

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/70

A61K 31/495



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816651.8

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668312A

[22] 申请日 2003.5.13 [21] 申请号 03816651.8

[30] 优先权

[32] 2002.5.13 [33] US [31] 60/380,696

[86] 国际申请 PCT/US2003/015548 2003.5.13

[87] 国际公布 WO2004/041155 英 2004.5.21

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.13

[71] 申请人 洛杉矶儿童医院

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 加州大学

[72] 发明人 段泰岚 保罗·D·本亚

大卫·沃伯顿

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

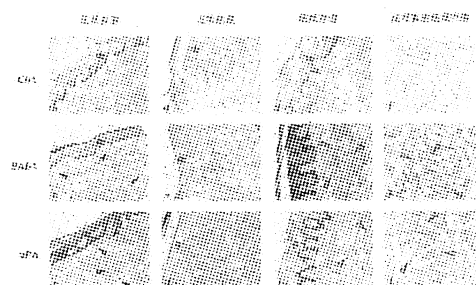
代理人 戴建波

权利要求书 6 页 说明书 48 页 附图 9 页

[54] 发明名称 疤痕疙瘩和它们的皮肤或内部的创伤或损伤中异常疤痕形成的处理和抑制

[57] 摘要

本发明涉及通过降低纤维蛋白溶酶原活化剂-1 (PAI-1) 活性来抑制胶原的过度沉积, 其中, 胶原过度沉积可导致形成异常疤痕。这些异常疤痕包括但不限于疤痕疙瘩、粘连、肥大疤痕、皮肤外貌损伤、纤维化、纤维囊性、挛缩和硬皮病, 所有这些异常疤痕与创伤愈合过程中胶原过度沉积有关或由其引起。因此, 一方面, 本发明提供了降低 PAI-1 活性来减少胶原过度沉积、从而阻止异常疤痕形成和/或治疗异常疤痕的方法。PAI-1 活性可以通过 PAI-1 抑制剂降低, PAI-1 抑制剂包括但不限于 PAI 中和抗体、二酮哌嗪类化合物、羟化四甲铵酸类化合物、维生素 C、维生素 E、米非司酮 (RU486) 和螺内酯等。另一方面, 本发明提供了通过测定创伤愈合过程中 PAI-1 的活性而确定异常疤痕形成可能性的方法。



知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1、一种减少创伤愈合过程中胶原过度积累的方法，该方法包括降低 PAI-1 活性的步骤。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 活性是通过 PAI 抑制剂降低的。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI 抑制剂是间接 PAI-1 抑制剂或直接 PAI-1 抑制剂。

4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的间接 PAI-1 抑制剂选自于福辛普利、咪达普利、卡托普利、依那普利、L158, 809、依普沙坦、曲格列酮、维生素 C、维生素 E、培朵普利、米非司酮 (RU486)、螺内酯和 RCL 肽。

5、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的直接 PAI-1 抑制剂选自于 PAI-1 中和抗体、二酮哌嗪类化合物、羟化四甲铵酸类化合物、羟基醌类化合物和 11-酮-9(E), 12(E)-十八碳二烯酸。

6、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，将所述的 PAI-1 抑制剂给药至创伤愈合过程中的受者。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 抑制剂通过如下方式给药：表皮给药、经皮给药、经肺给药、经鼻给药、眼部给药、口腔给药、口服给药、直肠给药、阴道给药以及胃肠外给药。

8、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的胶原过度积累导致异常疤痕，所述的异常疤痕包括疤痕疙瘩、粘连、肥大疤痕、皮肤外貌损伤、纤维化、纤维囊性、挛缩、硬皮病、Duyputren 病、派罗尼病和关节强直。

9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述的纤维化包括间质纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、视网膜和玻璃体病。

10、一种抑制由胶原过度积累所形成的异常疤痕的方法，该方法包括降低 PAI-1 活性的步骤。

11、如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 活性是通过 PAI 抑制剂降低的。

12、如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI 抑制剂是间接 PAI-1 抑制剂或直接 PAI-1 抑制剂。

13、如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述的间接 PAI-1 抑制剂选自于福辛普利、咪达普利、卡托普利、依那普利、L158, 809、依普沙坦、曲格列酮、维生素 C、维生素 E、培朵普利、米非司酮 (RU486)、螺内酯和 RCL 肽。

14、如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述的直接 PAI-1 抑制剂选自于 PAI-1 中和抗体、二酮哌嗪类化合物、羟化四甲铵酸类化合物、羟基醌类化合物和 11-酮-9(E), 12(E)-十八碳二烯酸。

15、如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，将所述的 PAI-1 抑制剂给药至已观察到胶原过度积累情况的受者。

16、如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 抑制剂通过如下方式给药：表皮给药、经皮给药、经肺给药、经鼻给药、眼部给药、口腔给药、口服给药、直肠给药、阴道给药和胃肠外给药。

17、如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的异常疤痕包括疤痕疙瘩、粘连、肥大疤痕、皮肤外貌损伤、纤维化、纤维囊性、挛缩、硬皮病、Dyupuytren 病、派罗尼病和关节强直。

18、如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的纤维化包括间质纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、视网

膜和玻璃体病。

19、一种处理由胶原过度积累所形成的异常疤痕的方法，该方法包括降低 PAI-1 活性的步骤。

20、如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 活性是通过 PAI 抑制剂降低的。

21、如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI 抑制剂是间接 PAI-1 抑制剂或直接 PAI-1 抑制剂。

22、如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述的间接 PAI-1 抑制剂选自于福辛普利、咪达普利、卡托普利、依那普利、L158, 809、依普沙坦、曲格列酮、维生素 C、维生素 E、培朵普利、米非司酮 (RU486)、螺内酯和 RCL 肽。

23、如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述的直接 PAI-1 抑制剂 PAI-1 中和抗体、二酮哌嗪类化合物、羟化四甲铵酸类化合物、羟基醌类化合物和 11-酮-9 (E), 12 (E) -十八碳二烯酸。

24、如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，将所述的 PAI-1 抑制剂给药至患有异常疤痕的受者。

25、如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 抑制剂通过如下方式给药：表皮给药、经皮给药、经肺给药、经鼻给药、眼部给药、口腔给药、口服给药、直肠给药、阴道给药和胃肠外给药。

26、如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述的异常疤痕包括疤痕疙瘩、粘连、肥大疤痕、皮肤外貌损伤、纤维化、纤维囊性、挛缩、硬皮病、Dupuytren 病、派罗尼病和关节强直。

27、如权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述的纤维化包括间质纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、视网膜和玻璃体病。

28、一种确定异常疤痕形成倾向的方法，该方法包括如下步骤：

- a) 创伤定位；
- b) 测定 PAI-1 的活性水平。

29、如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述的方法进一步包括如下步骤：将 PAI-1 活性与标准 PAI-1 活性进行比较，以确定形成异常疤痕的可能性。

30、如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述的 PAI-1 活性水平是由以下方法测定的：ELISA、色原实验、纤维蛋白覆盖实验

或逆向纤维蛋白覆盖实验。

31、如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述的异常疤痕包括疤痕疙瘩、粘连、肥大疤痕、皮肤外貌损伤、纤维化、纤维囊性、挛缩、硬皮病、Dupuytren 病、派罗尼病和关节强直。

32、如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述的纤维化包括间质纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、视网膜和玻璃体病。

疤痕疙瘩和别的皮肤或内部的创伤或损伤中 异常疤痕形成的处理和抑制

相关申请

本申请基于并要求 2002 年 3 月 13 日递交的第 60/380,696 号美国临时申请作为其优先权，并包含其全部内容包括其附图。

政府资助

本发明得到了美国国家大众医学科学院资助 (GM55081)，因而美国政府在某些方面享有本发明的某些权利。

发明领域

本发明涉及异常疤痕形成的处理和抑制，更具体地讲，本发明涉及降低创伤愈合过程中纤维蛋白溶酶原活化剂抑制因子-1 的活性从而降低胶原的过度沉积，而胶原的过度沉积可引起异常疤痕，包括疤痕疙瘩 (keloid)、肥大疤痕、粘连和其它皮肤或内部的创伤或损伤。

发明背景

创伤愈合是一个连续的过程，通常可以分为四期：1) 凝结期；2) 炎症期；3) 迁移和增生期；以及 4) 重塑期。

当身上出现伤口后不久,创伤愈合过程就开始启动,首先是纤维蛋白(fibrin)和纤维连接素(fibronectin)凝结形成基体或叫凝块,并且血小板聚集在伤口部位。当血小板凝结时,炎症细胞,如中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞也附着到受伤部位,并且释放相关因子治疗伤口。例如,巨噬细胞分泌细胞因子和生长因子如成纤维细胞生长因子(FGF)、源自血小板的生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、白介素-1(IL-1)、 γ -干扰素(INF- γ)和上皮生长因子类物质。受激的血小板也可以释放出上皮生长因子(EGF)、PDGF、变形生长因子 α 、 β_1 、 β_2 (TGF- α 、TGF- β_1 以及TGF- β_2)、血小板源性上皮生长因子(PDEGF)、血小板激活因子(PAF)、胰岛素类生长因子-1(IGF-1)、纤维连接素和血清素。所有这些生物性因子都与角化细胞、成纤维细胞和内皮细胞的渗透、增殖和迁移有关。在炎症期的末期,蛋白质、脂肪和交联的新胶原整合在一起,形成一个临时支架。

在迁移和增殖期,迁移到伤口部位的细胞进入快速有丝分裂和分化。这些细胞包括角化细胞和成纤维细胞。一方面,角化细胞经历上皮形成过程,在这个过程中细胞形成层状并分化成为上皮覆盖物。角化细胞也释放角化细胞生长因子(KGF)和VEGF来刺激血管形成,释放TGF- α 作为化学引诱物,释放PDGF促使细胞外基质(ECM)形成,以及释放蛋白酶来分解无法生存的组织 and 纤维屏障。另一方面,迁移的成纤维细胞合成并沉积胶原和蛋白多糖,释放生长因子如KGF、连接组织生长因子(CTGF)、纤维蛋白溶酶原活化剂抑制因子-1(PAI-1)

和 TGF- β 。像角化细胞一样，成纤维细胞也释放蛋白酶，其可以促进接下来的重塑过程。在迁移和增殖期，所有这些细胞活动如迁移、增殖、分化、临时支架的降解以及新基质的合成经常被描述为纤维组织形成过程。

创伤愈合过程的最后一个阶段即重塑过程，改变了基质组分的沉积模式。如本发明所述的，最初的基质是来自内部稳定环境的纤维蛋白和纤维连接素的凝块。随着成纤维细胞的增殖和迁移，胶原合成和沉积，在蛋白酶的作用下替代和重新排列最初的基质。胶原纤维逐渐增加厚度，并沿伤口的张力线进行排列。在正常疤痕组织形成的末期，最终的疤痕显示胶原纤维大多与表皮平行(Hunt 等, 创伤愈合的生理学, *Adv. Skin. Wound Care* 13: 6-11 (2000); Ferguson 等, 疤痕形成: 胎儿和成人伤口修复的特性, *Plas. Reconstr. Surg.* 97: 854-60 (1996); Gailit & Clark, 在细胞外基质背景下伤口的修复, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 717-25 (1994)))。

因此，伤口愈合过程是一个精细和谐的生长过程与分解过程之间的平衡。任何过程中的畸变都可导致这种平衡的破坏，走向病态异常的伤口愈合或者疤痕组织的过度沉积。例如，伤口愈合过程中的疤痕组织的过度沉积可以导致疤痕疙瘩或者肥大疤痕（增殖性疤痕）。疤痕疙瘩是伤口愈合过程中的疤痕组织超出正常原始损伤外的过度增生。相反，肥大疤痕发生于创伤或损伤侵犯了深处真皮组织，而过度的疤痕沉积物却被限制在原始损伤的边界内。在这两种情况下，胶原的过度沉积或者表达被认为是其原因。请参阅 Tuan&Nichter, 疤痕

疙瘩与肥大疤痕形成的分子学基础, *Mol. Med. Today* 4: 19-24 (1998)。

皮肤上异常疤痕的存在,经常会令受其影响的人们无法接受。实际上,避免或者治疗异常伤口愈合以及异常疤痕的治疗策略是美容行业的推动力。此外,异常疤痕可能引起疼痛或者瘙痒,而且可能限制动作范围。在发生创伤时,严重的情况可能会导致组织或者器官的功能障碍。因此,伤口愈合过程中的畸形或者异常疤痕需要进行临床研究和医学处理。

异常疤痕形成的细胞和分子病源学正被广泛研究。研究表明生长因子参与到异常疤痕形成的致病机制中。特别是 TGF- β 家族扮演了重要的生物学角色。据报道, TGF- β_1 和 TGF- β_2 被证实在疤痕疙瘩纤维原培养基中比在正常皮肤纤维原培养基中具有更高的水平,因而被认为与异常疤痕形成和纤维变性有关。Lee 等, 在疤痕疙瘩中变形生长因子 $\beta_1, 2$ 和 3 的蛋白表达, *Ann. Plast. Surg.* 43: 179-184 (1999)。

传统的异常形成的疤痕的预防和治疗包括: 将类皮质酮直接注射于伤口部位来限制成纤维细胞的生长; 用硅树脂胶化护板治疗疤痕疙瘩造成的瘙痒症; 利用冷冻疗法造成疤痕疙瘩的热损伤或者死亡; 外科切除过度生长的疤痕组织; 以及应用干扰素 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 抑制胶原的合成, 这种抑制是通过限制真皮成纤维细胞中细胞信使 RNA 的合成而实现的。然而由于疤痕形成的潜在病理原因还未被认知, 这些治疗方法表现出严重的副作用或者异常疤痕的复发。因此, 目前还没有被广泛接受的可以消除或者预防异常疤痕的治疗方法。Alster & West, 疤痕的治疗: 综述, *Ann. Plast. Surg.* 39: 418-432 (1995)。

因此,现在仍然需要一种新的方法来治疗或者预防伤口愈合中的畸变和异常疤痕。

发明内容

一个方面,本发明提供了一种减少伤口愈合过程中胶原过度堆积或沉积的方法,包括降低纤维蛋白溶酶原活化剂抑制因子-1 (PAI-1) 的活性,而这种过度的胶原堆积或沉积可能导致异常疤痕的形成。

另一个方面,本发明提供了一种防止异常疤痕形成的方法,包括降低 PAI-1 活性的步骤。

再一个方面,本发明提供了一种通过降低 PAI-1 的活性来处理异常疤痕的方法。

又一个方面,本发明提供了一种通过测量 PAI-1 的活性来确定伤口愈合过程中的异常疤痕形成倾向的方法。

在本发明的一个具体实施方式中,PAI-1 的活性被 PAI-1 的抑制剂所抑制。PAI-1 抑制剂的实例包括但不限于: 福辛普利 (Fosinopril); 咪达普利 (Imidapril); 卡托普利 (Captopril); 依那普利 (Enalapril); L158, 809; 依普沙坦 (Eprosartan); 曲格列酮 (Troglitazone); 维他命 c; 维他命 E; 培朵普利 (Perindopril); 米非司酮 (RU486); 螺内酯; 活化肽聚糖中央环 (reactive center loop peptide); PAI-1 中和抗体; 二酮哌嗪类化合物; 羟化四甲铵酸 (tetramic acid) 类化合物; 羟基醌 (hydroxyquinolinone) 类化合物和 11-酮-9 (E), 12 (E) 十八碳二烯酸。

