

(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
2013年11月14日 (14.11.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/166833 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 36/537 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/086605
- (22) 国际申请日: 2012年12月13日 (13.12.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210142501.4 2012年5月10日 (10.05.2012) CN
- (72) 发明人: 及
- (71) 申请人: 林秀英 (LIN, Xiuying) [CN/CN]; 中国贵州省安顺市西秀区南郊路21号, Guizhou 561000 (CN)。
- (74) 代理人: 江苏致邦律师事务所 (JIANGSU CO-FAR LAW FIRM); 中国江苏省南京市鼓楼区石头城6号5栋, Jiangsu 210013 (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

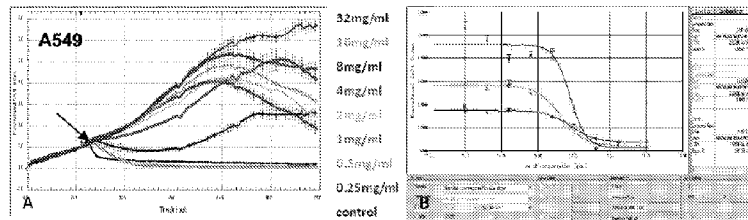
本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。

WO 2013/166833 A1

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING HUMAN CYCLOOXYGENASE AND DOXORUBICIN OR DOXORUBICIN ANALOGUE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF IN PREPARING DRUGS

(54) 发明名称: 包含有人环氧酶及阿霉素或类阿霉素的药用组合物、其制备方法及其在制备多种药物的应用



TC50 12hrs 2.92mg/ml TC50 24hrs 2.03mg/ml TC50 48hrs 2.83mg/ml

图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: Provided are a pharmaceutical composition containing human cyclooxygenase and doxorubicin or a doxorubicin analogue using *Salvia plectranthoides* (also referred to as rare grass) as a crude drug, a preparation method therefor and the use thereof in preparing drugs for treating nephritis, cholecystitis and gallbladder polyps, tumours or antiphlogistic and analgesic drugs.

(57) 摘要: 使用长冠鼠尾草、也称作奇珍草作为原料药的包含人环氧酶和阿霉素或类阿霉素的药物组合物、其制备方法及其在制备治疗肾炎、胆囊炎及胆息肉、肿瘤或消炎止痛药物中的应用。

包含人环氧酶和阿霉素或类阿霉素的药物组合物、其制备方法及其在制备药物中的应用

技术领域

本发明涉及从一种自然植物提取的药用组合物，具体涉及一种含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物、这种含有天然人环氧酶、天然阿霉素或天然类阿霉素物质的药用组合物的制备方法，以及这种含有天然人环氧酶、天然阿霉素或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肾炎的药物中的应用、在制备治疗胆囊炎和胆息肉的药物中的应用、在制备治疗肿瘤的药物中的应用，或在制备消炎药物中的应用。

背景技术

阿霉素（Doxorubicin）化学名称：
(2R,4S)-4-(3-Amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyloxy)-2-hydroxyacetyl-1,2,3,4-tetrahydro-2,5,12-trihydroxy-7-methoxynaphthacene-6,11-dione，是一种抗肿瘤抗生素，可抑制 RNA 和 DNA 的合成，对 RNA 的抑制作用最强，抗瘤谱较广，对多种肿瘤均有作用，属周期非特异性药物，对各种生长周期的肿瘤细胞都有杀灭作用。主要适用于急性白血病，对急性淋巴细胞白血病及粒细胞白血病均有效。恶性淋巴瘤可作为交替使用的首先药物。乳腺癌、肉瘤、肺癌、膀胱癌等其他各种癌症都有一定疗效，多与其他抗癌药联合使用。

该品为广谱抗肿瘤药，对机体可产生广泛的生物化学效应，具有强烈的细胞毒性作用。其作用机理主要是该品嵌入 DNA 而抑制核酸的合成。临床上用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞性白血病、何杰金和非何杰金淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、软组织肉瘤、成骨肉瘤、横纹肌肉瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、甲状腺癌、绒毛膜上皮癌、前列腺癌、睾丸癌、胃癌、肝癌等。

