



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101969969 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200880125072.1

代理人 瞿卫军

(22) 申请日 2008.12.17

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 36/185(2006.01)

10-2008-0005782 2008.01.18 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2008/007485 2008.12.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/091121 EN 2009.07.23

(71) 申请人 杨智化学(株)

地址 韩国京畿道

申请人 韩和制药(株)

(72) 发明人 玉珉镐 李廷钰 崔云善 孙正德

金钟勋 林智雄 李正根

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

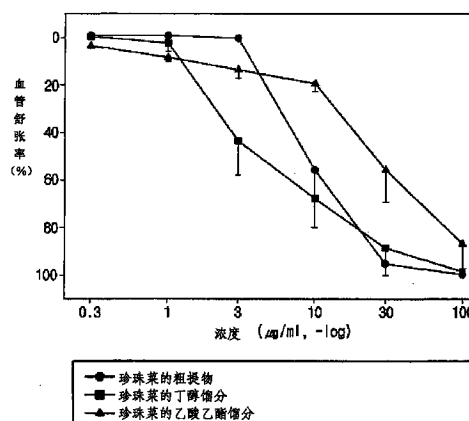
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于防治心血管疾病的含有珍珠菜提取物的组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于防治心血管疾病的组合物,所述组合物含有珍珠菜(Lysimachia clethroides)提取物。更具体地,所述珍珠菜提取物能强烈抑制作为血管病主要诱因的NAD(P)H氧化酶,并同时调节血管平滑肌的收缩和舒张,表现出强力的舒张血管效应,从而能改善血压调节以及血管内皮功能障碍。因此,含有珍珠菜提取物作为活性成分的组合物可有效地用于防治心血管疾病。



1. 一种用于防治心血管疾病的组合物,其含有珍珠菜 (*Lysimachia clethroides*) 的提取物作为活性成分。
2. 根据权利要求 1 所述的防治心血管疾病的组合物,其中所述珍珠菜的提取物为其树叶或整棵植物的提取物。
3. 根据权利要求 1 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物由选自水、C₁-C₅ 低级醇及其混合物的溶剂提取得到。
4. 根据权利要求 3 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物由 30-95wt% 的乙醇水溶液提取得到。
5. 根据权利要求 3 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物由选自水、C₁-C₃ 低级醇及其混合物的溶剂提取,并用丁醇再提取得到。
6. 根据权利要求 3 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物由选自水、C₁-C₃ 低级醇及其混合物的溶剂提取,浓缩后得到粗提物,将粗提物悬浮于水中,按己烷、乙酸乙酯和丁醇的顺序进行再提取。具有 NAD(P)H 氧化酶抑制活性。
7. 根据权利要求 1 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物具有 NAD(P)H 氧化酶抑制活性。
8. 根据权利要求 1 所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述珍珠菜的提取物具有血管舒张作用。
9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的防治心血管疾病的组合物,其中,所述心血管疾病选自下组:充血性心脏病、冠状动脉疾病(心脏病)、缺血性心脏疾病(心肌缺血)、高脂血症、动脉硬化、高血压、低血压、心律失常、心力衰竭、血管再狭窄、脑血管疾病(中风、老年痴呆症)、周围性血管疾病和代谢性疾病。
10. 用于预防心血管疾病的功能保健食品,含有珍珠菜的提取物作为活性成分。

用于防治心血管疾病的含有珍珠菜提取物的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于防治心血管病的含有珍珠菜 (*Lindera obtusiloba*) 的提取物的组合物, 以及功能保健食品。更具体地, 本发明的特点是含有珍珠菜的提取物作为活性成分, 所述提取物通过直接抑制 NAD(P)H 氧化酶抑制氧化应激, 同时激活内皮型一氧化氮合酶, 从而调节血管平滑肌细胞的收缩和舒张, 具有防治心血管疾病的作用。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织的统计信息 (WHO) 的报告, 1999 年, 世界范围内心血管疾病的死亡率为 30% 或更高, 到 2010 年, 在发达国家心血管疾病将成为致死率排名第一的疾病, 而在亚洲国家包括日本、韩国等, 心血管疾病的增长率尤其高。人们推测这是由于冠状动脉疾病的危险因素增加所致, 是正在到来的老龄化社会、饮食习惯的改变等因素导致的结果。

[0003] 内皮功能障碍是诱导范围广泛的心血管疾病包括高血压、动脉硬化、高血脂、糖尿病、肥胖等的主要机制 (Brunner H. 等, *J. Hypertens.*, 2005, 23 :233-246), 在 1990 年, 人们就已经发现高血压患者的血管异常舒张 (Panza JA 等, *New England Journal of Medicine*, 323 :22-27, 1990)。内皮细胞为沿着血管和淋巴管腔排列的上皮细胞, 其主要功能为生成血管舒张物质和血管舒张介质以调节血管张力和结构。

[0004] 心血管疾病开始时表现为内皮功能障碍并最终导致心脏和血管系统异常。心血管疾病是心脏和血管中的一组异常的泛称, 包括但不限于, 动脉硬化、高血压、高脂血症、冠状动脉疾病 (心脏病)、脑血管疾病 (中风、老年痴呆症), 周围性血管疾病、心律失常、心力衰竭、充血性心脏病、心肌疾病, 等等。

[0005] 对于导致心血管疾病的主要因素, 已知的多种因素为例如遗传因素、生活方式、以及糖尿病并发症。从现代医学的角度看, 已知还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶活性增加导致活性氧 (ROS) 和血管的氧化应激增加, 以及内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 减少导致一氧化氮减少为主要因素。由内皮型一氧化氮合酶生成的一氧化氮是一种强力血管舒张因子, 通过抑制血小板聚集、血管平滑肌细胞增殖、单核细胞的血管粘附, 以及动脉粥样硬化相关蛋白的表达而在心血管系统的整体稳态调节中起到决定性作用 (Forstermann 等, *Circulation*, 113 :1708-1714, 2006)。然而, 多种因子导致的负责生成血管中活性氧的 NADPH 氧化酶的增加导致一氧化氮生成的减少 [Gryglewski 等., *Nature*, 320 :454-456, 1986 ;Paravicini 等, *Circulation Research*, 91 :54-61, 2002 ;Dusting 等, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25 :S34-41, 1998], 而且因此生成的活性氧调节粘附分子的表达 [Lo 等, *Am. J. Physiol.*, 264 :L406-412, 1993], 刺激血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖和迁移 [Griendling and Ushio-Fukai, *J. Lab. Clin. Med.*, 132 :9-15, 1998], 调节具有氧化能力的脂蛋白等等, 从而导致心血管疾病 [Lynch and Frei, *J. Lipid Res.*, 34 :1745-1753, 1993]。此外, NAD(P)H 氧化酶引起的血管中活性氧生成增加, 与具有动脉粥样硬化和冠状动脉疾病的临床风险因素的患者内皮一氧化氮 (NO)