在本发明的另一个具体实施方式中, 通过以下给药途径将 PAI-抑制剂给药受试者, 这些给药途径包括但不限于: 口服、小肠给药、口腔给药、经鼻给药、局部给药、直肠给药、阴道给药、气雾剂、穿粘膜给药、表皮给药、经皮给药、眼药、经肺给药和/或胃肠外给药。

在本发明的再一个具体实施方式中, 通过如下的方法测定 PAI 的活性, 如色原分析法、酶联免疫分析法、纤维蛋白覆盖分析法和逆向纤维蛋白覆盖分析法。

在本发明的又一个具体实施方式中, 异常疤痕是由于伤口愈合过程中胶原的过度堆积导致。异常疤痕的例子包括但不限于: 疤痕疙瘩、手术粘连、肥大疤痕、皮肤外形损伤如痤疮和皱纹、蜂窝组织炎的形成、纤维瘤、纤维化、纤维泡症、挛缩、硬皮病、Dupuytren's 病、派罗尼(派罗尼)病和关节强直。

附图简要说明

附图是说明书的一个组成部分, 用于说明本发明的实施例以及解释本发明的原理。附图只用于阐明本发明所采用的优选的和可选的实施方式。当然, 应当理解, 附图只是用于描绘和说明本发明的概念。不能将附图解释为本发明只局限于所给出的实施例。本发明的各种优点和特征可从其文字说明和附图得以体现。其中:

图 1 显示应用免疫组织化学法研究关于 uPA 和 PAI-1 在正常皮肤、正常疤痕和疤痕疙瘩的表达。疤痕疙瘩组和正常皮肤组的样品来自非裔美国病人, 他们的黑素细胞在免疫组织化学中呈现棕黑色。对

照：对照组无一抗。"*"：表皮，"J"，"k"，和"l"是来自疤痕疙瘩的真皮区域。实心箭头"b"和"c"表示血管。空心箭头"h"、"k"、"i"和"l"表示成纤维细胞。相片的放大倍数为 100 倍。

图 2 显示用 RNA 印迹（RNA 印迹）分析法观察正常皮肤组、正常疤痕组和疤痕疙瘩组的纤维母细胞的 PAI-1 的 RNA 信使。正常皮肤组（N65 and N77）、正常疤痕（NS70 and NS75）和疤痕疙瘩（K76 和 K80）的成纤维细胞在 8×10^3 细胞/cm² 的密度下培养并用于 RNA 印迹分析。将 20 微克的所有 RNA 加样在每一个泳道。样品用 β -肌动蛋白（ β -肌动蛋白）水平来校正。

图 3 比较了正常疤痕和疤痕疙瘩的成纤维细胞在纤维蛋白凝胶中 16 天培养期胶原聚集的时间相关性。不管是用正常还是用疤痕疙瘩的成纤维细胞合成的胶原均按照本发明的程序进行纯化。在每一个时点每孔中的胶原表达进行每分钟计数。

图 4 比较了 14 天内正常和疤痕疙瘩的成纤维细胞 uPA 和 PAI-1 的表达。面板上部：纤维蛋白覆盖实验证明 uPA 活性。面板下部：逆向纤维蛋白覆盖实验证明 PAI-1 活性。双链 uPA 分子量为 50kD，单链 uPA 为 30kD。高分子量蛋白（110kD）是 uPA/PAI-1 复合物。人 PAI-1 分子量大约为 50kD。

图 5 显示了来自于供者与解剖部位相符的正常（N86）和疤痕疙瘩（K86）的成纤维细胞在 13 天培养期中 uPA 和 PAI-1 的表达。面板上部：纤维蛋白覆盖实验证明 uPA 活性。面板下部：逆向纤维蛋白覆盖实验证明 PAI-1 活性。双链 uPA 分子量为 50kD，单链 uPA 分子量

为 30kD, 高分子量蛋白 (110kD) 是 uPA/PAI-1 复合物。人 PAI-1 分子量大约为 50kD。

图 6 显示了在纤维蛋白、纤维蛋白-胶原或胶原凝胶中培养的正常或疤痕疙瘩的成纤维细胞 uPA 和 PAI-1 的表达。面板上部: 纤维蛋白覆盖实验证明 uPA 活性。面板下部: 逆向纤维蛋白覆盖实验证明 PAI-1 活性。双链 uPA 分子量 50kD, 单链 uPA 分子量 30kD, 高分子量蛋白 (110kD) 是 uPA/PAI-1 复合物。人 PAI-1 分子量大约为 50kD。

图 7 显示了在纤维蛋白或胶原凝胶中培养的正常或疤痕疙瘩的成纤维细胞的胶原累积情况。成纤维细胞合成的胶原如本发明所述进行纯化及计数。

图 8 显示了抗 PAI-1 中和抗体对培养在纤维蛋白凝胶中疤痕疙瘩成纤维细胞胶原积累的作用。成纤维细胞合成的胶原按本发明所述的程序进行纯化及计数。

图 9 是方框原理图, 该图总结了在疤痕疙瘩纤维化中的一些重大发现以及其与组织损伤修复中关键因素或成分的关系。纤维蛋白溶酶原活化剂/纤维蛋白溶酶和 PAI-1 系统是基质重塑中的重要成分, 其可以调节纤维蛋白的降解、影响 TGF- β 和基质金属蛋白酶 (MMP) 的活性以及调整细胞附着/迁移到细胞外基质 (ECM)。疤痕疙瘩成纤维细胞不仅显示出较高的胶原累积水平, 当其暴露于 TGF- β 时还可以进一步升高, 而且还显示出在纤维蛋白降解时的缺陷, 这种缺陷引起 PAI-1 活性的增高和 uPA 活性的降低。增高的 PAI-1 活性和疤痕疙瘩的成纤维细胞过度胶原积累有关, 这可以通过如下情况得到证实:

PAI-1 中和抗体可以将疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原积累降低到正常成纤维细胞水平，或者在含有基质凝胶的胶原中培养疤痕疙瘩成纤维细胞能够提升 uPA 活性。实心箭头表示活性水平。

具体实施方式

本发明基于以下发现：来自于异常形成的疤痕的成纤维细胞呈现胶原过度积累，并表达增高的 PAI-1 活性，以及 PAI-1 活性的降低可以使非正常疤痕成纤维细胞的过度沉积的胶原变薄。

更具体地，本发明通过免疫组织化学研究发现：尽管正常疤痕和异常疤痕（如疤痕疙瘩）的表皮层成纤维细胞均表达尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂（uPA）和 PAI-1，但是异常疤痕成纤维细胞的 PAI-1 表达水平高得多。长期的三维纤维蛋白的凝胶培养显示出正常成纤维细胞表达适中的及受调控的 uPA 和 PAI-1 活性水平。相反，疤痕疙瘩成纤维细胞总是表达高水平的 PAI-1 以及低水平的 uPA。疤痕疙瘩成纤维细胞增高的 PAI-1 活性与纤维蛋白凝胶中增高的胶原累积有关。并且，还可以观察到 PAI-1 活性的降低减少了疤痕疙瘩成纤维细胞胶原的累积。

这些发现说明不管在体内还是在体外，PAI-1 过度表达或活性提高是异常疤痕中成纤维细胞固有的特性。既然 PAI-1 活性的降低可以导致胶原过度沉积的减少，那么 PAI-1 似乎是异常疤痕中成纤维细胞增高胶原累积的原因。相应地，本发明的一方面就是提供抑制或减少胶原过度沉积的方法，包括减少 PAI-1 的活性。

众所周知,纤维蛋白基质的蛋白分解以及随后成纤维细胞产生的胶原替换是创伤愈合过程中的必要特性,尤其是在纤维组织形成和重塑阶段。据报道胶原过度沉积或过度表达可以引起创伤愈合过程的异常状态,从而导致异常疤痕形成。*Tuan & Nichter, The Molecular Basis of Keloid and Hypertrophic Scar Formation, Mol. Med. Today 4: 19-24 (1998)*。PAI-1 活性的降低可以抑制由胶原过度沉积引起的创伤愈合过程中的异常状态。另外, PAI-1 活性的降低还可以逆转异常疤痕形成的病理过程,并使创伤愈合过程进入正常状态。相应地,本发明的另一方面就是提供抑制或降低因胶原过度沉积而导致的创伤愈合过程中的异常情况或异常疤痕的方法,包括减少 PAI-1 活性。

因为 PAI-1 的活性可以利用本领域内已知的方法进行测量,例如色原分析法、纤维蛋白覆盖实验以及逆向纤维蛋白覆盖实验,因此,创伤愈合的正常过程中或正常疤痕形成中的 PAI-1 活性水平可以确定并作为标准 PAI-1 活性。标准 PAI-1 活性可以用来同创伤愈合中创伤部位的 PAI-1 活性进行比较。正常创伤愈合过程中的标准 PAI-1 活性可以通过已知的方法或化验进行确定,或以下文献中提出的方法:*Gaffney & Edgell, The international standard for plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity, Thromb. Haemost. 76: 80-83 (1996)*。因为由胶原过度沉积引起的异常疤痕持续表达增高的 PAI-1 水平,因此创伤愈合过程中创伤部位 PAI-1 活性水平的提高代表了胶原过度积累的可能性,或者有形成异常疤痕的倾向,或者创伤愈合过程的异常状态。相应地,本发明的另一方面就是提供一种确定

胶原过度积累可能性或者形成异常疤痕倾向性的方法,包括确定创伤部位以及测量 PAI-1 活性水平。这些方法进一步包括将创伤部位的 PAI-1 活性同标准 PAI-1 活性进行比较,从而确定形成异常疤痕的可能性。

纤维蛋白溶酶原活化剂抑制因子-1 (PAI-1)

本发明使用的 PAI-1 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SERPIN) 家族成员,并且是丝氨酸蛋白酶 uPA 和组织型纤维蛋白溶酶原活化剂 (tPA) 主要的抑制剂。已经发现纤维蛋白溶酶原活化剂的 PAI-1 抑制剂通过 PAI-1 蛋白 (氨基酸残基#346 (Arg) 到#347 (Met)) 的诱饵(bait)肽键来调节,其模拟纤维蛋白溶酶原活化剂的天然底物,即纤维蛋白溶酶。

uPA 和 tPA 是将纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶的酶。然后纤维蛋白溶酶参与 ECM 中其它糖蛋白的分解、MMP 的活化以及 TGF- β 的释放 (Rifkin 等, *Plasminogen plasminogen activator and growth factor activation*, *Ciba. Found. Symp.* 212: 105-115 (1997))。相应地,作为体内纤维蛋白溶酶原活化的主要调整物,PAI-1 参与创伤愈合过程中细胞外基质的新陈代谢。据报道,体内 PAI-1 表达的增高可以抑制组织正常纤维蛋白溶解系统,以及形成局部血栓生成状态,血栓形成可以在组织损伤部位导致病理性纤维蛋白沉积 (Yamamoto & Saito, *A Pathological Role of Increased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human or Animal Disorders*, *Int'l. J. Hematol.* 68: 371-385 (1998))。

PAI-1 的分子基础已经很好地得以表征,尤其是编码人和动物的 PAI-1 全长 DNA 序列已得以克隆及进行序列分析。例如, cDNA 序列及其编码的人 PAI-1 氨基酸序列在 Genbank Accession No. X047444 中列出。 cDNA 序列及其编码的鼠 PAI-1 氨基酸序列在 Genbank Accession No. M33960 中列出。本发明中应用的 PAI-1 参照人 PAI-1。

PAI-1 的一个特性就是可以自发地由其活性形态转化为潜伏的、非活性形态,此形态不能绑定到纤维蛋白溶酶原,从而抑制其活性 (Sancho, 等, *Conformational studies on plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in active, latent, substrate, and cleaved forms*, *Biochem. 34: 1064-1069 (1995)*)。据报道来自于 PAI-1 #333 (Ser) 到 #346 (Lys) 的氨基酸残基,也称为活性中央环 (RCL), 是对纤维蛋白溶酶原活化剂形成 PAI-1 抑制效应的原因 (Eitzman 等, *Peptide-mediated inactivation of recombinant and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in vitro*, *J. Clin. Invest. 95: 2416-2420 (1995)*)。在 PAI-1 的活性形态,活性中央环 (RCL) 伸出蛋白表面并将诱饵肽键 (Arg346 至 Met347) 暴露给作为假底物的纤维蛋白溶酶原活化剂。然而,在潜伏、非活性形态,RCL 作为中央股插入 β -层 (sheet) A (见同上文献)。另外,与 PAI-RCL 相符的一个 14-氨基酸的肽 (RCL 肽) 可以削弱 PAI 功能和活性 (见同上文献)。

PAI-1 活性的降低

PAI-1 的减少可以通过如下方法实现,即减少、降低或消除 PAI-1 的表达、活性或存在。例如,PAI-1 活性可以通过移除 PAI-1 基因或

蛋白来降低。据报道, PAI-1 剥夺那些可以免除博来霉素诱导的肺纤维化的小鼠的能力 (Hattori 等, *Bleomycin- Induced Pulmonary Fibrosis in Fibrinogen-Null Mice, J. Invest. Invest.* 106: 1341-1350 (2000))。PAI-1 活性也可以通过增加 uPA 活性而降低, uPA 活性提高可以在胶原或纤维蛋白-胶原凝胶中培养成纤维细胞获得。

本发明的一个实施方式是通过抑制剂来降低 PAI-1 活性。PAI-1 抑制剂可以是能够直接或间接抑制 PAI-1 活性的分子或高分子。

在本发明的一个优选实施方式中, PAI-1 抑制剂是一个直接抑制剂, 可以同 PAI-1 直接起作用或绑定到 PAI-1 上, 从而降低 PAI-1 活性。PAI-1 抑制剂包括 (1) 二酮哌嗪 XR330 和 XR334, 见 Bryans 等, *Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity by two diketopiperazines produced by Streptomyces sp., J. Antibiot.* 49: 1014-1021 (1996); (2) 二酮哌嗪 XR1853 和 XR5082, 见 Charlton 等, *Evaluation of a low molecular weight modulator of human plasminogen activator inhibitor-1 activity, Thromb. Haemost.* 75: 808-15 (1996); (3) XR5118 和来自于 XR5118 以二酮哌嗪为基础的复合物, 例如复合物#24, 25, 33, 34, 35, 36, 37 和 38, 见 Folkes 等, *Synthesis and In Vitro Evaluation of a Series of Diketopiperazine Inhibitors of Plasminogen Activator Inhibitor-1, Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* 11: 2589-2592 (2001); (4) 羟化四甲铵酸 (tetramic acid) 为基础的复合物和羟基醌 (hydroxyquinolinone) 为基础的复合物, 见 Folkes 等, *Design,*

synthesis, and in vitro evaluation of potent, novel, small molecule inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 1063-1066 (2002); (5) 11-酮-9(E), 12(E)-十八碳二烯酸, 见 Chikanishi 等, *Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 by 11-keto-9(E), 12(E)-octadecadienoic acid, a novel fatty acid produced by Trichoderma sp.*, *J. Antibiot.* 52: 797-802 (1999)。对于抑制 PAI-1 活性的低分子化合物, 可参看 U. S. Pat. No. 5, 902, 812、U. S. Pat. No. 5, 891, 877 和 U. S. Pat. No. 5, 750, 535。