人环氧酶（cyclooxygenase COX），也称为前列腺素过氧化物合成酶（prostaglandin synthase PGHS），是花生四烯酸转化为前列腺素与二十烯类的限速酶。其中包括 COX-1 和 COX-2 两种不同结构和不同生理功能的环氧酶。人环氧酶（COX-2）于 1988 年被发现；天然的人环氧酶于 1991 年被从植物中分离出来。天然人环氧酶是一种蛋白质，也是一种诱导型酶，能够起到酶的作用来加速某种化学信号的产生，在发炎和疼痛时活跃。当 COX-2 的活性被抑制时，疼痛就减轻。活化后的 COX-2 可以催生花生四烯酸，产生多种前列腺素，参与机体多种生理和病理过程。目前比较认同的观点是，COX-2 可以通过

促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管形成、抑制免疫功能等机制，参与肿瘤的发生和发展。

虽然对人环氧酶（COX-2）进行的研究文件众多，但是现有技术中始终没有找到一种富含人环氧酶（COX-2）的药用天然植物，能够采用传统中药的方式实现天然阿霉素（atm）与人环氧酶（COX-2）的医药产业化。

参考文献：

薛佩妮、常小红、杨丽嵘，延安大学学报（医学科学版）2011年09卷03期：《COX-2与

非小细胞肺癌相关性的研究进展》；

邹英鹰、姚楠、王芳、高倩、宋精玲，昆明医学院学报2010年31卷01期：《CDX2和COX2在人大肠肿瘤中的表达特点及与转移的关系》；

张慧峰、高晓琴、李荣山：山西医科大学学报2009年40卷12期：《P₍₃₈₎MAPK/COX₂信号转导通路在大鼠肾脏缺血预处理第二窗保护效应的实验研究》；

施柏年、刘江、何建方、戴利成、周建方、赵卫锋、甘建和，中原医刊2007年34卷09期：《环氧化酶2在肝衰竭模型肝损伤中的表达》；

发明内容

为了弥补现有技术的上述不足，本发明的目的是提供一种含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物、这种含有天然人环氧酶、天然阿霉素或天然类阿霉素物质的药用组合物的制备方法，以及这种含有天然人环氧酶、天然阿霉素或天然类阿霉素物质的药用组合物在治疗肾炎的药物中的应用、在制备治疗胆囊炎及胆息肉的药物中的应用、在制备治疗肿瘤的药物中的应用，或在制备消炎药物中的应用。本发明提供了富含人环氧酶（COX-2）及天然阿霉素或类阿霉素的药用天然植物制备的药用组合物，该组合物能够采用传统中药的方式实现天然阿霉素（atm）与人环氧酶（COX-2）的医药产业化。可以避免化学合成药物的很多副作用，并且具有良好的治疗效果。

完成上述发明任务的技术方案是，一种含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物，其特征在于，该组合物的原料为奇珍草（或称贵州奇珍草）。

以上技术方案中所述的“该组合物的原料为奇珍草”，是指：可以采用奇珍草全株(包括根部)脱水、干燥、粉碎得到的粉末；或者该奇珍草的鲜品或其提取物。

所述的奇珍草的提取物是指以下形式的提取物中的一种：

奇珍草鲜品捣制成绒；

奇珍草水煎液；

奇珍草水煎液浓缩、干燥得到的粉末；

奇珍草水煎液，经乙醇提取得到的醇提液；

奇珍草水煎液，经乙醇提取得到的醇提液浓缩、干燥得到的粉末；

奇珍草全株或奇珍草水煎液经有机溶剂萃取得到的萃取液；

奇珍草全株或奇珍草水煎液经有机溶剂萃取得到的萃取液再浓缩、干燥得到的粉末；

奇珍草全株或奇珍草水煎液经二氧化碳超临界萃取得到的萃取液；

奇珍草全株或奇珍草水煎液经二氧化碳超临界萃取得到的萃取液浓缩、干燥得到的粉末；

奇珍草全株提取的挥发油。

除所述原料奇珍草或其提取物以外，该含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合中还可以含有制药领域所允许的辅料。例如：作为片剂时的赋形剂、调味剂或抗氧化剂，作为胶囊时的抗氧化剂或稳定剂；作为口服液或糖浆时的调味剂、稳定剂或抗氧化剂，作为外用药的膏剂时的乳化剂或凡士林；作为注射剂时的乳化剂、溶剂或稳定剂，等等。

