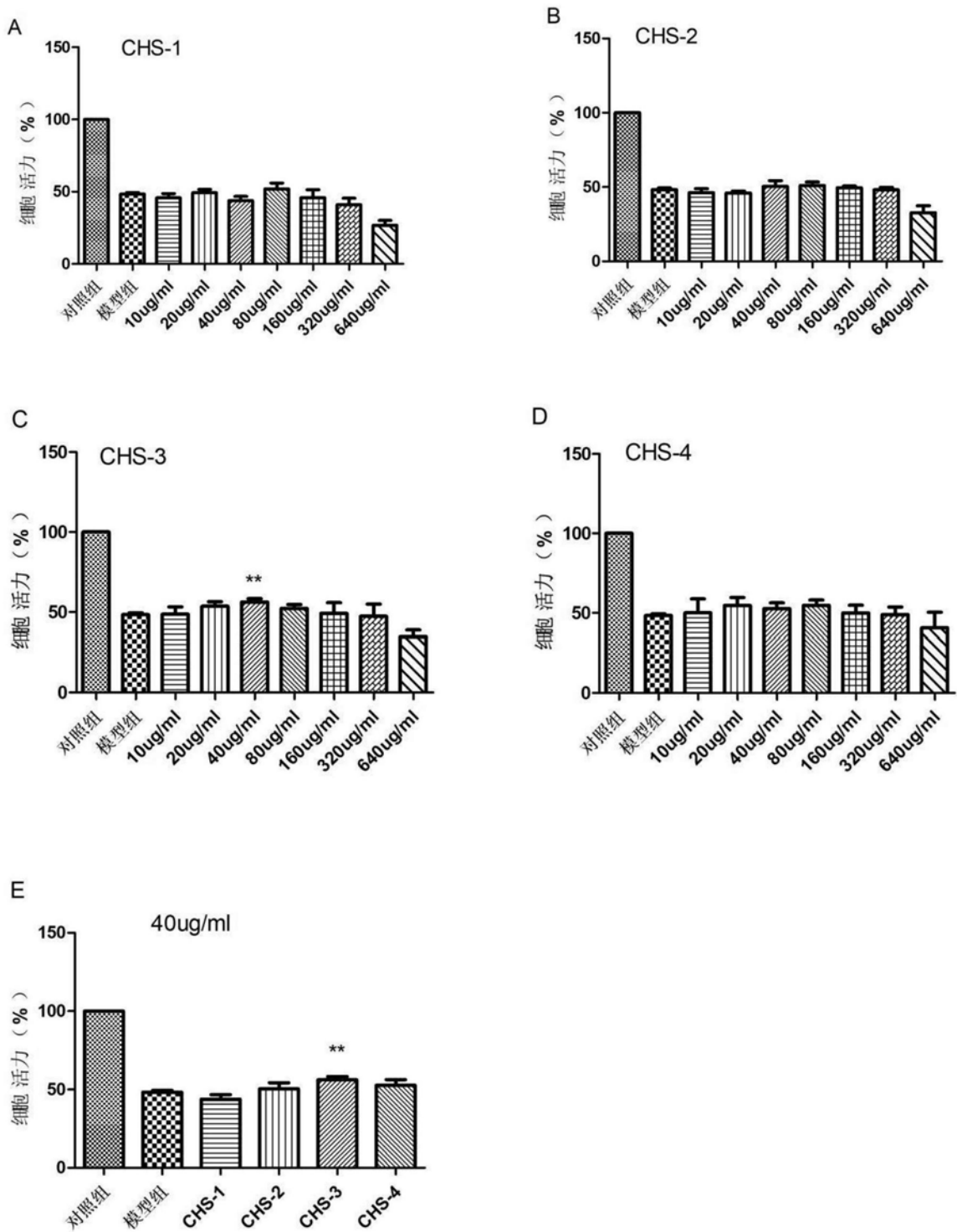


图1

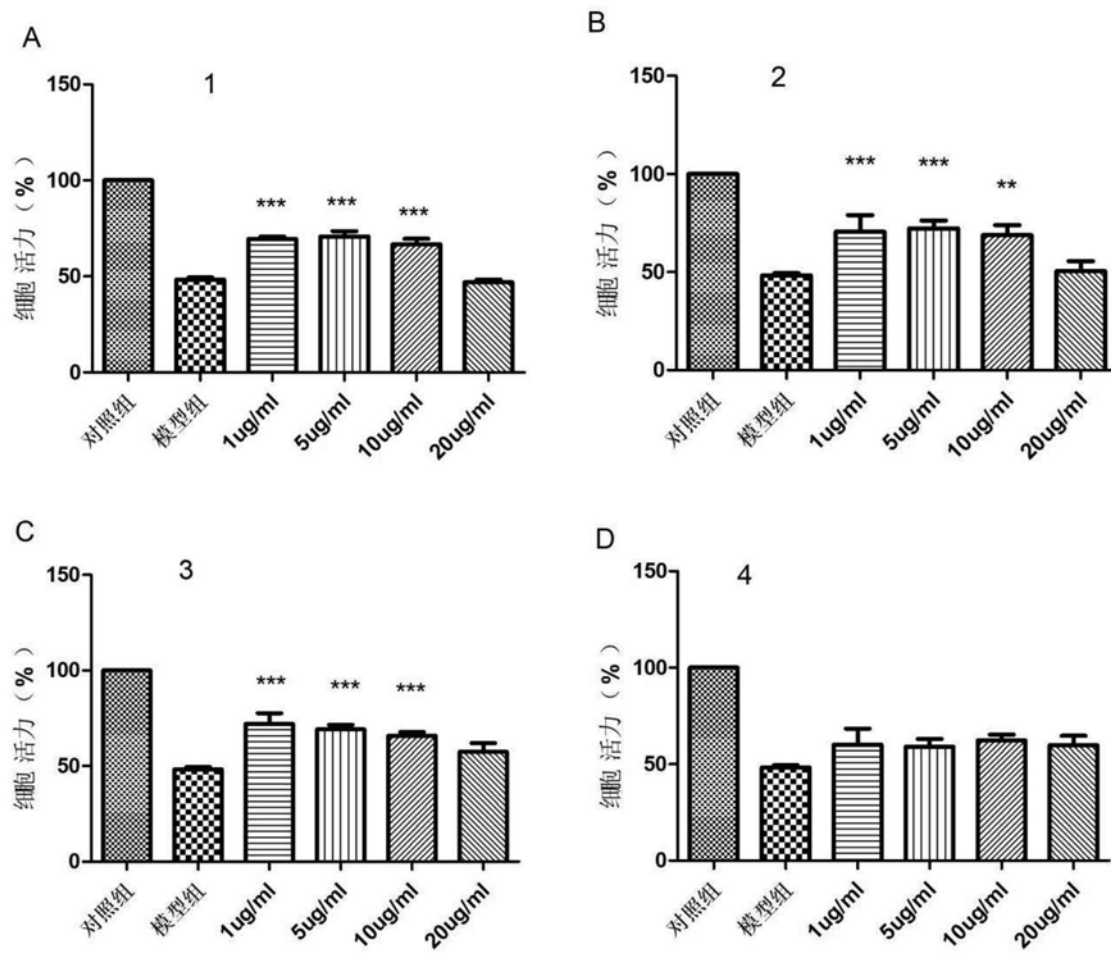


图2

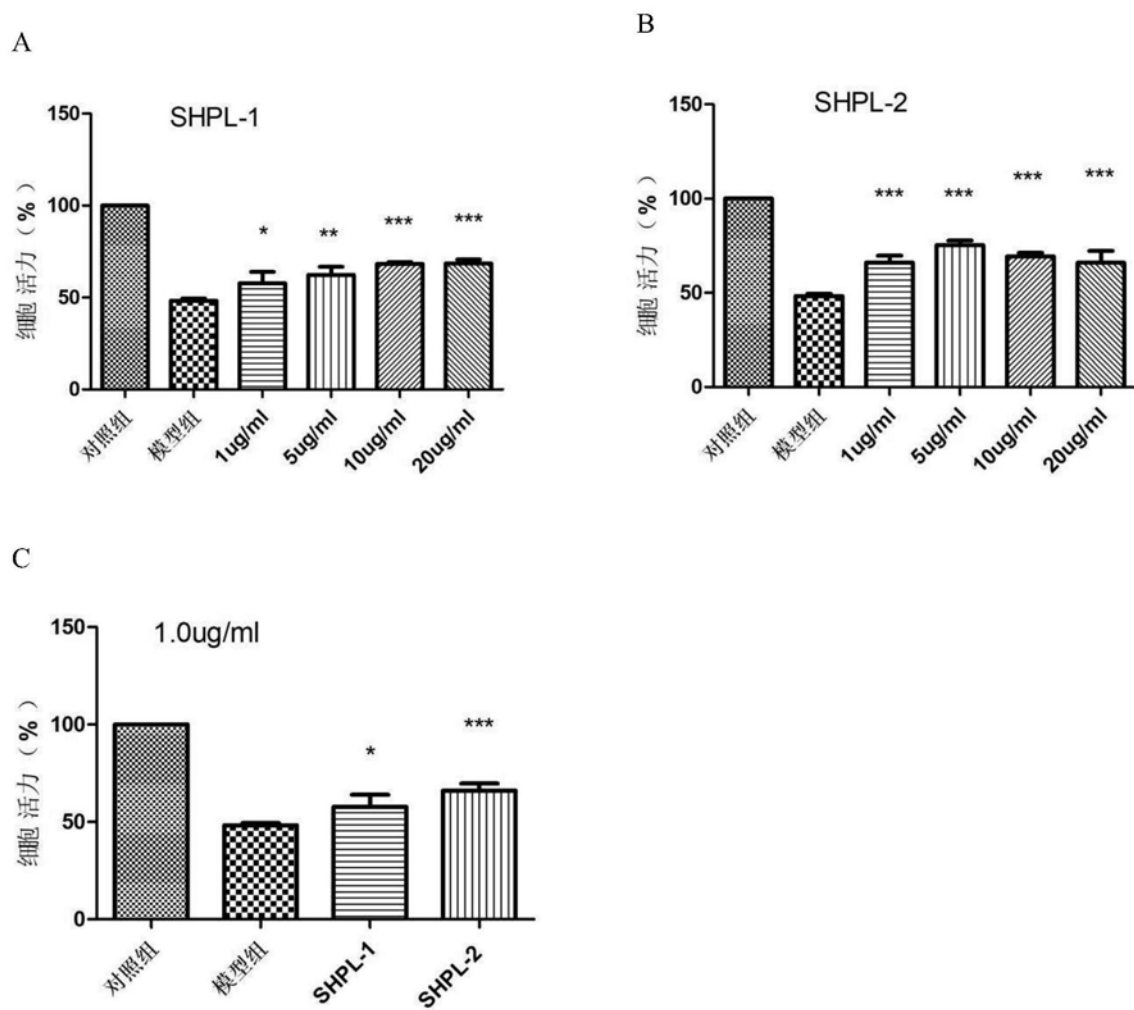