本发明的另一个优选实施方式中, 直接的 PAI-1 抑制剂包括 PAI-1 中和抗体以及 PAI-1 抑制性单克隆抗体, 这种 PAI-1 抑制性单克隆抗体包括但不限于鼠抗人 PAI-1 单克隆抗体 MA-44E4、MA-42A2F6、MA-56A7C10、MA-33B8, 见 Verhamme 等, *Accelerated conversion of human plasminogen activator inhibitor-1 to its latent form by antibody binding*, *J. Biol. Chem.*, 274: 17522-17517(1999); Bijmens 等, *The distal hinge of the reactive site loop and its proximity: A target to modulate plasminogen activator inhibitor-1 activity*, *J. Biol. Chem.*, 276: 44912-44918 (2001)。因为活性中央环 (PAI-1 的 Ser³³³ 至 Lys³⁴⁶) 从 PAI-1 结构表面突出, 并对纤维蛋白溶酶原活化剂呈现诱饵肽键 (Arg³⁴⁶-Met³⁴⁷), 因此抗 RCL 的单克隆或多克隆抗体可以用作直接 PAI-1 抑制剂。PAI-1 中和抗体或抑制性抗体可以绑定到 PAI-1 来阻滞 PAI-1 活性,

这是通过抑制其同纤维蛋白溶酶原活化剂相互作用而实现的。另外，PAI-1 中和抗体或抑制性抗体可以通过加速 PAI-1 的活性结构转换为潜伏的、非活性结构来抑制 PAI-1 活性。参照前述的 Verhamme 的报告。

在本发明的另一个实施方式中，PAI-1 抑制剂是间接抑制 PAI-1 活性的、分子或高分子物质的间接 PAI-1 抑制剂。例如，在细胞和分子水平，间接 PAI-1 抑制剂可以是专门抑制 PAI-1 基因的转录和表达的因子或复合物，或者是与 PAI-1 序列互补的阻止 PAI-1 表达的反义寡核苷酸，反义寡核苷酸是一种多聚核苷酸结构诱导 RNA 干扰 PAI-1 mRNA 降解，或者是产生 siRNA（短干扰 RNA）的 dicer（一种 RNA 酶 III 型核酸酶），siRNA 然后又降解 PAI-1 mRNA，或者是与 PAI-1 竞争同纤维蛋白溶酶原活化剂的酶促反应的分子。已知 PAI-1 的表达可由以下因子增强，如内毒素、凝血酶、TNF- α 、TGF- β 、白介素-1、胰岛素、地塞米松、PDGF、EGF、脂蛋白和血管紧缩素 II。相应地，间接 PAI-1 抑制剂可以是这些因子的抑制剂，以间接降低 PAI-1 的表达。

更优选地，间接 PAI-1 抑制剂是抑制 PAI-1 表达的复合物。已知抑制或削弱 PAI-1 表达的间接 PAI-1 抑制剂包括但不限于：血管紧缩素转化酶抑制剂（例如福辛普利、咪达普利、卡托普利、依那普利）；血管紧缩素 II 受体拮抗剂（L158, 809、依普沙坦）；曲格列酮；维他命 C；维他命 E；培朵普利；米非司酮(RU486)和螺内酯。请参阅：*Eitzman 等, Peptide-mediated inactivation of recombinant and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in vitro,*

J. Cliva. Invest. 95: 2416-2420 (1995); Pawlowska 等, Natriuretic peptides reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells, CellBiol.Lett : 7 : 1153-1157 (2002); Mitsui 等, Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, inhibits thrombosis via reduction in aortic plasminogen activator inhibitor type-1 levels in spontaneouslyhypertensive rats, Biol.Phann. Bull. 22: 863-865 (1999) ; Pawlowska et al., Natriuretic peptides reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells, CellBiol.Lett: 7: 1153-1157 (2002); Mitsui 等, Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, inhibits thrombosis via reduction in aortic plasminogen activator inhibitor type-1 levels in spontaneously hypertensive rats, Biol.Phann. Bull. 22: 863-865 (1999); Mitsui 等, Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, inhibits thrombosis via reduction in aortic plasminogen activator inhibitor type-1 levels in spontaneous lyhypertensive rats, Biol.Phann. Bull. 22: 863-865 (1999); Brown 等 , Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo, Kidney Int. 58: 1219-1227 (2000); Wong 等, Gene expression in rats with renal disease treated with the angiotensin n receptor antagonist,

Eprosartan, Physiol. Genomics 4: 35-42 (2000); Papp 等, Biological mechanisms underlying the clinical effects of mifepristone (RU486) on the endometrium, Early Pregnancy 4:230-239(2000); Oikawa 等, Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibitor, Kidney Int. 51:164-172(1997); Fogari 等, Losartan and perindopril effects on plasma plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen in hypertensive type 2 diabetic patients, Am J Hypertens. 15: 316-320(2002); Pahor 等, Fosinopril versus amlogipine comparative treatment study: a randomized trial to assess effects on plasminogen activator inhibitor-1, Circulation 105:457-461(2002); Orge 等, Vitamins C and E attenuate plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in a hypercholesterolemic porcine model of angioplasty, Cardiovasc. Res. 49: 484-492(2001); Gottschling-Zeller 等, Troglitazone reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in cultured human adipocytes, Diabetologia 43: 377-383 (2000); Katoh 等, Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of

nitric oxide synthesis, J. Mol. Cell Cardiol. 32: 73-83 (2000).

在另一个优选实施方式中, 间接 PAI-1 抑制剂是干扰 PAI-1 与纤维蛋白溶酶原活化剂反应的肽类, 从而间接降低 PAI-1 活性。例如, 含有 PAI-1 的 RCL 序列的肽 (RCL 肽) 可以抑制 PAI-1 活性, 见 Verhamme 的前述报告。

在确定是否某种分子或高分子是否是 PAI-1 抑制剂时, 本领域常用的色原实验法常被用来测量 PAI-1 活性。在此法中, 分子首先与含有 PAI-1 的溶液或含有分泌 PAI-1 的细胞的培养液混合, 然后定量的组织纤维蛋白溶酶原活化剂加入到混合物中同 PAI-1 相互作用。在中性条件下通过加入 Glu-纤维蛋白溶酶原、多聚 D-赖氨酸和显色底物混合物来测定残余 tPA。残余 tPA 催化纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶, 而纤维蛋白溶酶进一步水解显色底物。显色程度与 tPA 的量具有比例关系, 进而代表了分子的抑制性及效力。色原法在以下文献有详细描述: Wysocki 等, *Temporal Expression of Urokinase Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and Gelatinase-A in Chronic Wound Fluid Switches from a Chronic to Acute Wound Profile with Progression to Healing, Wound Repair Regen. 7: 154-165 (1999)*。此外, 是否此类分子能够抑制 PAI-1 表达可以通过纤维蛋白覆盖实验、逆向纤维蛋白覆盖实验和 ELISA 来确定。

为了检测 PAI-1 抑制剂降低过度胶原累积的效力, 在体外应用三维纤维蛋白基质凝胶培养系统。3-D 纤维蛋白基质凝胶培养系统是一

种体外纤维组织形成模型，此模型是在研究创伤愈合过程中细胞和 ECM 的相互作用中确立的(见 Tuan 等, *In vitro Fibroplasia: Matrix Contraction, Cell Growth and Collagen Production of Fibroblasts Cultured in 3-Dimensional Fibrin Matrix, Exp. Cell Res. 223: 127-134 (1996)*)。3-D 纤维蛋白基质凝胶培养系统可以表现纤维组织形成重要的特性，尤其是这一系统模拟了创伤愈合中细胞增殖、纤维蛋白的重建和降解以及胶原的合成和沉积。因此，此系统有效地刻画了体内的纤维组织形成过程。3-D 纤维蛋白基质凝胶培养系统中 PAI-1 抑制剂的存在引起 PAI-1 活性的降低，以及随后胶原合成的减少。胶原合成的水平可以通过本领域常用的方法进行确定(见 Tuan 等, *In vitro Fibroplasia: Matrix Contraction, Cell Growth and Collagen Production of Fibroblasts Cultured in 3-Dimensional Fibrin Matrix, Exp. Cell Res. 223: 127-134 (1996)*)。

既然 PAI-1 活性可以通过色原法进行测定，那么正常疤痕形成过程中 PAI-1 活性水平就可以确定并作为标准 PAI-1 活性，用来同异常疤痕形成过程中 PAI-1 活性进行比较。因此可以确定在疤痕形成的每一个阶段中异常疤痕形成的倾向性，并且可以给予有效治疗剂量的 PAI-1 抑制剂来抑制异常疤痕形成或减少异常疤痕形成的可能性。

创伤愈合中的异常状态

如前所述，本发明的一个方面就是要提供在创伤愈合中避免因胶原过度表达而形成异常疤痕或异常状态的方法，这种方法包括减少

PAI-1 活性的步骤。此处的“创伤”指伤害、损伤或创伤引起的、至少伤及机体或机体组织器官的内或外表面的膜或上皮层，机体组织器官包括皮肤、肺、肾脏、肝脏、心脏、胃肠道、骨、肌腱、眼睛或神经等。创伤可以由外伤、手术、切割、感染、磨损、穿刺、水疱、污染或毒素引起。一旦创伤形成，为了修复损伤的组织或器官，创伤区域或部位就会经历一个创伤愈合过程。正常的创伤愈合过程会尽可能地使伤口部位损伤的组织或器官恢复到未损伤状态。但是创伤愈合是一个包含多阶段的过程并受多种因素影响。任何畸变都可以干扰这一过程使之偏离正常创伤愈合轨道，从而形成异常疤痕。

此处使用的短语“异常疤痕”、“异常疤痕形成”、“创伤愈合的异常状态”或“创伤愈合紊乱”均指由胶原过度沉积引起的偏离正常创伤愈合过程的情况。异常疤痕或创伤愈合的异常状态指纤维化、纤维瘤病、疤痕瘤、粘连（如手术粘连）、肥大疤痕、纤维囊性状态以及关节强直，但并不限于以上情况。异常疤痕或创伤愈合的异常状态可以根据创伤出现的组织不同而分为不同类型，例如在皮肤出现的异常疤痕可导致疤痕疙瘩、肥大疤痕、挛缩或硬皮病。胃肠道创伤愈合的异常可导致狭窄、粘连或慢性胰腺炎。另外，在肾脏可导致血管球性肾炎，在眼睛导致晶体后纤维增生症，在肝脏导致肝硬化和胆道闭锁，在心脏导致风湿性疾病或心室动脉瘤。请参考 *Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice, Chapter 12 (16th Ed., 2001)*。

与皮肤相关的创伤愈合紊乱或异常疤痕主要包括肥大疤痕、疤痕

疙瘩、皮肤外貌损伤（包括痤疮、皱纹、蜂窝织炎和纤维瘤）、Duypuytren 病、派罗尼病以及其它皮肤的或内部损伤，但是并不局限于以上情况。更重要的形成的异常疤痕是肥大疤痕、疤痕疙瘩和皮肤外貌损伤问题。疤痕疙瘩源自疤痕组织的过度沉积，增生的疤痕组织超过了原来创伤的边界。当疤痕组织的过度沉积被限制在原始创伤的边界时就形成了肥大疤痕。不管是疤痕疙瘩还是肥大疤痕，过度结疤均是由胶原的过度累积引起。见 *Haverstock, Hypertrophic Scars and Keloids, Clin. Podiatr. Med. Surg. 18: 147-159 (2001)*。

创伤愈合紊乱主要是纤维化。纤维化显示出过度的胶原积累，在伤口部位组织被异常疤痕所代替时，还会损害组织或器官的功能。纤维化的具体实例包括但不限于以下情况：心脏病发作后形成损害心脏泵吸功能的疤痕组织；糖尿病患者肾脏出现导致肾功能进行性丧失的异常结疤；以及手术后引起挛缩和疼痛的器官间纤维粘连。主要器官或组织的纤维化包括但不限于糖尿病或高血压引起的肾纤维化、酒精或病毒性肝炎引起的肝纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、视网膜黄斑退化以及视网膜玻璃体病变。

本发明中提到的“胶原过度累积”、“胶原过度沉积”或“胶原过度表达”是指在创伤部位或疤痕中增高的胶原水平，较正常创伤愈合或正常疤痕中的正常胶原水平高，而且至少高 20%。胶原累积水平可以通过体内或体外测试来确定。在体内实验中，创伤部位或疤痕处胶原的量可通过活组织检查法进行形态学和生物化学方面的评估。在体外试验中，取自创伤部位的成纤维细胞加到三维纤维蛋白基质培养

系统中。用来源于正常疤痕或正常组织的成纤维细胞作为对照组。将这些成纤维细胞新合成的胶原进行纯化并利用标记的氨基酸进行测定。参照 Tuan 等, *In vitro fibroblast cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels*, *Exp. Cell. Res.* 223: 127-134 (1996)。如果新合成的胶原水平较对照组高, 比较理想的是至少高 20%, 更为理想的是至少高 30%, 那么创伤部位或疤痕就会产生过度胶原沉积或积累。

PAI-1 抑制剂的给药途径

本发明的一种实施方式就是提供一种通过给予 PAI-1 抑制剂复合物来阻止异常疤痕形成或治疗异常疤痕的方法。PAI-1 抑制剂复合物或者是 PAI-1 抑制剂本身, 或者是含有 PAI-1 抑制剂及药物学上可接受的载体。

PAI-1 抑制剂复合物可以通过任何已知的给药途径给予受试者, 包括口服、小肠、口腔、鼻、局部、直肠、阴道、气雾剂、粘膜、上皮、真皮、眼、肺以及胃肠外给药。表皮或局部给药是指 PAI-1 抑制剂直接释放入创伤部位; 结膜给药是指 PAI-1 抑制剂穿过角膜或结膜进入眼睛或其它损伤部位; 鼻腔给药是指 PAI-1 抑制剂穿过鼻粘液上皮细胞进入周边循环; 口腔给药是指 PAI-1 抑制剂穿过口腔或舌上皮细胞进入周边循环; 口服给药是指 PAI-1 抑制剂主要被吞咽下去在胃及消化道吸收; 直肠给药是指 PAI-1 抑制剂通过消化道末端粘膜释放入周边循环; 阴道给药是指 PAI-1 抑制剂通过阴道粘膜释放入周边循

