

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02830016.5

[51] Int. Cl.

A61K 36/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100518745C

[22] 申请日 2002.12.10 [21] 申请号 02830016.5

[86] 国际申请 PCT/CN2002/000878 2002.12.10

[87] 国际公布 WO2004/052381 英 2004.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.10

[73] 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界

[72] 发明人 李明 沈祖尧 梁秉中 董辉
陈启明

[56] 参考文献

柔毛水杨梅化学成分的初步研究. 唐正平, 陈香华, 徐纪文. 湖南中医药导报, 第 6 卷第 4 期. 2000

水杨梅化学成分的研究(III). 樊高骏, 何直升. 中草药, 第 28 卷第 4 期. 1997

水杨梅化学成分的研究(IV). 樊高骏. 中草药, 第 29 卷第 3 期. 1998

水杨梅属植物化学成分及其生物活性的研究进展(英文). 明东升, 王峰, 徐宏喜, 董辉, 毕培曦. 药学学报, 第 35 卷第 7 期. 2000

审查员 程 诚

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 3 页

[54] 发明名称

柔毛水杨梅的有机提取物及其应用

[57] 摘要

本发明确证中草药柔毛水杨梅有机提取物对受损骨骼肌中的快速血管生成(<24h)、肌生成和抑制纤维化方面表现出有力的刺激作用。在兔和大鼠动物模型中,该提取物显示出对受损骨骼肌中的血管生成和肌生成的双重功效,导致骨骼肌完全愈合。本发明的所述提取物能够开发为治疗骨骼肌损伤,包括烧伤、皮肤损伤和手术切口的软组织损伤,以及骨折和骨损伤的有效的治疗性药剂。

1. 一种制备柔毛水杨梅有机提取物的方法，包括如下步骤：
 - a) 用选自 C1-C4 的醇对所述水杨梅植株进行提取；
 - b) 将所述步骤 a)得到的提取物干燥成干粉；及
 - c) 依次用 C6 烷烃、乙酸乙酯和选自 C1-C4 的醇对所述步骤 b)得到的干粉进行提取。
2. 如权利要求 1 所述的方法，还包括以下步骤：
 - d) 将所述步骤 c)得到的提取物干燥成干粉。
3. 如权利要求 2 所述的方法，还包括步骤
 - e) 将所述步骤 d)得到的粉末装入层析柱中；及
 - f) 使用浓度逐渐增加的醇的水溶液对所述层析柱进行洗脱，其中所述醇选自 C1-C4 的醇。
4. 如权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的方法，其中所述步骤 a)在室温下进行 2-3 小时，并重复 5 次。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述步骤 a)中所用的醇为甲醇。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 C6 烷烃为正己烷，且所述步骤 c)中所用的醇为正丁醇。
7. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述的层析柱为用 10%重量比的甲醇平衡的 Sephadex LH-20 柱，且其中所述步骤 e)中所用的醇为甲醇。
8. 如权利要求 1-3 和 5-7 中任一项权利要求所述的方法，其中所述步骤 b)或 d)在减压下进行。

9. 如权利要求 4 所述的方法, 其中所述步骤 b) 或 d) 在减压下进行。

10. 如权利要求 1-3 和 5-7 中任一项权利要求所述的方法, 其中所获得的提取物主要含有丹宁酸和三萜, 所述丹宁酸包括 gemins A、B、C、D、E 和 F, 所述三萜包括 2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷。

11. 如权利要求 4 所述的方法, 其中所获得的提取物主要含有丹宁酸和三萜, 所述丹宁酸包括 gemins A、B、C、D、E 和 F, 所述三萜包括 2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷。

12. 如权利要求 8 所述的方法, 其中所获得的提取物主要含有丹宁酸和三萜, 所述丹宁酸包括 gemins A、B、C、D、E 和 F, 所述三萜包括 2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷。

13. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所获得的提取物主要含有丹宁酸和三萜, 所述丹宁酸包括 gemins A、B、C、D、E 和 F, 所述三萜包括 2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷。

14. 柔毛水杨梅有机提取物, 所述提取物是通过权利要求 1-13 中任一项权利要求所述的方法获得的。

15. 柔毛水杨梅有机提取物在制备用于治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤或骨折的药物中的应用，其中所述柔毛水杨梅有机提取物是通过权利要求1-13中任一项权利要求所述的方法获得的。

16. 如权利要求15所述的应用，其中所述动物为哺乳动物。

17. 如权利要求16所述的应用，其中所述哺乳动物为人。

柔毛水杨梅的有机提取物及其应用

技术领域

本发明涉及中草药。具体地,本发明涉及柔毛水杨梅(*Geum Japonicum* Thunb variant, 在下文中以“EGJV”表示)的有机提取物, 及将所述提取物用于刺激受损的骨骼肌及包括皮肤在内的软组织中的血管新生、骨骼肌再生、及抑制纤维化。本发明还涉及制备 EGJV 有机提取物的方法, 以及治疗骨骼肌损伤或皮肤损伤, 促进手术切口愈合, 或减少在皮肤愈合及整形手术中形成的疤痕。

背景技术

水杨梅是包括 65 种具有单叶或羽状复叶和整齐花朵(regular flowers)的带地下茎的草本和半灌木植物的属, 例如 *G. borisii*、*G. chiloense*、*G. coccineum*、*G. macrophyllum*、*G. montanum*(买麻藤)、*G. reptans*、*G. rivale*、*G. triflorum*、*G. Urbanum* 和 *G. Japonicum*(柔毛水杨梅)等。柔毛水杨梅是蔷薇科多年生草本开花植物。在传统中医里柔毛水杨梅的全植株水提取物被用作利尿剂(Perry, L. M., *In Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, MIT Press, Cambridge, Mass, pp. 242, 1980)。

骨骼肌严重损伤后的愈合是缓慢和不完全的。骨骼肌有限的再生能力以及在受伤部位迅速形成纤维性疤痕组织是临床的主要问题。严重受损的骨骼肌的通常结果是纤维化。迄今为止, 还没有有效的治疗手段能够促进严重损伤后的骨骼肌的完全愈合。

如上所述, 严重损伤后的肌肉愈合是缓慢和不完全的, 导致了纤维组织的替代(Grounds, M. D. *Muscle regeneration : molecular aspects and therapeutic implications*. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 535-543 (1999); Nikolaou, PK, et al., *Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury*. *American J Sports Med.* 15, 9-14 (1987))。目前, 还没有有效的治疗方法能够促进严重损伤后的骨骼肌的显著再生。在我们的早期研究中(Li, M. et al., *Two novel myogenic factors identified and*

isolated by sequential isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 21, 289-292 (2000) ; Li, M., et al., Identification and purification of an intrinsic human muscle myogenic factor that enhances muscle repair and regeneration. Arch. Biochem. Biophys. 384, 263-268 (2000)), 已鉴定了能够在动物模型中增强培养的卫星细胞的增殖和分化以及肌纤维再生的肌肉肌原因子(myogenic factors)。尽管这些肌原因子能促进肌肉愈合,但不能实现严重肌肉损伤后的完全愈合。

纤维组织可在相对局部缺血环境中生长,但正常组织细胞很难生长。当骨骼肌受到损伤时,血管系统通常被损坏,因此受损部位周围的血液供应不足。通常,纤维组织生长较快并占据先前由受损肌纤维占据的位置,于是阻碍新的肌纤维取代该位置。依照先前的研究,某些生长因子如 VEGF、aFGF、bFGF 或 PDGF 能够增强血管生成,但由那些生长因子介导的血管生成需要约 2 到 9 周。在国际市场上没有产品能诱导严重受损的骨骼肌的完全愈合,尤其是在数小时内诱导母体中血管快速新生。迄今为止,未见报道市场上或研究中有任何药剂或因子能引起严重受损的骨骼肌完全愈合。