的功能削弱有关。基本上,活性氧的产生导致血管收缩 [Guzik 等, *Cir. Res.*, 86 :E85-90, 2000]。

[0006] 一般来说,通过直接抑制 AD(P)H 氧化酶造成的活性氧减少、下游活性氧的产生的抑制,以及内皮型一氧化氮合酶的活性诱导被认为是心血管防治中非常重要的靶标 [Forstermann 等, *Circulation*, 113 :1708-1714, 2006 ;Doggrell SA, *Drug News Perspect.*, 17(9)615-632, 2004 ;Inoguchi T., *Curr. Drug Targets*, 6(4) :495-501, 2005 ; Muzaffar S. 等, *Trends Cardiovasc Med.*, 15(8) :278-282]。

[0007] 迄今为止,已知二亚苯基碘鎓 (DPI) 和 4- 羟基 -3- 甲氧基苯乙酮 (夹竹桃麻素) 为抑制 NAD(P)H 氧化酶的物质 [Holland J, 等, US5902831]。然而,因为毒性和专一性问题,这些物质尚未投入商用或临床应用。此外,作为一氧化氮调节剂,可用的有硝普钠和硝酸甘油。然而,因为临床应用中出现的抵抗和毒性问题,这些物质也仅在紧急情况下,例如心脏病发作时使用。

[0008] 同时,珍珠菜为多年生报春花科植物,是一种通常长在阳光底下的多年生草本植物。它长到 50 至 100 厘米高,并以野生状态生长于朝鲜全境以及生长于日本、满洲诸省和中国。它也被称为鹅颈珍珠菜,已知可治疗女性月经不调、白带异常、婴儿体重减轻、水肿,痢疾,擦伤、耳后疼痛等。私下里,珍珠菜已长期被用于治疗月经不调、痢疾和瘀伤。因为其强酸味,珍珠菜还可在烹调时在酸味食品中应用 [Illustrated Book of Korean Plants, by Chang-Bok Lee, 1980 ;Illustrated Book of Korean Folk Medicines, by Jong-Hee Park, 2005, Encyclopedia of Local Medicines ;Illustrated Book of Korean Medicinal Plants, by Chang-Su Yook, 1989, Natural Herbs, Healthy Herbs, Young-Han Kwon, 2006]。

[0009] 关于对珍珠菜成分的研究,已经报道了黄芪甙、异槲皮甙、山奈酚 -3-O- 芸香糖苷、山奈酚 -3-O-(2,6-di-O- 吡喃鼠李糖基吡喃葡萄糖苷)、山奈酚 -3-O-(吡喃鼠李糖基吡喃葡萄糖苷)、(3-O- 甲基 - 槲皮素 -7-O-[α -L- 吡喃鼠李糖基 (1-2)- β -D- 吡喃葡萄糖苷)、(-)- 表儿茶素,槲皮素 -3-O- β -D- 吡喃葡萄糖苷、山奈酚 -3-O- β -D- 吡喃葡萄糖苷、和山奈酚 -3-O-[α -L- 吡喃鼠李糖基 (1-6)- β -D- 吡喃葡萄糖苷] (Yasukawa K., 等, *Yakugaku Zasshi*, 106, 939, 1986 ;Jin-Suk Kim, 等, *Yakhak Hoeji*, 4, 325-330, 1993)。已报道了珍珠菜的提取物和分离成分的药理作用为对食物中毒相关的微生物均有抗菌活性、还具有抗癌活性、抗氧化作用等 (Ji-Sook Han, 等, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 33, 772-783, 2001 ;Ki-Hwan Bae, 等, *Korean Journal of Pharmacognosy*, 27, 173-177, 1996 ;Seung-Eun Lee, 等, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 47, 265-269, 2004)。

[0010] 然而,然而,上述文献未曾披露或教导珍珠菜提取物通过抑制 NADPH 氧化酶而具有抑制血管氧化应激、直接舒张血管、增强内皮型一氧化氮合酶活性以及调节血压的作用。据 Seung-Eun Lee 等 (*J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 47, 265-269, 2004) 的报道,珍珠菜抑制血管紧张素转化酶的活性。然而,该文章披露了尽管粗提物的浓度很高,高达 4000 μ g/ml, 该提取物对血管紧张素转化酶仅有轻微抑制活性。此外,以此得出的结论是,珍珠菜的正丁醇馏分对血管紧张素转化酶的活性未施加任何影响,相反增加了其活性 (增加 34%)。

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本发明人使用了大量植物提取物对抑制 NAD(P)H 氧化酶的活性和舒张作用进行研究,并最终确证了强烈抑制 NAD(P)H 氧化酶活性、减少血管的氧化应激、直接增强内皮型一氧化氮合酶的活性、舒张血管和调节血压的效果,从而完成了本发明。

[0013] 具体而言,与 Seung-Eun Lee 等报道的相比,本发明证实了珍珠菜的粗提物在低浓度下,低于 10 μ g/ml 时,无论血管紧张素转化酶如何作用,对血管舒张有直接作用。此外发现,在采用正丁醇馏分时,前述作用得到增强。

[0014] 基于上述发现设计了本发明,,本明的目的是提供一种防治心血管疾病的组合物,其包括珍珠菜提取物作为活性成分。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种防治心血管疾病的保健食品,其包括珍珠菜提取物作为活性成分。

[0016] 技术方案

[0017] 为了实现上述目的,用于防治心血管疾病的组合物具有下述特点:含有珍珠菜的提取物作为活性成分。

[0018] 所述珍珠菜的提取物优选从珍珠菜的树叶或整棵植物中提取得到。

[0019] 所述珍珠菜的提取物优选由选自水、C₁-C₅ 低级醇及其混合物的溶剂提取得到。

[0020] 此外,C₁-C₅ 低级醇优选为甲醇、乙醇或丁醇。

[0021] 所述珍珠菜的提取物优选由 30-95wt % 的乙醇水溶液提取得到。

[0022] 优选所述珍珠菜的提取物由选自水、C₁-C₃ 低级醇及其混合物的溶剂提取,并用丁醇再提取得到。

[0023] 还优选珍珠菜的提取物由选自水、C₁-C₃ 低级醇及其混合物的溶剂提取,浓缩后得到粗提物,将粗提物悬浮于水中,按己烷、乙酸乙酯和丁醇的顺序进行再提取。

