

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109597.3

[51] Int. Cl.

A61K 36/258 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 17 日

[11] 公开号 CN 1774257A

[22] 申请日 2003.12.10

[21] 申请号 200380109597.3

[30] 优先权

[32] 2002.12.10 [33] FR [31] 0215613

[86] 国际申请 PCT/FR2003/003651 2003.12.10

[87] 国际公布 WO2004/062678 法 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.9

[71] 申请人 拜尔消费者保健股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 A·卢瓦索 G·塞内 E·特龙

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 3 页 说明书 51 页

[54] 发明名称

制备富含羟基积雪草苷和特米诺苷的积雪草
酸提取物的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种制备包含羟基积雪草苷、特米诺苷和任选的积雪草皂苷的混和物的提取物的方法，制备包含超过相对于提取物总重量的 75wt% 的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物的积雪草酸提取物的方法，以及制备包含超过相对于提取物总重量的 95wt% 的羟基积雪草苷、特米诺苷的混和物的积雪草酸提取物的方法，本发明还涉及它们在调节炎性机制方面的应用。

1. 一种制备包含羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物的积雪草酸提取物的方法，其特征在于包括以下步骤：

- 5 a). 通过醇性溶剂提取积雪草酸的地上部分；
 b). 将步骤 a) 得到的醇溶液通过阴离子树脂；
 c). 将步骤 b) 得到 的洗脱液通过液/液提取进行选择脱脂；
 d). 浓缩脱脂的水-醇相，并连续过滤得到水相；
 e). 步骤 d) 得到的水相连续通过阳离子树脂，并随后通过阴离子
10 树脂；
 f). 通过加入醇稳定步骤 e) 得到的水相，并得到包含羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物。

2. 一种制备包含羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物的积雪草酸提取物的方法，其特征在于其包括以下步骤：

- 15 a). 通过醇性溶剂提取积雪草酸的地上部分；
 b). 将步骤 a) 得到的醇溶液通过阴离子树脂；
 c). 将步骤 b) 得到 的洗脱液通过液/液提取进行选择脱脂；
 d). 浓缩脱脂的水-醇相，并连续过滤得到水相；
20 e). 步骤 d) 得到的水相连续通过阳离子树脂，并随后通过阴离子树脂；
 f). 通过加入醇稳定步骤 e) 得到的水相；
 g). 将步骤 f) 得到的预纯化的水-醇相进行选择色谱分离；并
 h). 以其最终形式回收包含羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物。

25 3. 如权利要求 1 或 2 所述的提取方法，其特征在于在步骤 b) 中所用的阴离子树脂是带有季铵型官能基团的强效阴离子树脂。

4. 如前述任一权利要求所述的提取方法，其特征在于步骤 e) 所用的阳离子树脂是带有磺酸型官能基团的强效阳离子树脂。

30

5. 如前述任一权利要求所述的提取方法，其特征在于步骤 e) 所用

的阴离子树脂是带有季铵型官能基团的强效阴离子树脂。

6. 如权利要求 2-5 任一项所述的提取方法, 其特征在于步骤 g) 的选择性色谱分离所用的溶剂是水和乙醇的混和溶剂, 其中水/乙醇的体
5 积比范围为 50/50—90/10。

7. 如权利要求 2-6 任一项所述的提取方法, 其特征在于用于选择性色谱分离的固定相是非极性固定相, 特别是由接枝的非极性硅酸盐组成的固定相, 所述非极性的接枝含有 2-18 个碳原子。

10

8. 如权利要求 2-7 任一项所述的提取方法, 其特征在于所得到的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物的纯度相对于提取物总重量大于 95wt%。

9. 如权利要求 2-8 任一项所述的提取方法得到的积雪草酸提取物, 其包含超过 95 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物。

15

10. 权利要求 9 所述的积雪草酸提取物, 其特征在于混和物中羟基积雪草苷的比例为 30—70 wt%, 优选为 40—60 wt%。

20

11. 如权利要求 1-8 任一项所述的提取方法, 其特征在于其还包括平行地将步骤 f) 所得到的混和物标准化的步骤, 该步骤是通过附加入适当量的如权利要求 9 或 10 的提取物而实现的, 其中所得到的最终提取物的纯度相对于提取物总重量达到 90—98wt%。

25

12. 通过权利要求 11 的方法得到的标准化的积雪草酸提取物, 其包括相对于提取物总重量至少 75 wt%的包含羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物, 优选是至少 85 wt%。

30

13. 如权利要求 12 的标准化的提取物, 其特征在于积雪草皂苷: (羟基积雪草苷+ 特米诺苷) 的质量比为 5: 95—25: 75。

14. 如权利要求 12 或 13 的标准化的提取物, 其特征在于羟基积雪草苷: 特米诺苷的质量比为 30: 70—70: 30, 优选为 40: 60—60: 40。

15. 包含权利要求 9 或 10 的积雪草酸提取物和药学可接受的载体的药物。

16. 如权利要求 15 所述的药物, 其是用于调节炎性机制的。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的药物, 其是用于治疗自身免疫性疾病、慢性炎性疾病、特异反应性炎性疾病或肠疾病。

18. 权利要求 15—17 任一项所述的药物, 其是用于治疗银屑病、白癜风、糠疹、硬皮病、大疱疹皮肤病、湿疹、特异性皮炎、过敏症或类风湿性关节炎。

19. 权利要求 15—18 任一项所述的药物, 其是用于预防和治疗与老化及其结果有关的慢性炎症性迁移。

20. 如权利要求 19 所述的药物, 其是用于预防和/或治疗选自过敏反应、皮肤色素异常、皮肤血管过度形成和炎性龟裂的疾病。

21. 如权利要求 19 所述的药物, 其是用于调节皮肤组织的动态平衡。

22. 一种化妆组合物, 其包含如权利要求 12—14 任一项所述的积雪草酸提取物和化妆可接受的载体。

23. 如权利要求 22 所述的组合物的化妆上的应用, 其用于预防由皮肤老化造成的任何自身免疫引起的病理性变异, 用于延迟皮肤的自然老化过程, 用于预防外界刺激引起的皮肤老化加速, 特别是用于预防光诱导的皮肤老化。

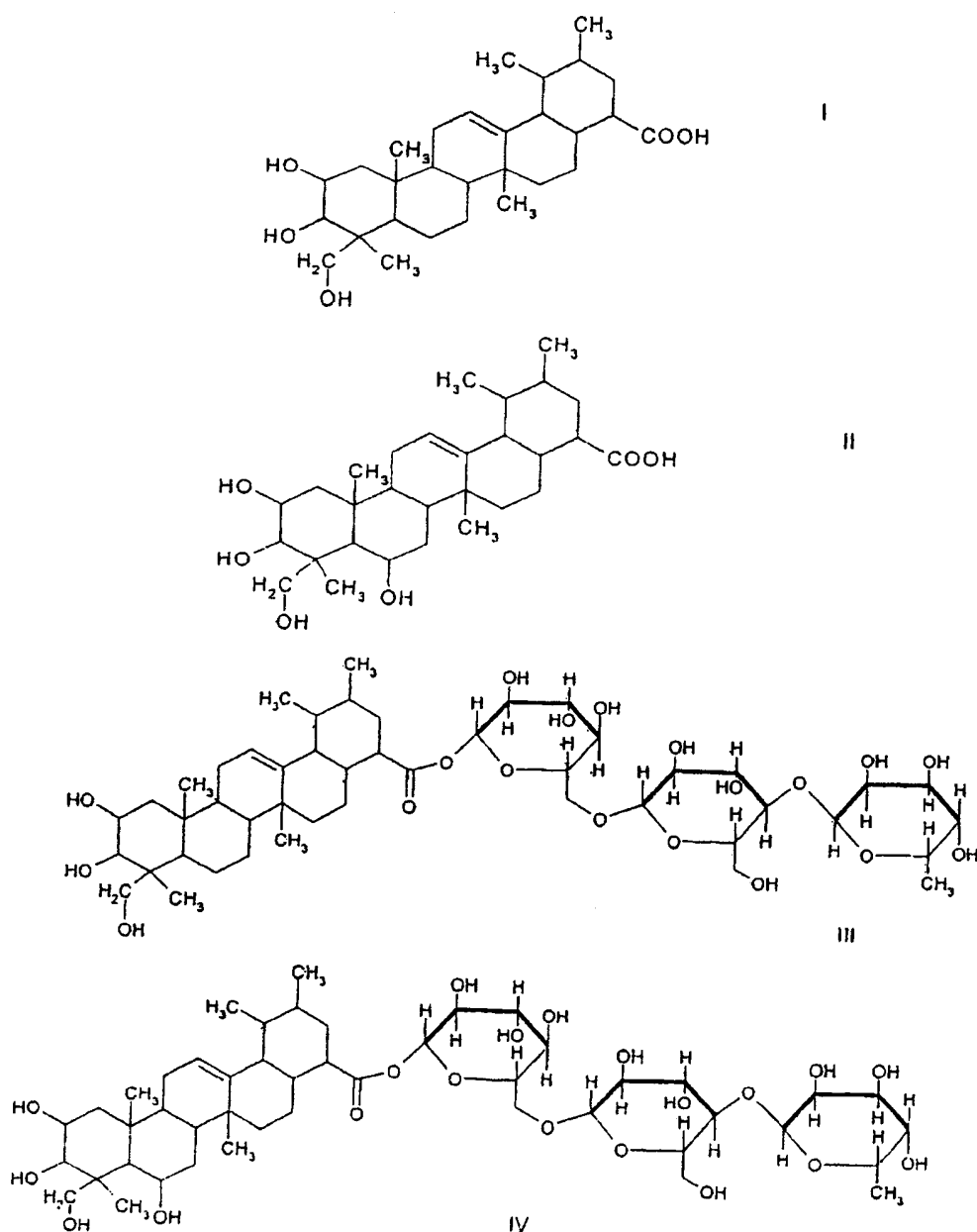
制备富含羟基积雪草苷和特米诺苷的积雪草酸提取物的方法

- 5 本发明涉及一种制备包含羟基积雪草苷(madecassoside)和特米诺苷(terminoloside)的混和物的提取物,并在适当的情况下还含有积雪草皂苷(asiaticoside),还涉及制备包含超过相对于提取物总重量的 75 wt% 的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物的积雪草酸提取物的方法,以及制备包含超过相对于提取物总重量的 95 wt%的羟基积雪草苷、特米诺苷的混和物的积雪草酸提取物的方法,本发明还涉及它们
10 它们在调节炎性机制方面的应用。

- 积雪草酸(*centella asiatica*), 又称作紫萼 (*Violette marronne*) (联合岛), 购土可乐 (Gotu Kola), 或者印度石莲花 (印度), 或者积雪草
15 R.(*Centella repanda*) (北美), 以及他乐婆 (*Talapetraka*) (马达加斯加), 是一种多形态的草药, 生长在海拔 600 米的潮湿阴暗的野外地区。

- 积雪草酸属于伞形科族 (*Apiaceae*), 特别属于天胡妥 (*Hydrocotyle*) 亚科。积雪草相当于植物属的名称, 积雪草酸则相当于种
20 的名称。积雪草酸包括三个种, 分别为典型, 阿比氏型和佛罗里达型 (*Typica*、*Abyssinica* 和 *Florida*)。积雪草酸已是公知的物质, 并在马达加斯加、印度、中国、北美印第安和印尼作为药用已有 3000 年的历史。其在不同的国家, 药用也不尽相同。其特别在伤口愈合、镇静、止痛、抗抑郁、抗病毒和抗微生物方面有益处。其通常可以局部应用或口服。奇怪的是, 积雪草酸在现代西药中的应用较晚, 直至
25 1884 年方有记载, 在 1941 年才生产出第一种干提取物。

积雪草酸的活性成分是五环三萜物质, 以苷的形式存在; 它们是积雪草酸 (通式 I) 和羟基积雪草酸 (通式 II), 以及葡萄糖苷形式; 它们是积雪草皂苷 (通式 III) 和羟基积雪草苷 (通式 IV)。



积雪草皂苷、羟基积雪草苷、积雪草酸和羟基积雪草酸分子形成植物的天然防御。为了更好地工业利用积雪草的活性成分，有必要收集天然状态的植物，并需要一定的自然压力，以获得较高的三萜含量。

积雪草酸葡萄糖苷，羟基积雪草苷，以及积雪草皂苷，都是含糖的复合物，其构成植物的羟基积雪草酸和积雪草酸的贮存形式，需在潮湿的季节才能生成。细菌、酵母或真菌等侵袭植物，激活配体释放水解酶。三萜分子由于能够调节及活化胶原的合成而特别有用。从积雪草酸中提取的苷及糖苷特别能够促进胶原 1 和 3 的合成。这些活性

剂可用于医药领域，主要是促进伤口愈合及治疗静脉机能不全。它们还可以用于化妆品领域，主要是作为抗皱和抗蜂窝组织剂应用。在先前技术中通常使用的积雪草酸的活性剂是积雪草酸和羟基积雪草酸，还可以是积雪草皂苷。由于羟基积雪草苷具有高水溶性，其通常在常规5 的提取脂溶性活性剂的方法中随水洗液流出。