发明概述

本发明的主要目的是提供能够诱导严重受损的骨骼肌充分愈合,同时抑制该受损骨骼肌纤维化的试剂。为达成此目的,本发明人进行了辛勤的研究。结果发现天然原料(柔毛水杨梅的完整植株)的有机提取物对快速血管生成和肌生成表现出双重功效。此双重功效可用于治疗骨骼肌损伤,诸如皮肤愈合、手术切口愈合、烧伤及溃疡愈合和其它软组织愈合,以及诸如骨折愈合和骨损伤修复的硬组织愈合。

本发明的一个目的是提供所述 EGJV。所述“EGJV”主要含有包括 gemins A、B、C、D、E 和 F 的丹宁酸,和包括 2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸(euscaphic acid)、委陵菜酸(tormentic acid)、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷等等的三萜。

本发明的另一目的是提供所述“EGJV”在制备用于治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤或骨折的药物中的应用。可将所述 EGJV 与其它药物或药物可接受的添加剂结合制成各种用于治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤或骨折的复合药物。

本发明的另一目的是提供治疗骨骼肌损伤或皮肤损伤的方法，包括将有效量的“EGJV”对患有骨骼肌损伤或皮肤损伤的动物进行给药。

本发明的另一目的是提供制备所述“EGJV”的方法，包括用 C1-C4 醇对柔毛水杨梅植株进行提取的步骤。

通过以下参照附图的详细描述，本领域所属技术人员能够很好地理解本发明的这些及其它特征。

附图的简要说明

图 1 所示为使用本发明的溶于 5% DMSO 的所述 EGJV 或用 5% DMSO 对照治疗的牵张(stain)损伤的兔胫骨前肌在治疗 1、2、3、7 和 18 天时的外观(appearance)。图 1A 显示该受伤部位炎性细胞浸润(Inf)。符号“N”表示正常肌纤维的外观。图 1B 显示经 EGJV 治疗后一天，在受伤部位可观察到许多新再生的细小肌管和新生的血管。所述新生血管用黑色箭头指示，而所述新再生的肌管用蓝色箭头指示。图 1C 显示，肌肉损伤 2 天后，在受伤部位观察到许多新形成的血管(黑色箭头指示)且形成许多新再生的肌管(蓝色箭头指示)。相比之下，如图 1E 所示(DMSO 对照组)该伤口仍然新鲜，既没观察到新形成的血管，也没观察到新再生的肌管。

损伤及 EGJV 治疗后第 18 天，如蓝色的椭圆包含的区域所示，许多新再生的有中央核的且相对成熟的肌管(尺寸略小于用 N 表示的正常肌纤维)桥接及修复了损伤的伤口(图 1D)。相比之下，图 1F 中对照组的伤口内布满用“Fib”表示的纤维组织。

图 2 为显示牵拉损伤的胫骨前肌在使用本发明的 EGJV 治疗 1、2 和 3 天后的外观照片。图 2a 显示，第二天在 5% DMSO 对照组，该受伤部位布满大量的炎性细胞(Inf)。符号“N”表示正常肌纤维的外观。相比之下，图 2b-2d 显示 EGJV 治疗组的结果，肌肉损伤一天后，在受伤部位观察到许多新形成的血管(用黑色箭头指示)(参照图 2b)。在肌肉损伤 2 天

后,除黑色箭头指示的许多新形成的血管外,还观察到沿所述新形成血管的许多新再生并延伸的细小鼠肌管(由绿色箭头指示)。(参照图 2c)。并且在肌肉损伤 3 天后观察到如绿色箭头环绕着的更多新再生的肌管簇。(参照图 2d)。

