

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年9月15日(15.09.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/084693 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 35/78, A61P 11/02, 11/08

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000172

(22) 国际申请日: 2004年3月4日(04.03.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 日本大学
(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 日本国东京都千代
田区九段南四丁目8番24号, Tokyo 102-8275 (JP)。

(71)(72) 发明人/申请人: 王珏(WANG, Jue) [CN/JP]; 日本
千叶县船桥市夏见6-1-18 403室, Chiba 273-0865
(JP)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 北中进(KITANAKA,
Susumu) [JP/JP]; 草间贞(KUSAMA, Tadashi) [JP/
JP]; 木泽靖夫(KIZAWA, Yasuo) [JP/JP]; 日本国东
京都千代田区九段南四丁目8番24号日本大学内,
Tokyo 102-8275 (JP)。古谷美野里(FURUYA,
Minori) [JP/JP]; 日本国东京都目黑区八云2-15-15,
Tokyo 152-0023 (JP)。

(74) 代理人: 北京北新智诚知识产权代理有限公司
(BEIJING BEIXIN-ZHICHENG INTELLECTUAL

PROPERTY AGENT CO., LTD.); 中国北京市西城
区西直门南大街16号, Beijing 100035 (CN)

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: EXTRACT OF HIPPOPHAE RHAMNOIDES SEED

(54) 发明名称: 沙棘种子提取物

(57) Abstract: The present invention discloses extract of Hippophae rhamnoides seed having effects of inducing apoptosis, antihypersensitivity and antiinflammation. The present extract can be obtained by a method comprising extracting Hippophae rhamnoides seed with ethanol twice, concentrating the extract combined under reduced pressure, dissolving the resulting brown residue in water, extracting sequentially with ethyl ether, ethyl acetate, butanol three times respectively, concentrating ether phase, applying the resulting brown oil to silica gel column, eluting with ethyl acetate, and collecting the elutes. The present extract has the activity of inducing apoptosis of eosinophil granulocyte; can activate MBP kinase; and serve to induce apoptosis of eosinophil granulocyte in various diseases caused by excess eosinophil granulocyte.

(57) 摘要

本发明公开了一种具有诱导细胞凋亡、抗过敏和抗炎作用的沙棘种子提取物。该提取物可以通过以下方法得到: 将沙棘种子经过乙醇浸泡提取重复2次, 合并这些提取液, 经减压浓缩得到褐色粉末提取物; 将该粉末提取物溶解在水中, 依次用乙醚、乙酸乙酯、丁醇作为提取液分别提取三次; 浓缩乙醚组分, 得到褐色油; 取该褐色油上硅胶柱, 用乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱组分而得到该提取物。该提取物具有诱导嗜酸性粒细胞凋亡的活性; 该提取物可以活化 MBP 激酶; 该提取物对由过多的嗜酸性粒细胞而引起的各种疾病起到诱导嗜酸性粒细胞凋亡的作用。

5

沙棘种子提取物

技术领域:

本发明涉及一种具有诱导细胞凋亡、抗过敏和抗炎作用的沙棘种子提取物。

10

背景技术:

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是一种很久以前就被中国利用的胡颓子科药用植物, 野生在西藏和欧洲的温带干旱地域。由于沙棘在自然界漫长的演化过程中形成了包括一系列有抗逆性的维生素和生物活性的天然物质, 从沙棘种子中可以提取多种具有很强生理活性的物质, 对
15 可以有效的调节血脂, 预防及治疗冠心病、心绞痛等心脑血管疾病, 抗辐射、抗炎生肌等。我国藏医药经典著作《四部医典》收集记载了用沙棘制成的汤、散、丸、膏、酥、灰、酒等 7 种合剂以及 84 种沙棘的配方。1941-1942 年, 从前苏联第一次分析出沙棘含维生素 C 和胡萝卜素以来, 到 80 年代中期, 已相继发现沙棘所含生物活性物质上百种之多。1977 年, 沙棘作为中药被列入《中华人民共和国药典》, 《药典》中记述: “沙棘果表面橙黄色, 种子斜卵形, 褐色有光泽, 种仁乳白色, 有油性, 气微, 味酸、涩, 具有止咳祛痰、消食化滞、活血散瘀功能。” 至今仍未发现具有诱导细胞凋亡、抗过敏和抗炎作用的沙棘种子提取物。

25 炎症性呼吸器官疾病被认为是由淋巴细胞和嗜酸粒细胞引起的炎症反应反复发生引起的慢性病, 清楚炎症时的淋巴细胞和粒细胞的增殖调节机制, 对了解该疾病非常重要。如特异反应性支气管哮喘是一种以嗜酸粒细胞、肥大细胞等浸润为主的慢性气道变态反应性炎症。病情发作时气管局部的嗜酸粒细胞数增加, 嗜酸粒细胞的生存得到延长, 如将嗜
30 酸粒细胞引起细胞凋亡可以看到有效的气管局部消炎效果, 控制气管局部的嗜酸粒细胞的功能与气管炎症的停止相关。