以上技术方案中所述的奇珍草(暂定名)的植物分类位置如下：

贵州奇珍草 Guizhoutreasuresgrass:
 长冠鼠尾草 Saivia plectranthoides Griff 系
 被子植物门 Angiospermae
 双子叶植物纲 Dicotyledoneae
 合瓣花亚纲 Sympetalae
 管花目 Tubiflorae
 马鞭草亚目 Verbenineae
 唇形科 Labiatae
 鼠尾草属 Salvia linn.

该奇珍草为一年或多年生草本，须根根系，根茎直立或匍匐上升，匍匐茎在节处有生根，单生或丛生，茎钝四棱形(方形)，具槽，密被短柔毛。

该奇珍草(暂定名)的种子已经于 2011 年 4 月 2 日, 交设在武汉大学的中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏编号: CCTCC No: P201102 (见说明书附页 1)。该植物已向美国申请植物新品种权; 受理号为: 12/215.016。美国商标受理号: 77633688。

经国家新药筛中心: 样品编号、nc00168954、含阿霉素(或含有类阿霉素物质, 即具有阿霉素抗性)有效(见说明书附页 2)。经国家新药中心筛选中心: 人环氧酶-2(COX-2)活性抑制报告。经国家新药筛中心: 抗肿瘤生物经国家新筛选中心: 对免疫生物活性, T、B 淋巴细胞的增殖及细胞毒性实验结果评定(见说明书附页 2)。经杭州高通量新药筛选中心筛选出该植物含有抑制癌细胞活性物 7 种(见说明书附页 3)。

该植物品种已向农业部递交资料, 材料已补充完毕。

完成本申请第 2 个发明任务的技术方案是, 上述含有天然人环氧酶(COX-2)、天然阿霉素(atm)或天然类阿霉素物质的药用组合物的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

(1). 奇珍草全株洗净;

(2). 将步骤(1)得到干净奇珍草全株脱水、干燥、粉碎得到的粉末;

所述的步骤(2)或者采用以下各步骤之一提取奇珍草的提取物:

(2)-1. 奇珍草水煎液, 或其再浓缩、干燥得到粉末;

(2)-2. 奇珍草水煎液, 经乙醇提取得到的醇提液, 或其再浓缩、干燥得到的粉末;

(2)-3. 奇珍草全株或奇珍草水煎液经有机溶剂萃取得到的萃取液, 或其再浓缩、干燥得到的粉末;

(2)-4. 奇珍草全株或奇珍草水煎液经二氧化碳超临界萃取得到的萃取液, 或其再浓缩、干燥得到的粉末;

(2)-5. 奇珍草全株提取挥发油;

(3). 将步骤(2)、步骤(2)-1、步骤(2)-2、步骤(2)-3、步骤(2)-4 或(2)-5. 得到的粉末和/或挥发油, 与药用辅料混合; 分别制成所需要的剂型;

(4). 杀菌;

(5). 检验;

(6). 包装。

完成本申请第 3 个发明任务的方案是: 上述含有天然人环氧酶(COX-2)、天然阿霉素(atm)或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肾炎及的药物中的应用。

完成本申请第 4 个发明任务的方案是: 上述含有天然人环氧酶(COX-2)、天然阿霉素(atm)或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗胆囊炎及胆息肉的药物中的应用。

完成本申请第 5 个发明任务的方案是：上述含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

完成本申请第 6 个发明任务的方案是：上述含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备消炎药物中的应用。