[0024] 珍珠菜的提取物优选在 30-95℃ 下获得。

[0025] 优选粗提物和水以体积比 1 : 5-25 混合并悬浮。

[0026] 还优选己烷、乙酸乙酯或丁醇与悬浮液以体积比 1 : 0.1-2.0 混合提取。

[0027] 所述丁醇优选为正丁醇。

[0028] 所述珍珠菜的提取物的特点是具有 NAD(P)H 氧化酶抑制活性。

[0029] 所述珍珠菜的提取物的特点是具有血管舒张效用。

[0030] 所述珍珠菜的提取物的特点是具有增强内皮型一氧化氮合酶活性的效用。

[0031] 所述珍珠菜的提取物的特点是具有降低血压和减少血管氧化应激的作用。

[0032] 所述心血管疾病可选自下组:充血性心脏病、冠状动脉疾病(心脏病)、缺血性心脏病(心肌缺血)、高脂血症、动脉硬化、高血压、低血压、心律失常、心力衰竭、血管再狭窄、脑血管疾病(中风、老年痴呆症)、周围性血管疾病和代谢性疾病。

[0033] 同时,防治心血管疾病的保健食品的特点是含有珍珠菜提取物作为活性成分。

[0034] 有益效果

[0035] 如上所述,本发明的珍珠菜提取物能强烈抑制作为血管病主要病因的 NAD(P)H 氧化酶,同时显示出强效的舒张血管效应,因此可用于防治心血管疾病的药物组合物或功能性保健食品。

附图说明

- [0036] 图 1 示出了珍珠菜提取物对猪冠状动脉的血管舒张作用的测定图谱；
- [0037] 图 2 示出了珍珠菜提取物对白色大鼠主动脉的血管舒张作用的测定图谱；
- [0038] 图 3 示出了在珍珠菜提取物作用下，内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和 Akt 蛋白的活性水平的测定图谱；
- [0039] 图 4 示出了珍珠菜提取物对心率的影响水平的测定图谱；
- [0040] 图 5 示出了在珍珠菜提取物作用下，血管氧化应激减少水平的测定图谱；
- [0041] 图 6 示出了珍珠菜提取物的细胞毒水平的测定图谱。

具体实施方式

[0042] 以下将具体描述本发明的优选实施方案。下面对各种特征术语例如具体的组成要素进行了详细说明，但这些只是为了更全面的理解本发明，本领域技术人员容易知道没有这些特征术语也可以实施本发明。此外，在本发明的描述中，如果任何相关的已知功能或组成的具体解释被认为是不必要地使本发明不清楚，则这个具体的解释应予以删除。

[0043] 本发明的珍珠菜提取物可由如下方式获得。

[0044] 可使用整棵珍珠菜，包括根和地上部分，来源形式不限，可以是自然界收集的植物、培育的植物、市售获得的植物等等。提取用的溶剂选自水、C₁-C₅ 低级醇及其混合物。本发明的发明人对珍珠菜的叶子和树枝进行了清洗以去除杂质和盐并对其进行干燥。随后，用极性溶剂例如水或 C₁-C₅ 低级醇例如甲醇、乙醇或丁醇或其混合物进行提取，混合溶剂的混合比例为约 1 : 0.1-1 : 10，优选使用 30-95wt% 的乙醇水溶液，溶剂的体积约为珍珠菜样品的 5-50 倍，优选 10-30 倍，在 50-95℃ 下提取 1 小时-7 天。重复上述的提取步骤 2-5 次，然后将所得产物减压浓缩和 / 或冻干，得到珍珠菜粗提物。

[0045] 在本发明的提取物中，通过下述步骤可获得非极性溶剂可溶的提取物：将前述粗提物悬浮于蒸馏水中，随后加入相当于悬浮液体积 0.1-100 倍，优选 1-5 倍的非极性溶剂例如己烷、乙酸乙酯或氯仿，提取分离 1-10 次，优选 2-5 次。此外，可再进行常规的分馏步骤 (Harborne, J. B., *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., pp. 6-7, 1998)。

[0046] 更优选地，将前述步骤获得的珍珠菜粗提物，优选地，珍珠菜的乙醇水溶液提取物用有机溶剂，例如正丁醇、己烷和乙酸乙酯进行顺序溶剂分提，溶剂的使用顺序为溶剂极性由低至高，优选的顺序为己烷、乙酸乙酯和正丁醇，然后减压浓缩，从而获得己烷、乙酸乙酯和正丁醇馏分。

[0047] 本发明提供防治心血管疾病的组合物，其含有由上述方法获得的珍珠菜粗提物或非极性溶剂可溶的提取物作为活性成分。

[0048] 本发明的防治心血管疾病的组合物按重量计含有 0.1-99% 上述提取物，基于该组合物的总重量。

[0049] 含有本发明珍珠菜提取物的组合物还可含有组合物制备中常用的合适的载体、赋形剂和稀释剂。

[0050] 本发明的提取物的药物剂型可以药用盐的形式使用，也可单独使用，或与其它药物活性化合物适当组配以复合物的形式使用。

[0051] 含有本发明提取物的药物组合物可根据常规方法分别制备成口服制剂例如粉末、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液、乳液、糖浆和气雾剂,也可制成局部制剂、栓剂和无菌注射液后使用。

[0052] 至于可包含于含提取物的组合物的载体、赋形剂和稀释剂,可提及的有乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、非结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁,及矿物油。

[0053] 就制剂的配制而言,可使用常规使用的稀释剂或赋形剂,例如填充剂、膨胀剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂。

[0054] 口服固体制剂的示例包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊等,这些固体制剂通过混合至少一种赋形剂例如,淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等前述提取物中制得。此外,除了简单的赋形剂之外,也可使用乳化剂例如硬脂酸镁和滑石粉。

[0055] 口服液体制剂的示例包括悬浮液、内用液体、乳液、糖浆等。这些液体制剂可包括各种赋形剂,例如,润湿剂、甜味剂、香精、防腐剂等,此外,水和液体石蜡是常规使用的简单稀释剂。

[0056] 胃肠外给药的制剂的示例包括菌水溶液、非水溶液、悬浮液、乳液、冻干制剂和栓剂。作为非水溶剂或悬浮剂,可使用丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、注射酯如油酸乙酯等。作为栓剂的底料,半合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇、吐温、可可黄油、月桂精脂肪(laurin fat)、甘油明胶等均可使用。

[0057] 本发明提取物优选的给药剂量可根据患者体重、疾病的严重程度、药物剂型、给药途经和周期变化有所不同,但可由本领域技术人员对此进行适当的选择。然而,为了得到更好的效果,施予本发明提取物的理想的剂量为每天 0.0001-100mg/kg,优选 0.001-100mg/kg。可一天给药一次或一天给药七次。给药剂量绝不限于本发明的范围。

[0058] 本发明提供一种功能保健食品,其含有具有预防心血管疾病作用的前述提取物,和可食用的食品添加剂。

[0059] 对于可添加珍珠菜提取物的功能保健食品。例如,可提及各种普通食品、饮料、口香糖、茶叶、维生素复合物等。

[0060] 为了获得预防心血管疾病的效果,也可将珍珠菜提取物添加到食品或饮料中。在这种情况下,食品或饮料中的提取物含量基于食品的总重量为 0.01-15%。保健饮料中的提取物含量相对于饮料的总重量 100g 可为 0.02-5g,优选 0.3-1g。