图3

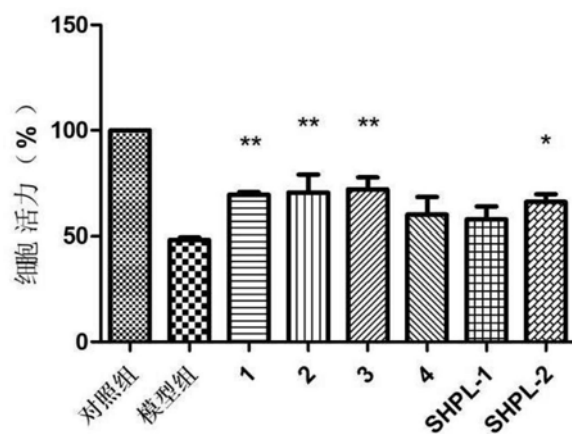


图4

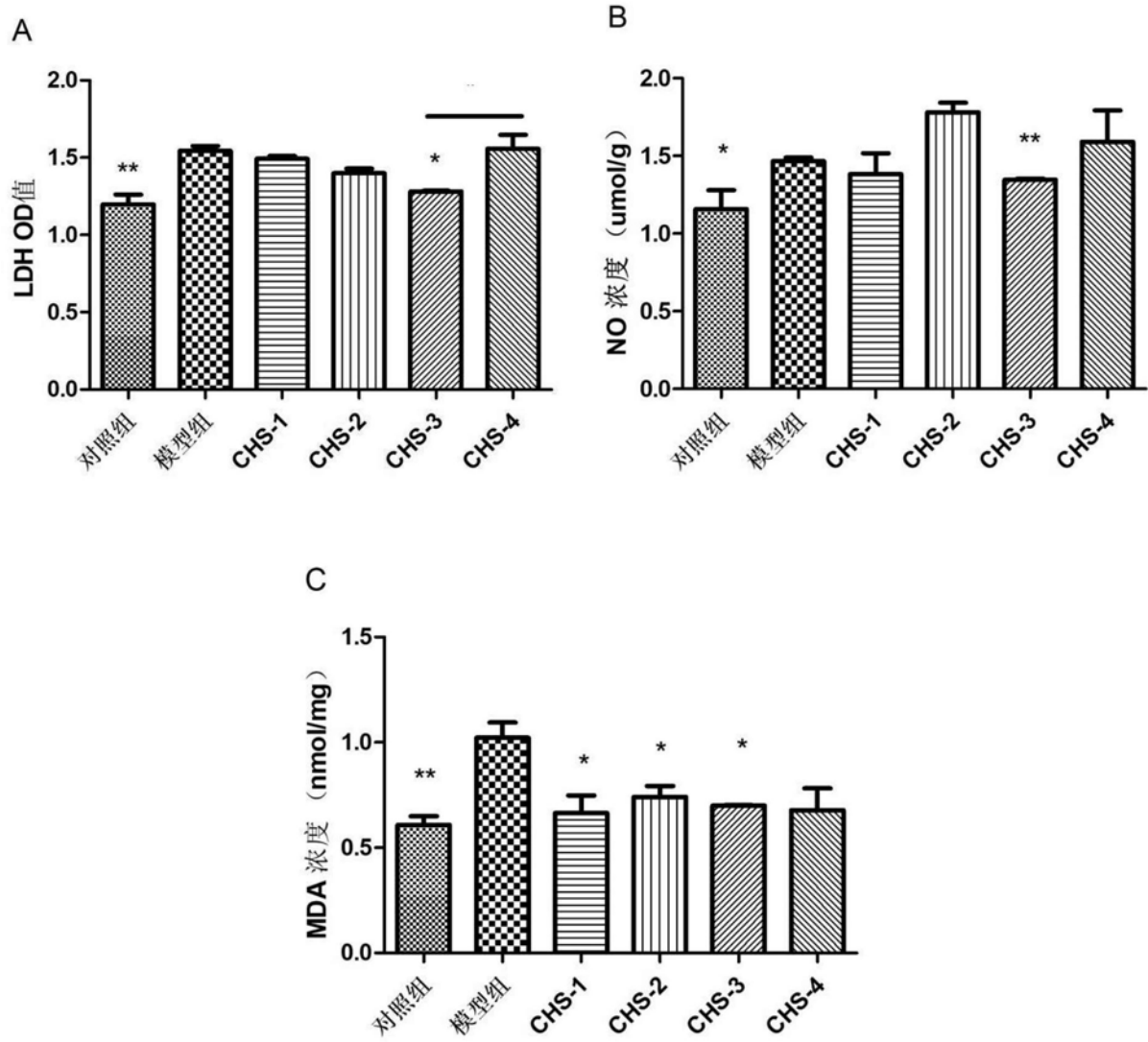


图5

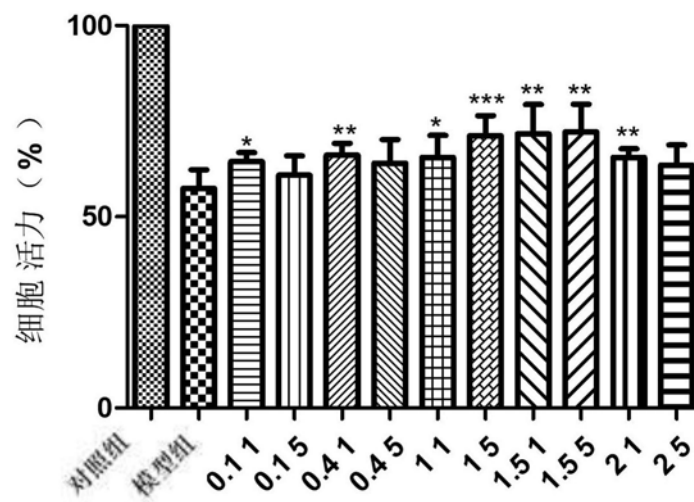