以上所说的含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肾炎的药物、在制备治疗胆囊炎的药物、在制备治疗肿瘤的药物，或在制备消炎药物中的应用时，其给药方式是：口服片剂、胶囊、口服液或糖浆、口服蒸馏液、外用眼药水、外用眼药膏、外敷烫伤止痛膏剂、外用消炎、止血、散瘀、止痛粉、不排除注射给药。

其给药剂量是：成人每天计量相当于原料贵州奇珍草粉末 5g-6g，本申请推荐量为 5.4g。即每日三次，每次 1.8 g。

其治疗周期（疗程）是 7 天。用于治疗一般炎症需两个疗程；治疗慢性炎症需要 6 个疗程。治疗肾炎、胆囊炎、肿瘤一般需要 6 个疗程以上。

本发明的药用组合物可以迅速治疗炎症、消除肿胀，和缓解疼痛；还可以去除病毒，抑制肿瘤细胞，激活肌体免疫系统的活力。因此，本发明的药用组合物对治疗慢性肾炎、急性胆囊炎（包括胆汁反流性胆囊炎），人体淋巴、肺、肝、胃、乳腺、纤维瘤、白血病等多种肿瘤疾病。本发明的药用组合物还可以用于沙眼、火眼的治疗。

本发明的药用组合物作为外用药涂擦，可以治疗跌打损伤，水火烫伤，疮痛溃破流脓。

本发明的药用组合物原料植物的鲜品，捣烂外敷可以促进骨折愈合。

本发明的药用组合物还具有美容功效，可以用于美容产品的开发。

以下是本发明用于制备治疗肾炎的药物、制备治疗胆囊炎及胆息肉的药物，或制备治疗肿瘤的药物时的效果证明：

含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肾炎的药物中的应用时，肾炎患者的确诊是按照通常的标准确诊；“有效”、“显效”、“治愈”等的标准也按照传统标准。本发明药物的给药剂量是：成人每日三次，每次 1.8 g。疗程 7 天。6 个疗程以上时，治疗效果对比如下表：

表 1

	有效	显效	治愈	无效
本发明药物组	98.3%	92.5%	84.2%	

布尼洛尔组	93.2%	59%		
-------	-------	-----	--	--

本发明药物组

治愈时间 7—15 天。

含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗胆囊炎的药物中的应用时，胆囊炎患者的确诊是按照通常的标准确诊；“有效”、“显效”、“治愈”等的标准也按照传统标准。本发明药物的给药剂量是：成人每日三次，每次 1.8 g。疗程 7 天。6 个疗程以上时，治疗效果对比如下表：

表 2

	有效	显效	治愈	无效
本发明药物组	95.8%	93.2%	80%	
胆宁片组	82.79%	78.57%		7.14%

含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用时，肿瘤（淋巴癌）患者的确诊是按照通常的标准确诊；“有效”、“显效”、“治愈”等的标准也按照传统标准。本发明药物的给药剂量是：成人每日三次，每次 1.8 g。疗程 7 天。8 个疗程以上时，治疗效果对比如下表：

表 3

	有效	显效	治愈	无效
本发明药物组	89.3%	80.5%	80%	
紫杉醇组	48.8%	32.6%	16.3%	2.3%

含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的药用组合物作为一般消炎止痛药物应用时，一般炎症患者的确诊是按照通常的标准确诊；“有效”、“显效”、“治愈”等的标准也按照传统标准。本发明药物的给药剂量是：成人每日三次，每次 1.8 g。疗程 7 天。两个疗程以上时，治疗效果对比如下表：

表 3

	有效	显效	治愈	无效

本发明药物组	97.6%	92.9%	90%	
链霉素组	14.29%	78.57%		7.14%

关于本发明的药物应用的技术效果,请参照说明书附页 2、说明书附页 3 与说明书附页 4。其中杭州高通量新药筛选中的实验报告(说明书附页 3):

提供奇珍草药物筛选,对细胞肺癌、纤维肉瘤、宫颈癌、肝癌、4 个项目有较强抑制作用;大肠癌、前列腺癌、乳脉癌三项抑制作用较弱。

- (1) 中药提取液对 A549 细胞有明显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依赖性。
- (2) 中药提取液抑制 HT29 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依性。
- (3) 中药提取液对 PC3 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依赖性。
- (4) 中药提取液对 HT1080 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依性。
- (5).中药提取液对 Hela 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依赖性。
- (6).中药提取液对 MDA-MB-231 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依赖性。