图 3 为显示牵拉损伤的大鼠胫骨前肌在使用本发明 EGJV 治疗 7 天后的组织学外观照片。图 3a 显示,在对照组中所述受伤部位布满炎性细胞(由“Inf”表示)及纤维组织(由“Fb”表示)。相比之下,图 3b 和 3c 显示,在 EGJV 治疗组中观察到整齐排列并延伸的新再生肌管(由红箭头指示),并且其将损伤部位的伤口桥接起来。图 3d 是图 3c 中蓝色矩形部分的放大区域。图 3d 中的红色箭头指示新再生肌管,绿色箭头指示所述新再生肌管的中央核,及蓝色箭头指出活性卫星细胞。可以看出一些所述卫星细胞将与所述肌管融合。

图 4 为显示牵拉损伤的胫骨前肌在使用 EGJV 治疗 14 天后的组织学外观照片。图 4a 显示,在对照组中所述受伤部位为纤维化愈合(由“Fb”表示)及伤口处收缩(蓝色箭头)。相比之下,图 4b 和 4c 显示,在 EGJV 治疗组中伤口部位完全由整齐排列并延伸的新再生肌纤维桥接。符号“Rm”表示新再生的肌纤维,而符号“Em”表示原有的肌纤维。如绿色箭头所示,切口的轮廓仍可辨认。在图 3b 和 3c 中,与先前存在的肌纤维相比,新再生肌纤维(不足 2 周龄)具有不同的染色,这可能是由于在两个不同龄的细胞群中的蛋白质含量仍不同。

发明的详细说明

本发明包括以下四个方面:

第一方面涉及制备所述 EGJV 的方法。

1. 本发明提供一种从柔毛水杨梅制备有机提取物的方法。该方法包括如下步骤 a) 用选自 C1-C4 的醇提取所述水杨梅植株。在室温条件下重复该步骤 a)3-6 次,优选重复 5 次。在进行步骤 a)前,优选获得所述水杨梅植株的粉末。所述 C1-C4 醇包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇及叔丁醇。更有用的醇为甲醇和乙醇。而甲醇是最优选的。至于所述醇相对于待用该醇提取的柔毛水杨梅的用量没有特别的限制。

但从经济角度考虑,所用的醇量优选为待提取的所述柔毛水杨梅重量的1-10倍。

2. 上述第1项所述的方法还可包括步骤b) 将所述步骤a)得到的提取物干燥成干粉;及c) 依次用C6烷烃、乙酸乙酯和选自C1-C4的醇提取所述步骤b)得到的干粉。所述C6烷烃包括具有6个碳原子的环烷烃及非环烷烃,包括例如环己烷、正己烷和新己烷等。所述C1-C4醇包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇及叔丁醇。步骤c)中更有用的醇为正丙醇和正丁醇。而正丁醇是最优选的。至于所述C6烷烃、乙酸乙酯和醇相对于之前干燥步骤所得的干粉的用量没有严格的限制。但从经济角度考虑,所用的有机溶剂的量优选为待进一步提取的所述干粉重量的1-10倍。

3. 为使所述EGJV更适用,以上第2项所述方法优选包括步骤d) 将所述步骤c)得到的提取物干燥成干粉。在进行步骤d)的干燥操作之前,优选将之前步骤c)得到的提取物过滤以除去其中任何不溶性粉末。d)的干燥步骤可在减压及高于室温(如在50°C)的条件下完成。

4. 为使所述EGJV更纯净,以上第3项所述的方法优选还包括步骤e) 将所述步骤d)得到的粉末装入层析柱中;及f) 使用浓度逐渐增加的醇的水溶液对所述层析柱进行洗脱,所述醇选自C1-C4醇。步骤e)中的所述层析柱没有限制。例如,可使用Sephadex或反相柱。步骤f)中所用的醇可选自甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇及叔丁醇中任何一种。且甲醇为最优选的。