图6

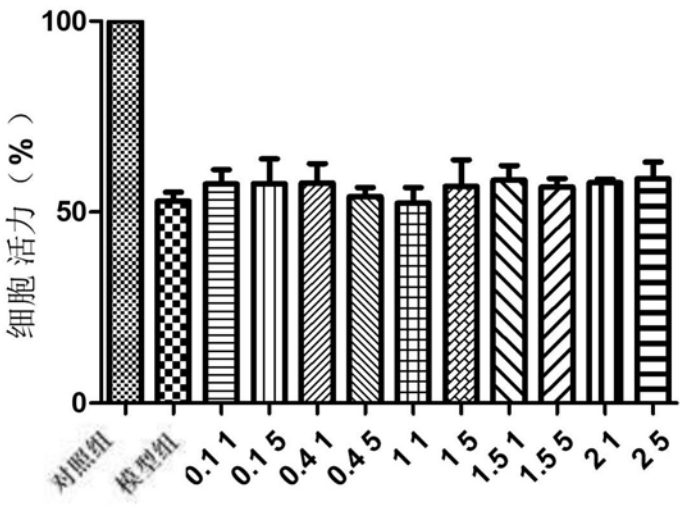


图7

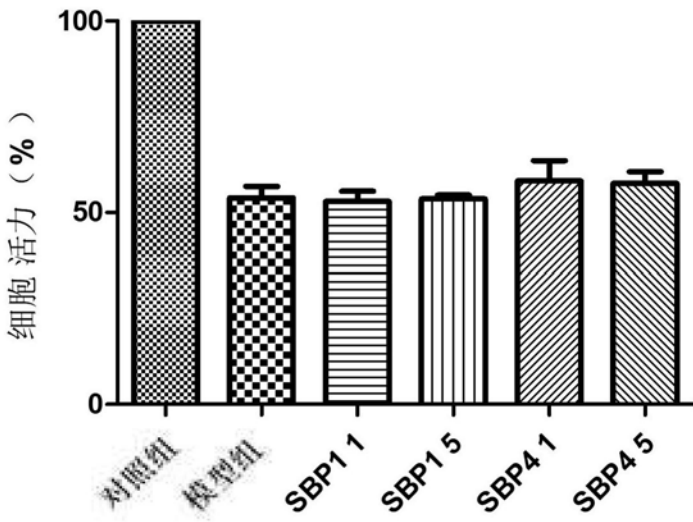


图8