[0061] 本发明的功能保健饮料组合物除了含有指定比例的提取物作为必需成分外,对含有的其它组分并不特别限定,其可含有其它成分,例如传统饮料常用的各种芳香剂或天然碳水化合物。上述天然碳水化合物的示例包括常见的糖,例如单糖,例如葡萄糖,果糖等,双糖,例如麦芽糖,蔗糖等,以及多糖,如糊精,环糊精等,和糖醇例如木糖醇、山梨醇和赤藓糖醇。除了前述的试剂之外,可作为芳香剂善加使用的还有奇异果甜蛋白、甜叶菊提取物,例如莱鲍迪甙 A(levauidoside A)、甘草酸等;以及合成的芳香剂,如,糖精、阿斯巴甜等。碳水化合物的比例通常为每 100 克本发明的组合物,约 1 至 20 克,优选约 5 至 12 克。

[0062] 除了这些,本发明的提取物可含有各种营养素、维生素、矿物质(电解质)、合成和天然芳香剂、着色剂和加重剂(奶酪、巧克力等)、果胶酸及其盐、藻朊酸及其盐、有机酸,保

护性胶体增稠剂、pH值调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇,用于碳酸饮料的碳酸化剂等等。除了这些之外,本发明的提取物可含有天然果汁、以及制备果汁饮料和蔬菜饮料用的果肉。这些成分可以单独或组合使用。在这种情况下,添加剂的比例并不重要,但通常选择每 100 重量份本发明的提取物,含 0.01 至约 20 份添加剂。

[0063] 以下,将参照下述实施例和实验例对本发明作更具体地描述。

[0064] 实施例 1:珍珠菜粗提物的制备

[0065] 将从江原道 (Kangwon-do) 省采集的珍珠菜用水冲洗去除杂质。然后干燥粉碎。在提取容器中,加入 25g 粉碎的珍珠菜,和总量 500ml70wt% 的乙醇水溶液,在回流冷却下于 70℃ 进行热提取,重复三次,每次三小时。所得产物用滤纸过滤,并将滤液在 40℃ 水浴中减压浓缩并冻干。结果,得到了 5.3g 珍珠菜粗提物。

[0066] 实施例 2:珍珠菜粗提物的馏分的制备

[0067] 将实施例 1 获得的珍珠菜粗提物,每份 5g,分别悬浮于 50ml 纯净水中,按己烷、乙酸乙酯和正丁醇的顺序,每种溶剂 50ml,对所得产物分别进行顺序溶剂分提,提取三次,分别得到各溶剂的馏分,将这些馏分减压浓缩。结果得到了珍珠菜的己烷馏分、乙酸乙酯馏分和正丁醇馏分。

[0068] 实验例 1:珍珠菜粗提物对 NAD(P)H 氧化酶活性的抑制效果的测定

[0069] 对上述实施例 1 和实施例 2 得到的珍珠菜粗提物和馏分抑制 NAD(P)H 氧化酶活性的效果进行测定,NAD(P)H 氧化酶为心血管疾病发展的指标酶。为实现此目的,采用大白鼠的动脉平滑肌细胞(大鼠动脉平滑肌细胞;RASMC)和牛血管内皮细胞(牛主动脉内皮细胞;BAECs)比较 NAD(P)H 氧化酶活性的变化。结果参见表 1。首先,将动脉平滑肌细胞和血管内皮细胞分别与 MEM(最基本培养基)、DMEM(Dulbecco's 最基本培养基)和 10% FBS(胎牛血清)溶液混合,并将这些细胞在 5% CO₂/37℃ 条件下分别置于 96 孔板中培养 24 小时。然后在不含 FBS 的培养液中再培养 24 小时。稳定细胞后,将其用 HBSS(Hank's 平衡盐溶液)冲洗。将这些细胞与实施例 1 获得的珍珠菜提取物一起振荡,然后使所得混合物反应 15 分钟,再用 HBSS 冲洗。随后,向反应液中加入 100mM NAD(P)H 和 5 μM 光泽精 (Lucigenin),使用荧光读数器 (Victor Light, PerkinElmer) 测量 NAD(P)H 氧化酶的活性 1 小时。本实验重复 3 次,而每次操作重复 2-7 次。随后比较对照组和样品处理组的活性,计算 IC₅₀ 值。IC₅₀ 值为实验材料的浓度,以 μg/ml 表示,在此浓度下,50% NAD(P)H 氧化酶活性受到抑制。

[0070] **【表 1】**

[0071] 珍珠菜提取物对 NAD(P)H 氧化酶活性的抑制效果(单位:μg/ml)

[0072]

	IC ₅₀ (BAECs)	IC ₅₀ (RASMC)
珍珠菜的树枝粗提物	3.6	4.6
珍珠菜的丁醇馏分	3.6	2.2
珍珠菜的乙酸乙酯馏分	3.5	1.8

珍珠菜的己烷馏分	20.2	6.2
----------	------	-----

[0073] 如表 1 所示,可以看出本发明的珍珠菜粗提物在抑制血管细胞的 NAD(P)H 氧化酶活性方面具有极好的效果。此外,在这些馏分中,可以看到正丁醇提取物显示出极好的效果。

[0074] 实验例 2:珍珠菜提取物的血管舒张作用的测定(冠状动脉和主动脉)

[0075] 对实施例 1 和实施例 2 制备的珍珠菜粗提物和馏分的血管舒张作用进行确证。为实现此目的,对猪心脏的冠状动脉和大鼠主动脉的舒张作用进行了比较,结果示于表 1、表 2(冠状动脉)和表 3(主动脉)。冠状动脉取自屠宰场宰杀后即刻购买得到的猪心脏。主动脉取自雄性 SD(Sprague-Dawley) 大白鼠,将其浸在含有 18mM NaCl,4.7mM KCl,1.1mM MgSO₄,1.2mM KH₂PO₄,1.5mM CaCl₂,25mMNaHCO₃ 和 10mM 葡萄糖的 Krebs 溶液中 (pH7.4) 以去除结缔组织和脂肪,然后切成长度约为 3mm 的样品。

[0076] 将制备的冠状动脉和主动脉样品固定于 37℃ 的 Krebs 溶液中,该溶液已用 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体充饱和。用装配有压力移动传感器 (Hugo Sachs, Germany) 的 Grass 生理记录仪 (Grass physiograph) (Hugo Sachs, Germany) 测量样品的等长张力。对于冠状动脉,首先使用 U46619 (1-60nM),一种血栓素衍生物,将动脉收缩至最大血管收缩的 80%。这之后 10 分钟,用 10 μM 乙酰胆碱舒张主动脉,测定血管内皮细胞的安全性。然后用 Krebs 溶液冲洗主动脉三次以进行试验。通过下述步骤测量血管舒张作用的变化:首先用药物 U46619 收缩动脉,然后以浓度依赖性的方式测定珍珠菜提取物诱导的舒张反应。