环。周边循环将 PAI-1 抑制剂带到损伤部位。胃肠外给药是指给药途径主要与注射有关，包括静脉、肌肉、动脉、膜内、囊内、眼窝、心脏内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、胸骨内注射或灌输。

本发明中所谓的“药物学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、复合物或装置，例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或胶囊材料，这些物质可以将 PAI-1 抑制剂从机体的一个组织、器官或某部分转运到机体的另一个组织、器官或另一部分。每一种载体必须是药物学上合适的，可以与其它成分如 PAI-1 抑制剂共存的，并且适于接触人或动物的组织或器官，而无过度毒性、刺激性、过敏反应、免疫原性或其它问题及并发症。一些可以充当此类载体的物质包括：

- (1) 糖类，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；
- (2) 淀粉，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉；
- (3) 纤维蛋白以及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维蛋白和醋酸纤维蛋白；
- (4) 粉末黄芪胶；
- (5) 麦芽；
- (6) 凝胶；
- (7) 滑石；
- (8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂；
- (9) 油类，例如花生油、棉花子油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和静脉注射用脂肪乳剂；
- (10) 乙二醇，例如丙二醇；
- (11) 多元醇，例如丙三醇、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；
- (12) 酯类，例如油酸乙酯；
- (13) 琼脂；
- (14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；
- (15) 藻酸；
- (16) 无热原水；
- (17) 等渗盐；
- (18) 林格 (Ringer) 溶液；
- (19) 乙醇；
- (20) 磷酸盐缓冲液；
- (21) 其它无毒性的可兼容的物质。

典型地，PAI-1 抑制剂复合物可以任何适合的给药途径给予受者。

本发明的方法中有效的配方可包括一种或多种 PAI-1 抑制剂、一种或多种药学上可接受的载体以及其它任选的治疗成分。此配方可以方便地在单位剂量中体现出来,也可以用任何药学领域的已知方法制备出来。可以与载体结合、制成单剂的活性成分的数量取决于受者状态和特定的给药模式。可以与载体结合而制备具有药学效果制剂的 PAI-1 抑制剂数量通常就是具有药学效果的 PAI-1 抑制剂数量。一般地, PAI-1 抑制剂的数量在 1%-99% 之间变动,最佳的是 5%-70%。

制备这种药物或复合物的方法包括将 PAI-1 抑制剂同药学上可以接受的一种或多种载体以及任选的一种或多种附属成分整合起来。一般而言,该药物就通过将 PAI-1 抑制剂均一地同液态载体或细分的固态载体或二者一起紧密结合起来,然后成形(如有必要)。

适合于口服给药的设计可以是胶囊剂、面囊剂、丸剂、片剂、糖剂(应用芳香成分,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒剂或是含水的或不含水的溶液或悬浮液,或是水包油或油包水乳液,或是酏剂或糖浆,或是锭剂(利用惰性成分,如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶),或是口腔洗剂,每一种药剂均含有预定量的 PAI-1 抑制剂作为活性成分。复合物也可以通过大丸剂、药糖剂或贴剂给药。

在用于口服给药的固体药剂(如胶囊、片、丸、糖衣丸、粉末、颗粒等)中, PAI-1 抑制剂可混有一种或多种药学上可接受的载体,如枸橼酸钠或磷酸二钙,和/或如下任何物质:(1) 填料或膨胀剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;

(3) 保湿剂, 如甘油; (4) 分解因子, 如琼脂、碳酸钙、马铃薯或树薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠; (5) 溶液阻滞剂, 如石蜡油; (6) 吸收加速剂, 如季胺组分; (7) 湿润剂, 例如乙醇和甘油单硬脂酸盐; (8) 吸收剂, 如高岭土和膨润土; (9) 润滑剂, 如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、聚乙二醇、十二烷基磺酸钠以及它们的混合物; (10) 着色因子。在胶囊剂、片剂、丸剂的情况下, 药物学成分也可包括缓冲剂。相似类型的固体成分可以用来作为软和硬明胶胶囊的填料, 如用乳糖、高分子量的聚乙二醇等。

片剂通过压缩或成形制成, 也可以带有一种或多种附属成分。压缩片可以利用粘合剂(如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(如淀粉羟乙酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂进行预配。成形片在一个适合的机器里将粉末状肽或肽类仿制物用惰性液体稀释剂弄湿后塑造而成。

片剂和其它固体形态如糖丸、胶囊、丸和颗粒也可以覆有外衣或外壳, 例如肠溶衣和其它已知的药物学性制备的外衣。为了提供缓慢的或受控的释放 PAI-1 抑制剂, 可以将他们进行特别制备, 例如, 为了产生期望的释放曲线, 可采用不同比例的羟丙基甲基纤维素、其它聚合体基质、脂质体和/或小球体。它们可通过如下方式灭菌: 通过细菌过滤器进行过滤, 或者以无菌固态混合物的形式加入灭菌剂, 其在使用前可以溶于灭菌水或其它无菌的可注射的介质中。这些复合物也可以任选包含某些遮光剂, 并且可以仅仅或主要在胃肠道的某部位释放 PAI-1 抑制剂, 此外, 还可以选择让其以延迟的方式进行释放。

可适用的包埋物质可以是聚合体物质和蜡类。PAI-1 抑制剂可以装入微胶囊内，如果合适的话，并加入一种或多种以上所述的赋形剂。

口服给药的液体形态包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了 PAI-1 抑制剂，液体形式也可以包括惰性稀释剂，例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，如普通酒精、异丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油（尤其是棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻的油）、甘油、四氢糠基乙醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸以及它们的混合物。除了惰性稀释剂，还可以包括佐剂，如湿润剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

除了 PAI-1 抑制剂，悬浮液可以包含悬浮因子如乙氧基化乙醇、聚氧乙烯山梨酯和山梨聚糖酯、微晶纤维素、膨润土、琼脂和黄芪胶以及它们的混合物。

直肠或阴道给药可以是栓剂，这可以通过将一种或多种 PAI-1 抑制剂同一种或多种适合的无刺激性的赋形剂或载体混合在一起而制备，这些载体包括可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐，制成的栓剂在室温下是固体，而在体温下就可以变成液体，因此，就可以在直肠或阴道中融化释放活性物质。适合于阴道给药的形式也可以包括子宫套、止血栓、乳膏、凝胶、泥膏剂、泡沫剂或喷雾剂。

PAI-1 抑制剂局部或经皮或表皮给药的形态包括粉剂、雾剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、药膏和吸入剂。在无菌条件下将活性成分与药物学载体和其它防腐剂、缓冲剂或推进剂相混合。除了 PAI-1 抑制

剂、药膏、贴剂、乳膏和凝胶，还包含一些赋形剂，如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维蛋白衍生物、聚乙二醇、硅树脂，膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或者它们的混合物。搽粉和喷雾剂除了含有 PAI-1 抑制剂还包括一些赋形剂，如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或者这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有惯常使用的推进剂，如氯氟烃和挥发性未取代的碳氢化合物，例如丁烷和丙烷。

PAI-1 抑制剂的复合物可以选择性的利用气雾剂给药。这可以通过制备含有 PAI-1 抑制剂的水性气溶胶、脂质体制剂或固体颗粒而实现。可以使用非水的（碳氟化合物推进剂）悬浮液。音波喷雾器也可以被使用。水性气溶胶是通过将水性溶液或悬浮液同传统上药物学上可接受的载体和稳定剂合在一起而形成。载体和稳定剂根据特定组分的需要而改变，但是特有的包括非离子型表面活性剂（吐温、聚醚、聚乙二醇）、无害的蛋白像血清白蛋白、山梨聚糖酯、蛋黄素、氨基酸如氨基乙酸、缓冲剂、盐、糖或糖乙醇。气雾剂通常是等渗溶液。

经皮的药膏可以用来释放 PAI-1 抑制剂复合物到正常疤痕。这种形式通过在适当的介质中溶解或分散相关药剂而得到。吸收增强剂可以用来提高物质的流出通过皮肤。这种流出的比例可以通过如下方式实现，提供一种可控制薄膜或在聚合物基质或凝胶中分散有效成分。

眼科产品如眼膏、粉末、溶液等，同样在本发明的范围之内。

适于胃肠外给药的形式包括 PAI-1 抑制剂与如下物质结合，即一种或多种药物学上可接受的无菌等渗水溶液或无水溶液、分散液、悬

浮液或乳浊液，或者是可以在使用前制成无菌注射液或分散液的粉末，它们可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、能形成与血液等渗的溶解物。

用于肠胃外给药的水性或非水性载体包括水、乙醇、多羟基化合物（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）及其适合的混合物、蔬菜油如橄榄油、可注射的有机酯如油酸乙酯。可通过以下方式保持合适的流性，例如，通过使用被覆物如卵磷脂以及通过应用表面活性剂，而在分散液中保持所需的颗粒大小。

适于胃肠外给药的形式也可以包括一些佐剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。抑制微生物可以通过含有不同抑菌剂和抑真菌剂的物质完成，例如氯代丁醇、苯酚山梨酸等。复合物也可以包括等渗物质，如糖、氯化钠等。另外延长注射物质的吸收可以通过含有阻滞吸收的内容物来完成，例如硬脂酸铝和明胶。

在某些情况下，为了延长 PAI-1 抑制剂的效应，希望通过皮下或肌肉注射的药物被缓慢吸收。这可通过应用水溶性较差的晶体或无定型物质的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又取决于晶体的大小和晶形。此外，延迟药物吸收还可以通过在油类媒介物中溶解或悬浮 PAI-1 抑制剂复合物来实现。

可注射的长效制剂由含有 PAI-1 抑制剂的微胶囊基质或可生物降解的多聚体如聚交酯-聚乙交酯构成。根据聚合物中 PAI-1 抑制剂的比率以及所使用的聚合物的特性，可以控制药物释放的速率。其它生物可降解的聚合物包括多聚（原酸酯）和多聚（甲酸酐）。长效可

注射制剂通过在脂质体或微乳剂中包容 PAI-1 抑制剂来制备。

在本发明的主要内容中, PAI-1 抑制剂复合物以治疗性有效剂量释放到创伤部位。这里所谓的治疗性有效剂量是指 PAI-1 抑制剂、PAI-1 抑制剂复合物或 PAI-1 抑制剂药物的量, 它可以有效产生预期的治疗效应, 或者通过减少创伤愈合过程中胶原的过度积累或表达而反映出来, 或者将异常状态的创伤愈合中的胶原累积水平降低到正常创伤愈合状态, 或者观察到在创伤部位正常疤痕形成过程中若不给予 PAI-1 抑制剂而有形成异常疤痕的倾向, 或者观察到异常疤痕的消散。依药理可知, 准确治疗剂量的 PAI-1 抑制剂在患者身上产生最大治疗效应还取决于如下因素, 如药物活性、特性、药物代谢动力学、药效学、PAI-1 抑制剂的生物利用度、受试者的生理状态 (包括种族、年龄、性别、体重、饮食、疾病类型及状态、一般生理状态、对药物治疗剂量的反应状况)、载体特性、给药途径及频率、创伤及正常疤痕形成的严重程度等等。无论如何, 以上提到的指导方针可以作为调节治疗的基础, 例如, 确定给药的最适宜的剂量, 这仅需一个常规试验, 包括监测受试者及调整剂量。请参考 *Remington : The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000)*。

以上概括描述了本发明, 下面通过实施例来更好地理解本发明。

实施例

材料和方法

细胞分离: 成纤维细胞来自于人的正常皮肤、疤痕和疤痕疙瘩, 采用

移植的方法。皮肤和疤痕收集方案由洛杉矶儿童医院和查里斯-诸医科大学认可。疤痕疙瘩凸起的核心区域被用来分离成纤维细胞。成纤维细胞在 DMEM (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) 中培养, 其中含有 100U/ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素, 以及 10% 胎牛血清 (Life Technologies, Inc.)。细胞在 5% CO₂ 和 95% 空气的增湿培养箱里培养。成纤维细胞用含有 0.05% 乙二胺四乙酸的 0.25% 胰蛋白酶的 Hank 溶液 (Life Technologies 公司) 里进行消化传代, 每周一次。实验所使用的为 2-10 代细胞。细胞传代定义为从原代培养进行每周扩增。本发明中使用的每一株成纤维细胞的来源都列在表 1 中。这些样品代表了 8 年的样品采集调查成果。本发明中的每一个实验均在正常和疤痕疙瘩的成纤维细胞的多株细胞之间进行比较, 而这些细胞株尽可能地在年龄和解剖部位上相匹配。

纤维蛋白凝胶的制备: 人纤维蛋白原 (Calbiochem, 圣迪戈, 加州) 被用来制备纤维蛋白凝胶。纤维蛋白原在蒸馏水中重建, 调整到 10mg/ml 并贮存在 -20℃。通过将 1-5 mg/ml 纤维蛋白原与 1-2U/ml 人凝血酶混合并在 37℃ 条件下孵育 30 分钟来测定纤维蛋白原的凝结能力。形成的凝块从试管壁上分离, 然后以 12,000 转/分的转速离心 15 分钟, 使凝块形成小颗粒并收集可溶性纤维蛋白原。保留在上清液中的可溶性非凝结性纤维蛋白原可通过 OD₂₈₀ 的蛋白浓度来确定。所用的纤维蛋白原的凝结性均为 95-98%。

纤维蛋白凝胶制备的方法已在以前的出版物中已经阐明, 如 *Tuan & Grinnell, Fibronectin and fibrinolysis are not required for*

fibrin gel contraction by human skin fibroblasts, J. Cell Physiol. 140: 577-583 (1989)。简单地说,就是在 24℃下,将 DMEM 培养液中人皮肤成纤维细胞加到纤维蛋白原溶液中。纤维蛋白原的最终浓度是 2.5mg/ml,而成纤维细胞是 0.5×10^6 个/ml。将等分的部分 (180 μ l) 成纤维细胞/纤维蛋白原同每个样品 1U 凝血酶加到 24 孔培养板 (Costar, Cambridge, MA) 中。每一等份在孔板中占据 16 mm 直径的区域。所得制剂在 5% CO₂、37℃、增湿培养箱里孵育 1 小时确保纤维蛋白聚合。在孵育期的末期,将含有 10% 胎牛血清的 1ml DMEM 加入每一个孔中覆盖凝胶。

用来研究 uPA 和 PAI-1 的样品首先用 DMEM 彻底洗涤 (5 次),然后在 DMEM 中另外孵育 24 小时。条件培养基用于纤维蛋白覆盖实验和逆向纤维蛋白覆盖实验。

胶原凝胶的制备: 胶原凝胶按 Tuan 等人描述的方法进行制备,见 Tuan 等, *Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels, J. Cell. Sci. 107: 2285-2289 (1994)*。在实验中被使用 Vitrogen (Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA), 一种主要的 I 型胶原制剂。简单地说,在 4℃胶原用 10×MEM (最少基本介质, Sigma 化学公司) 和 0.1N NaOH 调节至生理离子强度和 pH 值。最终胶原浓度为 1.5mg/ml。将成纤维细胞加入重建的胶原中,最终浓度为 0.5×10^6 个/ml。胶原/成纤维细胞悬浮液样品被分配到 24 孔培养板中。每孔 180 μ l 等份,然后培养板置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中 45 分钟使胶原聚合。