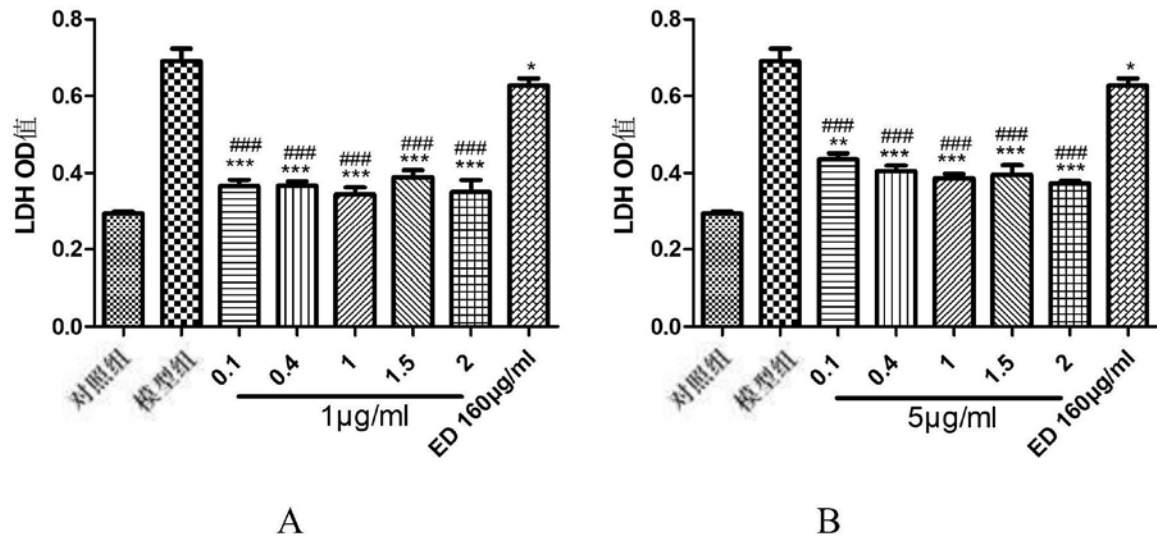


图9

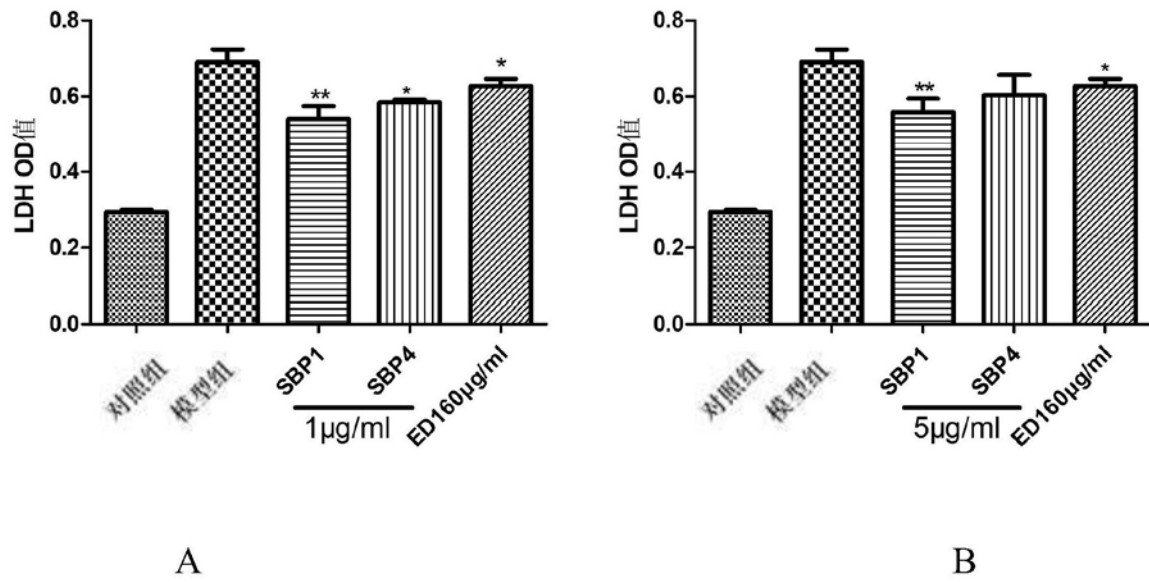


图10

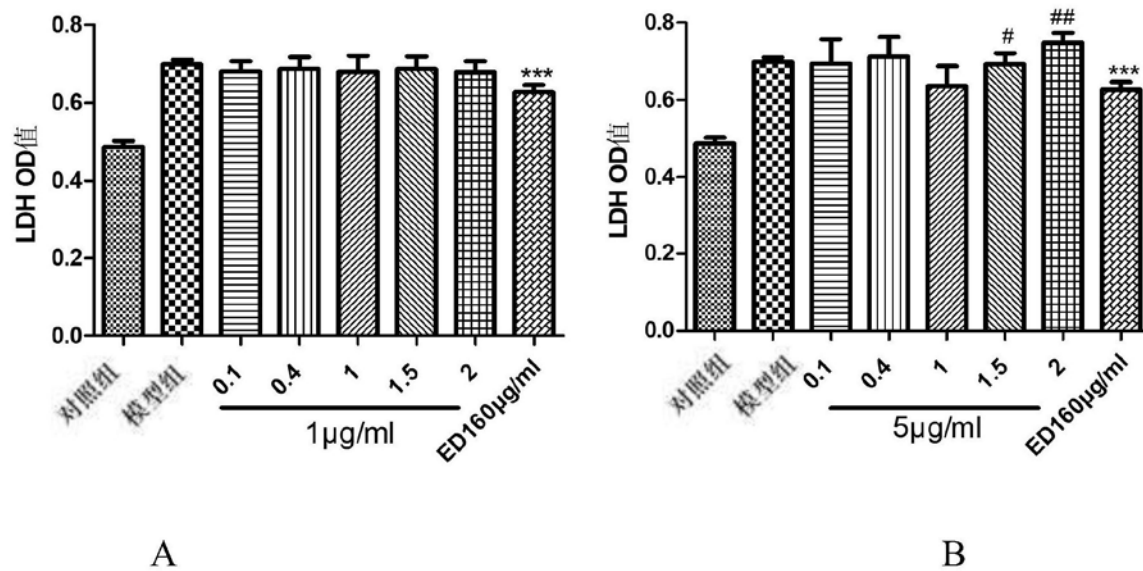


图11