人嗜酸粒细胞(EOS)增多是慢性支气管哮喘的特征。嗜酸粒细胞增多症也是寄生虫感染特有的特征, EOS 是蠕虫免疫性的效应细胞。最近研究提出了几种嗜酸粒细胞增多症的致病机理: 其一, 过敏原特异性辅助
35 (CD4+) T 淋巴细胞 Th2 亚型的活化细胞因子如白细胞介素 (IL)-3, IL-5, 以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。IL-5 和嗜酸粒细

5 胞增多症有关，它们均对 EOS 的增殖和活化具有特异性作用；其二， α 4 β 1-整合素，活化抗原（VLA）-4 在 EOS 中的表达，表明 VLA-4 及血管细胞粘附分子（VCAM）-1 与通道的粘附，均与选择性嗜酸粒细胞增多症有关；其三，趋化因子 8kd c-c 组成在 EOS 募集和脱粒中起着重要作用；其四，LT 和 PAF 等几种介质的抑制剂对嗜酸粒细胞增多症有效，表
10 明某些介质对嗜酸粒细胞增多症的形成有作用。

干扰或阻断气道变应性疾病每一环节的药物都可称为抗过敏药物，此类药物为哮喘防治的一线药物。常用的药物有：①色甘酸钠：可抑制肥大细胞释放炎性介质，抑制嗜酸粒细胞、中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的激活，具有抗气道变应性的炎症效应。②酮替芬；③抗组胺药：可抑制肥大
15 细胞、嗜酸粒细胞，嗜碱粒细胞及肺泡巨噬细胞等炎症细胞释放介质，该类药物常用的有：苯酚嗪、特非那定、赛替利嗪、息斯敏等药。

迄今为止，尽管已报道了为数众多的哮喘治疗化合物，但现在的大多数化合物是通过化学方法合成的，其性质上决定了连续使用将不可避免的产生各种副作用，如抗过敏药引起嗜睡而影响患者的精神、生活和工作；使用激素类药物引起高血压、糖尿病、肥胖症等疾病的发生或加重，
20 还因其副反馈抑制作用，导致神经—内分泌—免疫功能紊乱，长期使用可引起内分泌腺的逐渐萎缩甚至丧失功能，从而对人体的生理功能造成更大的损害；使用解痉平喘类药物因兴奋交感神经而影响心脏功能，甚至造成猝死等等。

25 另外，过敏性鼻炎主要是由于过敏患者吸入过敏原（如尘螨、真菌、花粉等）和已结合于肥大细胞、嗜酸粒细胞、血小板等细胞上的特异 IgE 相结合，引起这些细胞释放炎症介质，从而使鼻粘膜发生炎症。炎症过程包括炎症细胞和嗜酸粒细胞，中性粒细胞等细胞浸润，组织胺，LTS 和 PG 等原发和继发炎症介质的释放，以及嗜酸性细胞的激活致早期和晚期
30 反应。现在常用的化合物药物也存在较多的副作用。

发明内容：

本发明的目的是提供一种完全不必担心化学药物所产生的副作用、从植物沙棘种子中提取的具有诱导细胞凋亡、抗过敏和抗炎作用的物质。

35 本发明的技术方案是以沙棘种子的有机溶剂提取物为活性物质，经过包括以下步骤的得到：将沙棘种子经过乙醇浸泡提取重复 2 次，合并

5 这些提取液，经减压浓缩得到褐色粉末提取物；

将该粉末提取物溶解在水中，依次用乙醚、乙酸乙酯、丁醇作为提取液分别提取三次；

浓缩乙醚组分，得到褐色油；

取该褐色油上硅胶柱，用乙酸乙酯洗脱，收集洗脱组分。

10 其中上述乙醇浓度优选为 80%，

上述乙醇浸泡时间优选为 12 小时；

上述乙酸乙酯的洗脱浓度优选为 15%。

该提取物具有诱导细胞调亡的活性。

该提取物具有诱导嗜酸粒细胞调亡的活性。

15 该提取物可以活化 MBP 激酶。

该提取物对由过多的嗜酸粒细胞而引起的各种疾病起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

该提取物对过敏性鼻炎起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

20 该提取物对特异反应性支气管哮喘起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

本发明与现有技术相比有如下优点：

沙棘种子的提取物在减少嗜酸粒细胞的等方面显示出优异的效果，可以用于有效的预防和治疗由过多的嗜酸粒细胞而引起的各种疾病，也就是说可以起到有效的预防和治疗过敏性鼻炎或特异反应性支气管哮喘的作用。可以用作为细胞调亡诱导剂、抗过敏剂、抗炎剂和保健食品。