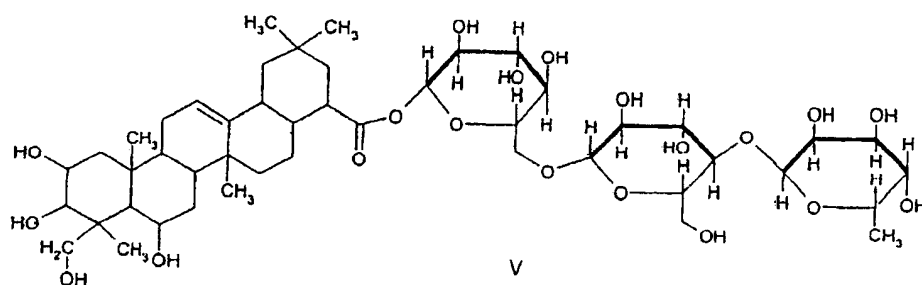
先前技术的方法可以得到羟基积雪草苷和积雪草皂苷的混和物。该混和物包括相对于混和物总重量的大约 25 wt%的积雪草皂苷，60 wt%的羟基积雪草苷和 15 wt%的副产物，主要由脂肪酸和糖苷组成。先前技术的其它方法也可以得到纯度为相对于混和物总重量的 81 wt%10 的羟基积雪草苷，所述提取物还包括羟基积雪草苷的异构体，脂肪酸，主要是亚油酸、亚麻酸、棕榈酸或油酸，以及糖，例如糖苷。

令人惊奇的是，本申请人开发出了一种新的提取方法，可以得到羟基积雪草苷、积雪草皂苷和一种新的分子的混和物，该分子称为特米诺苷，所述混和物具有超过相对于混和物总重量的 75 wt%的纯度，15 并可得到超过相对混合物种总重量 95 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物。类似地，申请人还发现了包含羟基积雪草苷、特米诺苷和适当的积雪草皂苷混和物的积雪草酸提取物。

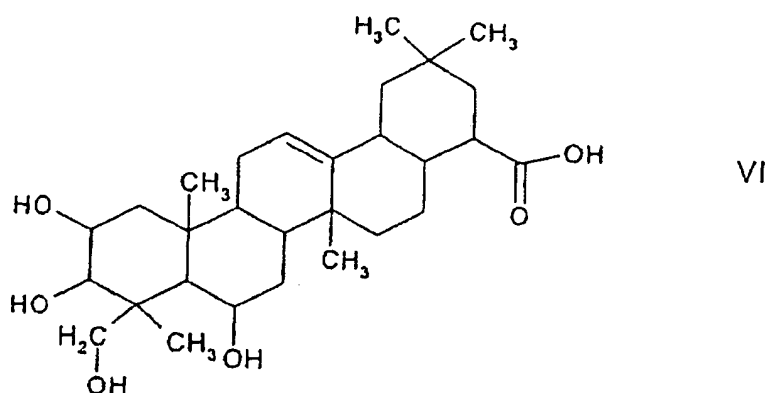
令人惊奇的是，本申请人还发现从积雪草酸地面部分提取的羟基积雪草苷和特米诺苷混和物可以用于调节炎症机制的药物中。20

另外，从积雪草酸地面部分提取的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物还可以用于预防和延迟皮肤过早老化的化妆品组合物中。

在本发明中，术语“特米诺苷”是指化学结构分子命名为 1-[O- α -L-鼠李吡喃糖苷基-(1-4)-O- β -吡喃葡萄糖苷-(1-6)]-O- β -D-吡喃葡萄糖 2 α ,3 β ,6 β ,23-四羟基油酰-12-基-28-酸酯，结构式如通式 V 所述：25



该分子拥有与羟基积雪草苷相同的糖的部分，也就是说，拥有葡萄糖-葡萄糖-鼠李糖。特米诺苷萜环的结构相当于特米诺酸（terminolic acid）的萜环，其结构如下式的 VI：



5

特米诺苷是羟基积雪草苷的位置异构体。先前技术中从未分离出该分子。另外，也从来没有提到过特米诺苷能够从积雪草酸中提取，并且，也没有抑制的从积雪草酸中提取特米诺苷的方法。

还可以设想存在有检测不到的积雪草皂苷的异构体。因此，在本发明中，术语“积雪草皂苷”指的是如通式 III 所述的分子，如果存在的话，可能有包括一种异构体的混和物。

在本发明中，术语“二元混和物”指的是主要包括羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物，此混合物实际上不含有积雪草皂苷，术语“三元混和物”指的是主要包括羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物。

15

本发明的主旨是涉及一种制备包含羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物的提取物的方法，其特征在于包括如下步骤：

- a). 通过醇性溶剂提取地上部分的积雪草酸；
- b). 将步骤 a) 得到的醇溶液通过阴离子树脂；
- c). 步骤 b) 的洗脱液通过液/液提取进行选择脱脂；

20

- d). 浓缩脱脂的水-醇相, 并连续过滤得到水相;
 - e). 步骤 d) 得到的水相连续通过阳离子树脂, 并随后通过阴离子树脂;
 - f). 通过加入醇稳定步骤 e) 得到的水相, 并得到包含羟基积雪草
- 5 苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物。

本发明的主旨还涉及一种制备包含羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物的提取物的方法, 其特征在于包括如下步骤:

- a). 通过醇性溶剂提取地上部分的积雪草酸;
- 10 b). 将步骤 a) 得到的醇溶液通过阴离子树脂;
- c). 步骤 b) 的洗脱液通过液/液提取进行选择脱脂;
- d). 浓缩脱脂的水-醇相, 并连续过滤得到水相;
- e). 步骤 d) 得到的水相连续通过阳离子树脂, 并随后通过阴离子树脂;
- 15 f). 通过加入醇稳定步骤 e) 得到的水相;
- g). 预纯化的步骤 f) 得到的水-醇相进行选择色谱分离; 并
- h). 回收包含羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物, 得到其最终形式。

- 积雪草酸植物的活性成分的提取优选其植物的地上部分进行,
- 20 目的主要是不破坏植物的根部, 是保持此种植物可自然更新。

- 根据本发明的一个优选可变化的方法为, 植物的地上部分在提取步骤前浸渍于醇性溶剂中。能够用于本发明的醇性溶剂是那些本领域技术人员所使用的常规的溶剂, 如乙醇, 特别是 70%的乙醇。所得的醇性溶液随即通过阴离子树脂纯化(步骤 b)。本发明所用的阴离子树脂
- 25 脂优选是具有季铵型官能基团的强阴离子树脂。醇溶液通过阴离子树脂可捕获阴离子型的副产物, 特别是酚类物质。

- 根据本发明一个优选可变化的方法, 步骤 a)得到的醇性溶液在通过阴离子树脂前进行澄清处理。优选的澄清步骤包括在所述溶液中加入强碱溶液, 如氢氧化钠溶液及活性炭。加入强碱形成沉淀, 过滤除去可与强碱反应的金属和一些其它物质。而活性炭通过纯化可以使醇
- 30 溶液脱色, 并可固着脂肪酸或氧化产物。

继由通过树脂组成的步骤 b)之后,优选是在此之前进行澄清步骤,得到的洗脱液纯化去除脂肪部分。为此,需经液/液提取过程。所用的提取溶剂是非极性溶剂,优选是链烷烃,如庚烷。任何本领域技术人员已知的液/液提取方法都可以用于本发明的方法之中。特别是,所述
5 的提取可以离心分离。由于羟基积雪草苷是水溶性的,故回收水醇相。

得到的水-醇相随后浓缩成水相,随后过滤,优选的为数次。沉淀出在水相中不溶解的物质。

本发明的方法的第一步骤之后,得到了水相,其中含有两种已知的
10 的积雪草酸的葡萄糖苷,即积雪草皂苷和羟基积雪草苷,以及特米诺苷,都是可溶的。水相随即通过阳离子树脂,以及阴离子树脂进行纯化。此通过阳离子树脂后再通过阴离子树脂的步骤是本发明的重要步骤。优选的是,所用的阳离子树脂是强阳离子树脂,其含有磺酸盐型官能基团。优选的是,所用的阴离子树脂是强阴离子树脂,其含有季
15 铵盐型官能基团。根据本发明的方法,为了增强残留酸部分的结合能力,所用离子交换树脂的顺序是非常重要的。

根据本发明优选的一个变化,在步骤 e)的连续通过阳离子树脂及阴离子树脂步骤之后,和在步骤 f)之前,所得水相通过活性炭。活性炭可以吸收使溶液着色的次级酚类物质。

20 根据本发明另一个优选的变化,所得水相在步骤 e)之后,步骤 f)之前,任选地通过活性炭的步骤,进行一次或多次浓缩。

步骤 e)之后所得的水相,任选通过活性炭和/或脱色后,随后通过加入醇进行稳定(步骤 f))。随即得到预纯化的水-醇相,其中含有两种已知的积雪草酸葡萄糖苷和特米诺苷,均为可溶的。得到的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物优选纯度为大于相对于所述
25 混和物总重量的 75 wt%。

步骤 f)中得到的含有羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的预纯化的水-醇相可以通过选择性的色谱方法进行纯化。选择性色谱技术是本领域技术人员公知的技术。分子通过与固定相的亲力的不同而被分离。该选择性色谱分离步骤可以使积雪草皂苷从含有羟基积雪草
30 苷和特米诺苷混和物中分离出来。

在本发明中，在选择性色谱分离中使用的洗脱剂为极性溶剂。优选的是，所用溶剂为水和乙醇的混和溶剂，其体积比为水/乙醇为 50/50—90/10，典型的是 75/25。

在本发明中，选择性色谱分离中应用的固定相是非极性固定相。

- 5 优选的是，该固定相由接枝的非极性二氧化硅组成。该非极性接枝优选为 2-18 个碳原子，更优选为 12-18 个碳原子。

本方法的这些步骤之后，即步骤 h)，得到了含有羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物。该混和物中羟基积雪草苷和特米诺苷的重量比优选的为 30-70 wt%，更优选为 40-60 wt%。所得到的该混和物的纯度
10 优选为占混和物总重量的 95 wt%。该二元混和物基本上不包括积雪草皂苷（只可能含有痕迹量的积雪草皂苷）。

本发明的主旨还包括通过以上所描述的方法获得的积雪草酸的提取物，其包含超过 95 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物。存在的不纯物主要是脂肪酸。根据本发明的一个优选可变的方面，羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物的比率以羟基积雪草苷占总质量的比率为计，为 30-70 wt%，优选是 40-60 wt%。优选的是，本发明的提取物是
15 抗炎剂和免疫调节剂。

根据本发明的另一优选可变的方面，其方法还包括一平行的步骤，其为将在步骤 f)之后得到的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的
20 三元混和物的标准化，通过加入适当量的根据本发明的纯的积雪草酸的提取物来完成，即加入通过本发明的方法的步骤 h)之后得到的羟基积雪草苷和特米诺苷的纯度大于 95 wt%的混和物（二元混和物），最终提取物的纯度相对于最终提取物的总重量为 90-98 wt%。通过加入二元混和物以固定最终提取物的纯度范围相对于最终提取物的总重量为
25 90-98 wt%来对三元混和物进行标准化。例如，为得到纯度为 90%的最终提取物，将一份的二元混和物和一份三元混和物混和；为得到纯度为 98%的最终提取物，则将 9 份二元混和物与 1 份三元混和物混和。

本发明的一个主旨还包括在本发明的方法的标准化步骤后得到的标准化的积雪草酸提取物，其包含至少 75 wt%的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的混和物（标准化的三元混和物），优选为 85 wt%。
30 存在的不纯的物质主要是脂肪酸。在标准化的积雪草酸提取物中，积

雪草皂苷：（羟基积雪草苷+特米诺苷）的质量比优选在 5: 95—25: 75。如果积雪草皂苷质量百分比过高，就有可能产生相分离。特别地，积雪草皂苷可溶于有机溶剂，而羟基积雪草苷和特米诺苷是水溶性的。由羟基积雪草苷和特米诺苷组成的混和物水溶性非常好，可溶解大约 5 25 wt%的积雪草皂苷。在此标准化的积雪草酸提取物中，羟基积雪草苷：特米诺苷的质量比优选为 30: 70~70: 30，更优选为 40: 60~60: 40。

本发明的一个主旨还包括一种药物，其包括超过 95 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷的积雪草酸提取物，或如上所述的标准化的积雪草酸提取物，以及药学可接受的载体。实际应用中，二元混和物较之三元混和物更适于药用。

羟基积雪草苷和特米诺苷可以水解，特别在与皮肤菌丛接触时，分别产生羟基积雪草酸和 *terminolic acid*。然而，这些酸没有免疫调节活性。

15 当一个外来的生物体，如细菌或病毒，进入体内，后者引发一种防御体系，亦称作免疫系统，进行攻击。免疫系统清除外来生物体而并不破坏其自身器官。在患有自身免疫性疾病的患者，免疫系统不再识别自身的器官结构；这样便会产生调节失控从而进攻其自身的结构。