(7) 中药提取液对 Hepc2 细胞有明细显的抑制细胞增殖作用,抑制作用呈药物浓度依赖性。
实验结果:

中药提取液由于药 8 克制成药汁 120 克 1 比 15 浓度, 55.56ug/ml 时,对细胞有明显的毒性作用,这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低,迁移至下室的细胞数量减少。而当药物浓度低于 55.56ug/ml 时对细胞基本没有毒性作用。(实验检测资料附后)。

本发明提供了富含人环氧酶(COX-2)及天然阿霉素或类阿霉素的药用天然植物制备的药用组合物,该组合物能够采用传统中药的方式实现天然阿霉素(atm)与人环氧酶(COX-2)的医药产业化。可以避免化学合成药物的很多副作用,并且具有良好的治疗效果。

附图说明

- 图 1 为中药提取液抑制 A549 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 2 为中药提取液抑制 HT29 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 3 为中药提取液抑制 PC3 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 4 为中药提取液抑制 HT1080 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 5 为中药提取液抑制 Hela 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 6 为中药提取液抑制 MDA-MB-231 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 7 为中药提取液抑制 HepG2 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察曲线;
图 8 为化合物特异性图谱;

- 图 9 为中药提取液对 A549 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 10 为中药提取液对 PC3 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 11 为中药提取液对 HT1080 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 12 为中药提取液对 HeLa 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 13 为中药提取液对 MDA-MB-231 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 14 为中药提取液对 HepG2 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测曲线；
图 15 为 HT29 细胞株体外迁移能力检测曲线；
图 16 为实时细胞分析仪；
图 17、图 18 为反映心肌细胞跳动特性及其细胞状态的测定曲线；
图 19 为心肌细胞模型中参数和数据分析页面；
图 20 为中药提取液对新生大鼠原代心肌细胞活性影响曲线；
图 21 为原代心肌细胞随加药后时间的跳动曲线变化；
图 22 为中药提取液影响跳动频率（Beating rate）的作用曲线；
图 23 为中药提取液影响跳动幅度（Amplitude）的作用曲线；
图 24 为中药提取液影响新生大鼠原代心肌细胞跳动频率和幅度的 IC50 曲线。

具体实施方式

实施例 1、含有天然人环氧酶（COX-2）、天然阿霉素（atm）或天然类阿霉素物质的混合药用组合物，片剂的制备方法及其临床用。

天然阿霉素（或天然类阿霉素物质）与人环氧酶药物片剂制备方法：

蒸汽蒸馏液制法：

制剂提取物将奇珍草：净洗、灭菌、用 1 斤药材 10 斤水的比例，提取蒸汽蒸馏取得挥发油和蒸馏液，挥发油备用，蒸留液经低温 24 小时以上，滤取上清液、回收乙醇至无醇味，浓缩成稠膏，干燥、粉碎、得浸膏粉、取挥发油和沉淀物均匀喷洒于浸膏粉，微粉加入磷酉酸钙、乳糖、去光淀粉、和硬脂酸镁等药物辅料、制成相应剂型，即得。

浸膏粉片剂制法：干浸膏先粉碎成细粉，过 5—6 目筛，用乙醇润湿制粒，在进行压片。

喷雾转动制粒法：加入磷酉酸钙、乳糖、泡光淀粉、将干浸膏细粉置包衣锅中，也转动边将润湿以雾喷入，逐渐地湿粉成粒。

药粉制片法：药材净洗、灭菌、燥制、和干燥，加工微米中药粉，粒径 10um(1—20um) 过 300 目筛、可制成片剂；

胶囊制备方法：用 1 斤药材 10 斤水的比例

3、胶囊制法：药材处理：净制、炮制、提纯、灭菌、粉碎粒径 75um^{4.1} 过 200um 目筛、灌装胶囊；

溶剂提取法：奇珍草药材，适当粉碎，用 1 斤药材 10 斤水的比例，使用浸渍法，渗漉法、煎者法；可选用亲酯性：石油醚.苯.>乙醚>乙酸乙酯>丙酮>乙醇>甲醇>水(亲水性)等，提取过程中有机溶剂。