25

具体实施方式：

实施例 1 沙棘种子提取物的制备

30 将 6.7kg 沙棘种子经过筛选去杂等预处理，用 55L 的 80%乙醇体积比为乙醇：水=8：2(下同)浸泡 12 小时。然后再一次用 55L 的 80%乙醇提取，合并这些提取液，经减压浓缩、真空干燥得到 1384.9g 褐色粉末提取物。

35 将 674.2g 的该粉末提取物溶解在 2L 的水中，依次用 2L 乙醚、2L 乙酸乙酯、2L 丁醇作为提取液分别提取三次。然后浓缩乙醚组分，得到 436.5g 褐色油。上述各组分中，取 7.42g 乙醚组分浓缩提取物上硅胶柱(和光硅胶 C—300 和光纯药、 5.5×1.5 cm)，依次用 (1) 己烷 1L、

5 (2) 5%乙酸乙酯 2.5L、(3) 10%乙酸乙酯 2L、(4) 15%乙酸乙酯 2L、(5) 20%乙酸乙酯 3.5L、(6) 30%乙酸乙酯 3L 洗脱,接着用(7) 100%乙酸乙酯 2.5L 洗脱。得到(1)组分(收率 45.4mg)、(2)组分(收率 2.9503g)、(3)组分(收率 1.061g)、(4)组分(收率 752.6mg)、(5)组分(收率 521.3mg)、(6)组分(收率 284.4mg)和(7)组分(收率 104.7mg)。

10 实施例2 嗜酸粒细胞性细胞凋亡诱导试验和 MBP 激酶活性试验

嗜酸粒细胞性细胞凋亡诱导试验:试验根据 Vermes 等的方法(Journal of Immunological Methods 184 卷 39-51 页 1995 年)进行。使嗜酸粒细胞性细胞 HL-60 细胞浮游于 RPMI1640 培养基中,细胞浓度为 $1-3 \times 10^6$ 细胞/ml。向该细胞浮游液 500 μ l 中添加被检测物质(上述实施例 1 中最后收集得到的组分之一)或培养基,使浓度为 100 μ g/ml,在 37°C、5%CO₂ 的条件下培养 6 小时或 24 小时。离心洗净后,加入磷脂酰结合蛋白(Annexin) V 缓冲液,然后添加 5 μ l 磷脂酰结合蛋白 V-FITC。通过流动血细胞计数法,以磷脂酰结合蛋白 V 阳性细胞作为细胞凋亡诱导细胞,用
20 相对总细胞数的百分比评价。

MBP 激酶活性试验:试验根据 De Souza 等的方法(Blood 99 卷 3432-3438 页 2002 年)进行。将嗜酸粒细胞性细胞 HL-60 细胞浮游于 RPMI1640 培养基,细胞浓度为 $1-3 \times 10^6$ 细胞/ml。该细胞浮游液 500 μ l 中添加被检测物质或培养基,使浓度为 100 μ g/ml,在 37°C、5%CO₂ 的条件下培养 6 小时或 24 小时。离心洗净后,添加可溶解缓冲液,溶解细胞,
25 使用含有 MBP 5 mg/ml 的凝胶进行电泳。凝胶经脱变性、再变性处理后,用 ³²P-ATP 标记,实施 3 小时的磷酸化反应。凝胶干燥后,使用图象分析仪解析放射活性。在 36 kDa 生长出标记带时,记做 MBP 激酶活化阳性(+).

30 沙棘种子提取物在 HL-60 细胞中观察到了浓度依赖性的细胞凋亡诱导。另外进行凝胶 MBP 激酶分析(In-gel MBP kinase assay)时,沙棘种子提取物激活 36 kDa MBP 激酶。以上结果提示,沙棘种子提取物对嗜酸粒细胞能诱导细胞凋亡,该细胞凋亡与 36 kDa MBP 激酶有关。由此推断沙棘种子提取物中含有可以用于抗嗜酸粒细胞性炎症作用药物的成分。

35 所得结果如下表 1 所示:

确认提取物 4 具有强的细胞凋亡诱导活性,并伴有 MBP 激酶的活化。

5 表 1

	细胞凋亡诱发率 (%)		MBP 激酶活化
	6 小时	2 4 小时	
空白	21.0	22.5	—
沙棘种子乙醚提取物 1	25.0	57.5	+
沙棘种子乙醚提取物 2	16.4	37.0	—
沙棘种子乙醚提取物 3	15.6	17.8	—
沙棘种子乙醚提取物 4	43.7	92.9	+
沙棘种子乙醚提取物 5	15.6	31.7	—
沙棘种子乙醚提取物 6	35.8	42.9	+
沙棘种子乙醚提取物 7	29.1	39.8	+