在一个特定的牛皮癣病例中，器官的抗原被免疫防御包围，进攻自体的皮肤，造成炎症迁移。调节系统的过度反应造成角化细胞的过度增殖，并使角化细胞和角膜细胞形成厚的，不均匀的斑块。本发明的药物能够抑制免疫防御的病理性产物。所述药物优选地能调节炎症机制。更优选的是，所述药物可用于治疗自身免疫性疾病、慢性炎症疾病、特异性炎症或肠性疾病。优选的是，所述药物可用于治疗牛皮
20 癣、白癜风、糠疹、硬皮病、大疱疹、湿疹、特异性皮炎、过敏或类风湿性关节炎。

在皮肤病学领域，本发明的药物还可以用于预防和治疗与老化等有关的慢性炎症迁移。所述药物优选用于预防和治疗选自过敏症、皮肤色素异常、皮肤脉管炎和炎性裂隙的疾病。所述药物还优选地通过
30 细胞的保护和刺激来增强真皮-表皮交互作用细胞外基层，用于调节皮肤组织的平衡。

本发明的主旨还包括包含如上所述的标准化积雪草酸提取物和化妆品可接受的载体的化妆品组合物。所述化妆品组合物优选用于预防任何自身免疫性病理迁移，这种病理病变是由皮肤自然老化造成。所述化妆品组合物优选用于增强细胞功能以延迟自然老化。所述化妆品组合物更优选用于预防遭受外界攻击加速的皮肤老化，特别是可预防光诱导的皮肤老化。

外部的环境总是在对皮肤进行攻击，无论是紫外线辐射或是照明灯的照射，或是各种天然抗原或由于人类活动而存在的抗原，城市污染等等，都会引起一系列的生物过程从而加速皮肤老化。因此，抗炎系统总是在活动中，会加速皮肤中的角化细胞的更新，或甚至造成过度增殖，通过特定蛋白的过度表达造成组织衰退，最终导致功能的丧失。其结果是因不断的更新导致角化细胞天然资源储备的耗尽，造成皮肤过早的老化。本发明的组合物化妆方面的应用优选的可以抑制炎症性疾病并因此可预防皮肤老化。

药物或化妆品组合物优选是固体、糊状或液体形式。本发明优选的是，药物或化妆品组合物被配方成可局部施用、口服、皮下给予、注射给予、直肠给予、及生殖器途径给予。本发明优选的是，当药物或化妆品组合物被配方成局部给予时，所述药物或化妆品组合物是水性溶液、白色或有颜色的乳剂、软膏、乳状物、洗液、凝胶、油膏、乳清、糊剂、泡沫剂、气溶胶、香波或条状物。本发明优选的是，当药物或化妆品组合物被配方成口服给予时，所述药物或化妆品组合物可以是水性溶液、乳剂、片剂、明胶胶囊、胶囊、粉末、颗粒、溶液剂或口服悬浮剂。本发明优选的是，当药物或化妆品组合物被配方成皮下给予时，所述药物或化妆品组合物可以是无菌注射针剂。本发明优选的是，当药物或化妆品组合物被配方成直肠给予时，所述药物或化妆品组合物栓剂形式。本发明优选的是，当药物或化妆品组合物被配方成经生殖器途径给予时，所述药物或化妆品组合物可以是小卵泡的形式。

本发明的药物的用量依赖于所治疗病症的严重情况以及治疗时间的需要。一般地，医师会根据患者的情况调整药物剂量。对于自身免疫性疾病患者的治疗，应用包含相对于混和物总重量的超过 95 wt%的

羟基积雪草苷和特米诺苷的积雪草酸提取物，特别在局部给予所述药物的比例相对于赋形剂体积的 1-3 wt%，对于透皮载体的所述提取物，每天给予一到两次。特别优选的是，以上限定的所述药物的剂量分每日一到三次给予。

- 5 以下实施例用于说明本发明，但不对发明的范围有任何限定。

实施例 1：本发明的乳剂组合物

成分：INCI	w/w %
本发明的羟基积雪草苷/teminoloside 提取物（纯度 >95%）	1.0%
山箭-10（Beheneth-10）	1.5%
山箭-25（Beheneth-25）	1.5%
辛酰碳酸盐（Dycaprylyl Carbonate）	5.0%
己基月桂酸盐（Hexyl Laurate）	5.0%
异十六烷	5.0%
鲸蜡烷基异壬烷（Cetearyl Isononaoate）	5.0%
二甲基聚硅氧烷	1.0%
二十二烷醇	2.0%
氢化植物油甘油酯	2.0%
苯氧乙醇 & 对羟苯甲酸酯	0.5%
醋酸生育酚	0.5%
软化水	加至 100
甘油	3.0%
丁烯乙二醇	2.0%
黄原胶(Xanthan Gum)	0.1%
卡波姆(Carbomer)	0.2%

表 1

实施例 2：本发明的乳剂组合物

成分：INCI	w/w %
本发明的羟基积雪草苷/teminoloside 提取物（纯度>95%）	1.0%
鲸蜡烷基葡萄糖苷& 鲸蜡醇	5.0%
辛酸/羊脂酸甘油三酯	5.0%
角鲨烷	5.0%
鲸蜡烷基异壬烷（Cetearyl Isononaoate）	3.0%
二甲聚硅氧烷交联聚合物	2.0%
硬脂醇	1.5%
辛酰碳酸盐（Dycaprylyl Carbonate）	5.0%
对羟基苯甲酸酯	0.1%
软化水	加至 100
苯氧乙醇 & 对羟基苯甲酸酯	0.5%
甘油	2.0%
卡波姆	0.3%
PEG32	2.0%
黄原胶	0.2%
琥珀酸辛烯基淀粉铝（Aluminum starch octenyl succinate）	2.0%

表 2

5 **实施例 3：纯度相对于提取物总重量超过 95 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的提取方法：**

a) 过柱的初始含醇溶液的化学提纯净化

 积雪草酸的地面部分及用于本实施例的部分包括大约 2-3 cm 的茎叶。取 250 kg 积雪草酸的地面部分分成等量的三批。积雪草酸的活性成分从中通过逆流提取方法提取出来。另外一批新的积雪草酸的地面部分，即未经浸渍或过滤，其中富含活性成分的，用第二提取液，即被活性成分饱和的耗尽溶剂提取。所得的液体称为最终溶液，直接导入化学净化罐中。该批原料随后用第一浸渍液进行第二次提取，此浸渍液比首次使用的溶液有稍低的负载量，能溶解更多的活性成分。用于第二提取溶液的正是该溶液。该批原料最后用新鲜溶剂作第三次提

10

15

取，溶解出原料中仍存在的最终百分比的活性成分。该溶液用作第一次提取的溶液。

在该实施例中，所用的浸渍和过滤溶剂是 70%的乙醇。对于 250 kg 积雪草酸地上部分的原料来说，需用 1600 升的 70%的乙醇。

5 根据预先的提取步骤是在固定的罐还是在可活动的罐中进行，积雪草酸地上部分在多于或少于活性成分饱和的 70%乙醇中的浸渍的时间范围大约从 1 天到几个小时不等。在特定的活动罐的情形，加热至 60℃，浸渍时间约为 2 小时。随即加入 10 升 30%的氢氧化钠溶液至最终溶液之中，而后加入 10 kg 活性炭，通过搅拌可使溶液脱色。溶液继续搅拌 40 分钟后过滤。滤液以流速 300 l/h 通过含有季铵官能基团的强阴离子树脂。

得到的水-醇洗出液随即用氢氧化钠中和，使 pH 值在 5.3-6.9，而后进行液/液提取，优选使用庚烷分离。

得到的脱脂相通过连续蒸发浓缩，条件是减压，温度不超过 70℃。该浓缩可去除脱脂相中的积雪草皂苷。产物浓缩至乙醇体积有相当于最初脱脂相体积的 90%的量被回收，以及至积雪草皂苷从脱脂相中沉淀出来。该相随后被过滤，母液回收。羟基积雪草苷水溶性很好，可以溶解在浓缩过程中沉淀出的大约 20 wt%的积雪草皂苷。

b) 制备预纯化的水-醇相的步骤

20 回收的浓缩的水相通过阳离子树脂及随后通过阴离子树脂进行纯化。阳离子树脂是强阳离子树脂，具有磺酸盐型的官能基团。阴离子树脂是强阴离子树脂，具有季铵型官能基团。得到的洗脱液是水-醇相，随后被盐酸中和至 pH 值为 6.75+/-0.25，并通过活性炭进行脱色。

25 根据与前述浓缩相同的原则，所得溶液在减压条件下，在反应器中被过滤并浓缩，直至得到水相。再加入乙醇调节以得到稳定的水-醇相溶液，固体含量为每升 200 g+/-20，乙醇浓度为体积比 35%+/-3.5%。得到富含羟基积雪草苷和特米诺苷的预纯化相，其中仍然含有积雪草皂苷。

c) 纯化步骤

30 得到的预纯化的水-醇相通过选择性色谱法进行分离。在选择性色谱分离过程中，所用的固定相包含有接枝的非极性二氧化硅，其非极

性接枝含有 18 个碳原子，粒径为 $10\mu\text{m}$ 。所用溶剂为相对于混和物总体积的 65%的水和 35%的乙醇。而后得到的洗脱液被浓缩，干燥并粉碎。这些步骤可得到干燥的积雪草酸提取物。

干燥的提取物中含有相对于提取物总重量的 99.8 wt%的质量比为
5 51: 49 的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物（二元混和物）。

实施例 4: 提取和制备标准化的羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷的方法

包括得到富含羟基积雪草苷及特米诺苷，并含有积雪草皂苷（纯化步骤之前）的三元混和物的预纯化相的步骤的提取方法与实施例 3
10 所描述的步骤相同。

该预纯化相的纯度以羟基积雪草苷、特米诺苷及积雪草皂苷为计为 80 wt%。存在的不纯杂质主要为脂肪酸。若以羟基积雪草苷、特米诺苷及积雪草皂苷的含量为 100%，则混和物包含大约羟基积雪草苷 39 wt%，特米诺苷为 39 wt%，及积雪草皂苷为 22 wt%。

15 提取物通过加入 100 wt%的实施例 3 所得到的二元混和物进行标准化（即等量的三元混和物和二元混和物）。

随即得到 90 wt%纯度的标准化的积雪草酸提取物。该提取物包含：若以羟基积雪草苷、特米诺苷及积雪草皂苷的含量为 100%，则含有 45.7 wt%的羟基积雪草苷，44.5 wt%的特米诺苷，及 9.8 wt%的积雪草皂苷。

实施例 5: 两种羟基积雪草苷和特米诺苷异构体的分离

20 300 mg 的羟基积雪草苷和特米诺苷混和物在 30°C 下通过流动相为 81: 19v/v 的水: 乙腈的制备的色谱柱进行分离（高纯度标记 C18(250×4.6)），在 210 nm 波长下进行检测。得到 95 mg 的特米诺苷和 85 mg 的羟基积雪草苷。

25 羟基积雪草苷和特米诺苷的化学结构通过光谱测定法进行分析确定（ $^1\text{H NMR}$ ， $^{13}\text{C NMR}$ ，以及质谱）。

实施例 6: 羟基积雪草苷和特米诺苷对过度增殖的人角化细胞中的细胞生长的调节作用的评估

在该实施例及以下的实施例中，提取物包含相对于本发明提取物
30 总重量的 99.8 wt%的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物，所述混和物包含相对于混和物总重量的 51 wt%的羟基积雪草苷和 49 wt%的特米

诺昔。

由于本发明的提取物主要含有羟基积雪草苷和特米诺昔的混合物，在本实施例和以下的实施例中，所述提取物不再表示其特性，均以“羟基积雪草苷和特米诺昔的混和物”，或“本发明的混和物”来表示。

本实施例是评估羟基积雪草苷和特米诺昔对过度增殖的人角化细胞中的细胞生长的调节作用。该实施例是在角化细胞生长因子（以下称作 KGF）和 / 或人白细胞弹性蛋白酶（以下称作 HLE）刺激的角化细胞 HaCaT 上进行的。

10 a) 羟基积雪草苷和特米诺昔混和物的细胞毒性研究

该细胞毒性研究包括确定不引起细胞毒性的最大剂量值。该研究是用 HaCaT 人类角化细胞进行的，细胞培养在 96 孔平板中，细胞数量为每孔最大为 20×10^3 ，最小为 10×10^3 。细胞成活率的评估是通过应用中性红的色度法分析完成的。中性红是一种弱阳离子型染料，可通过非离子扩散机制渗入细胞膜，并在细胞内与磷酸和/或溶酶体基质的羧基基团结合。对中性红的积聚和储留的调节在细胞膜破坏时可被观察到。在中性红存在时细胞培养后得到的溶液的光密度与活细胞的数量成比例。

先测定 9 个不同浓度的宽范围值，从 0.001-1 mg/ml。不同的测定溶液在补充了 10 vol% 的胎牛血清（FCS）的 Dulbecco's 改良培养基（Dulbecco's Essential Medium, DMEM）中制备。24 小时后，通过中性红发现浓度小于等于 1 mg/ml 的样本对细胞反应没有显著的调节作用。仅在最高检测浓度，即 1 mg/ml 下观察到只有很小的中性红摄取的减少，即 10% 的抑制。基于这些结果，建立了 0.05-5 mg/ml 限定范围的浓度，以确定最大的无毒剂量。细胞存活通过 72 小时培养后的中性红色度分析法评估。结果确认无毒浓度为小于等于 1 mg/ml。从 1 mg/ml 起，就观察到了轻微的剂量依赖性的毒性。最高检测浓度，5 mg/ml 下，通过中性红观察到细胞抑制作用达到 43%。