[0077] 对于大白鼠的主动脉,用苯肾上腺素将主动脉收缩至最大血管收缩的 80%。这之后 15 分钟,用 300nM 缓激肽 (Bradykinin) 舒张动脉,测定血管内皮细胞的安全性。然后用 Krebs 溶液冲洗动脉三次以进行试验。通过下述步骤测量血管舒张作用的变化:首先用药物苯肾上腺素收缩主动脉,然后以浓度依赖性的方式测定珍珠菜粗提物和馏分提取物诱导的舒张反应。采用取自 5-10 个不同个体的血管重复进行实验。ED50 值是指样品的浓度 (μg/ml),在此浓度下,用样品处理的结果为收缩的血管显示出 50% 的血管舒张作用。

[0078] 【表 2】

[0079] 珍珠菜提取物对猪冠状动脉的舒张作用 (单位: μg/ml)

[0080]

	ED50
珍珠菜的粗提物	9.4
珍珠菜的丁醇馏分	5.0
珍珠菜树叶的乙酸乙酯馏分	26.8

[0081] 【表 3】

[0082] 珍珠菜提取物对大白鼠主动脉的舒张作用 (单位: μg/ml)

[0083]

	ED50
珍珠菜粗提物	2.8

[0084]

珍珠菜的丁醇馏分	2.5
珍珠菜的乙酸乙酯馏分	29.3
珍珠菜的己烷馏分	94.8

[0085] 结果示于图 1,本发明的珍珠菜提取物在浓度为 1-10 μ g/ml 时开始表现显著舒张作用,在浓度为 30 μ g/ml 时达到 96±2%舒张效果。如表 2 和表 3 所示,可以看到珍珠菜提取物具有极好的舒张冠状动脉和主动脉血管的作用。在这些馏分中,可以看到正丁醇提取物表现出极好的效果。

[0086] 实验例 3 :珍珠菜提取物对内皮型一氧化氮合酶活性作用的试验

[0087] 观察实施例 1 和实施例 2 制备的珍珠菜粗提物对增强内皮型一氧化氮合酶活性的作用。基于内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的丝氨酸残基和牛主动脉内皮细胞的 Akt 的丝氨酸残基 473 的磷酸化作用,对前述作用进行比较。结果示于图 3。

[0088] 首先,将动脉平滑肌细胞和血管内皮细胞与 DMEM(Dulbecco' s 最基本培养基) 和 10% FBS (胎牛血清) 溶液混合 并 培养,然后在不合 FBS 的培养液中再培养 24 小时。稳定细胞后,用各自浓度下的样品处理细胞,然后反应 30 分钟。接着,提取蛋白冰离心,收集上清液以去除细碎片。提取的蛋白在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后将凝胶中的蛋白用硝酸纤维膜进行印迹。用 3% BSA 封闭 1 小时后,将磷酸化 - 内皮型一氧化氮合酶 (phospho-eNOS) 和磷酸化 -Akt(phospho-Akt) (Cell Signaling, the USA) 以 1 : 1,000 的比例在 4℃下培养过夜。随后,对以 1 : 2000 比例稀释的二级抗体进行处理并在环境温度下培养 1 小时,然后,通过化学荧光使二级抗体显像。

[0089] 结果如图 3 所示,看以看到珍珠菜提取物表现出很强的增强能生成一氧化氮的内皮型一氧化氮合酶 (phospho-eNOS) 活化的作用,所述内皮型一氧化氮合酶能生成一氧化氮,并能增强上游调控因子 Akt (phospho-Akt) 的活化。

[0090] 实验例 4 :心血管疾病动物模型中的珍珠菜提取物的作用检测

[0091] 对由实施例 2 获得的珍珠菜提取物所引起的对患病动物的低血作用、改善血管氧化应激的作用以及改善内皮功能障碍的作用进行确证。为实现此目的,对由血管紧张素 2 诱导的患病动物模型的作用的程度进行比较,结果示于图 4、图 5、图 6 和表 4。

[0092] 雄性 SD (Sprague-Dawley, 6 周龄) 白色大鼠购自 Orientbio, Inc. ,并使这些大鼠适应环境一周,同时在可调节为明暗各 12 小时周期的小型动物饲喂室中随时向其供应固体饲料和水。然后将大鼠任意分为对照组和血管紧张素 2 处理组,每组包括 6 只动物。用血管紧张素 2 处理前的三天里,将实施例 2 获得的珍珠菜提取物以 100mg/kg 的浓度分别悬浮于 0.5% CMC(羧甲基纤维素) 中,经口给予该悬浮液,每天 2 次。对照组仅服用 0.5% CMC。将血管紧张素 2 以 65ng/min/kg 的浓度溶于生理盐水,并将所得溶液置于微型渗透泵

中 (Alzet Model 2002)。麻醉白色大鼠,通过切开皮肤,并将微型泵插入到肩胛区进行血管紧张素 2 处理。在开始口服给药的同时测量血压,两天测定一次,测定两周,在早晨口服给药后一小时进行。样品预先在 45-50℃ 下加热约 10 分钟,然后以非侵入方式通过尾套体积描记法采用自动血压记录系统测量最高压 (心脏收缩压)。同时测量心率。

[0093] 按实验例 2 相同的方式取主动脉,以 DHE (二氢乙锭) 引起的染色程度和乙酰胆碱诱导的舒张程度为特征测量血管氧化应激和血管内皮功能障碍的程度。将检测结果与对照组的结果进行比较。

[0094] 【表 4】

[0095] 珍珠菜提取物的低压作用 (单位 :mmHg)

[0096]

	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照	107.6	107.4	112.6
血管紧张素 2	110.3	169.6	158.3

[0097]

珍珠菜提取物	117.7	126.3	129.3
--------	-------	-------	-------

[0098] 如实验结果所示,由表 4 可以看出血管紧张素 2 诱导的测试动物的血压升高通过服用珍珠菜提取物受到显著抑制。

[0099] 测定到心率升高,结果示于图 4,证实珍珠菜提取物对心脏没有副作用,例如心跳过速。

[0100] 如图 5 所示,可以看到血管紧张素 2 诱导血管氧化应激的增加通过服用珍珠菜提取物受到显著抑制 (图 5 为照片黑白变化的产物,红色表示目标,黑色表示背景,变化时,使背景变白以更清楚地与目标区分开来)。

[0101] 将用血管紧张素 2 处理的动物中由 0.01 μ M 乙酰胆碱诱导的舒张与对照组的进行比较。发现在舒张不能顺利发生的地方发生血管内皮功能障碍 (对照组 -27%,乙酰胆碱组 -8%)。可以看出,通过服用珍珠菜提取物 (31%),内皮功能障碍得到改善。