纤维蛋白和胶原混合物凝胶: 将纤维蛋白原和胶原按不同比例 (纤维蛋白: 胶原 100%: 0%、50%: 50%、0%: 100%) 混合, 制备凝胶。成纤维细胞以 0.5×10^6 个/ml 加到基质中。180 μ l 等份的凝胶-成纤维细胞混合物置于 24 孔培养板中, 每个样品加入 1U 凝血酶。

纤维蛋白覆盖和逆向覆盖实验: 简单地说, 就是用含 0.1% 十二烷基磺酸钠 (SDS, Sigma) 的 10% 聚丙烯酰胺凝胶将 25 μ l 无血清的条件培养基样品进行电泳。室温下用 2.5% Triton X-100 洗涤凝胶 1 小时, 除去 SDS。凝胶在蒸馏水中短暂冲洗后, 置于指示剂凝胶层 (用于纤维蛋白溶酶原活化剂 (PA) 检测的纤维蛋白覆盖实验) 中, 其含有 1% 低温凝胶琼脂糖、人纤维蛋白溶酶原 (9 μ g/ml, Sigma, St. Louis, Mo)、凝血酶 (0.7 U/ml, Sigma) 和纤维蛋白原 (2mg/ml)。为了检测 PAI, SDS-聚丙烯酰胺凝胶室温下用 2.5% Triton X-100 洗涤 1 小时, 然后同加入的 uPA (0.2 U/ml, Sigma) 置于基质凝胶上部 (类似于前面的指示剂凝胶) (逆向纤维蛋白覆盖实验)。所得制剂都置于 37°C 增湿容器中。PA 活性以透明的条带出现在不透明的纤维蛋白指示剂层中表明纤维蛋白溶解。PAI 活性以不透明的条带出现在透明的逆向覆盖底物层表明纤维蛋白溶解的受抑。结果进行拍照。

色原基质分析: 采用两级间接酶分析 (Spectrolyse (pL) PAI (American Diagnostica #101201)) 定量测定血浆中 PAI-1 的活性。在第一阶段, 定量的组织血纤维蛋白溶酶原活化剂 (tPA) 被加到样品中, 并与 PAI-1 反应。然后将样品酸化, 破坏 α -2-抗血纤维连接素和其他潜在的纤维连接素抑制剂, 这些物质能够干扰 tPA 实验。在

第二阶段, 通过将样品加到谷氨酸纤维蛋白溶酶原、多聚 D-赖氨酸和色原基质的中性混合物中, 测量残留的 tPA 活性。残留的 tPA 活性催化纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶, 随之纤维蛋白溶酶水解色原基质。显色数量与样品中 tPA 活性是成比例的。其中, 多聚 D-赖氨酸是 tPA 催化纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶的刺激物。样品中的 PAI 含量可以以加入的 tPA 和回收的 tPA 数量差来表示。1U PAI 活性 (U) 由抑制 1 IU 人单链 tPA 的 PAI 量来确定, 并以 NIBSAC 发布的 tPA lot86/670 的国际标准进行校准。

胶原合成、纯化和表型分析: [³H]脯氨酸用来标记成纤维细胞新合成的胶原。3 份样品在含有 β -aminopropionitrile (62.5 μ g/ml), 10 % FCS 的 DMEM 中用 L-(5-[³H]脯氨酸) (50 μ Ci/ml) (Amersham, Arlington Heights, IL) 标记 48 小时。在标记末期, 所有样品调整为含 0.5M 乙酸, 并在 4°C 用 1mg/ml 胃蛋白酶 (PM grade, Worthington, Freehold, NJ) 处理 24 小时, 以消化蛋白而不是完整的胶原。通过加入 50mM Tris 并滴定到 pH7.4, 来抑制胃蛋白酶活性。胶原依次通过中性盐和酸性盐沉淀来纯化 (Tuan 等, *In vitro fibroplasia : matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels, Exp. Cell. Res. 223: 127-134 (1996)*)。最终胶原颗粒在 50 mM Tris 和 40 % 乙醇中清洗并用 0.5M 乙酸溶解。样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳然后荧光摄像。用来进行细胞计数的样品用胰蛋白酶和胶原酶处理, 活细胞数目在台盼蓝溶液中用血细胞计数仪来计数。纯化的胶原以 cpm/cell 表示。所示的数

据为三个样品的平均值。各组之间和每组之内的统计学差异用单因素方差分析进行研究。

RNA 印迹: 应用标准的 RNA 印迹分析来研究 RNA 表达 (Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989))。用硫氰酸胍来提取 RNA 样品, 并通过氯化铯离心分离样品。总 RNA (20 μ g/泳道) 通过电泳分离, 转移到尼龙过滤器上, 真空下 80℃ 烘烤 2 小时。预杂交后, 在 40℃ 下将放射物标记的 DNA 探针杂交 20 小时, 洗涤, 在 -70℃ x-射线下可见。cDNA 探针标记法参照 Feinberg 和 Vogelstein: *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Addendum, Anal. Biochem.* 137: 266-267 (1984)。每一细胞株的所有样品均用 β -肌动蛋白的表达水平进行标准化。采用特异性人 cDNA 探针作为 uPA 核苷酸 623-1039 和 PAI-1 cDNA (全长) 的杂交探针 (Laug 等, *Complex expression of the genes coding for plasminogen activators and their inhibitors in HeLa-smooth muscle cell hybrids, Cell Growth Differ.* 3: 191-197 (1992))。

免疫组织化学: 新鲜收集的皮肤和疤痕样品在冰冻的 PBS 中清洗并在 4℃ 的 4% 福尔马林 (Sigma, pH7.5) 中固定 24 小时。在脱水之前, 样品用 70% 乙醇处理 24 小时。脱水后, 样品包埋在石蜡 (60℃) 中, 并用切片机按 5 μ m 厚度进行切片。切片再次脱水并用 H_2O_2 进行处理。为了将非特异性结合降低到最小, 切片首先在室温下用 1.5% BSA/PBS 处理 30 分钟。1:50 的鼠抗人 uPA 单克隆抗体 (#3698 和 #394, American

Diagnostica Inc, Greenwich, CT) 和 1: 25 的鼠抗人 PAI-1 单克隆抗体 (#3785, American Diagnostica Inc.) 被分别用来检测 uPA 和 PAI-1。一抗处理后, 切片用 PBS 洗涤三次, 然后同辣根过氧化物酶共轭的二抗 (Amersham Pharmacia Biotech Limited, Buckinghamshire, England) 一起孵育 50 分钟。用 PBS 彻底清洗后, 切片用 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB, Sigma) 处理来暴露抗原-抗体反应部位。为使细胞核染色, 切片用苏木精进行轻微染色。

结果

疤痕疙瘩成纤维细胞中 PAI-1 表达升高

在培养时疤痕疙瘩呈现出增高的 PAI-1 表达 (Tuan 等, *Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts, J. Invest. Dermatol.* 106: 1007-1011 (1996)。为了检测是否在体内也出现 PAI-1 的过度表达, 在疤痕疙瘩损伤 (n = 5) 中, 利用免疫组织化学中对抗 PAI-1 或 uPA 的抗体研究 PAI-1 和 uPA 的蛋白表达。结果同正常皮肤 (n = 3) 和正常疤痕 (n = 3) 进行比较。疤痕疙瘩的特征是在真皮层中具有过量的胶原沉积, 因此本研究也包括疤痕疙瘩损伤的皮肤深层区域 (图 1, Keloid Deep Dennis: j、k 和 l)。在真皮层中, 除了胶原, 成纤维细胞和不同粗细的血管是主要的可见物 (图 1)。在正常皮肤中, PAI-1 和 uPA 染色位于血管处 (图 1b 和 1c)。在正常疤痕和疤痕疙瘩中, 尽管血管和成纤维细胞均对 PAI-1 和 uPA 染色阳性, 然而染色强度完全不同。疤痕疙瘩成纤维细胞的 PAI-1 染色强度大大强于正常疤

痕成纤维细胞的 (图 1h 和 1k 对照 1e); 而正常疤痕成纤维细胞 uPA 染色强度则强于疤痕疙瘩成纤维细胞 (图 1f 对照 1i 和 1L)。5 个疤痕疙瘩样品有 4 个 (80%) 可观察到高水平 PAI-1 染色。上皮层 uPA 和 PAI-1 同样染色阳性 (图 1 “*”), 并且疤痕疙瘩上皮层显示了较正常皮肤或正常疤痕强的 PAI-1 染色 (图 1h 对照 1e 和 1b)。疤痕疙瘩和正常皮肤来源于非裔美国人患者, 他们上皮基底层黑色素细胞在免疫组织化学中呈现黑褐色。所有对照组染色均为阴性 (图 1 中对照: a、d、g 和 j)。

为了确定是否 PAI-1 在 mRNA 水平也会出现过度表达, 从正常皮肤、正常疤痕以及疤痕疙瘩样品分离出皮肤成纤维细胞, 并用 RNA 印迹技术进行分析。结果表明 PAI-1 有两个 RNA 信使, 分别在 3.0kb 和 2.2kb (图 2)。疤痕疙瘩成纤维细胞 2.2kb PAI-1 mRNA 高于正常皮肤和正常疤痕的成纤维细胞。因此, 不管是在体内还是在体外, PAI-1 过度表达是疤痕疙瘩成纤维细胞的固有特征。

在长期的纤维蛋白凝胶培养中疤痕疙瘩成纤维细胞表现出较高的胶原积累, 并总保持较高的 PAI-1 活性。

为了检测是否疤痕疙瘩成纤维细胞中的 PAI-1 过度表达与胶原过度产生具有相关性, 应用体外纤维组织形成模型, 对 PA/PAI 和胶原产物进行为期两周的研究 (Tuan 等, *In vitro fibroplasias : matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels*, *Exp. Cell Res.* 223: 127-134 (1996))。每次实验检测一个疤痕疙瘩的和一个正常的成纤维细胞株,

总共至少分别检测 6 个。

所有成纤维细胞产生的胶原按前述方法进行纯化。在纤维蛋白凝胶中，疤痕疙瘩成纤维细胞以类似于正常成纤维细胞的速度生长。尽管可以检测到少量 III 型和 V 型胶原，但是在疤痕疙瘩和正常成纤维细胞产生的胶原中 I 型胶原（ $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ ）占主导地位。典型的实验结果如图 3 所示。总胶原数量用细胞数量进行归一处理，并用 cpm/细胞表示。在为期两周的研究中，每一种细胞类型不同细胞株中，胶原累积的一般模式具有高度重复性。对于正常成纤维细胞，前 10 天胶原积累是逐渐增长，大约 10-15 天达到高峰，并且在培养后期（第 16 天）降低（图 3，正常）。另一方面，疤痕疙瘩成纤维细胞显示出相似的增长速度，但是维持的水平总比正常成纤维细胞高 2-3 倍（图 3，疤痕疙瘩）。高于正常成纤维细胞胶原水平意味着胶原的过度积累。所有胶原数量与细胞数进行标准化，并按 cpm/cell 进行表达。

为了检测 uPA 和 PAI 以及它们的活性，在指定时间从培养中收集条件介质并用于纤维蛋白覆盖实验和逆向纤维蛋白覆盖实验，在正常和疤痕疙瘩成纤维细胞中每一种至少有 4 个细胞株被检测。典型实验结果见图 4。纤维蛋白覆盖实验揭示了正常成纤维细胞可以表达双链（50kD）和单链（30kD）uPA（图 4，正常：面板上部）。在培养早期（3-5 天）可表达 50 kD uPA，并且在培养后期（12 天后）又重新出现。而大部分培养期均以低水平表达 30 kD uPA，只在更后的培养期增高至高水平表达（图 4，正常：面板上部）。与之相反，疤痕疙瘩呈现中等水平的 30 kD uPA，并且仅仅出现在培养后期（图 4，

疤痕疙瘩：面板上部）

逆向纤维蛋白覆盖实验显示正常成纤维细胞表达的 PAI-1 为可变的活性水平(图 4, 正常：面板下部), 而疤痕疙瘩成纤维细胞在整个培养期恒定表达高水平(图 4, 疤痕疙瘩：面板下部)。

也用色原基质法(American Diagnostica)测定 PAI-1 活性。实验中, 疤痕疙瘩成纤维细胞的 PAI-1 活性水平是正常成纤维细胞的 2-3 倍(K: N, 45: 10; 80: 45; 40: 16 IU/ml, 来自于 3 个独立的测量)。正常和疙瘩成纤维细胞培养中均可以检测到少量 uPA/PAI-1 复合物(图 4, 面板上部: uPA/PAI-1 复合物)。这种复合物在原位置无催化活性, 它的纤维蛋白溶解活性归因于 SDS-PAGE 过程中 SDS 处理的人工产物 (*Granelli-Piperno & Reich, A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids, J. Exp. Med.* 148: 223-234 (1978))。

在供者和解剖部位相符的一对样品中, N86 和 K86, 对 uPA 和 PAI 的活性进行了检测。结果如图 5 所示。当与其他正常成纤维细胞比较时, 除了在时间和表达水平上有轻微差异外, N86 呈现出与之相类似的 uPA 表达模式(图 5, N86: 上部面板)。而在 PAI-1 表达方面则是有差异的, 在培养的前半期呈现高水平表达, 而在后半期则消失(图 5, N86, 下部面板)。K86 的 uPA 和 PAI-1 表达模式与其他疤痕疙瘩成纤维细胞极为相似, 即在第 11 天 30 kD uPA 以中等量出现, 而 PAI-1 在整个培养期过度表达(图 5, K86)。uPA/PAI-1 复合物(-110 kD)的存在表明疤痕疙瘩成纤维细胞分泌的 uPA 很大程度上受 PAI-1 限

制。因此，在纤维蛋白凝胶长期培养时，虽然正常成纤维细胞显示有控制的 uPA 和 PAI 表达，但是疤痕疙瘩成纤维细胞呈现一个低水平的 uPA 和恒定的高水平的 PAI-1，并且疤痕疙瘩成纤维细胞 PAI-1 的过度表达与提高的胶原累积具有相关性。