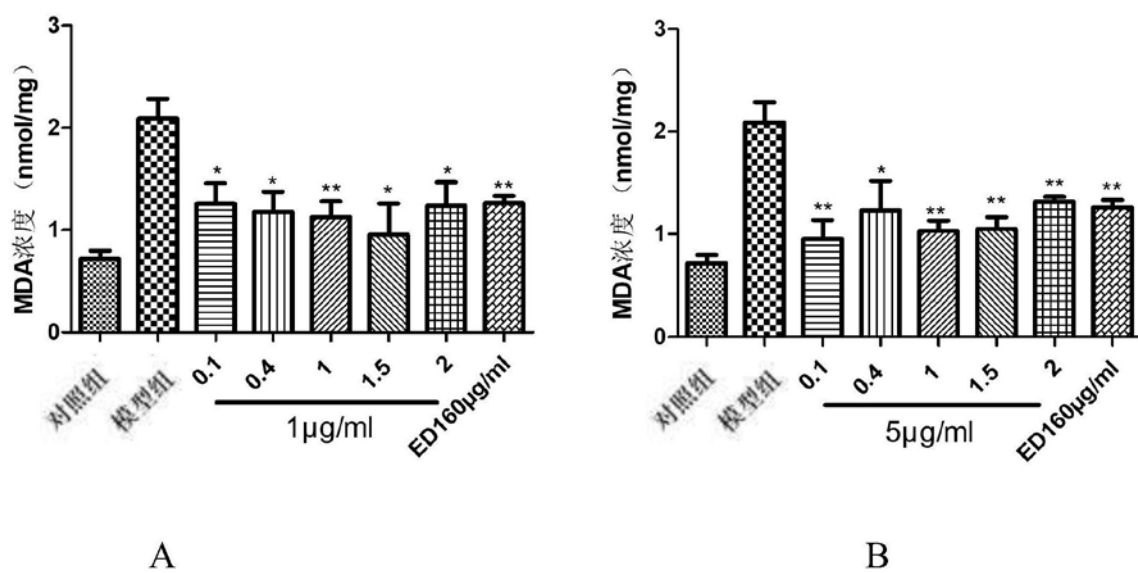


图12

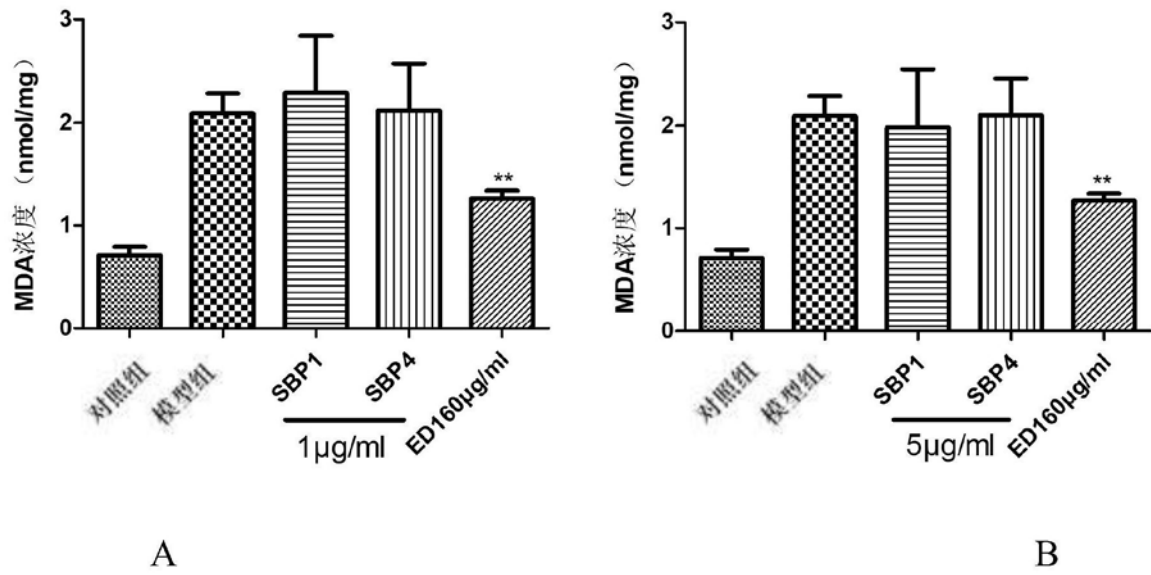


图13

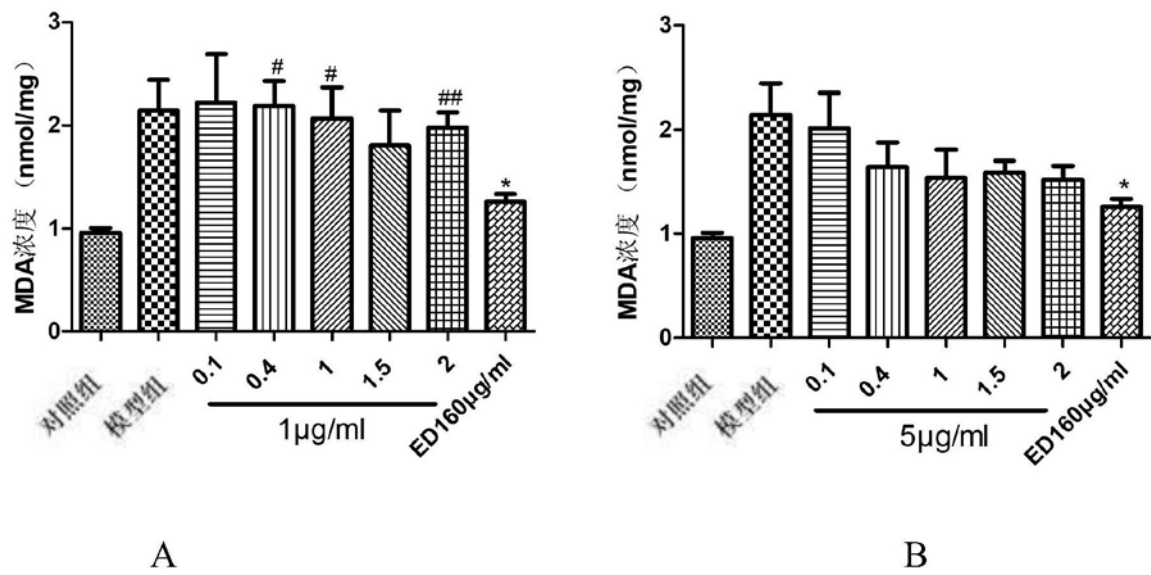