本发明的第二方面涉及由以上1-4项中任一项所述的方法获得的柔毛水杨梅有机提取物。通过NMR分析发现,本发明的EGJV主要含有丹宁酸和三萜,其中所述丹宁酸包括gemins A、B、C、D、E和F的,所述三萜包括2-羟基齐墩果酸、2-羟基乌索酸、2,19-二羟基-乌索酸、2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28酸、乌索酸、epimolic酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的28- β -D-葡萄糖苷。

本发明的第三方面涉及所述柔毛水杨梅有机提取物的应用,用来制备治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤或骨折的药物。可将所述EGJV组方成增强血管生成和肌生成的药物。除所述EGJV外,所述药物可包括与该EGJV

相容的其它药物试剂。所述药物试剂包括但不限于诸如抗生素、维生素、细胞因子及骨-诱导蛋白(osteo-inductive proteins)等的药剂。所述 EGJV 可与药物可接受的添加剂组方成各种剂型,包括但不限于粉末、溶液、悬浮液、霜剂(cream)和糊剂(paste)等。所述添加剂和制备各种剂型的方法是本领域所属技术人员所公知的。

本发明的第四方面涉及治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤或骨折的方法,包括给予具有骨骼肌损伤、皮肤损伤、手术切口或骨折的动物有效剂量的所述柔毛水杨梅有机提取物。术语“有效剂量”是能够有效增强细胞培养体系或动物模型体系中血管生成或肌生成的剂量。此“有效剂量”依赖多种因素,包括待治疗动物的种类、待给药的所述 EGJV 的浓度以及所述肌肉或皮肤损伤的严重程度。确定此“有效剂量”的方法是本领域所属技术人员公知的。本文中所用的术语“给药”表示任何标准途径传递药物。所述给药途径是本领域公知的,包括但不限于静脉内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮内给药或透皮给药等。术语“动物”优选指包括大鼠、小鼠、猫、狗、马和羊等的哺乳动物。更优选该术语指人。

实施例

参照以下实施例对本发明进行更详尽的描述。但本发明的范围不局限于这些实施例。

实施例 1

“EGJV”的制备

水杨梅采集自中国贵州省。将干燥的植株(1 kg)制成粉末,并在室温下用甲醇(8 L)渗滤 2-3 小时,重复 5 次。然后将该提取物减压干燥,得约 50 克残余物。将该干燥粉末(50 g)悬浮于 120 ml H₂O 中并依次用己烷(5×250 ml)、乙醇(5×250 ml)和正丁醇(5×250 ml)进行分配。对该正丁醇提取液部分进行过滤并减压蒸发(50°C)得到粉状残余物。将此粉状残余物装入用 10%甲醇平衡的 Sephadex LH-20 柱中,并用浓度逐渐增加的甲醇水溶液洗脱,洗脱出 12 份,经 NMR 分析主要含有诸如 gemins A、B、C、D、E 和 F 的丹宁酸,和包括 2- α ,19- α -二羟基-3-氧-12-ursenoic-28 酸、乌

索酸、epimolic 酸、山楂酸、刺梨酸、委陵菜酸、委陵菜酸的 28- β -D-葡萄糖苷的三萜。将此 12 份甲醇洗脱液合并用作实施例 2 和 3 中评价的 EGJV 提取物。

在从中草药中筛选血管生成和肌生成试剂的过程中，人发现所述正丁醇溶解的部分和其后的甲醇洗脱液部分具有强力的刺激严重受损骨骼肌中的新血管早期生长(少于 24 小时)和肌肉再生的双重功效。除非另有指出，下文使用的术语“EGJV”指所述甲醇洗脱部分。

实施例 2

活性成分对兔肌肉损伤模型的双重作用的评价

在此，本发明人测试了所述“EGJV”的效果。试验结果令人惊奇地证实，与对照组纤维性疤痕组织相比，所述 EGJV 对严重受损骨骼肌的愈合过程有显著的效果，在所述受损区域出现再生肌纤维。所述 EGJV 对于在受损肌肉愈合过程早期阶段刺激血管生成和肌再生，以及抑制在骨骼肌愈合和皮肤损伤愈合过程中纤维性疤痕的形成显示出非常有利的作用。