高 PAI - 1 活性是疤痕疙瘩成纤维细胞胶原累积提高的原因。

纤维蛋白基质中的成纤维细胞可活跃地识别基质并产生胶原代替纤维蛋白 (Tuan 等, *In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels*, *Exp. Cell Res.* 223: 127-134 (1996))。为了确认纤维蛋白凝胶中的 uPA 或 PAI-1 的表达模式受细胞外基质 (ECM) 环境改变 (例如从纤维蛋白到胶原) 的影响，在体外纤维组织形成过程中，纤维蛋白、纤维蛋白-胶原或胶原凝胶用于细胞培养来模拟早期、中期或晚期基质表型。结果显示，在胶原 (纤维蛋白-胶原和胶原凝胶) 条件下，正常成纤维细胞的 uPA 表达从 50kD 双链形态转换为 50kD 和 30kD 形态 (图 6，正常，面板上部)。有趣的是，当凝胶基质中胶原浓度从 50% 增为 100% 时，PAI-1 表达水平降低 (图 6，正常，面板下部)。疤痕疙瘩成纤维细胞通过表达 30kD uPA 对基质中的胶原作出反应；然而，在 PAI-1 水平却无显著变化 (图 6，疤痕疙瘩)。因此，正常成纤维细胞 uPA 和 PAI-1 的表达均受 ECM 调节，而疤痕疙瘩成纤维细胞仅有 uPA 的表达受 ECM 调控。纤维蛋白、胶原或纤维蛋白-胶原混合凝胶培养中的细胞生长无差异，因此，PAI-1 的过度表达是疤痕疙瘩成纤维细胞固有的特性，与 ECM 中胶原水平无关。

正常或疤痕疙瘩成纤维细胞中的胶原累积同样在纤维蛋白和胶原凝胶培养中进行研究和比较。结果表明正常成纤维细胞胶原累积水平在纤维蛋白和胶原凝胶中相似（图 7，正常）。相反，当疤痕疙瘩成纤维细胞在胶原凝胶中培养时，在纤维蛋白凝胶中观察到的高水平胶原累积通常降低到与正常成纤维细胞具可比性的水平（图 7，疤痕疙瘩）。当在纤维蛋白-胶原凝胶中培养时观察到疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原积累同样减少。相似的数据在另外两个疤痕疙瘩成纤维细胞株中得到。这些结果表明高 PAI-1 活性在提升疤痕疙瘩成纤维细胞胶原累积方面是必需的，因为在胶原或纤维蛋白-胶原混合凝胶中培养的疤痕疙瘩成纤维细胞 uPA 活性的提高可以降低疤痕疙瘩成纤维细胞胶原的累积。

为了进一步验证是否高 PAI-1 活性可以提高胶原累积，在 PAI-1 中和抗体存在条件下，对培养在纤维蛋白凝胶中的疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原累积进行研究。根据制造商的说明，抗体（兔抗-PAI-1 抗体，#395R，American Diagnostica）可以同所有形式的人 PAI-1 反应。在 50% 抑制点，1mg 这种抗体可以抑制 1000IU PAI-1。结果表明抗-PAI-1 抗体降低 PAI-1 活性（图 8，插入）和减少疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原累积（图 8，“纤维蛋白凝胶 + 抗-PAI-1 中的疤痕疙瘩”），而不是非免疫 IgG。另外有两个疤痕疙瘩成纤维细胞株也用来验证抗-PAI-1 中和抗体对胶原累积的作用。作为对照，同一时间对在纤维蛋白凝胶中培养的正常成纤维细胞或在胶原凝胶中培养的疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原累积情况也进行了研究（图 8，“纤维蛋白

凝胶中的正常疤痕”和“胶原凝胶中的疤痕疙瘩”)。

讨论

本发明中的实施例证明了不管是在体内还是在体外，PAI-1 的过度表达是疤痕疙瘩成纤维细胞的固有特性。在纤维蛋白凝胶中长期培养，正常成纤维细胞呈现出有调控的 uPA 和 PAI-1 水平，同胶原累积一样；而疤痕疙瘩成纤维细胞则呈现出恒定的高水平的 PAI-1 和胶原累积。能够降低 PAI-1 活性的条件下可以破坏疤痕疙瘩成纤维细胞胶原累积的提高。这些条件包括胶原或纤维蛋白-胶原凝胶中培养的成纤维细胞增加 uPA，或通过将 PAI-1 中和抗体加到纤维蛋白凝胶中培养的成纤维细胞中来降低 PAI-1 活性，或者本发明中描述的其他方法。因此，疤痕疙瘩成纤维细胞 PAI-1 活性的增加可以解释在纤维蛋白凝胶培养时胶原积累的增高。

纤维组织形成是一个动态的过程，该过程中，参与的细胞、ECM 和可溶解介体(mediator)之间持续发生相互作用并反馈整合(*Clark, Wound Repair: Overview and General Considerations, The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, pp. 22-32 (Edited by Clark RA. New York, Plenum Press, 1996)*)。前面已经显示，正常皮肤成纤维细胞可以识别纤维蛋白基质以及将其重塑为含有胶原的疤痕类组织(*Tuan 等, In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels, Exp. Cell Res. 223: 127-134 (1996)*)。本发明的实施例有证据表明，如同正常的成纤维细胞可以

合成胶原并将其沉积入纤维蛋白基质一样, uPA 和 PAI-1 的活性水平也可以进行调控 (图 4 和 5)。这种在 uPA 和 PAI-1 表达中 ECM 介导的改变可以在随后利用纤维蛋白、纤维蛋白-胶原混合物或胶原凝胶的实验中得到证实 (图 6)。整合素是调整成纤维细胞和 ECM 之间相互关系的最可能的候选者, 因为在细胞表型中与 ECM 衔接或脱离的整合素可以调节整合素物种特异性变化 (Xu & Clark, *Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins*, *J. Cell Biol.* 132: 239-249 (1996))。进一步的证据可以通过研究胶原凝胶得到。在胶原凝胶中, $\alpha_2\beta_1$ 整合素结合到胶原上可以提高细胞存活及 ECM 产量; 相反, 中断 $\alpha_2\beta_1$ 结合到胶原上可以诱导 MMP2 生产/活性, 因此, 基质降解 (Ellerbroek 等, *Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity*, *J. Biol. Chem.* 276: 24833-24842 (2001))。成纤维细胞可以利用含有 α_v 亚单位的整合素结合到纤维蛋白上 (Gailit 等, *Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha (v) beta3*, *Exp. Cell Res.* 232: 118-126 (1997))。然而, 当前研究并不能排除纤维连接素可能与成纤维细胞通过 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合到纤维蛋白凝胶基质上有关, 见 Clark 的 *Wound Repair: Overview and General Considerations*, *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, pp. 22-32 (Edited by Clark RA. New York, Plenum Press, 1996), 因为其研究中使用的纤维蛋白原包含痕量纤维连接素 (< 0.1 g/mg 纤维蛋白原), 同时在胶原合成

中才用了 10% FCS (含有纤维连接素)。因此, 纤维蛋白和胶原凝胶中 uPA 和 PAI-1 表达的差异可能通过 α_v 整合素或 $\alpha_5\beta_1$ 结合到纤维蛋白/纤维连接素和/或 $\alpha_2\beta_1$ 结合到胶原的差异来介导。

PAI-1 活性提高已经成为组织和器官纤维化的一个特点。有证据表明在炎性肺损伤后 PAI-1 表达的遗传决定水平与胶原累积程度存在直接关系。在转基因小鼠中对博来霉素诱导的肺纤维化的研究支持这点 (Eitzman 等, *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene*, *J. Clin. Invest.* 97: 232-237 (1996))。这些研究基于如下基本原理, 即过高的 PAI-1 活性导致纤维蛋白积累, 而这在肺部修复中产生成纤维效应。纤维蛋白是纤维蛋白溶酶最好的培养基, 并且其分解产物是趋化的炎症细胞。

(Clark, *Wound Repair: Overview and General Considerations*, 同上)。因此, 组织损伤部位纤维蛋白的积累是组织纤维化的原因。此外, 正常与疤痕疙瘩的成纤维细胞中 uPA: PAI-1 比率的差异在纤维基质降解程度上可反应出来, 而一个短期的检测显示正常成纤维细胞引起纤维基质降解, 但是疤痕疙瘩的成纤维细胞却不会 (Tuan 等, *Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts*, *J. Invests Dermatol.* 106: 1007-1011 (1996))。另外, 用 TGF- β 处理正常的成纤维细胞可以阻止纤维降解, 而 TGF- β 是 PAI-1 的潜在诱导者 (Keski-Oja 等, *Regulation of mRNAs for type-1*

plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type I procollagen by transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblasts and carcinoma cells, J. Biol. Chem. 263: 3111- 3115 (1988))。临床观察已经揭示在疤痕疙瘩形成前, 受影响的区域先发生一个延长的炎症反应。此外, 大多疤痕疙瘩有三个独特的区域: 红斑的外边缘 (扩增/生长区)、内部非红斑突起的边界 (传统疤痕疙瘩) 以及中央回归区。由于纤维蛋白与炎症有关, 可以相信疤痕疙瘩损伤处尤其是外边缘处, 含有更多的纤维蛋白累积。

虽然如此, 纤维蛋白作为纤维化的原因的观点最近在肺部损伤修复的研究中受到挑战。在缺乏纤维蛋白原 α 或 γ 链以及循环中无完整的纤维蛋白原的突变小鼠中, 用博来霉素处理后的肺纤维化程度与野生型小鼠相当 (Wilberding 等, *Development of pulmonary fibrosis in fibrinogen-deficient mice, Ann. N. Y. Acad. Sci. 936: 542-548 (2001)*)。这些研究表明虽然纤维蛋白可以促进纤维化, 但是并不能说明是纤维化的首要因素。根据本发明的实施例, 通过将 PAI-1 中和抗体加入到纤维蛋白培养基中, 或者通过在纤维蛋白-胶原或胶原凝胶中 (这可以减少 uPA 表达) 培养细胞, 疤痕疙瘩成纤维细胞中的胶原积累减少, 这强力暗示 PAI-1 的过度表达是疤痕疙瘩纤维化中过度胶原累积的关键, 而不是纤维蛋白。在无纤维蛋白的情况下, 疤痕疙瘩成纤维细胞培养的表层发现了 PAI-1 过度表达 (图 2) (Tuan 等, *Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts,*

J. Invests Dermatol. 106: 1007-1011 (1996) ; Higgins 等 ,
Differential regulation of PAI-1 gene expression in human fibroblasts predisposed to a fibrotic phenotype, Exp. Cell Res. 248: 634-642 (1999)) 和胶原过度产生 (Uitto 等 , *Altered steady-state ratio of type VIII procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts, Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 5935-5939 (1985)), 这进一步支持了 PAI-1 与疤痕疙瘩纤维化有关。

值得注意的是,本发明实施例中利用胃蛋白酶进行的胶原纯化程序只回收了完整的胶原,反应了胶原的累积(*Epstein, Alpha-3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life, J. Biol. Chem.* 249: 3225-3231 (1974))。因为胶原产物可以通过间质金属蛋白酶 (MMP) 家族中的蛋白水解酶进行翻译后调节 (*Rosert & Crombrughe, Structure, Synthesis, and, Regulation of Type I Collagen. Principles of Bone Biology, San Diego Academic Press, pp. 127-142 (1996)*), 因此,在胶原或纤维蛋白-胶原凝胶中疤痕疙瘩成纤维细胞的胶原累积减少,很可能是由于由纤维蛋白溶酶介导的 MMP 活性引起的胶原降解(图 9 是关于此路径的概述)。此外,也可能与整合素调节机制有关,因为 PAI-1 除了作用于细胞生长和凋亡,还可以通过结合到 uPA 和玻基结合素上而调节整合素介导的细胞粘连和迁移 (*Stefansson & Lawrence, The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha*

V beta 3 binding to vitronectin, Nature 383 : 441-443 (1996)).

因此,在前面所提到的条件下,疤痕疙瘩成纤维细胞的 uPA: PAI-1 比率改变可以影响疤痕疙瘩成纤维细胞结合到凝胶基质,并随后改变成纤维细胞分化和胶原合成的状态 (*Ellerbroek 等, Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity, J. Biol. Chem. 276: 24833-24842 (2001); Streuli, Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation, Curr. Opin. Cell Biol. 11 : 634-640 (1999)).* 这些观点可以通过使用体外纤维组织形成模型进行进一步的验证。

当正常成纤维细胞在胶原凝胶中培养时,值得注意的是,在 uPA 水平增高和 PAI-1 水平降低的情况下,胶原累积水平不发生变化 (图 6 和图 7)。这可能是由于在凝胶成纤维细胞收缩过程中在基质形成的等比例张力所造成。先前已经表明作为细胞-基质相互作用的结果,ECM 基质中的等比例张力可以用来描述细胞的变化状态 (*Nakagawa 等, Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness, Exp. Cell Res. 182: 572-582 (1989)).* 因此,脱离组织培养盘的胶原凝胶中的成纤维细胞可以在相关的少量张力下收缩胶原基质,并产生极少量胶原。相反,在附着的胶原凝胶中的成纤维细胞收缩基质并产生不断增加的张力时,则保持基底的胶原合成 (*Nakagawa 等, 同上*)。本发明实施例中,纤维蛋白和胶原凝集均附着在培养盘上,因此,没有观察到胶原累积有何差别。

疤痕疙瘩上皮也显示了较正常皮肤和正常疤痕更强的 PAI-I 表达 (图 1)。这也可能具有某些临床意义, 因为成人角质细胞通常不表达 PAI-1。它的表达伴有上皮迁移, 并且仅仅在创伤修复时出现 (Li 等, *Targeted inhibition of wound-induced PAI-1 expression alters migration and differentiation in human epidermal keratinocytes, Exp. Cell. Res.* 258: 245-253 (2000))。其它丝氨酸或 MMP 蛋白酶抑制剂如 α -1 抗胰蛋白酶、 α -2 巨球蛋白和组织 α -球蛋白同样可以在疤痕疙瘩损伤中检测到 (Diegelmann 等, *Tissue alpha-globulins in keloid formation, Plast. Reconstr. Surg.* 59: 418-423 (1977))。这些蛋白对疤痕疙瘩纤维形成的作用可以在将来利用体外模型进行验证。最后, 利用三维的基质凝胶系统, 本发明实施例证明, PAI-1 的过度表达与胶原累积的增加有关。当 PAI-1 活性被抑制或减少, 非正常的胶原累积就会停止, 因此, 二者之间存在因果关系。图 9 是一原理框图, 其描述了在疤痕疙瘩纤维化中的一些重大发现, 以及它们与组织损伤修复中的一些关键因素或成分。

本发明所引用的论文和专利全部用来作为参考文献。可以理解, 在说明本发明的优选实施方式时, 所有的相关描述、特定的实施例以及数据, 只是为了阐述本发明的内容, 而不是对本发明的限制。对于本领域的熟练人员, 可以根据此处所公开的内容, 轻而易举对本发明进行相应的改变和改进。因此, 权利要求的保护范围不应局限于此处的描述。