检测的限定范围 2 的浓度为 0.075-5 mg/ml。以 1% 的浓度将羟基积雪草苷和特米诺昔的混合物溶于二甲基亚砷（以下称 DMSO）之后，在 HaCaT 细胞上进行检测。细胞存活通过 72 小时培养后的中性红色

度分析法评估。结果类似于不加 DMSO 的检测结果。

表 3 列出所有的结果；细胞存活率用与对照的百分比表示。

浓度(mg/ml)	0.05	0.075	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5
宽范围(24 小时)	102%	n.t.	105 %	n.t.	100%	n.t.	90%	n.t.	n.t.
限定范围 1(72 小时)	99%	100%	98%	99%	97%	96%	91%	80 %	57 %
限定范围 2(72 小时)	n.t.	102%	101 %	99%	97%	94%	91%	78 %	55 %

表 3

n.t.表示未检测

5 根据这些结果，决定选择浓度 300 μ g/ml，作为检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗增殖活性的最大剂量。

b) 对细胞增殖的影响：

检测原理是基于在含或不含羟基积雪草苷和特米诺苷混和物时
对人角化细胞的过度增殖进行的评估。该方法是基于测定在培养基中的
10 的用 KGF 或 HLE 刺激后的细胞密度。该细胞密度的检测是通过使用
中性红的色度法完成的。应用微板读数器在 540 nm 下读取溶液的吸光度。

共检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的 4 个浓度：

$C_1=10\ \mu\text{ g/ml}$ $C_2=30\ \mu\text{ g/ml}$ $C_3=100\ \mu\text{ g/ml}$ $C_4 =$
15 300 μ g/ml

b.1) 用 KGF 刺激：

准备 6 批检测样本：一个对照组（不受刺激细胞），KGF 对照组
（100 ng/ml 的 KGF 刺激的细胞）和 4 个处理组（用羟基积雪草苷和特
米诺苷混和物处理及用 KGF 刺激的细胞）。分别在 t=0 天，t=2 天，t
20 =5 天时测定光密度。应用回归线： $O.D.=0.00355\times 10^3$ (细胞数每
孔)+0.0018, 将光密度的平均值 O.D.转变为细胞密度,即每孔的细胞数。

表 4 列出在 KGF 活化细胞 2 天及 5 天后记录的细胞密度。

	处理 2 天		处理 5 天	
KGF 刺激	每孔细胞数	细胞生长	每孔细胞数	细胞生长
无 KGF 的对照	56465 $\pm$ 2486		115802 $\pm$ 988	
KGF 对照	85833 $\pm$ 1742	100%	157616 $\pm$ 635 9	100%
C ₁ 及 KGF	84388 $\pm$ 2616	98% n.s.	161354 $\pm$ 516 5	102% n.s.
C ₂ 及 KGF	85304 $\pm$ 1312	99% n.s.	161248 $\pm$ 423 2	102% n.s.
C ₃ 及 KGF	84317 $\pm$ 1444	98% n.s.	152081 $\pm$ 253 6	96% n.s.
C ₄ 及 KGF	83259 $\pm$ 1960	97% n.s.	150071 $\pm$ 708 7	95% n.s.

表 4

n.s.表示无统计学的显著性差异。

以上结果显示本发明的混和物对 KGF 活化 2 天及 5 天的 HaCaT 细胞生长没有显著的调节作用。

5 b.2) 用 HLE 刺激:

准备 6 批检测样本: 一个对照组 (不受刺激细胞), HLE 对照组 (3 nM, 即 90 ng/ml 的 HLE 刺激的细胞) 和 4 个处理组 (用羟基积雪草苷和特米诺昔混和物处理及用 HLE 刺激的细胞)。分别在 t=0 天, t=2 天, t=5 天时测定光密度。应用回归线: $O.D.=0.00458 \times 10^3$ (细胞数每孔)+0.041 将光密度的平均值 O.D.转变为细胞密度, 即每孔的细胞数。

表 5 列出在 HLE 活化细胞 2 天及 5 天后记录的细胞密度。

	处理 2 天		处理 5 天	
HLE 刺激	每孔细胞数	细胞生长	每孔细胞数	细胞生长
无 HLE 的对照	66668+/-1380		89180+/-2202	
HLE 对照	875973+/-1400	100%	157616+/-6359	100%
C ₁ 及 HLE	76764+/-799	101% n.s.	114584+/-2463	100% n.s.
C ₂ 及 HLE	75891+/-1190	100% n.s.	115539+/-1261	101% n.s.
C ₃ 及 HLE	73408+/-1690	97% (p≤0.05)	112428+/-1548	98% (p≤0.05)
C ₄ 及 HLE	72016+/-1597	95% (p≤0.05)	93355+/-1429	82% (p≤0.05)

表 5

n.s.表示无统计学的显著性差异。

p≤0.05 意思是结果具有统计学显著性意义，其误差为 0.05%。

- 5 以上结果表明本发明的混和物对 HLE 活化 2 天及 5 天的 HaCaT 细胞的生长有小的减弱的作用。这种轻微的抑制作用仅在较高浓度时才出现。300 μg/ml 的羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物与对照组相比，使 HLE 处理 5 天的活化细胞的生长降低了 18%。

c) 结论：

- 10 结论是，KGF 在浓度 100 ng/ml，HLE 在浓度 90 ng/ml 时，刺激 HaCaT 细胞的生长。

- 15 羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物在检测所用的浓度范围内不能调节 KGF 刺激的 HaCaT 细胞的生长。但本发明的混和物可以剂量依赖的形式调节 HLE 刺激的 HaCaT 细胞的生长剂量依赖性。羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物在剂量为 300 μg/ml 时能够降低 HLE 刺激的 HaCaT 细胞生长达 18%。

实施例 7: 羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物对培养的人角化细胞的抗炎活性的证实

- 20 本实施例的主旨是通过暴露于刺激压力的培养的人角化细胞中制造和释放的促炎症表皮细胞因子、IL-1α 和 PGE-2 评估本发明的混和物的抗炎活性。

a) 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的细胞毒性研究

该细胞毒性研究是通过与实施例 4 相同的方法完成，并得到相同的结果。另外，还增加了人角化细胞、K₀₂₋₁H₄ 属的分析，以确定对目标细胞的无毒浓度。

- 5 准备 8 个浓度的检测样本，从 0.075-5 mg/ml。预溶解于 DMSO 中的羟基积雪草苷和特米诺苷混和物在所选浓度下加入到培养基中。最终 DMSO 的浓度为 1%。通过分析中性红评估细胞的存活力。

结果表明培养 72 小时后小于等于 2.5 mg/ml 的浓度是无毒的。最高浓度，5 mg/ml，导致了 30%的中性红摄取的抑制。

- 10 表 6 列出了结果。细胞存活用与对照的百分比表示。

浓度 (mg/ml)	0.075	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5
存活率 (72 小时)	98%	96%	102%	96%	93%	98%	95%	70%

表 6

根据结果，确定选择 1 mg/ml 为检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物抗炎活性的最大剂量。

- 15 **b) 抗炎活性**

该分析是基于评估受刺激的人角化细胞产生的促炎症细胞因子完成的。该方法通过在含或不含羟基积雪草苷和特米诺苷混和物培养的以及通过 PMA，即巴豆醇-1,2-肉豆蔻酸-13-醋酸酯刺激的角化细胞中测定释放至细胞外培养基中的细胞内 IL-1 α ，和 PGE-2 的量完成。

- 20 该研究在幼儿包皮分离的角化细胞，K₀₂₋₁H₄ 属上进行。检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的 3 个浓度：

$$C_1 = 0.1 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0.5 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 1.0 \text{ mg/ml}$$

b.1) PGE-2 的释放

- 25 表 7 列出了细胞活化以后得到的 PGE-2 的量，作为基数其通过蛋白质的 pg/ μ g 值表示。PMA 诱导的 PGE-2 的产生及抗炎活性（而后称为 AIA）可根据下式计算：

$$\text{PGE-2 产物} = \text{PGE-2(PMA)} - \text{PGE-2(无 PMA)}$$

$$\text{AIA} = [\text{PGE-2 产物(对照细胞)} - \text{PGE-2 产物(处理细胞)}] / \text{PGE-2 产}$$

物(对照细胞)]×100

羟基积雪草苷和特米诺昔混和物	0 mg/ml 对照培养	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2, 无 PMA	4.96+/-0.52	4.96+/-0.52	4.96+/-0.52	4.96+/-0.52
PGE-2, 有 PMA	39.34+/-2.64	18.73+/-0.67	10.69+/-0.50	6.60+/-0.44
PGE-2 产物	34.38+/-2.64	13.77+/-0.67	5.73+/-0.50	1.64+/-0.44
抗炎活性 (%)		60%	83%	95%

表 7

角化细胞暴露于 PMA 得到了非常明确的 PGE-2 的产物并释放 PGE-2 进入对照培养基中。特别地，无刺激培养基中记录的的基数值
5 在用 PMA 刺激后增加了 8 倍。结果说明 PGE-2 是一种表达、产生和释放能够被炎症物质如 PMA 诱导的细胞因子。

用羟基积雪草苷和特米诺昔混和物处理的在培养基中用 PMA 刺激后记录的 PGE-2 的量明显低于对照组。本发明混和物对 PMA 诱导的 PGE-2 的释放的抑制效果是剂量依赖性的。在 C₁、C₂、C₃ 组中记录
10 到的差异具有统计学的显著意义 (p≤0.01, t 检验)。羟基积雪草苷和特米诺昔混和物的最高浓度为 1 mg/ml 时，能够完全抑制 PMA 诱导的 PGE-2 的生成。

b.2) 细胞内 IL-1α 的产物

表 8 列出了在细胞活化以后得到的细胞内 IL-1α 的量, 作为基数其
15 通过蛋白质的 pg/μg 值表示。PMA 诱导的 IL-1α 的产生及抗炎活性(而后称为 AIA) 可根据下式计算:

$$\text{IL-1}\alpha \text{ 产物} = \text{IL-1}\alpha \text{ (PMA)} - \text{IL-1}\alpha \text{ (无 PMA)}$$

$$\text{AIA} = [\text{IL-1}\alpha \text{ 产物(对照细胞)} - \text{IL-1}\alpha \text{ 产物(处理细胞)} / \text{IL-1}\alpha \text{ 产物(对照细胞)}] \times 100$$

羟基积雪草苷和特米诺苷混和物	0 mg/ml 对照培养	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α ，无 PMA	2.88+/-0.23	2.88+/-0.23	2.88+/-0.23	2.88+/-0.23
IL-1 α ，有 PMA	12.11+/-0.41	8.94+/-0.11	6.86+/-0.47	4.70+/-0.30
IL-1 α 产物	9.23+/-0.41	6.06+/-0.11	3.98+/-0.47	1.82+/-0.30
抗炎活性 (%)	34%	57%	80%	

表 8

角化细胞暴露于 PMA 导致了一些 IL-1 α 的产物并释放进入对照培养基中。特别地，无刺激培养基中记录的基数值在用 PMA 刺激后增加了 4 倍。结果说明 IL-1 α 是一种其表达、产生和释放能够被炎症物质如 PMA 诱导的细胞因子。

在用羟基积雪草苷和特米诺苷混和物处理的在培养基中用 PMA 刺激后记录的 IL-1 α 的量明显低于对照组。本发明混和物对 PMA 诱导的 IL-1 α 的产生和聚积的抑制效果是剂量依赖性的。在 C₁、C₂、C₃ 组的差异具有统计学的显著意义 (p $\leq$ 0.01, t 检验)。羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的最高浓度为 1 mg/ml，能够降低 80%PMA 诱导的 IL-1 α 的生成。

c) 结论

羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗炎活性可通过体外模型进行评估，是通过其调节两种表皮细胞因子，PGE-2 和 IL-1 α ，的产物完成的，该二细胞因子在炎症过程中起重要作用。通过对用刺激剂 PMA 刺激的人正常的角化细胞培养进行研究。该实施例显示 PMA 在 10 ng/ml 的无毒剂量，首先诱导细胞内 IL-1 α 的明显升高，而后向培养基中生成和释放 PGE-2。羟基积雪草苷和特米诺苷混和物能够明显降低 PMA 诱导的 PGE-2 的释放。混和物在剂量为 1 mg/ml 时能够完全抑制 PGE-2 的释放。本发明的混和物能够以剂量依赖的方式调节 PMA 诱导的 IL-1 α 的生成和在细胞内的积累剂量依赖性。