该奇珍草植物制剂在 2006 年经送上海家新药筛选中心检测筛选中心检测筛选，结果表明，该植物含有天然人环氧酶-2(cox-2)活性及免疫生物活性，对抗炎治疗有很好的作用。同时对淋巴 T、B 细胞有很好的抑制作用，具有很好的应用前景。

附页-1（保存证明 1 页）

附页-2（国家新药筛选证明 3 页）

附页-3（杭州筛选证明 23 页）

说明书附页-1

中国典型培养物保藏中心

用于专利程序的培养物保藏受理通知书（收据）

地址：中国.武汉.武汉大学 邮编：430072 电话：(027) 68752319 传真 (027) 68754733 E-mail: ccrcc@whu.edu.cn

请求保藏人及其代理人：

请求保藏人：林秀英

专利代理人：

专利申请号：

您（们）请求保藏的培养物名称
及注明的鉴别特征本保藏中心保藏编号
CCTCC NO: 201102

贵州珍奇草种子

上述请求保藏的培养物附有

- 科学描述
 提议的分类命名

注：在框内打√号的表示有，打×号的表示没有。

该培养物已于 2011 年 2 月 22 日由本保藏中心收到，并登记入册。

根据您（们）的请求，自该日起保存 30 年。在届满前收到提供培养物样品的请求后再继续保存 5 年。

该培养物的存活性本保藏中心于 2011 年 3 月 26 日监测完毕，结果为存活。

中国典型培养物保藏中心

负责人（签名）



2011年4月2日

说明书附页-2

国家新药筛选中心
The national Center for Drug Screening

抗肿瘤生物活性体外筛选试验

筛选方法: 四氮唑盐 (Methy-Thiazol-Tetrozolium, MTT)
还原法

细胞株: HL-60 人白血病

作用时间: 72 小时

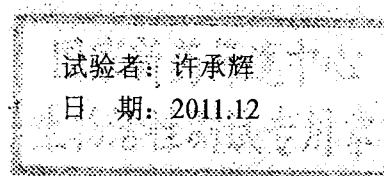
结果评定: 无活性: 1mg/ml < 50%;

有活性: 1mg/ml > 50%;

对肿瘤细胞生长的抑制率%

浓度 样品编号	0.5	0.25	0.13	0.063	0.031	评价	备注
NC00168954	41.8	55.9	72.2	72.9	38.9		
浓度 (M)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		
阿霉素	70.0	81.6	79.0	57.6	0	有效	

设原液浓度为 10



上海浦东张江高科技园区郭守敬路 189 号

189 Guo Shou Jing Road Zhnagjiang Hi-Tech.Park Shanghai 201203 china

电话(Tel): +86(0)21 50801313 传真(Fax): +86(0)21 50800721 网址(Wedslit): www.screen ora.cn

国家新药筛选中心
The national Center for Drug Screening

人环氧酶—2 (COX—2) 活性抑制报告

实验目的:

环加氧酶通过代谢花生四烯酸 (AA) 生成前列腺素和氧自由基 (ROS)。环加氧酶 (COX2), 是炎症发生发展的关键因子之一。而环加氧酶 1 (COX1) 则主要调控生理功能。COX2 选择性抑制剂在抗炎的同时, 避免干扰生理功能, 是抗炎治疗的很好的靶点, 筛选它的抑制剂具有明显的应用情景。

测试原理:

COX2 代谢花生四烯酸, 生成前列腺素和 ROS。测量 ROS 荧光或 PGE2 生成, 以确定酶活性。

实验结果:

样品对 COX—2 酶的抑制率 (%)

microg/ml	10
NC00127983	7.42

microM	0.1	1	10
Celecoxib	34.05	70.55	92.10

实验人: 金道忠
2006 年 06 月 11 日

国家新药筛选中心
The national Center for Drug Screening

免疫生物活性筛选实验

模型名称: T、B 淋巴细胞的增值反应及细胞毒性实验

筛选方法: BALB/C 小鼠脾脏淋巴细胞在有丝分裂原 ConA,LPS 的刺激下, 细胞的形态和代谢可发生一系列的变化, 转化为母细胞, 并分化增殖, 加入 LPS (脂多糖) 10mg/ml 诱导 B 淋巴细胞增殖, 以 ³H-TdR 掺入法定量测定细胞的增殖。活细胞内线粒体脱氢酶能将 MTT 由黄色还原成蓝色的甲臜, 甲臜产量与活细胞成正比。用有机溶剂溶解后, 可用酶标仪检测 OD 值。

测试体系: 体外

结果评定: 淋巴细胞的增值采用被测样品 CPM 值减对照孔 CPM 值, 除对照孔 CPM 值乘以%。

百分比前有负号表示此样品对 T、B 细胞有抑制作用。

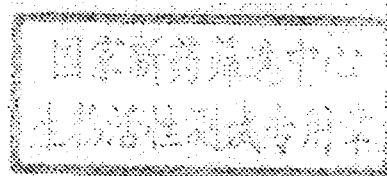
百分比前没有负号表示此样品对 T、B 细胞有增值作用。

淋巴细胞毒性的判断 “有” “无”

在无细胞毒的情况下 T、B 淋巴细胞的增值、抑制百分比在 15%以上, 表示有作用。

样品名	测定浓度	OD 平均值	SD	P 值	细胞毒性 有/无	T 淋巴细胞 ConA,刺激	CPM 平均值	SD	T 细胞增值 综合活性测定 增值/抑制百分比	B 淋巴细胞 LPS 刺激	CPM 平均值	SD	B 细胞增值 综合活性测定 增值/抑制百分比
						阴性对照	1569	173		1587	52		
对照		0.287	0.001			阳性对照	34014	2399		7434	506		
NC0012798 3	1:4000	0.243	0.030	0.1203	无		30884	13747	-9%	7381	887		-1%
	1:400	0.278	0.032	0.6593	无		16357	15445	-52%	5753	220		-23%
	1:40	0.410	0.032	0.0166	无		7754	5290	77%	3272	917		-56%

实验者:
实验负责人:
日期:



上海浦东张江高科技园区郭守敬路 189 号

189 Guo Shou Jing Road Zhnagjiang Hi-Tech.Park Shanghai 201203 china

电话(Tel): +86(0)21 50801313 传真(Fax): +86(0)21 50800721 网址(Wedslt): www.screen ora.cn

说明书附页-3

杭州高通新药筛选中心

Hangzhou high Throughput drug screening center

艾森生物

委托服务项目:

基于 xCELLigence 无标记动态实时细胞信号
与功能分析系统(RTCA)技术研究

- 1.由中药提取液介导的细胞毒性作用检测
2. 中药提取液对细胞的迁移影响的检测

基于 xCELLigence 无标记动态实时心肌细胞分析系统
(RTCA Cardio System)技术进行

- 3.中药提取物对心肌细胞的影响检测

实验报告

客户名称: 林秀英

报告单位: 杭州高通新药筛选中心

艾森生物(杭州)有限公司

报告发布日期: 2012年2月14日

1. 由中药提取液介导的细胞毒性作用检测

(一) 项目简介

本实验采用 xCELLigence 实时细胞分析系统，检测中药提取液对细胞增殖的抑制作用，并检测药物抑制细胞增殖的 IC50，采用的细胞为 A549、HT1 080、Hel. a、MDA-MB-231、HT29、HepG2 及 PC3 细胞。