10

15

20

25

30

5

权利要求

1、一种沙棘种子提取物，其特征在于经过以下方法得到：

将沙棘种子经过乙醇浸泡提取重复 2 次，合并这些提取液，经减压浓缩得到褐色粉末提取物；

10 将该粉末提取物溶解在水中，依次用乙醚、乙酸乙酯、丁醇作为提取液分别提取三次；

浓缩乙醚组分，得到褐色油；

取该褐色油上硅胶柱，用乙酸乙酯洗脱，收集洗脱组分。

2、如权利要求 1 所述的提取物，其特征在于所述乙醇浓度为 80%。

15 3、如权利要求 1 所述的提取物，其特征在于所述乙醇浸泡时间为 12 小时。

4、如权利要求 1 所述的提取物，其特征在于所述乙酸乙酯的洗脱浓度为 15%。

5、如权利要求 1 所述的提取物，其特征在于该提取物具有诱导细胞调亡的活性。

20 6、如权利要求 1 所述的提取物，其特征在于该提取物具有诱导嗜酸粒细胞调亡的活性。

7、如权利要求 2 所述的提取物，其特征在于该提取物可以活化 MBP 激酶。

25 8、如权利要求 3 所述的提取物，其特征在于该提取物对由过多的嗜酸粒细胞而引起的各种疾病起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

9、如权利要求 3 所述的提取物，其特征在于该提取物对过敏性鼻炎起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

10、如权利要求 3 所述的提取物，其特征在于该提取物对特异性支气管哮喘起到诱导嗜酸粒细胞调亡的作用。

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 A61K 35/78, A61P 11/02, 11/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

WPI, IPC7 A61K 35, A61P 11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

China Patent Applications Published or Patents Announced since 1985 and Non-patent Documents Published in China

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC PAJ; CPRS, CNKI; Hippophae rhamnoides, apoptosis, rhinitis, asthma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1473576A, Hebei Shenxing Institute of Hippophae, 11. 02. 2004, see the whole document	1-10
A	CN 1504467A, Hebei Shenxing Institute of Hippophae, 16. 06. 2004, see the whole document	1-10
A	CN 1169864A, Chifeng Pharmaceutical Factory, 14. 01. 1998, see the whole document	1-10
A	CN 1220886A, Gao Wenqing, 30. 06. 1999, see the whole document	1-10
A	DE 20203549U1, Eckardt R, 17. 10. 2002, see the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08. Jan. 2005 (08. 01. 2005)	Date of mailing of the international search report 03 · FEB 2005 (03 · 02 · 2005)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Hai Dian District, Beijing, China, 100088	Authorized officer WEI, Jian
Facsimile No. 86-10-62099451	Telephone No. 86-10-62085326

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/000172

Patent Documents Cited in International Search Report	Publication Date	Family Members	Publication Date
CN 1473576A	11. 02. 2004	None	
CN 1504467A	16. 06. 2002	None	
CN 1169864A	14. 01. 1998	None	
CN 1220886A	30. 06. 1999	None	
DE 20203549U	17. 10. 2002	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000172

A. 主题的分类

IPC7 A61K 35/78, A61P 11/02, 11/08

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

WPI, IPC7 A61K 35, A61P 11

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

1985 年以来公布的中国专利申请和公告的中国专利以及中国出版的非专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, CRPS, CNKI; 沙棘 *hippophae rhamnoides* 细胞凋亡 apoptosis 鼻炎 rhinitis 哮喘 asthma

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1473576A, 河北神兴沙棘研究院, 2004 年 2 月 11 日, 全文	1-10
A	CN 1504467A, 河北神兴沙棘研究院, 2004 年 6 月 16 日, 全文	1-10
A	CN 1169864A, 赤峰制药厂, 1998 年 1 月 14 日, 全文	1-10
A	CN 1220886A, 高文清, 1999 年 6 月 30 日, 全文	1-10
A	DE 20203549U1, ECKARDT R, 2002 年 10 月 17 日, 全文	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

08. 1 月 2005 (08.01.2005)

国际检索报告邮寄日期

03. 2 月 2005 (03. 02. 2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: 86-10-62019451

授权官员

魏健

电话号码: 86-10-62085326

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/000172

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1473576A	11. 02. 2004	无	
CN 1504467A	16. 06. 2004	无	
CN 1169864A	14. 01. 1998	无	
CN 1220886A	30. 06. 1999	无	
DE 20203549U	17. 10. 2002	无	