表 1: 研究中使用的正常皮肤、疤痕和疤痕疙瘩的成纤维细胞

类型	细胞株	种族背景	性别	年龄	解剖部位
正常皮肤	N65	拉丁裔人	M	8	耳
正常皮肤	N77	非裔美国人	M	4	耳
正常皮肤	N86	非裔美国人	M	28	耳
正常皮肤	N123	高加索人	F	23	NK*
正常皮肤	N127	伊朗人	M	33	耳后
正常皮肤	N141	高加索人	M	新生儿	包皮
正常皮肤	N143	高加索人	M	新生儿	包皮
正常皮肤	N144	高加索人	M	新生儿	包皮
正常疤痕	K7N	非裔美国人	NK*	NK*	NK*
正常疤痕	NSC14	拉丁裔人	F	25	肘
正常疤痕	NS70	高加索人	M	8	足
正常皮肤	NS75	非裔美国人	M	4	颊
疤痕疙瘩	K9	非裔美国人	F	NK*	耳叶
疤痕疙瘩	K10	非裔美国人	F	NK*	胁腹
疤痕疙瘩	K74	非裔美国人	M	28	耳垂
疤痕疙瘩	K76	非裔美国人	M	4	耳
疤痕疙瘩	K80	拉丁裔人	M	5	上阴
疤痕疙瘩	K86	非裔美国人	M	28	耳
疤痕疙瘩	K109	非裔美国人	M	14	耳
疤痕疙瘩	K134	亚裔人	F	6	胸
疤痕疙瘩	K135	拉丁裔人	F	6	手指
疤痕疙瘩	K139	非裔美国人	F	47	耳
疤痕疙瘩	K142	非裔美国人	F	7	胸骨区
疤痕疙瘩	K147	非裔美国人	M	18	耳
疤痕疙瘩	K148	非裔美国人	M	14	耳
疤痕疙瘩	K150c	非裔美国人	F	23	胸
疤痕疙瘩	K165	拉丁裔人	M	5	耳