图14

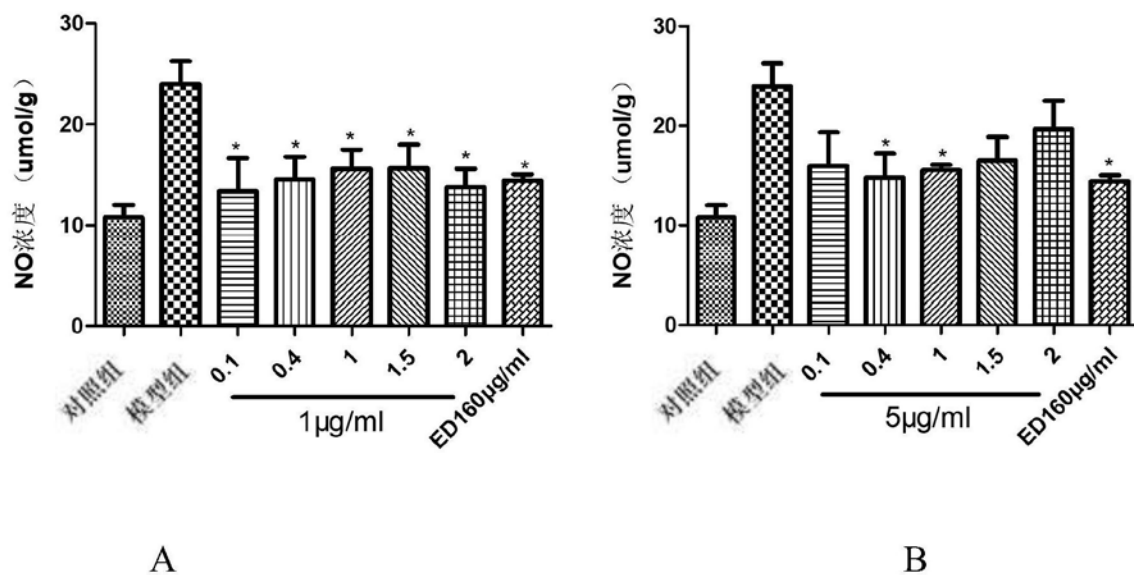


图15

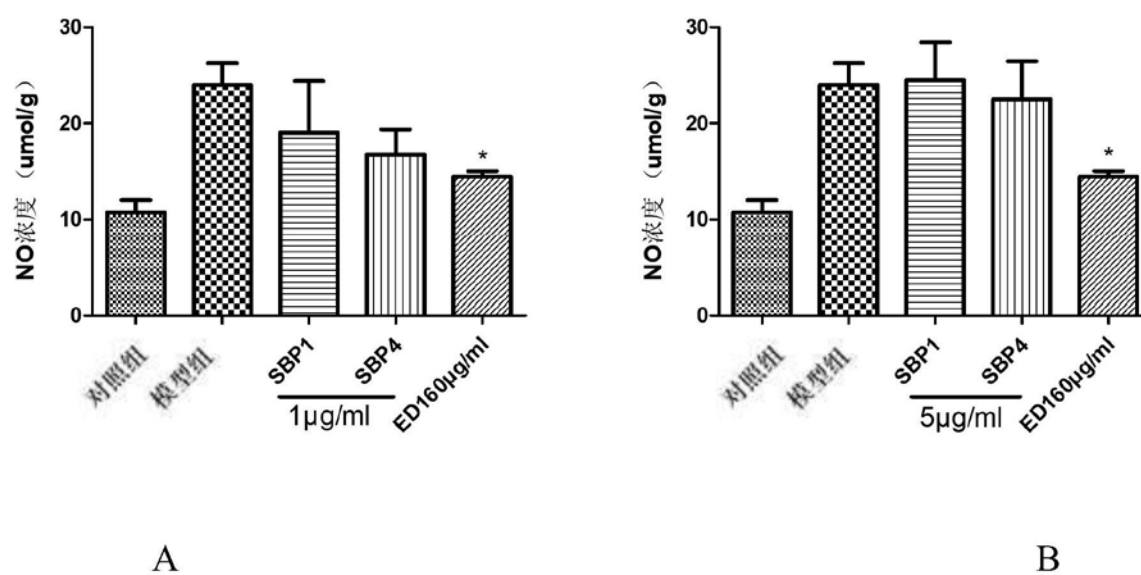


图16

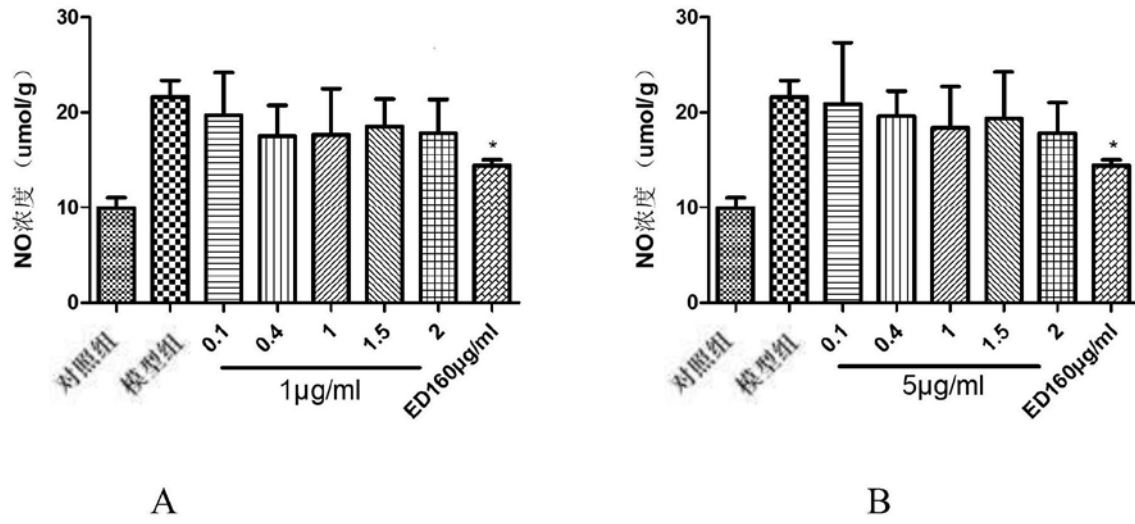