[0102] 实验例 5:珍珠菜提取物的细胞毒检测

[0103] 对实施例 1 和实施例 2 制备的珍珠菜粗提物的细胞毒程度进行比较,结果示于图 6。

[0104] 首先,将动脉平滑肌细胞和血管内皮细胞与 MEM (最基本培养基) 和 10% FBS (胎牛血清) 溶液混合,将这些细胞在 5% CO₂/37℃ 的条件下培养 24 小时。稳定细胞后,用实施例 2 获得的珍珠菜提取物处理细胞,振荡,并反应 24 小时。此后,在 MTS 溶液 (CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega) 存在下培养细胞 1 小时,然后测量 490nm 处的吸光度。

[0105] 如图 6 所示,可以看到,未发现本发明的珍珠菜提取物对细胞的存活有影响,它是一种非常安全的药物。

[0106] 实验例 6:数据处理

[0107] 对实验结果进行 t- 检验和单向方差分析确定实验结果的显著性, p 为 0.05 或更

小时,具有显著性差异。

[0108] 下面将对含有本发明提取物的药物组合物和功能保健食品的制备例进行描述,但本发明并不限于这些制备例,只是对它们进行具体描述。

[0109] 制备例 1:粉剂的制备

[0110] 珍珠菜提取物粉末 20mg

[0111] 乳糖 100mg

[0112] 滑石 10mg

[0113] 将这些成分混合并填充到密封包中,从而制得粉剂。

[0114] 制备例 2:片剂的制备

[0115] 珍珠菜提取物粉末 10mg

[0116] 玉米淀粉 100mg

[0117] 乳糖 100mg

[0118] 硬脂酸镁 2mg

[0119] 将这些成分混合,然后按照常规的片剂制备方法制片,从而制得片剂。

[0120] 制备例 3:胶囊剂的制备

[0121] 珍珠菜提取物粉末 10mg

[0122] 结晶纤维素 3mg

[0123] 乳糖 14.8mg

[0124] 硬脂酸镁 2mg

[0125] 根据常规的胶囊剂的制备方法,将这些成分混合并填充入胶囊,从而制得胶囊剂。

[0126] 制备例 4:注射制剂的制备

[0127] 珍珠菜提取物粉末 10mg

[0128] 甘露醇 180mg

[0129] 注射用无菌蒸馏水 2794mg

[0130] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26mg

[0131] 根据常规的注射制剂的制备方法,按前述组分配比制得注射制剂,每安瓿 2ml。

[0132] 制备例 5:液体制剂的制备

[0133] 珍珠菜提取物粉末 10mg

[0134] 高果糖玉米糖浆 10g

[0135] 甘露醇 5g

[0136] 纯净水适量

[0137] 根据常规的液体制剂的制备方法,添加各成分并溶于纯净水中,向其中加入适量的柠檬芳香剂,混合各成分。加纯净水将总量调至 100ml。所得溶液填充到棕色瓶中,灭菌,从而制得液体制剂。

[0138] 制备例 6:保健饮料的制备

[0139] 珍珠菜提取物粉末 10mg

[0140] 维生素 C 15g

[0141] 维生素 E(粉) 100g

[0142] 乳酸铁 19.75g

[0143] *135 氧化锌 3.5g

[0144] 烟酰胺 3.5g

[0145] 维生素 A 0.2g

[0146] 维生素 B10.25g

[0147] 维生素 B20.3g

[0148] 水适量

[0149] 根据常规的健康饮料制备方法,混合各成分,搅拌下将所得混合物在 85℃加热约一个小时,过滤。将滤液置于 2 升容器中,密封、灭菌并冷藏,这被用于制备本发明的保健饮料。在上述配比中,将相对适于制备风味饮料的成分混合并配成优选实施例。然而,该混合比例可根据地域和种族的偏爱,例如消费阶层或消费者的国别,用途等,任意改变。