由于两种细胞因子在炎症过程中的重要性，羟基积雪草苷和特米

诺昔混和物显示出的剂量依赖性调节 PGE-2 的表达和释放，及在体外由角化细胞刺激 IL-1 α 的生成的能力使之被认为其具有抗炎活性。

实施例 8: 羟基积雪草苷和特米诺昔混和物在培养的人角化细胞中的抗炎活性的评估

5 该实施例的主旨是对羟基积雪草苷和特米诺昔混和物在干扰素 γ 诱导的 TNF- α 和 IL-8 的产物中的抗炎活性的评估。

a) 细胞毒性研究

该细胞毒性研究是通过与实施例 4 相同的方法完成，并得到相同的结果。

10 根据这些结果，确定选择 1 mg/ml 作为用于测定羟基积雪草苷和特米诺昔混和物的抗炎活性的最大剂量。

b) 干扰素- γ 对表皮细胞因子的影响

该研究是针对正常的人角化细胞进行的。细胞首先用 4 个浓度的干扰素 γ (IFN- γ) 处理 24 小时。

15 接着，在对照培养基和用 IFN- γ 处理的培养基中，通过分析培养基上清中的 IL-8 和 TNF- α 以及分析细胞蛋白质来测定炎性培养基，。该测定方法为考马斯蓝检测法；其是标准方法。结果见表 9 和表 10:

IL-8(pg/ μ g 蛋白质)		对照		干扰素 γ (U/ml)	
	0	100	500	1000	2000
平均标准偏差	0.077 0.060	0.980 0.119	1.301 0.102	1.991 0.113	2.917 0.138

表 9

20

TNF- α (pg/ μ g 蛋白质)		对照		干扰素 γ (U/ml)	
	0	100	500	1000	2000
平均标准偏差	3.260 0.519	3.198 0.744	8.605 1.195	10.773 1.673	14.545 1.256

表 10

结果显示干扰素 γ 在检测的浓度范围,100-2000 U/ml，以剂量依赖

的形式明显的诱导刺激了 TNF- α 和 IL-8 的生成。字母 U 是单位的缩写；1 U 相当于一个剂量单位的干扰素 γ 。

对于表皮细胞因子 TNF- α ，其在无刺激的培养基中的基准值在使用 1000 和 2000 U/ml 的干扰素刺激后，分别升高了 3.3 倍和 4.5 倍。对于表皮细胞因子 IL-8，其无兴奋性的基准值，在使用 1000 和 2000 U/ml 的干扰素刺激后，分别升高了 26 倍和 38 倍。

这些结果表明，干扰素能够刺激两种表皮细胞因子的表达、生成和释放。根据这些结果，确定选择 1000 U/ml 浓度作为刺激角化细胞的浓度。

10 c) 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗炎活性

该研究在人正常的角化细胞中进行。细胞在诱导刺激压力之前，首先用被研究物质处理 48 小时。接着，通过加入干扰素 γ ，IFN- γ 诱导刺激压力。这些被激活的细胞在研究用产物存在下培养 24 小时。最后，检测培养上清中的 IL-8 和 TNF- α 及细胞蛋白质水平。

15 c.1) 细胞因子 IL-8 的分析结果：

下表列出了在细胞活化以后得到的 IL-8 的量，作为基数其通过蛋白质的 pg/ μ g 的值表示。每个浓度的抗炎活性（而后称为 AIA）可根据下式计算：

$$20 \quad AIA = [IL-8(\text{对照细胞}+IFN) - IL-8(\text{处理细胞}+IFN) / IL-8(\text{对照细胞}+IFN)] \times 100$$

用羟基积雪草苷和特米诺苷混和物处理的角化细胞样本的结果见下表 11：

	无 IFN 的对照	有 IFN 的对照	IFN 和羟基积雪草苷+特米诺苷混和物			
		0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/μg 蛋白质)	0.06+/-0.01	1.03+/-0.04	0.72+/-0.09	0.53+/-0.06	0.39+/-0.03	0.39+/-0.02
抗炎活性			31%	49%	62%	63%

表 11

所得结果显示在 100 U/ml 的干扰素 γ 的刺激后确实有 IL-8 的生成和向对照培养基中的释放。无刺激培养基中记录的基数值在用 IFN- γ 刺激后增加了 18 倍。而且,这些结果还显示 IFN- γ 刺激的培养基的 IL-8 的量按剂量依赖性方式明显降低。干扰素诱导的 IL-8 的产生明显低于对照组。最高浓度的羟基积雪草苷和特米诺苷混和物能够抑制 63% 的 IFN- γ 诱导的 IL-8。C1、C2、C3、C4 组记录的相对于对照组的差异具有统计学的显著意义 ($p \leq 0.01$, t 检验)。

c.2) 细胞因子 TNF- α 的结果:

下表列出了在细胞活化以后得到的 TNF- α (pg/mg 蛋白质)的量,其也作为基数。每个浓度的抗炎活性 (而后称为 AIA) 可根据下式计算:

15
$$AIA = [TNF- \alpha \text{ (对照细胞+IFN)} - TNF- \alpha \text{ (处理细胞+IFN)} / TNF- \alpha \text{ (对照细胞+IFN)}] \times 100$$

用羟基积雪草苷和特米诺苷混和物处理的角化细胞样本的结果见下表 12:

	无 IFN 的 对照	有 IFN 的 对照	IFN 和羟基积雪草苷+特米诺昔混和物			
		0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
TNF- α (pg/ μ g 蛋 白质)	2.39 $\pm$ 0.1 6	5.26 $\pm$ 0.31	4.95 $\pm$ 0.2 2	4.97 $\pm$ 0.2 4	4.67 $\pm$ 0.1 5	3.92 $\pm$ 0.1 0
抗炎活性			6%	6%	11%	26%

表 12

- 所得结果显示在浓度为 100 U/ml 的干扰素 γ 的刺激后确实有
- 5 TNF- α 的生成和向对照培养基中的释放。无刺激培养基中记录的基数
值在用 1000 U/ml 的 IFN- γ 刺激后增加了 2.2 倍。所得结果还显示 IFN- γ
刺激的培养基的 TNF- α 的量按剂量依赖性方式轻微降低。干扰素诱
导的 IL-8 的量明显低于对照组。最高浓度的羟基积雪草苷和特米诺昔
混和物能够抑制 26% 的 IFN- γ 诱导的 TNF- α 。

10 d) 结论

羟基积雪草苷和特米诺昔混和物的抗炎活性可在体外模型中，通
过其能调节在炎症过程发挥重要作用的两种表皮细胞因子，IL-8 和
TNF- α ，的生成来评估。通过对用刺激剂-IFN- γ 刺激的培养的人正常
角化细胞进行研究。

- 15 该实施例显示无毒剂量 1000 U/ml 的 IFN- γ 首先诱导 IL-8 水平的
显著升高，而后，生成 TNF- α 并向培养基中释放。本发明的混和物能
够以剂量依赖的形式调节 IFN- γ 诱导的 IL-8 的生成和在细胞内的积累
剂量依赖性。混和物在剂量为 1 mg/ml 时能够以 63% 水平抑制 IL-8 的
释放。

- 20 羟基积雪草苷和特米诺昔混和物能够降低 IFN- γ 诱导的 TNF- α
的释放。该混和物在剂量为 1 mg/ml 时能够抑制 26% 的 TNF- α 的释放。

如果在一个封闭系统中，即在体外进行的分析检验所得到的结果
被推断假设其化学活性在体内是有效的，则以下的观察是客观的：TNF-

α 不仅是在角化细胞中，而且在特别是巨噬细胞和 B 淋巴细胞中是一种 IL-8 生成的活性剂。

首先，该混和物仅部分地降低 TNF- α 的表达的事实，超出了炎症信号表达的缓解，表明了对免疫系统活性的调控没有被抑制，原因是
5 TNF- α 在细胞控制及对皮肤，特别是凋亡期的监控中起重要作用。其次，该混和物降低 IL-8 的表达，造成中性粒细胞、嗜碱性多形核白细胞趋向性的减弱，和蛋白水解“压力”的降低的结果，以及导致炎症信号传导的缓和，另外还有血管渗透性的减弱。另一个结果是，作为反馈，IL-8 诱导的皮肤的 T 淋巴细胞活性减弱。

10 实施例 9：羟基积雪草苷和特米诺苷混和物对人角化细胞的 SKALP 产物的影响

该实施例的主旨是通过处于分化状态的角化细胞的细胞角蛋白 10，特别是艾乐汾（elafin，这里简写为 CK10 或 SKALP）的表达评估羟基积雪草苷和特米诺苷混和物抗牛皮癣的活性。

15 a) 细胞毒性研究

该研究是通过与实施例 4 相同的方法完成，并得到相同的结果。根据结果，决定选择浓度 1 mg/ml 为检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗牛皮癣活性的最大剂量。

b) SKALP 的表达和角化细胞的分化

20 该研究是在人正常的角化细胞中进行的。这些细胞置于三种不同的培养基中进行培养。

- “增殖”培养基：含 gf，即生长因子的 KGM 培养基，培养基用生长因子补充，

- “正常分化”培养基：不含 gf 的 KGM 培养基，除去培养基的生
25 长因子，

- “牛皮癣型分化”培养基：含 FCS 的 KGM 培养基，培养基中补充有胎牛血清，以下称为 FCS（5%）。

接着，测定不同培养基中培养 72 小时的细胞中的 SKALP 含量。测定方法是在皮肤药理学和应用皮肤生理学，2002; 15:152-261.中描述的
30 的 EKISA 检测法。

结果如下：

1. 含 gf 的 KGM 培养基 SKALP=1.17+/-0.18 ng/ μ g 蛋白
100
2. 不含 gf 的 KGM 培养基 SKALP=1.34+/-0.20 ng/ μ g 蛋白
115
- 5 3. 含 FCS 的 KGM 培养基 SKALP=2.76+/-0.08 ng/ μ g 蛋白
236

所得结果显示 SKALP 表达根据细胞的分化状态而变化。SKALP 的生成在细胞用包含 FCS 的培养基培养时明显增加。“牛皮癣型”分化培养基中的 SKALP 量与增殖型培养基记录的 SKALP 量相比增加了 2.4 倍。

c) 产物“抗牛皮癣”效果的研究

该研究条件如下：细胞置于“正常”分化的培养基，即无 gf 的 KGM 培养基中，以及在“牛皮癣型”培养基，即含 FCS 的 KGM 培养基中，在不含（作对照组）或含本发明的混和物的条件下，培养 72 小时。随即测定培养液上清中 SKALP 的量。也随之测定细胞蛋白。表 13 和 14 列出了在无 gf 的 KGM 培养基和含 FCS 的 KGM 培养基中进行细胞培养后得到的 SKALP 的量，以蛋白 ng/ μ g 表达。

a) “正常”分化培养基中培养：不含 gf 的 KGM 培养基，

	含 gf 的 KGM	不含 gf 的 KGM	不含 gfKGM+本发明的混和物			
		0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
SKALP (pg/ μ g 蛋白质)	1.17+/-0.18	1.34+/-0.20	1.01+/-0.24	1.15+/-0.16	1.05+/-0.18	0.53+/-0.14
SKALP 产物		100 %	75%	86%	78%	40%

表 13

所得结果显示用本发明混和物处理的样本中 SKALP 的量下降。只有 C4 组与“无 gf 的 KGM”对照组有统计学上的显著差异 ($p \leq 0.01$, t 检验)。羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的最高浓度能够抑制 60% 的“正常”分化培养基组的 SKALP 的分泌。

β) “牛皮癣型”分化培养基中培养: 含FCS的KGM培养基

	含 gf 的 KGM	含 FCS 的 KGM	含 FCS 的 KGM+本发明的混和物			
		0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
SK ALP (ng/ μ g 蛋白 质)	1.13+ /-0.19	2.7 6+/-0.08	2.22+/ -0.24	2.34+/ -0.12	2.06+/ -0.15	1.64+/ -0.10
SKALP 产物		10 0%	80%	85%	75%	60%

表 14

所得结果显示用本发明混和物处理的培养基中 SKALP 的量有剂
5 量依赖性的下降。与“含 FCS 的 KGM”对照组相比，C1、C2、C3 和
C4 组统计学上有显著差异 ($p \leq 0.01$, t 检验)。羟基积雪草苷和特米诺
苷混和物的最高浓度能够抑制 40%的“牛皮癣型”分化培养基组的
SKALP 的分泌。

d) 结论

10 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗牛皮癣活性通过在体外模型
中调节 SKALP 分泌的能力加以评估，其中 SKALP 被认为在牛皮癣型
疾病中起重要作用。该研究是在不同培养基中的正常人角化细胞的培
养基中进行的。

该实施例显示 SKALP 的表达根据细胞分化状态的不同而变化，并
15 且在“牛皮癣型”培养基即含有 FCS 的培养基中显著升高。

本发明的混和物能够以剂量依赖性的方式抑制“正常”分化培养
基组和“牛皮癣型”分化培养基组中的 SKALP 的分泌。剂量为 1 mg/ml
的混和物能够抑制 60% 的“正常”分化培养基组中的 SKALP 分泌，
并抑制 40% 的“牛皮癣型”分化培养基组中的 SKALP 分泌。因为
20 SKALP 在牛皮癣疾病中起重要作用，羟基积雪草苷和特米诺苷混和物
以剂量依赖的方式对在体外不同分化培养基中的角化细胞的 SKALP
的分泌能力的调节被认为是其抗牛皮癣活性。该结果证明根据在炎性