所述 EGJV 被用于严重肌肉损伤的兔动物模型中(雌性，N=12，平均体重:2.5kg)。在兔胫骨前肌上用外科剪刀通过横切造成肌肉损伤。在所述损伤后立即对 6 只兔的胫骨前肌皮下注射 1ml 溶于 5% DMSO 的 EGJV 溶液。对其它 6 只兔注射相同体积的 5% DMSO 溶液作为对照。该注射只给予一次。在损伤后 2 天将每组的 2 只兔处死。取出胫骨前肌并处理用于石蜡切片和 HE (即苏木精和伊红)染色。在损伤后 1 周将每组的另外 2 只兔处死，及在损伤后 2 周将每组的余下 2 只兔处死。对不同时刻处死的所有兔进行以下相同处理。

如图 1E 所示，损伤后 1 天单独注射 5%DMSO 的胫骨前肌的损伤部位仍是新鲜的，几乎没有炎性细胞的浸润，且没观察到新形成的血管和再生肌管。对照之下，损伤后 1 天的 EGJV 治疗组的胫骨前肌损伤部位分布了大量炎性细胞，并且在损伤部位观察到一些新再生的细小肌管及新形成的血管(图 1B)。肌肉损伤后 2 天，在受伤部位观察到许多新形成的血管，并且也形成一些新再生的肌管(图 1C)。相对比地，在 DMSO 对照组，该损伤部位炎性细胞浸润(图 1A)，既没观察到新形成的血管，也没

观察到新再生的肌管(图 1A)。第 18 天,在 EGJV 治疗组的伤口处观察到许多新再生的且相对成熟的肌管(具有中央核,尺寸略小于正常肌纤维)(图 1D)。相比之下,对照组的伤口处布满纤维组织(图 1F)。

实施例 3

活性成分对大鼠肌肉损伤模型的双重作用的评价

在大鼠骨骼肌损伤模型中对 EGJV 进行进一步的研究。实验结果证实,所述 EGJV 能够显著刺激严重受损肌肉的受伤部位的血管再生(24 小时内)和卫星细胞的增殖。在损伤后 2 周内,接受 EGJV 治疗的动物的受伤部位完全被新再生的肌纤维取代,作为鲜明对照,纤维化是对照组动物的主要特征。

在实验大鼠(SD 大鼠,雌性, N=40, 平均体重:150 g)胫骨前肌上用外科剪刀通过横切造成肌肉损伤。在所述损伤后立即对 20 只大鼠的胫骨前肌注射 0.1 ml 溶于 5% DMSO 的 EGJV。对其它 20 只大鼠则注射相同体积的 5% DMSO 溶液作为对照。该注射只给予一次。分别在损伤 1、2 和 3 天后将每组的 4 只大鼠处死。取出胫骨前肌,进行石蜡包埋、切片和 HE 染色处理。在损伤后 7 天将每组的另外 4 只大鼠处死,及在损伤后 14 天将每组的余下 4 只大鼠处死。对不同时刻处死的所有大鼠进行以下相同处理。

在损伤后 1 天检查,对照组大鼠的胫骨前肌受伤部位大量炎性细胞浸润,而在第 2 天有更多炎性细胞浸润(图 2a)。还观察到少量的新形成的血管。相比之下,在 EGJV 治疗的大鼠的受伤部位发现,第 1 天,出现许多新形成的血管(图 2b),而在第 2 天出现更多的血管及新再生的细长肌管(该肌管中央出现核)(图 2c)。第 3 天,在 EGJV 治疗组的受伤部位观察到更多的新再生肌管簇取代受损的肌纤维(图 2d)。