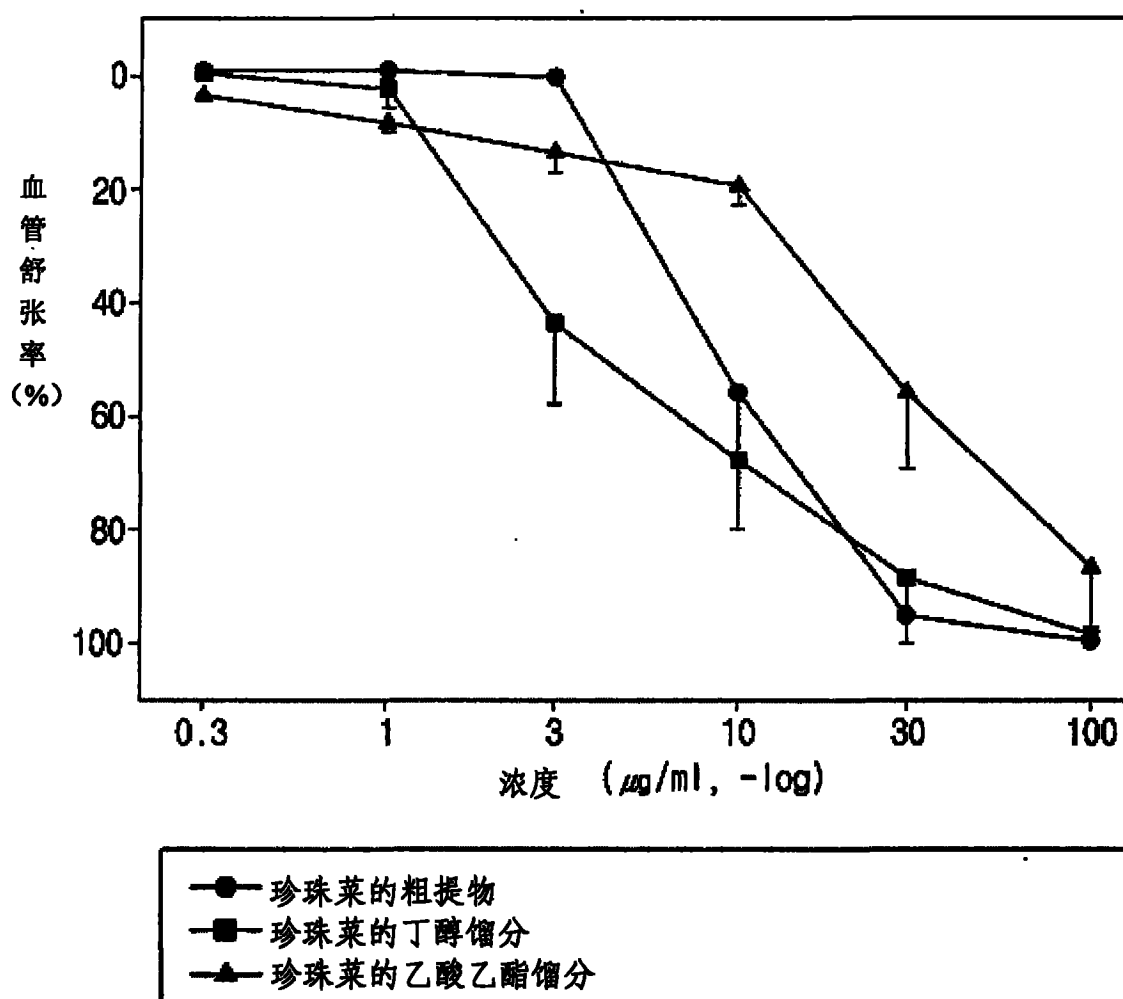


图 1

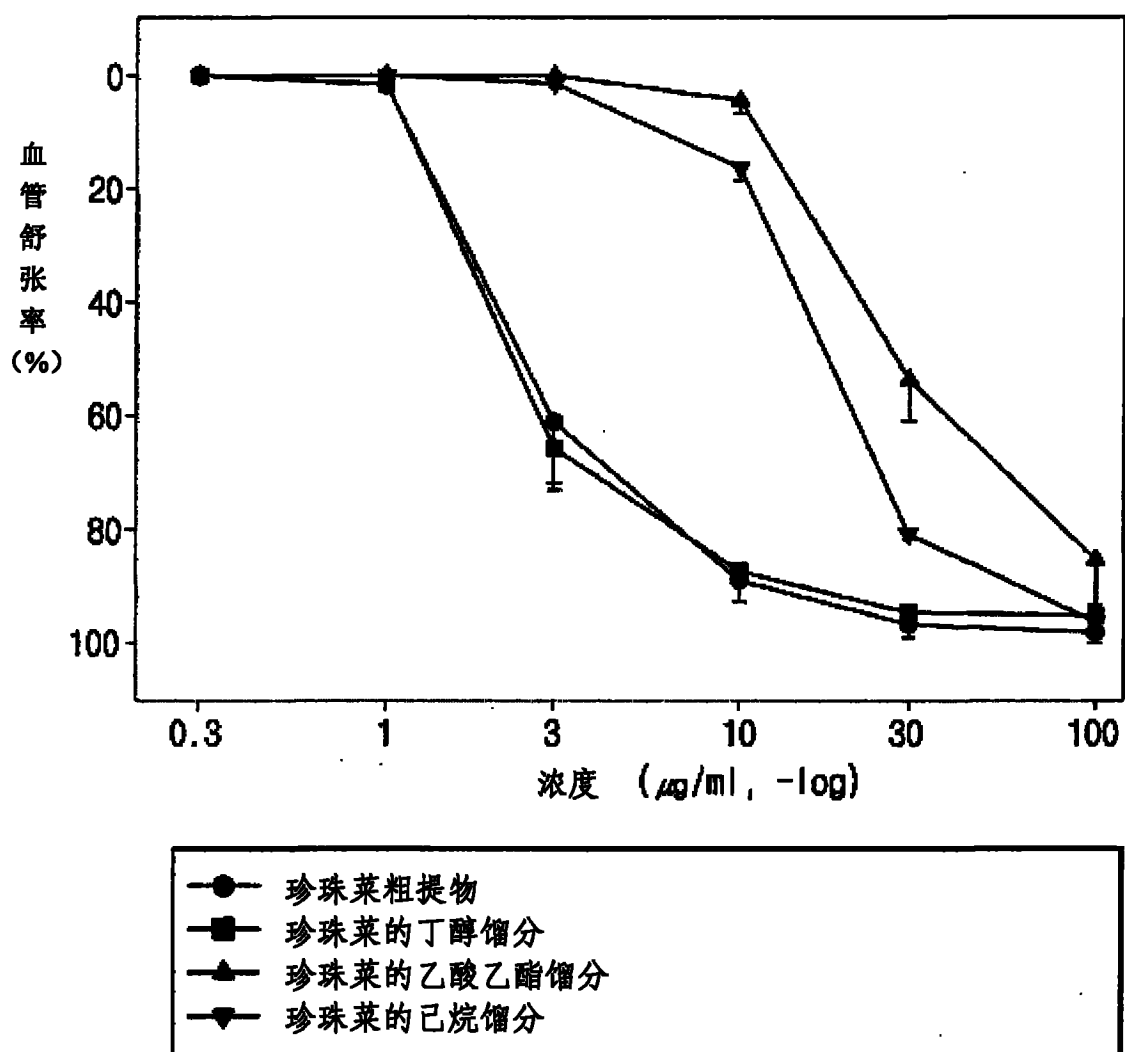


图 2

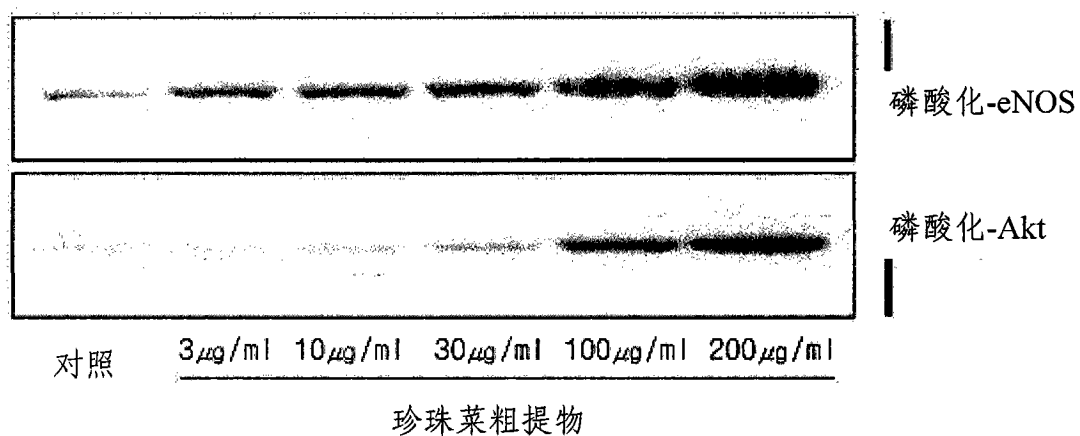


图 3