图17

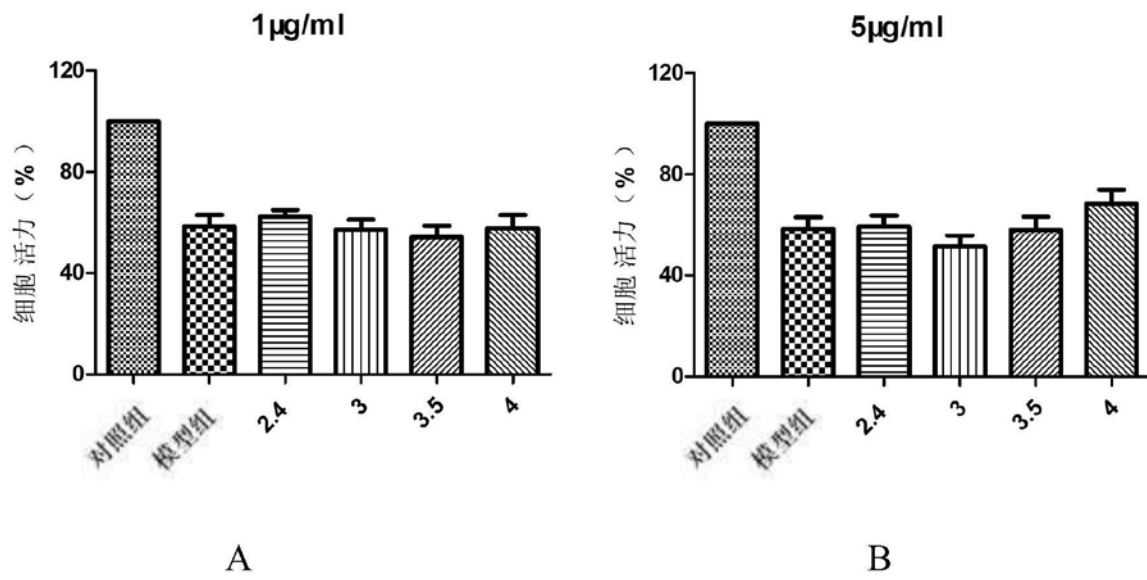


图18

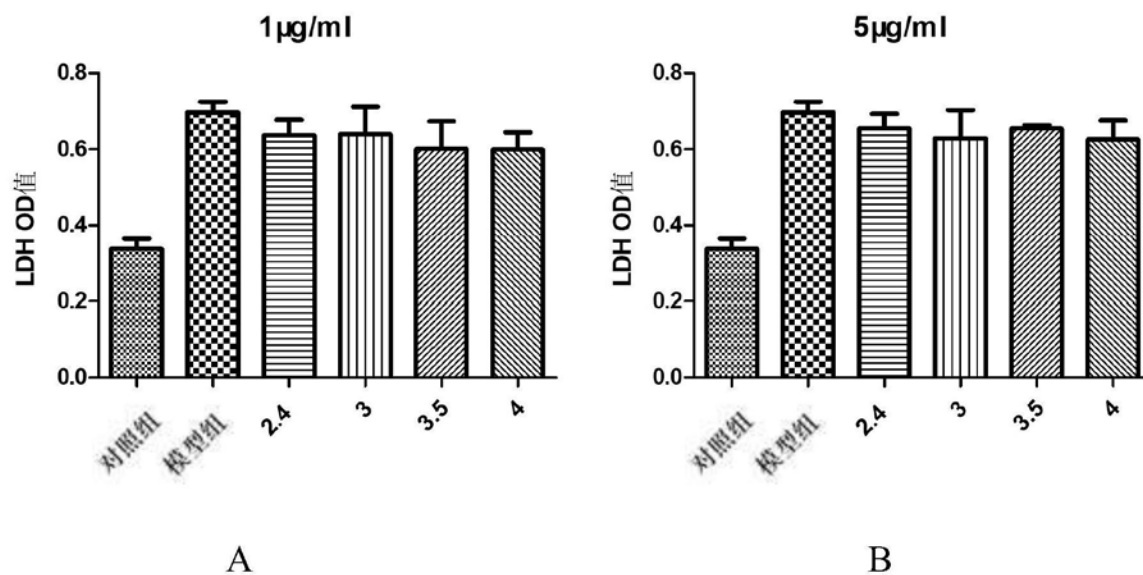


图19