第 7 天,对照组动物的受伤部位布满炎性细胞和纤维组织替代(图 3a)。而作为鲜明的对照,在 EGJV 治疗的动物的受伤部位则观察到大量新生的、成长中的、整齐排列的肌管(图 3b-3c)。在新再生的肌管上还发现一些增殖的卫星细胞(图 3d)。同时没发现显著的纤维化迹象。

在第 14 天, 对照组动物的伤口部位通过纤维化愈合。如图 4a 所示肌肉损伤的伤口收缩。但在 EGJV 治疗的大鼠中, 受伤部位没有纤维化迹象, 并由整齐排列的新再生肌纤维桥联(图 4b 和 4c)。

总之, 我们的实验结果显示, 在损伤后 24 小时内, 在骨骼肌受伤部位由单独局部注射 EGJV 诱导出现活跃的新血管形成现象, 并且在注射部位周围形成许多新的充满血细胞的毛细芽(capillary sprouts)。在肌肉受损后第 2 天, 除了许多新形成的血管外, 还观察到大量分散的新再生的细长的肌管。相比之下, 在对照组中有许多炎性细胞浸润。在第 7 天, 所述新再生肌管变长, 并准确地沿邻近的完好肌纤维的长轴方向填满该受损肌肉的伤口。但在对照组中, 在受伤部位除了浸润的炎性细胞, 还形成了纤维化组织。在第 14 天, 在 EGJV 治疗的肌肉中, 受损肌肉伤口完全被新再生肌肉代替, 而在对照组中, 所述伤口由纤维化愈合且伤口收缩。

实验结果的说明

实验结果显示, 本发明的 EGJV 凭借其对严重受损肌肉的愈合过程中的早期血管形成(少于 24 小时)、肌生成和抑制纤维化的多重作用参与骨骼肌的愈合过程。所述源自 EGJV 的早期血管形成、肌生成和抑制纤维化的多重作用彼此协调, 使严重受损骨骼肌完全愈合。所述早期血管生成、肌生成和抑制纤维化之间的协调作用为新肌肉生长构筑了更理想的周围环境。纤维组织能在相对缺血的环境中生长。例如, 如果没有供给必要的营养成分将不可能有好的肌生成。如果血液供应不充足, 纤维组织能够生长而正常组织细胞不能生长。只有在良好血液供应及无纤维组织阻碍的条件下才能够适当地发生肌生成。我们的 EGJV 能在 24 小时或更短时间内刺激新血管的快速生长, 因此建立起良好的细胞生长和增殖的环境。已证实增强早期血管生成、肌生成和抑制纤维化的协调作用引起严重受损肌肉的完全愈合。

本发明的工业应用性

所述 EGJV 对快速血管生成、肌生成及抑制纤维化的独特特征使其非常适用于治疗骨骼肌损伤、软组织创伤、手术切口、烧伤、溃疡、骨折及骨损伤。所述 EGJV 还可与其它治疗性药剂结合形成更好的药剂，例如将所述 EGJV 与骨-诱导蛋白结合用于治疗骨折和骨损伤，尤其在较少血液供应或多数血管受损的部位。因此，EGJV 很有可能发展为治疗骨骼肌损伤、皮肤损伤、手术切口愈合及骨折愈合的新一代治疗性药剂。



图1: 此图表示为使用本发明的溶于5% DMSO的所述EGJV或用5% DMSO对照治疗兔胫骨前肌的严重损伤及其促进血管重建和肌肉再生的作用。图1A显示该受伤部位初期(两天)炎性细胞浸润(Inf)。符号“N”表示正常肌纤维。图1B显示经EGJV治疗后一天,在受伤部位可观察到许多新再生的细小肌管(用蓝色箭头指示)和新生的血管(用黑色箭头指示)。图1C显示,肌肉损伤两天后,在受伤部位观察到许多新形成的血管(黑色箭头指示)且形成许多新再生的肌管(蓝色箭头指示)。如蓝色的椭圆包含的区域所示,第18天,许多新再生的有中央核的且相对成熟的肌管(尺寸略小于用N表示的正常肌纤维)桥接及修复了损伤的缺口(图1D)。相反,如图1E所示(DMSO对照组,损伤后一天),该伤口(WG)仍然新鲜,既没观察到新形成的血管,也没观察到新再生的肌管。图1F中DMSO对照组(18天)的伤口内布满用“Fib”表示的纤维组织。