增生反应中的细胞脱敏作用的方法，本发明的混和物对牛皮癣型模型特征性的表皮细胞蛋白水解有保护作用。

实施例 10：羟基积雪草苷和特米诺苷混和物对培养中的成纤维细胞 NFκB 活性的影响

5 核因子 κB 是一种支配编码细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞粘附分子和某些短效蛋白质的基因表达的转录因子。NFκB 被一些包括细胞因子、自由基、可吸入颗粒、紫外线辐射以及细菌或病毒的物质活化。

10 炎性介质如 TNF-α 通过 NFκB 转录因子的活化诱导目标前炎症反应基因的转录。在无刺激条件下，转录因子 NFκB 在细胞质内是与抑制性蛋白 IκB 结合的。TNF-α 与受体结合导致该复合物的磷酸化以及 NFκB 从抑制剂中裂解。活化的 NFκB 随即迁移进入细胞核中，与启动子序列结合，称为 NFκB 共有序列 (NFκB consensus sequence)，对被 NFκB 激活的基因有特异性。该序列引起目标基因的转录。NFκB
15 的激活能够通过使刺激的和非刺激的核提取物与固定在载体上的 NFκB 共有寡核苷酸序列接触来测定，并使用免疫酶方法如 ELISA，用抗 NFκB 的抗体定量所结合的 NFκB。

20 该研究可以依据测定转录因子 NFκB 与固定在塑性载体的共有寡核苷酸序列的结合的非常灵敏的特定方法来评估本发明的混和物对 NFκB 活性的影响。结合的 NFκB 继而通过特定的抗 NFκB 抗体识别。该分析是在分离的正常人成纤维细胞核上进行的。

培养基是 DMEM，其包括：

- 2mM 的 L-谷氨酰胺
- 50 IU/ml 青霉素，50 μg/ml 的链霉素
- 25 • 10% (v/v)的胎牛血清用于预培养，而后换成无血清培养基

分析样品	原溶液	稀释液	检测的最终浓度
本发明的混和物	10%在培养基中	培养基	0.01%

表 15

参照	原溶液	稀释液	检测的最终浓度
地塞米松 (Sigma D1756)	10^{-2} M, DMSO 中	培养基	$0.1 \mu\text{M}$
柳氮磺吡啶 (Sigma S0883, MW398.4)	1M, DMSO 中	培养基	5 mM

表 16

a) 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的细胞毒性研究

5 该研究是采用实施例 4 同样的方法，并有同样的结果。根据这些结果，确定选择 0.01%浓度作为最大剂量，用于检测羟基积雪草苷和特米诺苷混和物的抗牛皮癣活性。

b) 处理、提取和分析

成纤维细胞在 175 cm^2 长颈瓶中，在包含 10 vol%的 FCS 的 DMEM 培养基中预培养，直至达饱和状态，培养基随即换成无血清的 DMEM 培养基。细胞在被检测物或对照物存在的情况下培养 1 小时。前炎症反应物质生长因子 α (TNF- α ，在 25 ng/ml 的最终浓度下；Sigma T0157) 加入到培养基中，细胞在 37°C ，5% CO_2 条件下培养 1 小时。之后，在冰上收集细胞，根据供应商推荐的方法应用 Sigma NUC-101 试剂盒收集不同样本的细胞核。每个胞核提取物的蛋白质含量应用 Biorad 500-0116 检测试剂盒确定。活化的 NF κ B 与特定的寡核苷酸的结合的量在应用特定的抗 NF κ B 抗体目测后，以与同样样本的核提取物相同的量，即 $50 \mu\text{l}$ ，按 50/50 稀释，测定。该检测按供应商推荐的方法应用 BD 生物科学公司的 (BD Biosciences K2058-1) 转染 NF κ B 检测试剂盒墨可 (Mercury) 来完成。

c) NF κ B 分析

结果见表 17:

处理	NFκB(AU)	均值	%对照	P
非处理的对照	10.71 8.39 8.90 10.19	9.55	100	-
无 TNF-α 的对照	0.00 0.62 0.62 -0.21	0.26	3	p<0.01
5 mM 的柳氮磺吡啶	4.93 4.01 2.88 4.93	4.19	44	p<0.01
0.1 μM 的地塞米松	10.94 7.3 9.90 9.67	9.46	99	p<0.05
0.01% 的本发明混和物	10.16 6.79 9.63 9.63	9.05	95	p<0.05

表 17

AU 代表提取物中 NFκB 的任意单元；其为测定值和背景噪音的差值。

- 5 NFκB 在成纤维细胞核中的基数值很低。用 25 ng/ml 浓度的 TNF-α 处理很大程度地活化了转录因子 NFκB，与不含 TNF-α 的对照相比，约为 37 倍。应用过量寡核苷酸的对照可以显示实质上观察到的完全反应是可特定的结合 NFκB。5 mM 的柳氮磺吡啶，对照的 NFκB 易位抑制剂，明显降低 TNF-α 诱导的转录因子 NFκB 的活性，相当于 TNF-α 的对照的 44%，p<0.01。
- 10 α 的对照的 44%，p<0.01。

0.1 μM 地塞米松不抑制 TNF-α 诱导的 NFκB 的核易位。实际上，地塞米松抑制 NFκB 诱导基因的反式激活，但不抑制 NFκB 的活性或其向核的易位。因此具有对转录的抑制活性，但没有对 NFκB 易位的

影响；地塞米松的作用经由糖皮质激素受体在核水平上发生，因此其在柳氮磺吡啶的活性之后。

0.01%的本发明的产品没有显著的对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性的调节作用，相当于对照的 95%。该结果不排除其经其它机制形成的抗炎活性。

d) 结论

羟基积雪草苷或其异构体对 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性的不干涉导致了配体如炎症细胞因子和趋化因子的转录，这些因子可使细胞在致病抗原入侵时可以抵抗致病性抗原。

羟基积雪草苷及其异构体对于成纤维细胞生成的 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的活性没有协同或对抗作用。炎症配体在自身免疫反常异常中的调节，细胞膜上的 IL-1、IL-8、 $\text{TNF-}\alpha$ 、PGE-2 表明羟基积雪草苷及其异构体实际上是在翻译水平（更好的耐受炎症的迁移）及表达和/或蛋白、肽或其它配体（更少的细胞内的 ILs 的表达）的合成系统水平上起作用。

实施例 11：在皮炎等价模型即培养的人成纤维细胞中评价体外积雪草皂苷及羟基积雪草苷和特米诺苷的混和物(50/50 w/w)对细胞外基质金属蛋白酶生成的调节作用

该实施例的主旨是在模拟皮肤环境中培养的人类皮肤成纤维细胞（胶原点阵）中评估积雪草皂苷及羟基积雪草苷和特米诺苷混和物（50/50 w/w）对保护金属蛋白酶(MMPs)及它们特定的抑制剂(TIMPs)的调节活性。建议进行体外实验测定在含或不含本发明的产品及用 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激的人成纤维细胞引起的释放进入培养基中 MMP-1 和 TIMP-1 的量。该研究根据移植的方法，在源于对皮肤活检的人成纤维细胞上进行的。根据实验室常规的方法在相对湿度 37%，空气- CO_2 （95%-5%）的环境下在 DMEM 培养基（以 InvitrogenTM 商品名由 Life Technologies 商购）中培养成纤维细胞，该培养基中加入胎牛血清（10%FCS）及抗体。

a) 细胞毒性

细胞毒性研究方法同实施例 6。

• 积雪草皂苷：

产品的原液事先在 DMSO 中溶解制备，而后在培养基中稀释，得到不同的检测溶液（DMSO 的最终浓度：1%）。一个宽范围的 8 个浓度的样本 [从 5-1000 μ g/ml] 用来研究，以得到接近的最大的无毒性剂量（NCD）。接触 24 小时后，在所测定的浓度范围内没有显著的细胞毒性发生。根据这些结果，确定一个限定的范围（从 10-1000 μ g/ml）
5 以便于在接触 48 小时后确定最大无毒性剂量（NCD）。结果（表 18）证实培养 48 小时后低于 1 mg/ml 的浓度无毒性。在 1 mg/ml 的活性物质存在下细胞存活率仅有 12% 的下降。

积雪草皂 苷(pg/ml)	10	25	50	75	100	250	500	750	1000
存活率 (24h)	98%	101%	101%	n.t.	101%	101%	97%	n.t.	93%
存活率 (48h)	108%	107%	106%	104%	102%	99%	93%	90%	88%

表 18

10

• 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物：

产品的原液事先在 DMSO 中溶解制备，而后在培养基中稀释，得到不同的检测溶液（DMSO 的最终浓度：1%）。一个宽范围的 8 个浓度的样本 [从 0.005-100 mg/ml] 在人称纤维细胞上用来研究，以得到
15 接近的最大的无毒性剂量（NCD）。接触 24 小时后，浓度等于 1 mg/ml 没有显著的中性红摄取的调节作用。除此以外，记录到剂量依赖性的细胞毒性效果。根据这些结果，确定一个限定的范围（从 0.1-10 mg/ml）用于确定最大无毒性剂量（NCD）。

结果（表 19）证实培养 48 小时后的无毒性浓度为 1 mg/ml。

羟基积雪草苷 和特米诺苷混 和物(mg/ml)	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10
存活率(24h)	98%	98%	n.t.	96%	n.t.	94%	n.t.	68%	n.t.	60%
存活率(48h)	n.t.	101 %	96%	97%	99%	99%	99%	86%	71%	47%

表 19

20

根据细胞毒性的研究结果，“1 mg/ml”的浓度被选择作为最大无毒性剂量（NCD），用于测定积雪草皂苷及羟基积雪草苷和特米诺苷混和物对 MMPs 生成的活性作用。

b) 金属蛋白酶的生成

- 5 以单分子层培养的人类皮肤成纤维细胞通过胰蛋白酶的消化作用从其载体中分离并悬浮在培养基中。计数后，细胞悬浮液在培养基中稀释，并按规定的比例加入浓缩培养基（1.76×DMEM）、胎牛血清（FCS）和 I 型胶原（来源于鼠尾腱的醋酸提取物）的混和物中。冷却下将该混和物倾于 24-孔平板中，每孔 1 ml。皮肤等价物随即置于 37℃ 下培养
- 10 72 小时，条件为空气-CO₂（95%/5%）。在成纤维细胞的作用下凝胶逐渐收缩。

接种 72 小时后，去除培养基，更换包含各种不同的待研究的产品（进行“预处理”）的新的培养基。凝胶放到 37℃ 的培养箱内培养 24 小时，条件为空气-CO₂（95%/5%）。

- 15 培养后平板倾空。冲洗培养平板，而后暴露于含（处理组）或不含（对照组）不同浓度的研究样本的 TNF-α 溶液中。加入 TNF-α 后，在 37℃ 下培养 24 小时。培养结束后，去除培养基，离心取上清检测 MMP-1 和 TIMP-1。

- 20 研究是在三维胶原凝胶（与皮肤等同的）中培养的人类成纤维细胞中进行的。

► 操作条件：

1. 用 TNF-α 诱导 MMP-1 前处理细胞 24 小时。
2. 通过加入 TNF-α (10 ng/ml) 诱导 MMP-1，培养 24 小时。
3. 测定细胞存活率，及在对照和处理组上清中的 MMP-1 的量。

- 25 • 积雪草皂苷：

在三种浓度下检测积雪草皂苷：

C₁=0.2 mg/ml C₂=0.5 mg/ml C₃=1.0 mg/ml

► 细胞存活率（中性红检测）

- 30 用 10 ng/ml 的 TNF-α 处理的细胞对细胞存活率没有调节作用。暴露在 TNF-α 下没有观察到中性红摄取的下降。类似地，用 TNF-α 处

理后也没有观察到积雪草皂苷处理组的细胞存活的变化。

►MMP-1 的生成

表 20 列出了细胞 (+TNF) 活化后培养液上清中的 MMP-1 的量 (ng/ml)，和基础值 (-TNF)。

处理的胶原凝胶	MMP-1 的生成(ng MMP-1/ml)			
	(-)TNF- α		(+)TNF- α	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
对照	2.24	0.54	12.11	1.03
积雪草皂苷 (0.2 mg/ml)	未检测		9.96	0.47
积雪草皂苷 (0.5 mg/ml)	未检测		6.18	0.15
积雪草皂苷 (1.0 mg/ml)	未检测		3.40	0.21

5

表 20

在对照组细胞中，所得结果显示 TNF- α 诱导明显的 MMP-1 的生成。在非刺激细胞中记录的基值在用 TNF- α 刺激后升高了 503 倍。

在处理组细胞中，积雪草皂苷处理的样本用 TNF- α 刺激后的 MMP-1 的量低于(+)TNF- α 的对照组。

10

积雪草皂苷对 TNF- α 诱导的 MMP-1 的生成的效果是剂量依赖性的。在 C₁(p≤0.05)组、C₂(p≤0.01)组、C₃(p≤0.01)组相对于(+)TNF- α 对照组都具有统计学意义上的显著差异(t 检验)。