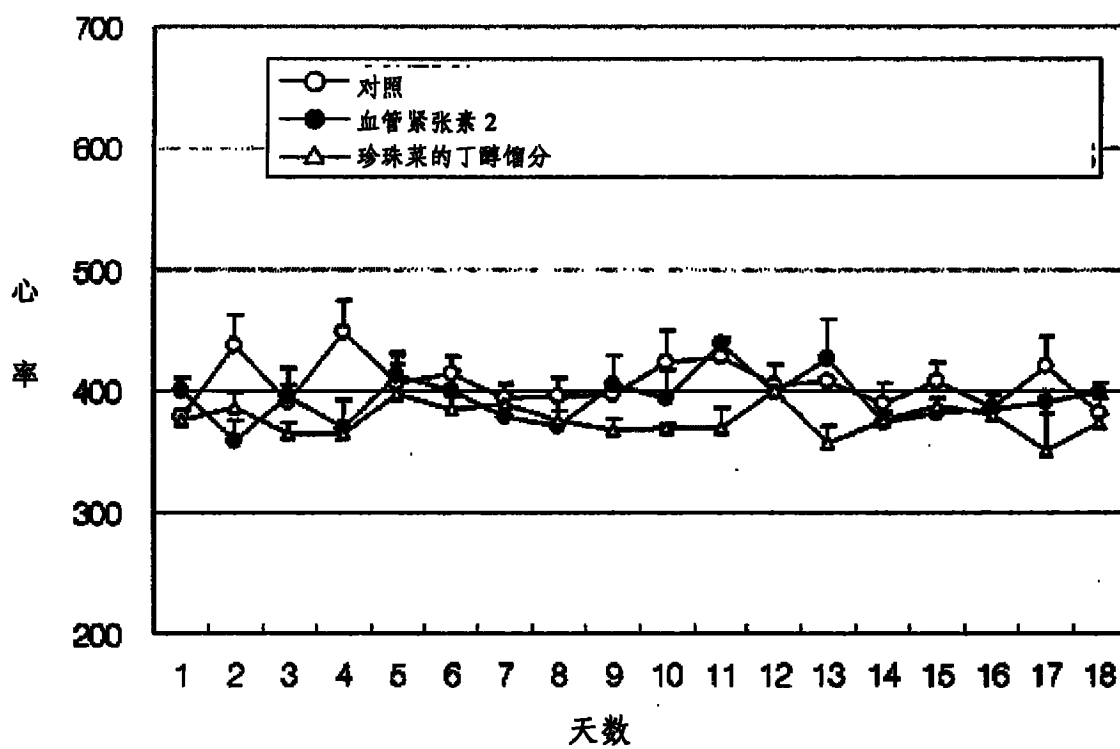


图 4

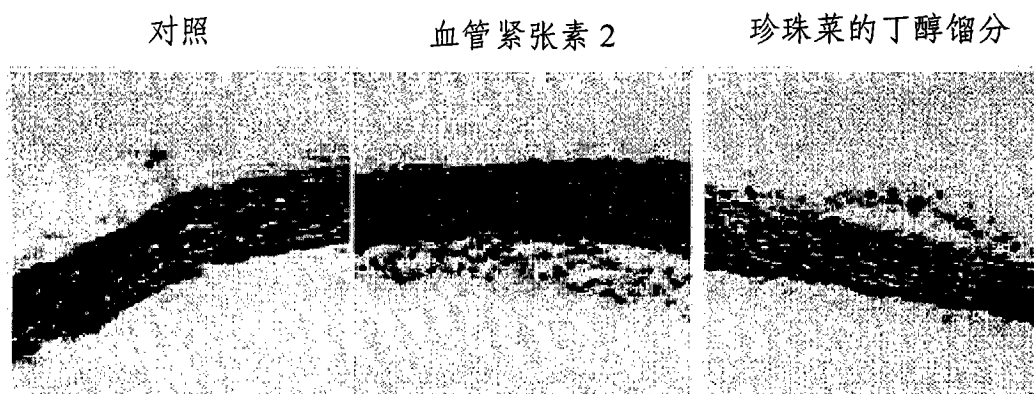


图 5

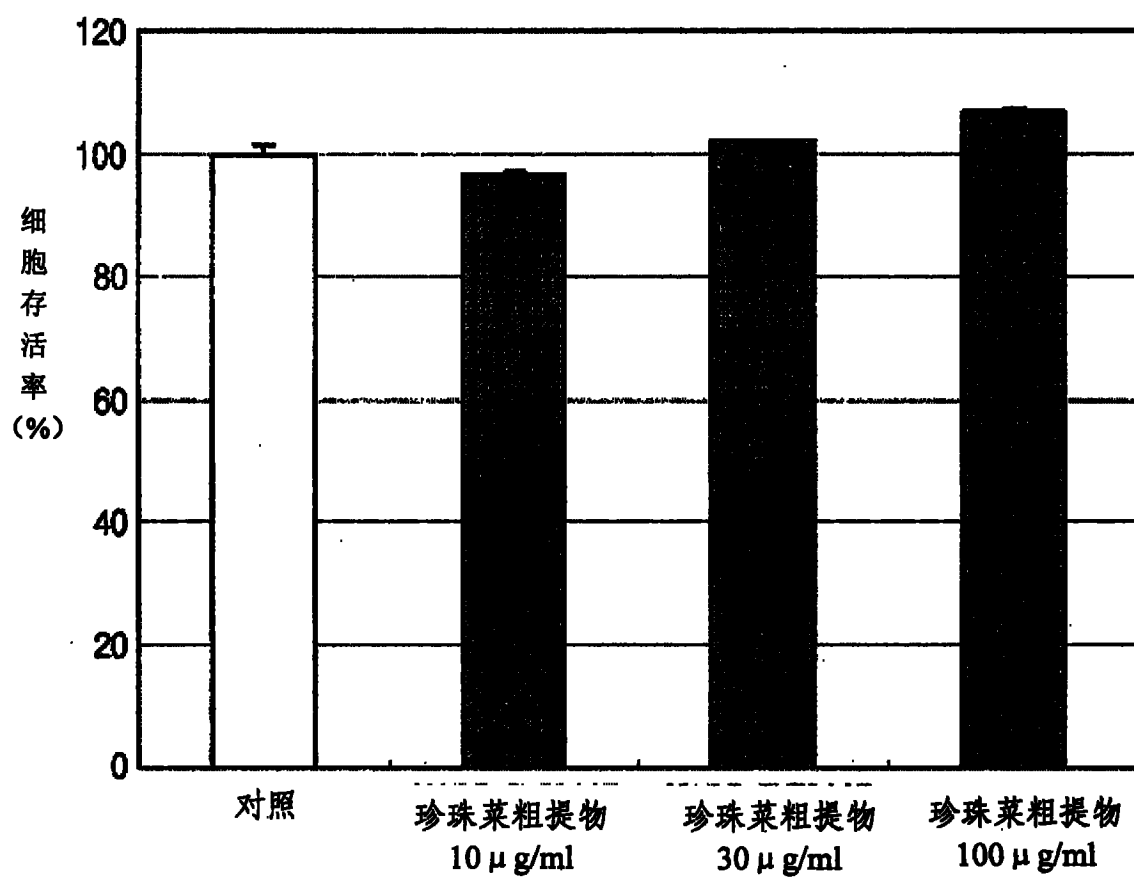


图 6