图2: 此图表示用EGJV来治疗大鼠胫骨前肌的刀切割伤的一个实例。损伤后两天对照组(5% DMSO)的伤口有大量的炎细胞浸润(图a, Inf)。而在EGJV治疗组, 损伤及用药后一天, 伤口处可观察到许多新生血管形成, 如图b中黑色箭头所示。损伤及用药后两天, 伤口处除了可观察到大量新生血管形成以外(如图c中黑色箭头所示), 还可以观察到许多新生的长而细的肌管(如图c中绿色箭头所示)。损伤及用药后三天, 可观察到更多的肌管形成, 并形成肌管簇取代损伤的肌纤维(如图d中绿色箭头所示)。



图3: 此图表示用EGJV来治疗大鼠胫骨前肌的刀切割伤后7天的一个实例。a, 5% DMSO对照组的伤口有大量的炎细胞浸润(Inf)和纤维组织形成(Fb)。相比之下, b和c (EGJV治疗组) 则可以观察到新生的较成熟及排列整齐的长的肌管形成。这些排列整齐的长的肌管取代损伤的肌纤维, 并连接了创口(红色箭头所示)。d是c中蓝色方框的放大图像, 红色箭头指示新再生的肌管, 绿色箭头指示新再生肌管的细胞核在细胞中心, 蓝色箭头指示激活了的卫星细胞。

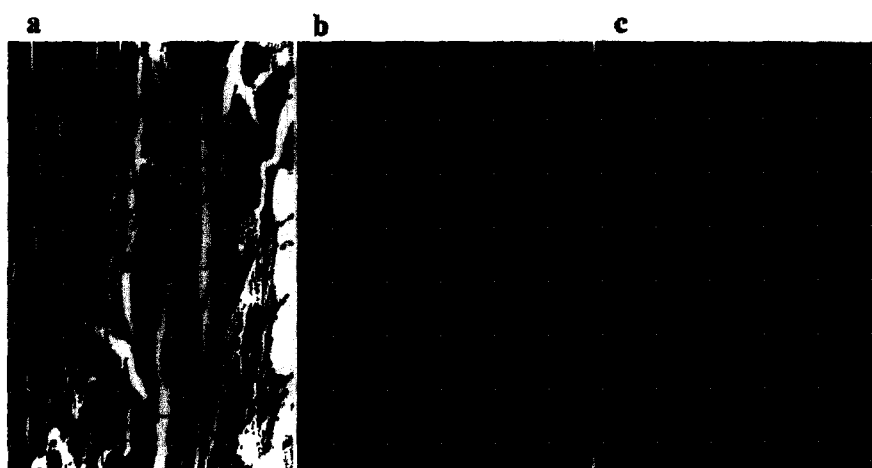


图4: 此图表示用EGJV来治疗大鼠胫骨前肌的刀切割伤后14天的一个实例。a, 5% DMSO对照组的伤口已纤维化(Fb), 纤维化修复的创口挛缩(蓝色箭头所示)。对比之下, 在EGJV治疗组, b和c则可以观察到新再生的较成熟及排列整齐的长的肌纤维(Rm)。这些排列整齐的新再生的肌纤维完全地取代了被损伤的肌纤维, 并连接了创口。箭头指示两周前的刀切割线, 刀切割线的两侧, 一侧是原有的未受损伤的肌纤维(Em), 另一侧是新再生的肌纤维(Rm)。