- 15
- C₁: 降低了 MMP-1 值的 18%
 - C₂: 降低了 MMP-1 值的 49%
 - C₃: 降低了 MMP-1 值的 72%

• 羟基积雪草苷和特米诺苷混和物
在三种浓度下检测该混和物：

C₁=0.2 mg/ml C₂=0.5 mg/ml C₃=1.0 mg/ml

20

►细胞存活率（中性红检测）

羟基积雪草苷和特米诺苷混和物处理的细胞存活率在用 TNF- α 处理后没有明显的调节作用。

►MMP-1 的生成

结果显示羟基积雪草苷和特米诺苷混和物处理和用 TNF- α 刺激的培养基上清中的 MMP-1 的量有剂量依赖性的降低。只在 C₂ 和 C₃ 组有统计学意义上的显著差异(($p \leq 0.01$, t 检验)。

- C₁: 降低了 MMP-1 值的 3% • C₂: 降低了 MMP-1 值的 39%
- C₃: 降低了 MMP-1 值的 61%

表 21 列出了上层细胞 (+TNF) 活化后上清中的 MMP-1 的量 (ng/ml), 和基础的值 (-TNF)。

	MMP-1 的生成(ng MMP-1/ml)			
	(-)TNF- α		(+)TNF- α	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
胶原凝胶处理				
对照	2.24	0.54	12.11	1.03
羟基积雪草苷+ 特米诺苷混和物 (0.2 mg/ml)	未检测		11.78	0.83
羟基积雪草苷+ 特米诺苷混和物 (0.5 mg/ml)	未检测		7.37	0.76
羟基积雪草苷+ 特米诺苷混和物 (1.0 mg/ml)	未检测		4.76	0.52

表 21

c) TIMP-1 的生成

也测定了积雪草皂苷或羟基积雪草苷+特米诺苷混和物处理的培养基上清中 MMP-1 的抑制剂 TIMP-1 的量。在 3 种浓度下测定每个活性物质。

C₁=0.2 mg/ml C₂=0.5 mg/ml C₃=1.0 mg/ml

表 22 列出了细胞 (+TNF) 活化后上清中的 TIMP-1 的量 (ng/ml),

还包括基础值（-TNF）。

	TIMP-1 的生成(ng TIMP-1/ml)			
	(-)TNF- α		(+)TNF- α	
胶原凝胶处理	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
对照	51.20	1.22	48.90	2.16
积雪草皂苷 (0.2 mg/ml)	未检测		51.01	1.51
积雪草皂苷 (0.5 mg/ml)	未检测		50.36	1.67
积雪草皂苷 (1.0 mg/ml)	未检测		48.82	2.22
羟基积雪草苷+特米 诺苷混和物 (0.2 mg/ml)	未检测		48.63	1.18
羟基积雪草苷+特米 诺苷混和物 (0.5 mg/ml)	未检测		46.98	2.02
羟基积雪草苷+特米 诺苷混和物 (1.0 mg/ml)	未检测		48.76	0.92

表 22

5 结果显示：

- 在凝胶中培养的成纤维细胞生成的 TIMP-1 不被 TNF- α 所调节；
- 包括积雪草皂苷及羟基积雪草苷+特米诺苷混和物的活性物在检测的浓度范围内没有显示对 TIMP-1 生成的调节作用。

d) 结论：

10 对包括积雪草皂苷及羟基积雪草苷+特米诺苷混和物的活性物对金属蛋白酶（MMPs）和其抑制剂（TIMPs）的生成的调节作用在体外人的真皮模型上进行评估。该研究是在三维胶原基质中培养的正常人成纤维细胞中进行的。该效果的评价是通过测定 TNF- α 的激活细胞后

培养基上清中的 MMP-1 和 TIMP-1 的量完成的。

应用所选择的实验条件，所得结果如下：

- TNF- α 在无细胞毒性剂量(10 ng/ml)下诱导显著的 MMP-1 生成的增加。另一方面，对 TIMP-1 的生成则没有明显的调节作用；

- 5 • 包含积雪草皂苷及羟基积雪草苷+特米诺苷混和物的活性物能够以计量依赖的方式降低 TNF- α 诱导的 MMP-1 的生成量，在最高检测浓度 1mg/kg 时，两种活性物质分别能降低 TNF- α 诱导的 MMP-1 的量的 72%和 61%。

- 10 • 积雪草皂苷及羟基积雪草苷+特米诺苷混和物在其检测浓度范围内，对 TIMP-1 的生成没有影响。

对人成纤维细胞的研究观察到 TNF- α 的炎性刺激明显增加了 (530%) MMP-1(胶原酶)释放入培养基。羟基积雪草苷-特米诺苷混和物，与积雪草皂苷一样，可显著地以剂量依赖方式降低 MMP-1 的浓度 (在 500 μ g/kg, 羟基积雪草苷-特米诺苷混和物=-39%，而积雪草皂苷=-49%)。MMP-1 的抑制剂 TIMPs 的释放，特别是 TIMP-1，不被调节。该结果是对比了 SKALPs (实施例 9) 的研究结果，在存在有羟基积雪草苷-特米诺苷混和物时，高浓度的白细胞蛋白酶并不增加抑制剂的分泌，但可通过角化细胞较大的降低前炎症反应配体的量。

20 该研究还表明羟基积雪草苷-特米诺苷混和物以及积雪草皂苷是两皮肤层的活性剂，即表皮层和真皮层。

实施例 12：特米诺苷、羟基积雪草苷和葡萄糖苷（特米诺苷、羟基积雪草苷和积雪草皂苷）混和物的抗炎活性

在该实施例中，葡萄糖苷混和物是由相对于混和物总重量的 40 wt%的特米诺苷、40 wt%的羟基积雪草苷和 20 wt%的积雪草皂苷组成。

- 25 为评估特米诺苷、羟基积雪草苷和葡萄糖苷（特米诺苷、羟基积雪草苷和积雪草皂苷）混和物的抗炎活性，我们研究了在用干扰素- γ (IFN- γ) 或 PMA 诱导的刺激性应激下，这三种活性物质对前炎症反应表皮细胞因子 (IL-8、IL-1 α 、PGE-2) 在培养的人角化细胞中的生成和释放。人角化细胞从人皮肤中分离。细胞在无血清的 KGM 培养基 (角化细胞生成培养基，可以从 Clonetics®公司商购) 中培养，运用的是实验室的常规技术，温度 37°C，湿润空气-CO₂ (95%-5%)。细胞生
- 30

长达饱和状态前在 25 cm² 瓶中接种，并有规律地传代。检测的原理是基于在应激条件下评价人角化细胞的前炎症反应细胞因子的生成。该方法是基于在研究产物存在或不存在情况下，测定应激用干扰素- γ (IFN- γ) 或 PMA (巴豆醇-12-肉豆蔻酸酯-13 醋酸酯) 刺激的细胞内 IL-1 α 和 IL-8 和 PGE-2 的释放来完成的。

a) 细胞毒性

细胞毒性研究用与实施例 6 相同的方法在 HaCaT 人角化细胞和正常人角化细胞中完成的。

• 特米诺昔:

10 *对 HaCaT 人角化细胞的毒性

表 23 列出了这些结果 (细胞存活率以与对照的%表示)

浓度 (mg/ml)	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10
存活率 (24h)	105 %	104 %	104 %	105 %	n.t.	100 %	100 %	81%	n.t.	73%
存活率 (72h)	n.t.	100 %	101 %	101 %	103 %	102 %	103 %	93%	86%	69%

表 23

15 接触 24 小时后, 浓度 ≤ 2.5 mg/ml 没有诱导显著的对 RN 的细胞反应的调节作用。超过 2.5 mg/ml 浓度, 则有轻微的剂量依赖性的细胞毒性。

*对人角化细胞的毒性

20 细胞毒性的研究是分析人角化细胞 (K₀₂₋₁H₄ 属), 以确定对靶细胞的无毒性的浓度。表 24 列出了这些结果 (细胞存活率以与对照的%表示)

浓度(mg/ml)	0.25	0.5	0.75	1.0	2.5	5	10
存活率(72h)	101%	103%	103%	102%	99%	96%	69%

表 24

结果确定了在培养 72 小时后, 无毒浓度小于或等于 2.5 mg/ml。

• 羟基积雪草苷:

*对 HaCaT 人角化细胞的毒性

表 25 列出了这些结果

浓度 (mg/ ml)	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10
存活 率 (24h)	105%	102%	103%	99%	n.t.	100%	85%	75%	n.t.	63%
存活 率 (72h)	n.t.	101%	102%	102%	101%	101%	92%	76%	71%	56%

表 25

接触 24 小时后，浓度低于 1.0 mg/ml 的没有诱导显著的对 RN 的
5 细胞反应的调节作用。超过 1.0 mg/ml 浓度，则有轻微的剂量依赖性的
细胞毒性。

*对人角化细胞的毒性

毒性研究是对人角化细胞（K₀₂₋₁H₄ 属）进行分析，以确定对“靶”
细胞的无毒性浓度。

10 表 26 列出了所有的结果（细胞存活率以与对照的%表示）

浓度(mg/ml)	0.25	0.5	0.75	1.0	2.5	5	10
存活率(72h)	102%	101%	102%	101%	97%	88%	72%

表 26

结果证实无毒性浓度低于 2.5 mg/ml。大于该浓度，有轻微的剂量
依赖性的细胞毒性效果。

• 葡萄糖苷：

15 *对人角化细胞 HaCaT 的细胞毒性

表 27 列出了所有的结果（细胞存活率以与对照的%表示）

浓度(mg/ml)	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10
细胞存活 (24h)	102 %	103 %	99%	100 %	85%	85%	75%	n.t.	63%
细胞存活 (72h)	100 %	101 %	97%	95%	97%	90%	80%	74%	38%

表 27

接触 24 小时后，浓度小于 1.0 mg/ml 的没有显著的对 RN 的细胞反应的调节作用。超过 1.0 mg/ml，有轻微的剂量依赖性的细胞毒性作用。

5 *人角化细胞的细胞毒性

细胞毒性的研究是对人角化细胞的分析（K₀₂₋₁H₄ 属），以确定对“靶”细胞的无毒性浓度。表 28 列出了所有的结果（细胞存活率以与对照的%表示）。

浓度(mg/ml)	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.5	5	10
存活率(72h)	97%	97%	99%	93%	88%	64%	34%	12%

表 28

结果证实无毒性的浓度小于 0.75 mg/ml。超过此值，有轻微的剂量依赖性的细胞毒性影响。基于这些结果，浓度等于 1 mg/ml 被选择作为检测三种活性剂的抗炎活性的最大剂量。

b) 干扰素- γ 的作用

干扰素- γ （IFN- γ ）对于表皮细胞因子的生成和释放的作用应用人正常的角化细胞（K₀₂₋₁H₄ 属）进行研究。检测 4 种浓度的 IFN- γ ：

C₁=100 U/ml C₂=500 U/ml C₃=1000 U/ml C₄ = 2000 U/ml

► 细胞内 IL-1 α 的生成

结果见表 29：

IL-1 α (pg/μg 蛋白)	对照	干扰素-γ (U/ml)			
	0	100	500	1000	2000
平均值	3.25	6.80	8.29	11.21	12.48
标准偏差	0.05	0.12	0.12	0.73	0.80

表 29

结果显示干扰素-γ 在检测的浓度范围内，按剂量依赖方式诱导显著的细胞内 IL-1 α 的刺激。在无刺激的细胞中记录的基线值 (3.25±0.05 pg/μg 蛋白)在用 1000 和 2000 pg/ml 的 IFN-γ 刺激后，大约分别有 2.6 倍和 3.8 倍的增加。

►IL-8 的释放

IFN-γ 对 IL-8 生成和释放的影响是在相同的实验条件下研究的。结果见表 30:

IL-8 (pg/μg 蛋白)	对照	干扰素-γ (U/ml)			
	0	100	500	1000	2000
平均值	0.093	0.252	0.350	0.516	0.671
标准偏差	0.013	0.042	0.009	0.004	0.048

表 30

培养基中未用干扰素-γ 刺激的结果证实在基础状态的角化细胞的培养基中含或不含小量的 IL-8。另一方面，用 IFN-γ 刺激后的 IL-8 生成和释放明显增加。该剂量依赖性的细胞内 IL-8 的增加(+IFN-γ)证实了前炎症反应细胞因子在 IL-8 的生成和释放中的作用。

►PGE-2 的释放

IFN-γ 对 PGE-2 的生成和释放的影响是在相同的实验条件下研究的。结果见表 31:

细胞外 PGE-2 (pg/μg 蛋白)	对照	干扰素-γ (U/ml)			
	0	100	500	1000	2000
平均值	10.49	3.60	3.45	3.48	3.80
标准偏差	3.16	0.61	0.32	0.74	0.13

表 31

结果显示 IFN-γ 不能在检测的范围内刺激 PGE-2 的生成和释放。

c) 抗炎活性:

该研究是用从幼童包皮分离出的角化细胞进行分析的(K₀₂₋₁H₆ 属)。

5 每种活性物质，特米诺昔、羟基积雪草苷和葡萄糖苷，都检测 4 个浓度：

C₁=0.01 mg/ml C₂=0.25 mg/ml C₃=0.50mg/ml C₄ = 1.00 mg/ml

检测条件:

10 1. 在刺激应激诱导之前用所要研究的产品处理细胞 48 小时; 2. 加入刺激应激诱导：即用 IFN-γ (1000 U/ml); 3. 在研究产品存在的情况下培养 “活化” 细胞 24 小时; 4. 分析：IL-8 (细胞外) 和 IL-1 α (细胞内)。进行细胞蛋白分析。

► IL-8 的释放

15 表 32 至 34 列出了 IL-8 在细胞活化后 (+IFN-γ) 的量，以及基础量 (-IFN-γ)。对于每种浓度的活性物质 IFN-γ 诱导的 IL-8 的生成及抗炎活性可以根据如下公式计算：

AIA = [IL-8(对照细胞+IFN)-IL-8(处理细胞-IFN)/IL-8(对照细胞+IFN)]×100

20 • 特米诺昔

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ + 特米诺昔			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g 蛋白)	0.099 $\pm$ 0.005	0.843 $\pm$ 0.026	0.862 $\pm$ 0.076	0.762 $\pm$ 0.052	0.708 $\pm$ 0.030	0.492 $\pm$ 0.014
抗炎活性 (%)			0%	9%	15%	42%

表 32

用 IFN- γ 刺激后在对照组观察到 IL-8 的释放。在无刺激组中记录的很小的基础值说明 IL-8 在基态下并不存在，但其表达和释放可由 IFN- γ 诱导。用 IFN- γ 刺激后基础值有大约 8.5 倍的升高。用 IFN- γ 刺激后记录的 IL-8 的量在用活性剂特米诺昔处理组低于(+)IFN- γ 对照组。

活性剂特米诺昔对于 IFN- γ 诱导的 IL-8 的释放的影响是剂量依赖性的。在 C₂ ($p \leq 0.05$)、C₃ ($p \leq 0.01$) 和 C₄ ($p \leq 0.01$) 组中发现有相对于(+)IFN- γ 对照组的统计学意义上的显著差异 (t 检验)。最大检测浓度 (1 mg/ml) 能够降低 IFN- γ 诱导的 IL-8 生成的 42%。

• 羟基积雪草苷:

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ + 羟基积雪草苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g 蛋白)	0.099 $\pm$ 0.005	0.843 $\pm$ 0.026	0.656 $\pm$ 0.043	0.643 $\pm$ 0.047	0.614 $\pm$ 0.039	0.368 $\pm$ 0.019
抗炎活性 (%)			21%	24%	27%	56%

表 33

结果显示了在用羟基积雪草苷处理和 IFN- γ 刺激的组中有剂量依赖性的 IL-8 的降低。在 C₁、C₂、C₃ 和 C₄ 组中有统计学意义上的显著差异 ($p \leq 0.01$, t 检验)。最大检测浓度 (1 mg/ml) 能够降低 IL-8 生成的 56%。

• 葡萄糖苷:

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ + 葡萄糖苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g 蛋白)	0.099+/- 0.005	0.843+/-0.0 26	0.83+/-0.0 4	0.63+/-0.1	0.47+/-0.0 6	0.36+/-0. 01
抗炎活性 (%)			1%	25%	44%	57%

表 34

结果显示了在用葡萄糖苷混和物（羟基积雪草苷、特米诺苷和积雪草皂苷）处理和 IFN- γ 刺激的组中有剂量依赖性的 IL-8 的降低。在 C₁、C₂、C₃ 和 C₄ 组中有统计学意义上的显著差异 ($p \leq 0.01$, t 检验)。浓度 (1 mg/ml) 能够降低 57% 的 IL-8 生成。

► 细胞内 IL-1 α 的生成

表 34 至 36 列出了 IL-1 α 在细胞活化后 (+IFN- γ) 的细胞含量，以及基础值 (-IFN- γ)。对每个浓度的活性物质 IFN- γ 诱导 IL-1 α 的生成及抗炎活性可以以如下公式加以计算：

$$AIA = [\text{IL-1}\alpha \text{ 产量(对照细胞)} - \text{IL-1}\alpha \text{ 产量(处理细胞)} / \text{IL-1}\alpha \text{ 产物(对照细胞)}] \times 100$$

• 特米诺苷

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ + 特米诺苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g 蛋白)	2.71+/-0.0 9	10.04+/- 0.44	8.78+/-0.7 7	8.08+/-0.4 3	7.31+/-0.3 8	5.02+/-0.1 3
IL-1 α 产量		7.33	6.07	5.37	4.60	2.31
抗炎活性 (%)			17%	27%	37%	68%

表 35

在(+IFN- γ)对照组中，IL-1 α 的基础值在用 IFN- γ 处理后有 3.7 倍的升高，证实 IL-1 α 是一种细胞因子，其可在细胞内被 IFN- γ 诱导生成。在用特米诺昔活性剂处理的组中有明显的 IL-1 α 量的降低。该
5 抑制效果是剂量依赖性的。在 C₁ ($p \leq 0.05$)、C₂ ($p \leq 0.01$)、C₃ ($p \leq 0.01$) 和 C₄ ($p \leq 0.01$) 组中发现有相对于(+IFN- γ 对照组的统计学意义上的显著差异 (t 检验)。

活性物质在浓度为 1 mg/ml 时能够降低 68%的 IFN- γ 诱导的 IL-1 α 的生成。

- 10 • 羟基积雪草苷：

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ +羟基积雪草苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g 蛋白)	2.71+/-0.09	10.04+/-0.44	8.23+/-0.57	8.23+/-0.64	8.07+/-0.69	6.05+/-0.37
IL-1 α 产量		7.33	5.52	5.52	5.36	3.34
抗炎活性 (%)			25%	25%	27%	54%

表 36

结果显示在用 1 mg/ml 的羟基积雪草苷处理的组中 IL-1 α 有 54% 的 IL- α 的降低。另外, 在 C₁、C₂ 和 C₃ 浓度下有相同的结果: 大约 25% 的 IL-1 α 量的降低 ($p \leq 0.01$)。

• 葡萄糖苷:

	对照 (-IFN- γ)	对照 (+IFN- γ)	IFN- γ +葡萄糖苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g 蛋白)	2.71+/-0.09	10.04+/-0.44	8.78+/-0.13	9.03+/-0.83	7.52+/-0.38	5.56+/-0.39
IL-1 α 产量		7.33	6.07	6.32	4.81	2.85
抗炎活性 (%)			17%	14%	34%	61%

表 37

结果显示了在用 1 mg/ml 的葡萄糖苷混和物处理的组中 IL-1 α 有 61%的降低 ($p \leq 0.01$)。

10 d) 抗炎活性-PMA 应激:

由于 IFN- γ 对 PGE-2 生成的释放缺乏影响, 活性物质的抗炎作用在用 PMA 刺激的人正常角化细胞 (K₀₂₋₁H₆ 属) 上进行研究。每个活性

物质检测 4 个浓度：

C1=0.10 mg/ml C2=0.25 mg/ml C3=0.50 mg/ml C4 = 1.00 mg/ml

检测条件：

- 5
1. 应激刺激诱导前用研究产物处理细胞 48 小时，

2. 应激诱导：PMA(10 ng/ml)，

3. 在研究产物存在下培养“活化”细胞 24 小时，

4. 检测 PGE-2（细胞外）和细胞蛋白。

►PGE-2 的释放

- 10
- 表 37-39 列出了细胞活化后（+PMA）的 PGE-2（pg/μg 蛋白）的量，以及基础值（-PMA）。对于每种浓度，PMA 诱导的 PGE-2 的生成和抗炎活性可以以下公式进行计算，

PGE-2 产物=[PGE-2(+PMA)-PGE-2(-PMA)]

- 15
- AIA=[PGE-2 产量(对照细胞)-PGE-2 产量(处理细胞) / PGE-2 产物 (对照细胞)]×100

• 特米诺昔

	对照 (-PMA)	对照 (+PMA)	PMA+活性剂 “特米诺昔”			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/μg 蛋白)	165.8+/-19.8	660.0+/-51.6	660.0+/-29.9	606.80+/-63.6	445.7+/-16.7	321.0+/-21.1
PGE-2 产量		494.2	494.2	441.0	279.9	115.2
抗炎活性 (%)			0%	10.8%	43.4%	68.6%

表 38

- 20
- 在(+PMA)对照组中，将角化细胞暴露于 PMA 下导致显著的 PGE-2 的生成及向培养基的释放。在无刺激培养基中记录的基础值在用 PMA 刺激后有 4 倍的升高，证实 PGE-2 为一种细胞因子，其可在 PMA 诱导下表达、生成和释放。结果显示 PGE-2 在用特米诺昔处理和用 PMA 刺激的组中有按剂量依赖方式下降。在 C₃ 和 C₄ 组中发现有统计学意义上的显著差异（p≤0.01，t 检验）。活性物质在浓度为 1 mg/ml 时能够

降低 69%的 PGE-2 的释放。

• 羟基积雪草苷：

	对照 (-PMA)	对照 (+PMA)	PMA+羟基积雪草苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/ μ g 蛋白)	165.8+/- 19.8	660.0+/-51. 6	622.7+/-18. 9	618.1+/-20. 7	436.3+/-32. 1	348.3+/-17. 8
PGE-2 产量		494.2	456.9	452.3	270.5	182.5
抗炎活性 (%)			7.5%	8.5%	45.3%	63.1%

表 39

- 5 在用活性物羟基积雪草苷处理的组中 PGE-2 在培养基中的量有明显的下降。该抑制效果属剂量依赖性。相对于(+)PMA 对照组只有 C₃ 和 C₄ 组有统计学意义上的显著差异 ($p \leq 0.01$, t 检验)。活性物羟基积雪草苷浓度在 1 mg/ml 时能够降低 63%的 PMA 诱导的 PGE-2 的生成。

10

• 葡萄糖苷：

	对照 (-PMA)	对照 (+PMA)	PMA +葡萄糖苷			
	-	0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/ μ g 蛋白)	165.8 +/-19. 8	660.0+/-5 1.6	646.5+/-33. 8	515.1+/-48. 4	326.8+/-15. 5	142.1+/-6.6
PGE-2 产量		494.2	480.7	349.3	161.0	0
抗炎活性 (%)			2.7%	29.3%	67.4%	100%

表 40

抑制活性为剂量依赖性的。葡萄糖苷混和物在 1 mg/ml 浓度下能够

完全抑制 PMA 诱导的 PGE-2 的生成。

e) 结论:

活性物质特米诺昔、羟基积雪草苷和葡萄糖苷的抗炎活性是在体外模型中通过它们对在炎症过程中起重要作用的表皮细胞因子 (IL-8、
5 IL-1 α 和 PGE-2) 的生成的调节能力来评估的。该研究是在干扰素- γ 或 PMA 刺激的人的正常的角化细胞中进行的。

活性物质的抗炎活性是通过测定以下量值来评估的:

- 干扰素- γ 活化后的 IL-8 和 IL-1 α 。
- 用 PMA 刺激后的 PGE-2。

10 在选择的实验条件下, 该研究显示:

► IFN- γ , 在检测浓度范围内(100-2000 U/ml)以剂量依赖方式诱导明显的 IL-1 α (细胞内) 的生成, 并导致 IL-8 的生成以及向培养基的释放。另一方面, 相同浓度的 IFN- γ 并不能刺激 PGE-2 的释放。

► PMA, 在无毒性剂量下 (10 ng/ml), 导致 PGE-2 向培养基的释
15 放。

► 活性物质特米诺昔、羟基积雪草苷和葡萄糖苷能够调节白细胞介素 IL-8 和 IL-1 α 的生成, 并能调节对炎症应激发生反应的前列腺素-2 的生成。比较细胞因子的量证实抗炎效果是根据研究物质、细胞因子的类型而可变的, 其变化为:

20 • 相对于 IL-8

三种检测活性剂均能够以剂量依赖方式调节这些细胞因子在生成和在细胞外的释放。

如果考虑用最高浓度的活性物质处理细胞后细胞因子的量, 三种检测产品可以按它们的抗炎的能力分类, 结果如下:

25 葡萄糖苷>羟基积雪草苷>特米诺昔

- 相对于 IL-1 α

三种检测活性物质均能够降低 IFN- γ 诱导的 IL-1 α 的生成和在细胞内的积累。三种检测产品可以根据最大抗炎效果分类, 如下:

特米诺昔 $\geq$ 葡萄糖苷 $\geq$ 羟基积雪草苷

30 • 相对于 PGE-2

两种活性剂, 羟基积雪草苷和特米诺昔, 能够明显降低 PMA 诱导

的 PGE-2 的释放。葡萄糖苷的混和物能够完全抑制 PMA 诱导的 PGWE-2 生成。根据这些结果可对产品作如下的分类：

葡萄糖苷混和物>羟基积雪草苷≈特米诺苷

- 5 由于这些细胞因子在炎症过程中的重要性，活性物质特米诺苷、羟基积雪草苷和葡萄糖苷通过在体外刺激的角化细胞调节 IL-8 和 IL-1 α ，以及前列腺素-2 的能力，被认为是非常有作用的具有“抗炎”活性的成分。