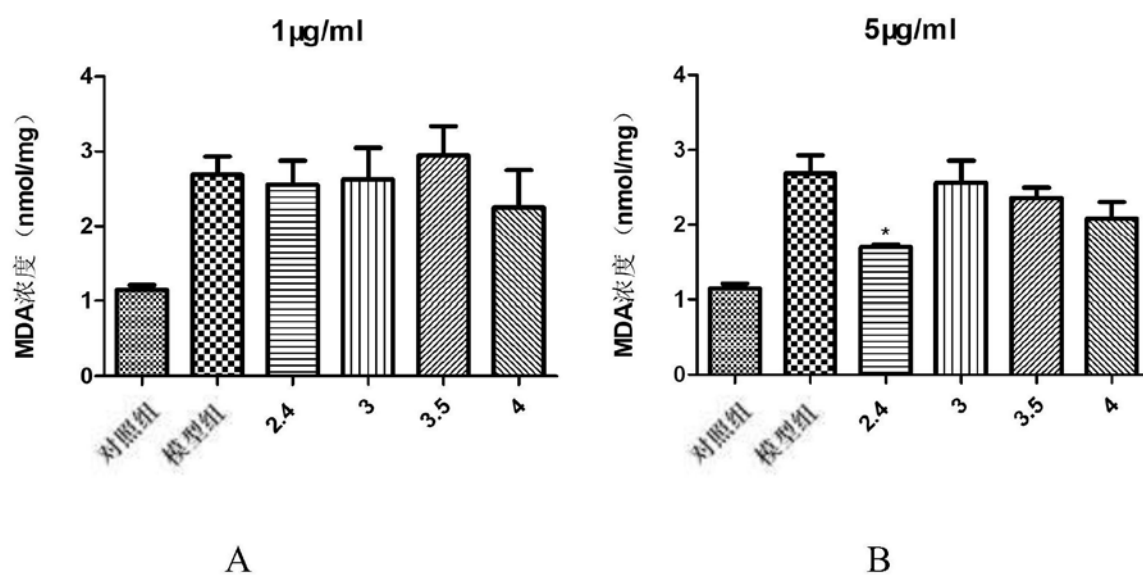


图20

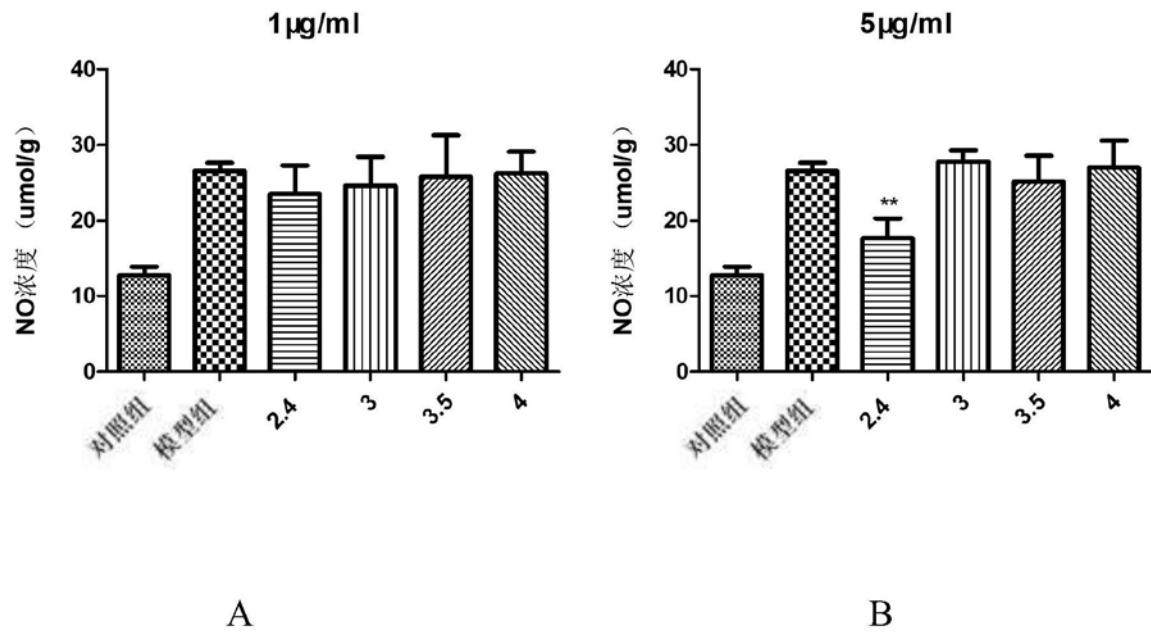


图21

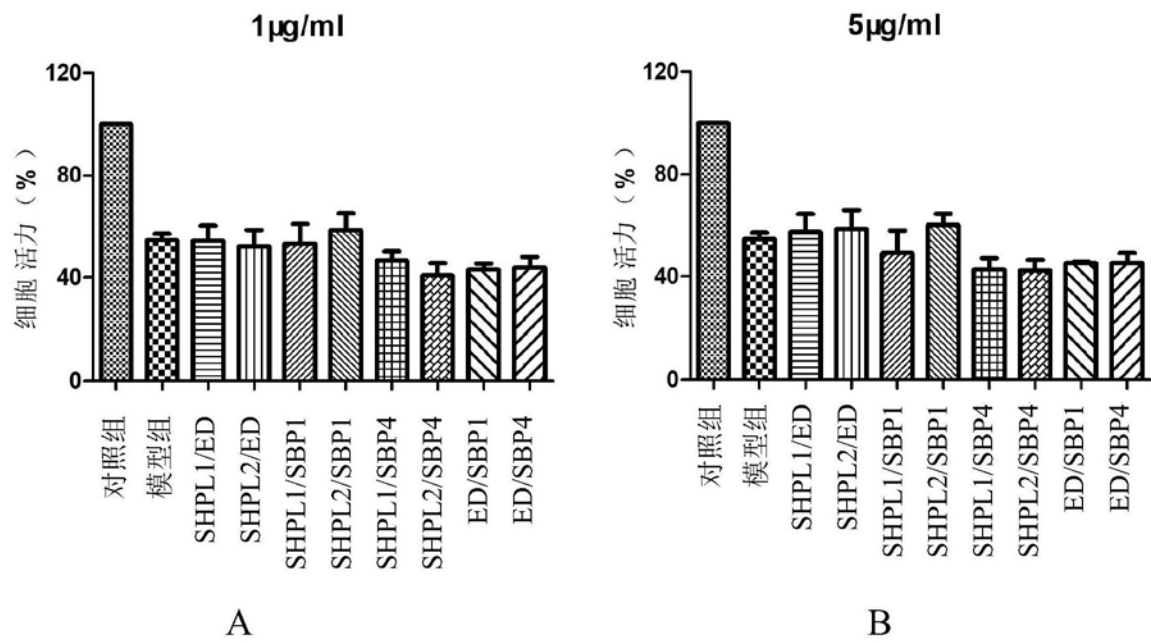


图22