*NK=不知道

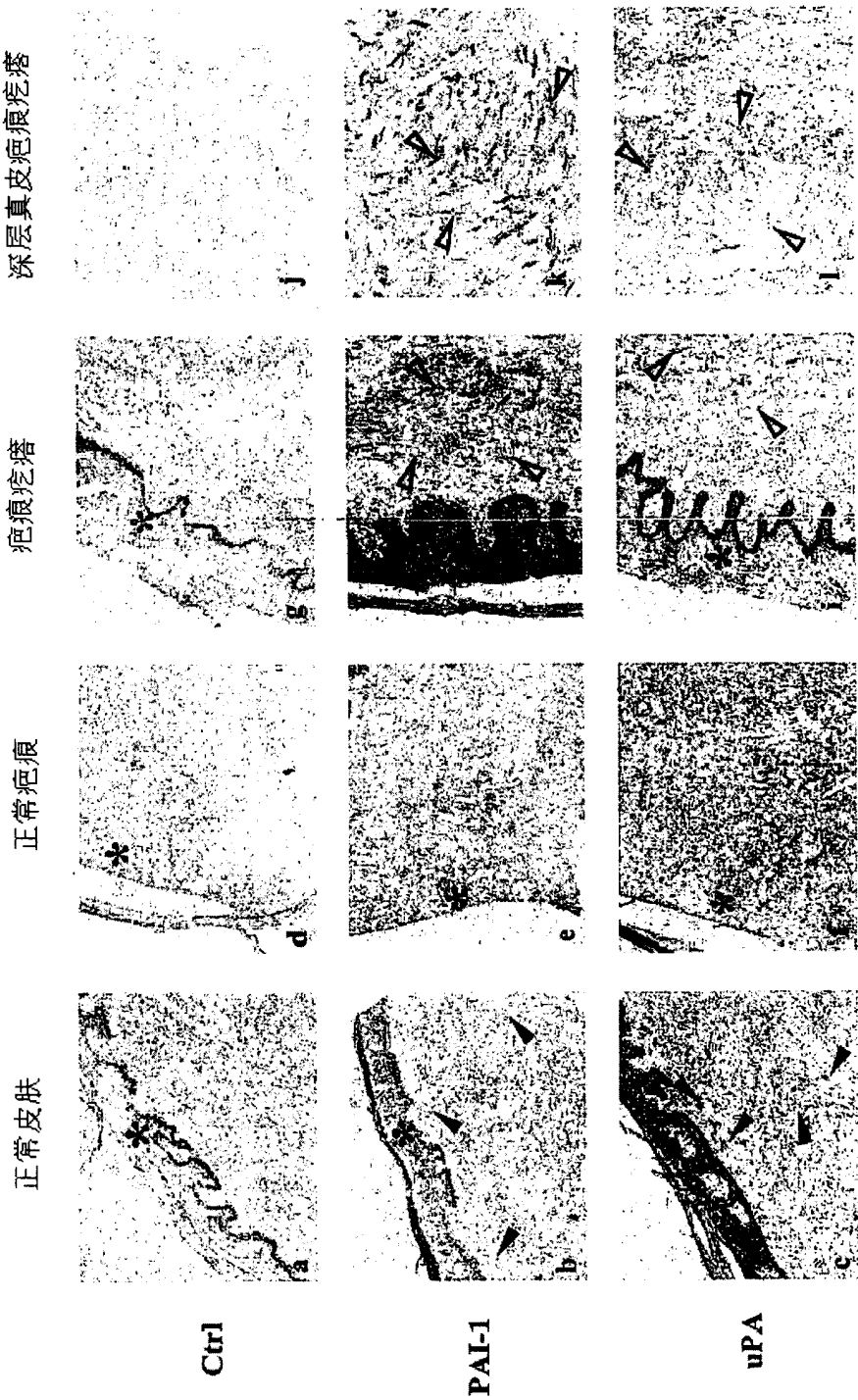


图 1

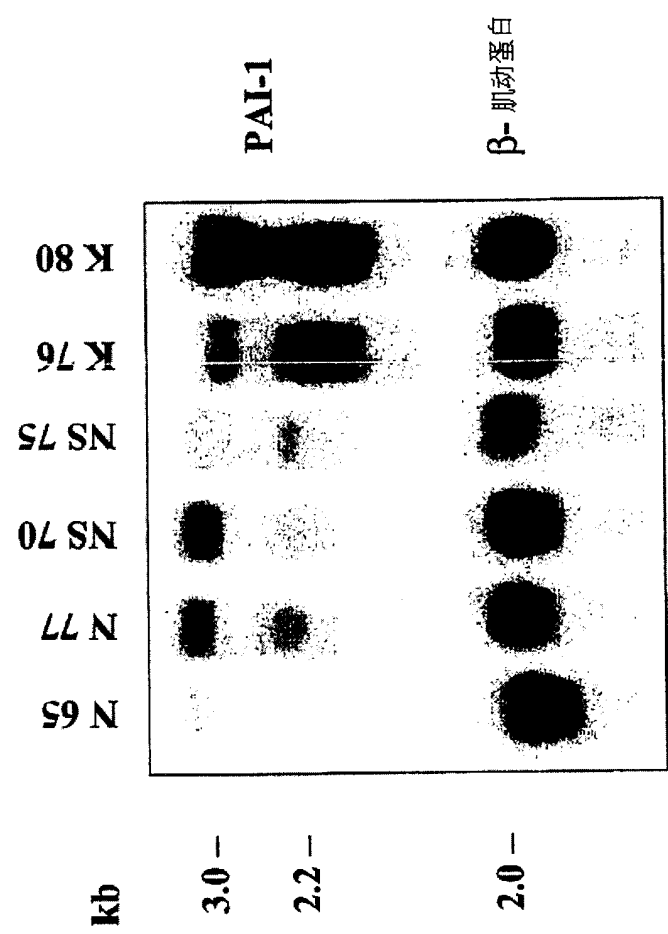


图 2

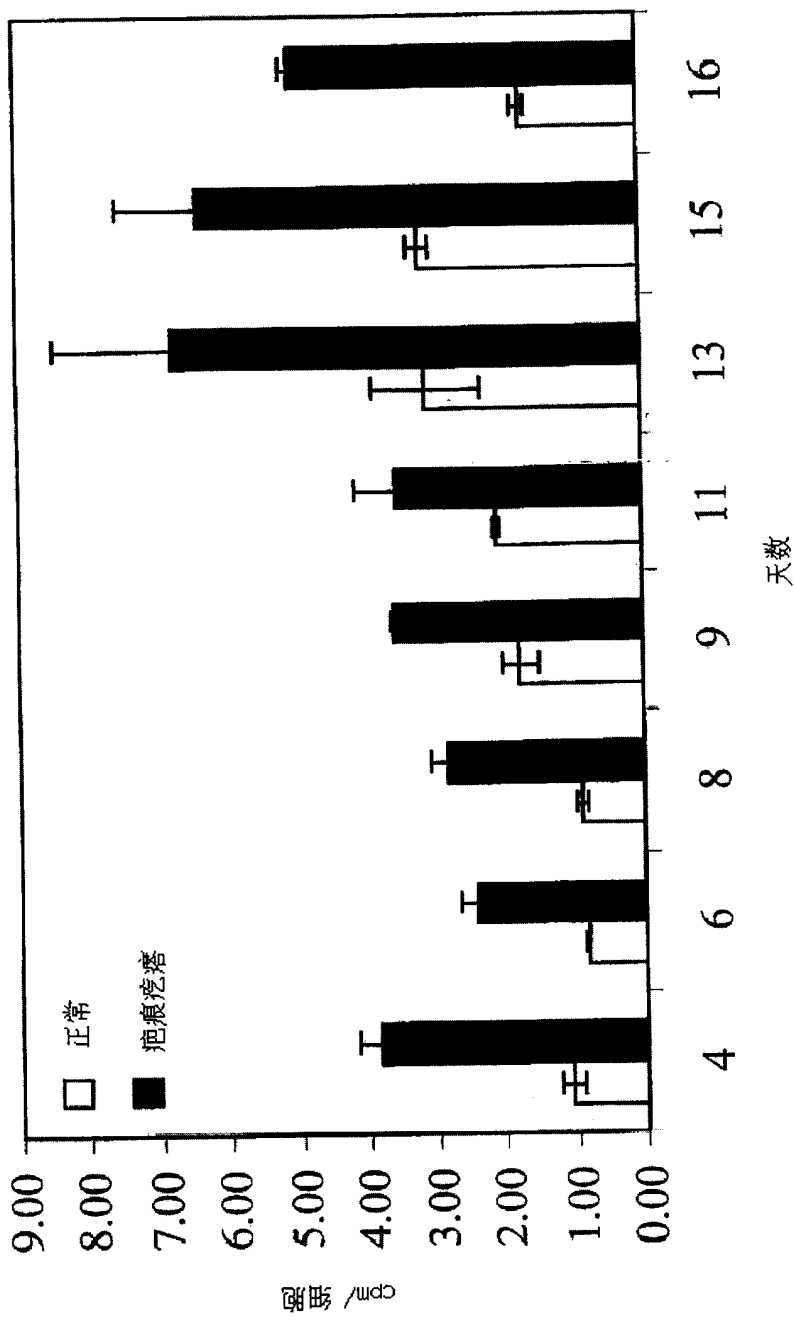


图 3

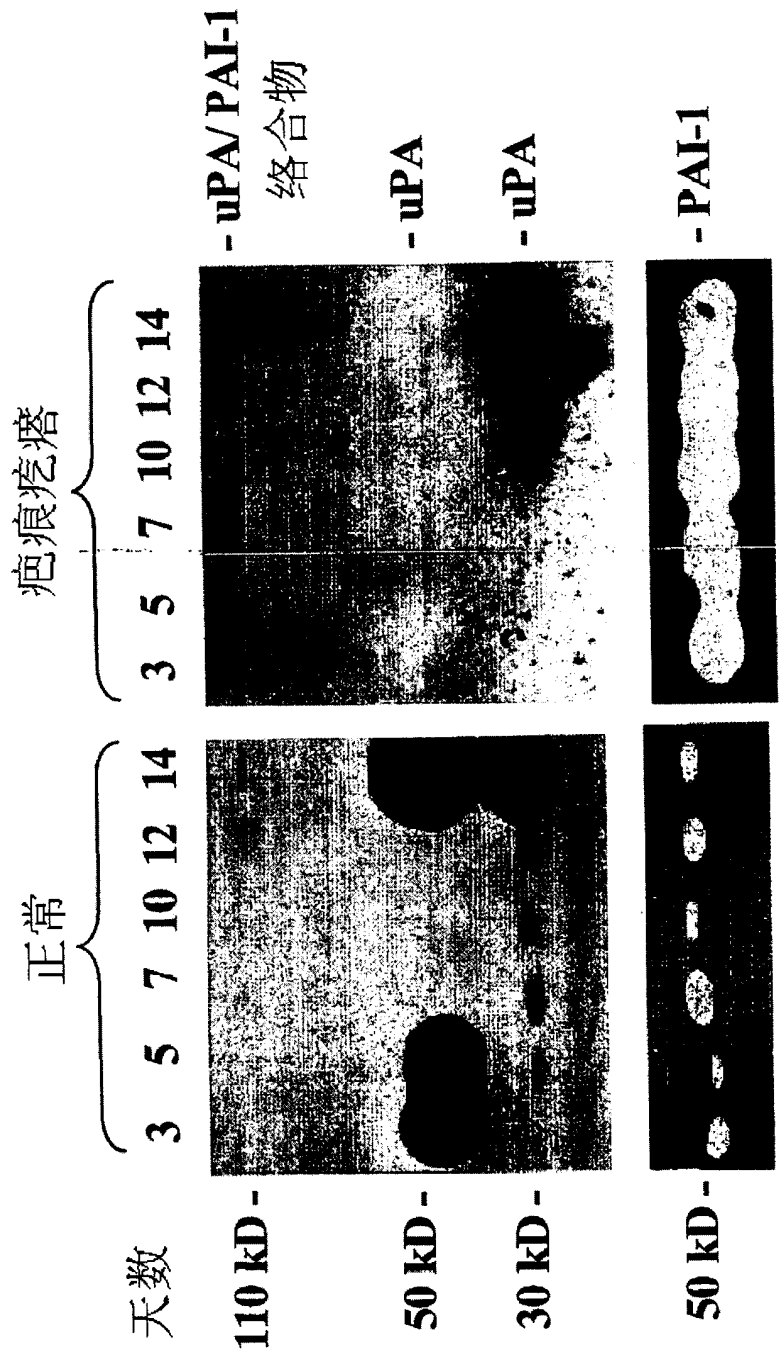


图 4

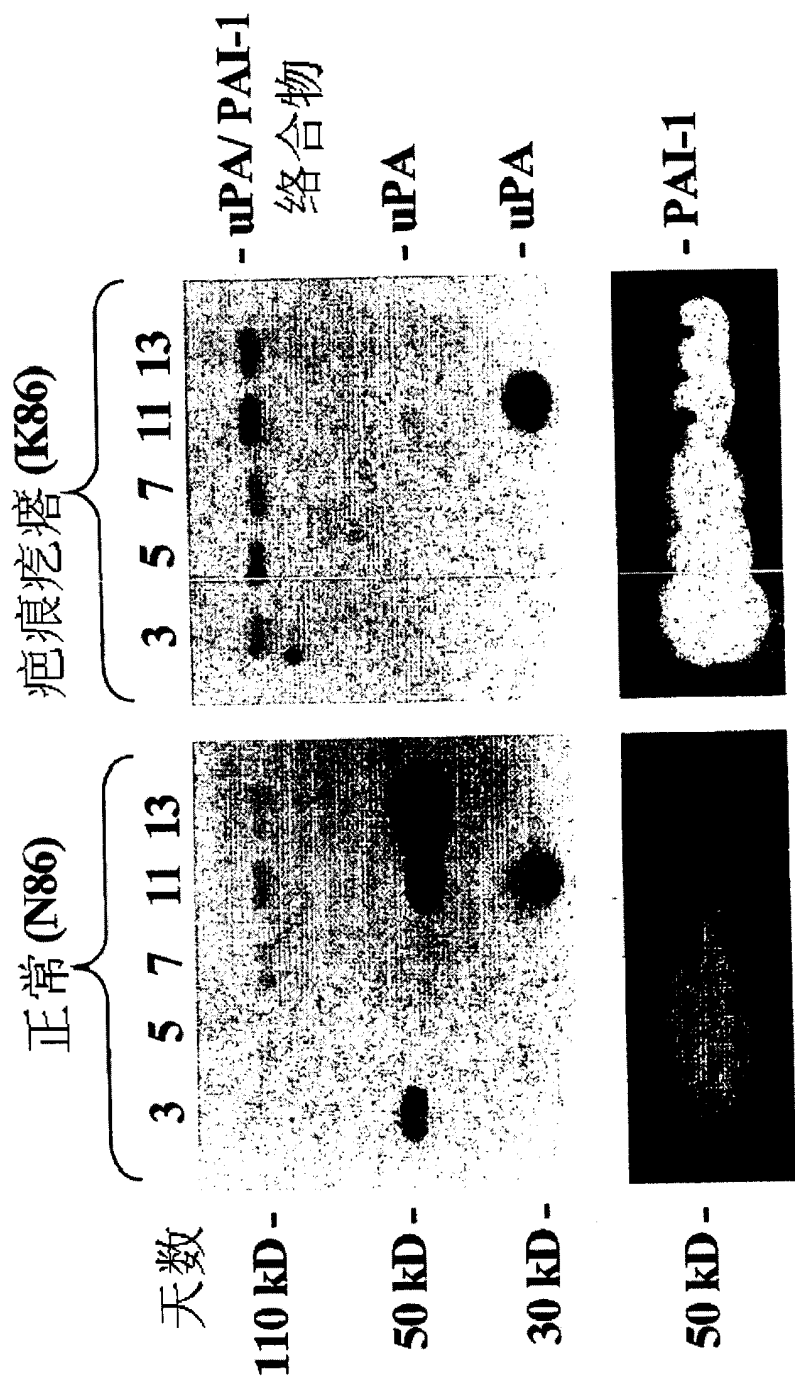


图 5

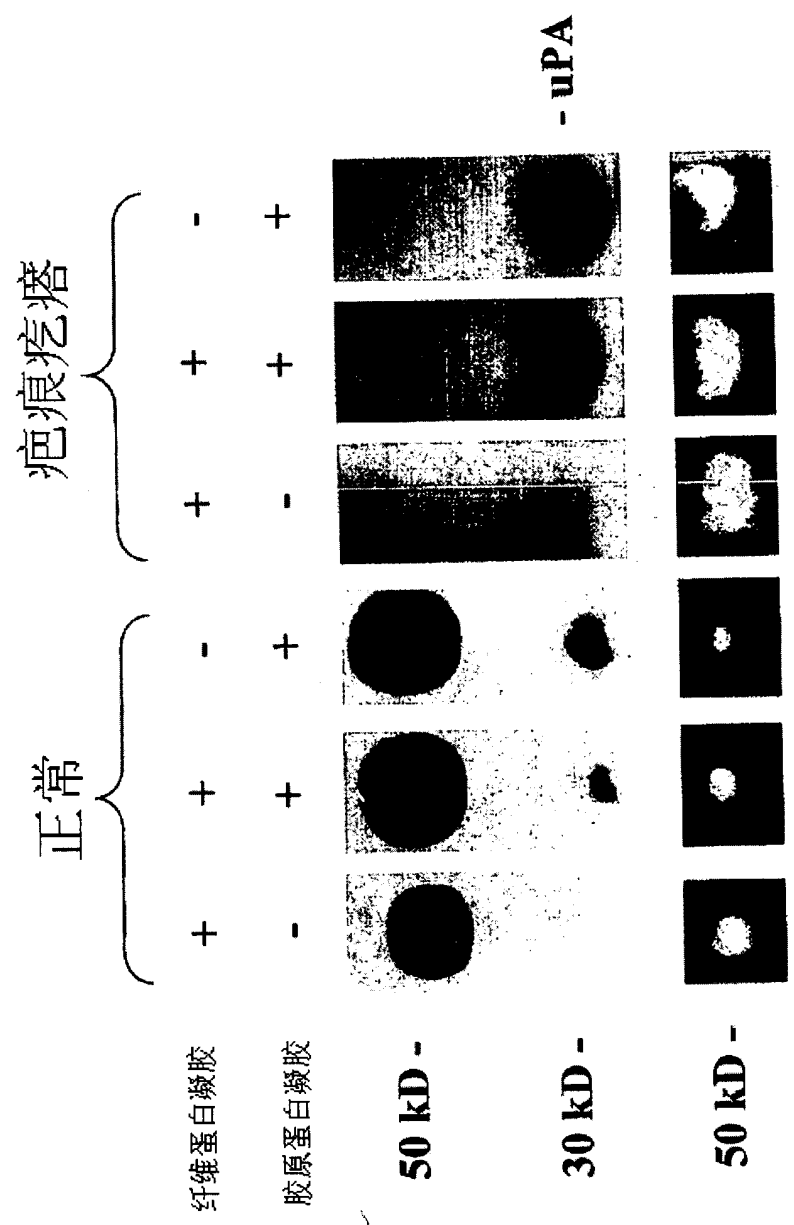


图 6

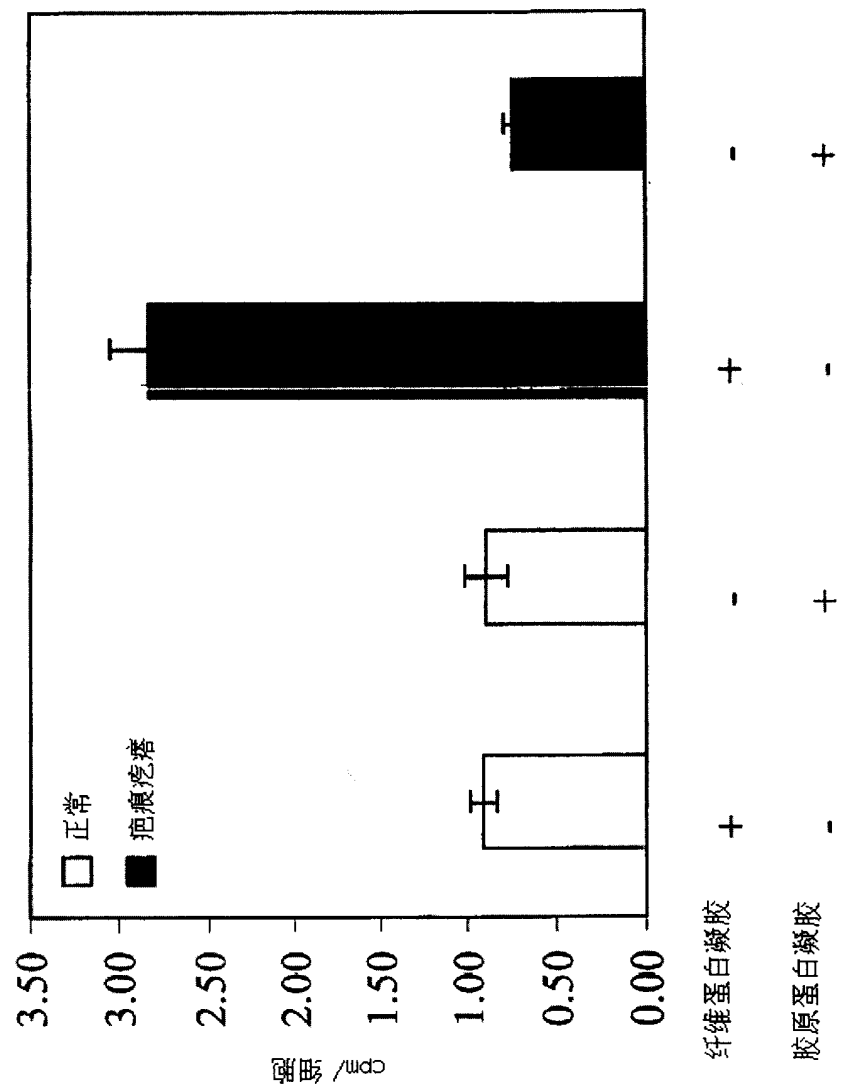


图 7

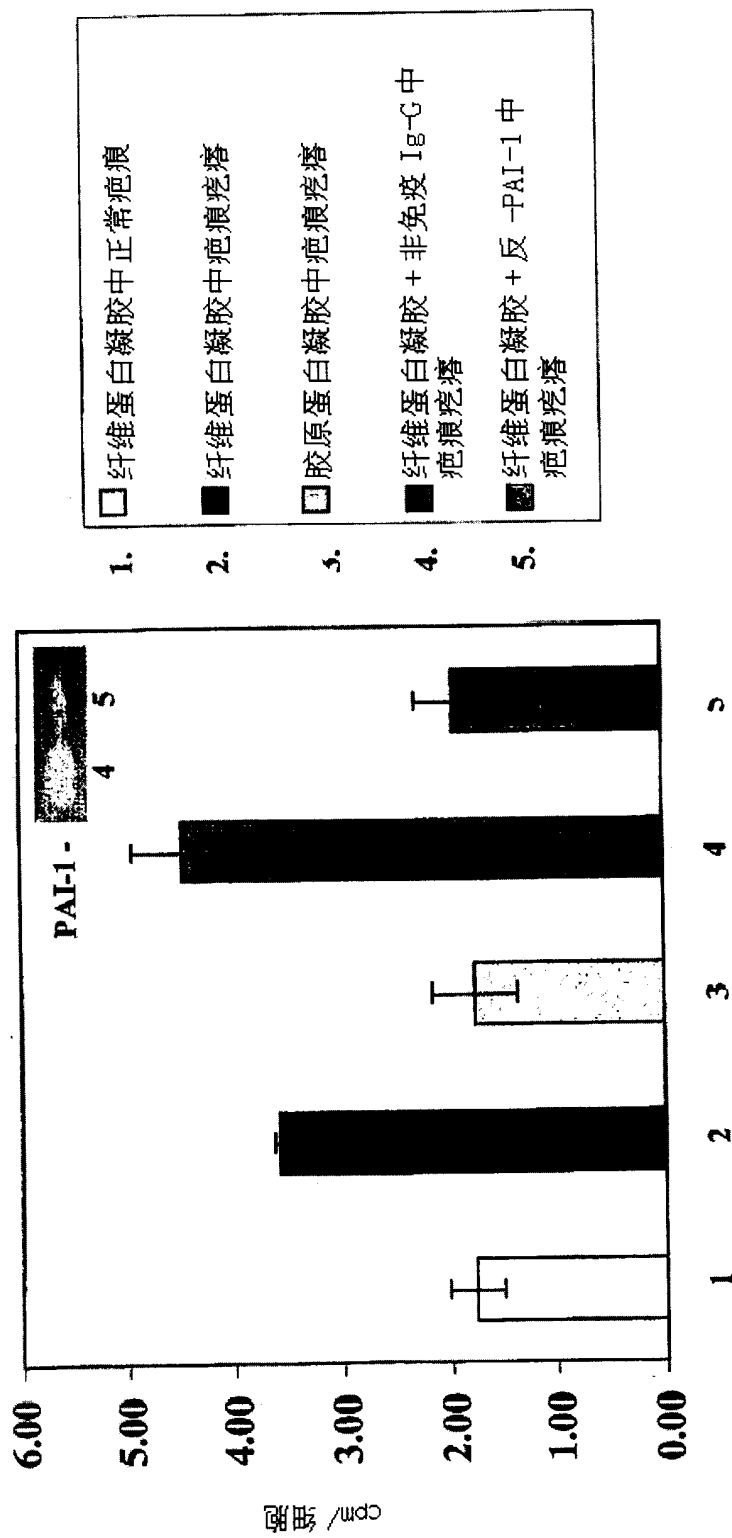


图 8

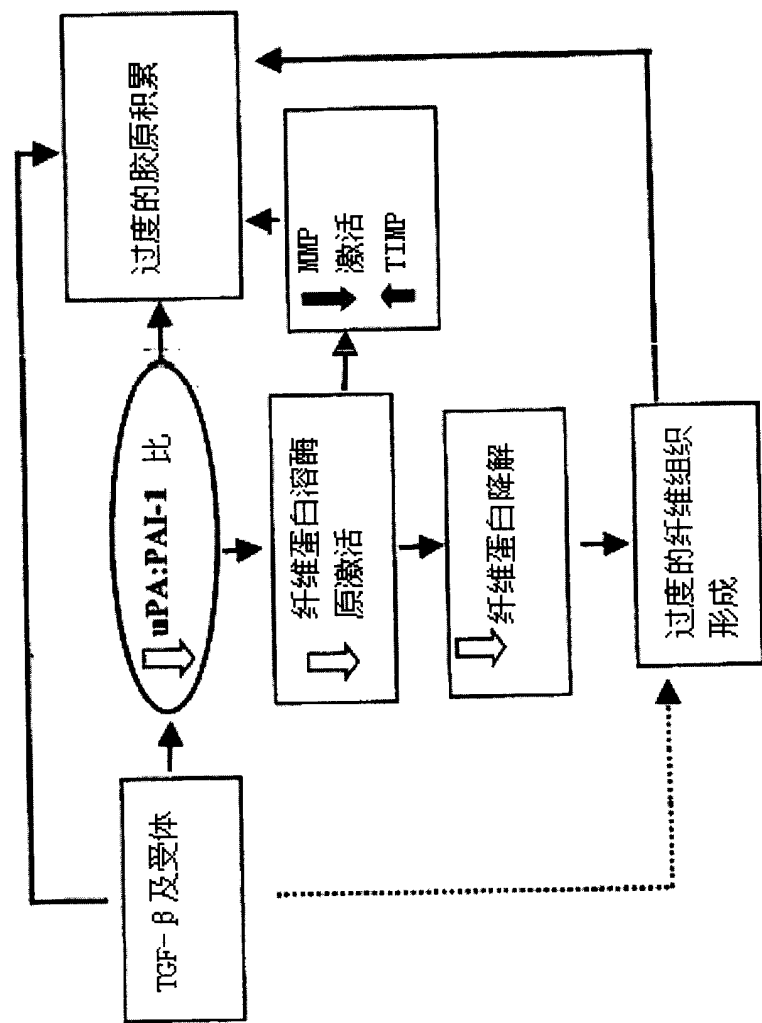


图 9