(二) 实验仪器：

本实验采用艾森和罗氏共同开发的 xCELLigence 实时细胞分析系统。

(三) 实验试剂、耗材：

DMEM 培养基：货号 SH30022. 01B, Hyc]one(中国)。

改良型 RPMI-1640 培养基：货号 SH30809. 01B, Hyclone(中国)。

MEM 培养基：货号 SH30024. 01B, Hyclone(中国)。

F12 培养基：货号 SH30526. 01, Hyclone(中国)。

MyCOA' s 5A 培养基：货号 GNM 16600, 吉诺(中国)。

血清：货号 16000-044, Gibco(美国)。

胰酶：货号 27250—018, Gibco(美国)。

PBS：货号 SH30256. 01B, Hyclone(中国)。

移液管：货号 4487, Costar。

离心管：货号 430791, Corning。

96x E-plate: ACEA。

A549(非小细胞肺癌细胞株)、PC3(人前列腺癌细胞株)、HT1080(人成纤维肉瘤细胞株)、Hela(人宫颈癌细胞株)、MDA MB — 231(人乳腺癌细胞株)、HepG2(人肝癌细胞株)细胞：ATCC。

中药提取液：林秀英提供。

(四) 药品配置方法

根据客广提供的信息，中药提取液为 20 克药物得到 125ml 药汁，浓度为 160mg / ml。

实验过程中根据实际需要的浓度，用培养基稀释后，加入细胞中。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

(五) 试验设计及方案

实验方法:

在 96x E-plate 上按照 Layout 接种细胞, A549 (5000 个/孔)、Hela (2500 个/孔)、HT1080 (2500 个/孔)、MDA-MB-231 (4000 个/孔)、HT29 (10000 个/孔) HepG2 (10000 个/孔)、PC3 (10000 个/孔) 待细胞增殖过夜后, 按照 Layout 加入药物后, 继续检测 72h。

实验 Layout 如下:

Plate1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	HT29		PC3		MDA-MB-231		HepG2		HeLa		HT1080	
	中药提取液											
A	32mg/ml		64mg/ml		32mg/ml		32mg/ml		32mg/ml		32mg/ml	
B	16mg/ml		21.33mg/ml		16mg/ml		16mg/ml		16mg/ml		16mg/ml	
C	8mg/ml		7.11mg/ml		8mg/ml		8mg/ml		8mg/ml		8mg/ml	
D	4mg/ml		2.37mg/ml		4mg/ml		4mg/ml		4mg/ml		4mg/ml	
E	2mg/ml		0.79mg/ml		2mg/ml		2mg/ml		2mg/ml		2mg/ml	
F	1mg/ml		0.26mg/ml		1mg/ml		1mg/ml		1mg/ml		1mg/ml	
G	0.5mg/ml		87.79mg/ml		0.5mg/ml		0.5mg/ml		0.5mg/ml		0.5mg/ml	
H	con		con		con		con		con		con	

Plate2

	1	2	3
	中药提取液		
A	32mg/ml		
B	16mg/ml		con
C	8mg/ml		
D	4mg/ml		
E	2mg/ml		
F	1mg/ml		
G	0.5mg/ml		
H	0.25mg/ml		

采集信号设置如下：

步骤	循环次数	间隔时间/次	备注
Step_1	1	1min	测量基数
Step_2	100	15min	检测增殖曲线
Step_3-1	200	2min	检测药物作用
Step_3-2	300	15min	检测药物作用

（六）实验结果

1.RTCA Plot

（1）中药提取液抑制 A549 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

（见图 1）

图 1 中药提取液抑制 A549 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。其中，横坐标表示细胞增殖及药物作用时间；纵坐标表示标准化细胞指数（NCI）。细胞指数提示细胞生长状态。其值越高反映活细胞越多。箭头所指为加药时间，加药浓度见图中所示。该图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性动态反应曲线，control1 为阴性对照，显示正常的细胞生长动态曲线。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 A549 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 12,24 和 48 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 A549 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

（2）中药提取液抑制 HT29 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

（见图 2）

图 2 中药提取液抑制 HT29 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 HT29 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 48 和 72 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 HT29 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

（3）中药提取液抑制 PC3 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

（见图 3）

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

图 3 中药提取液抑制 PC3 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 PC3 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 24, 48 和 72 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 PC3 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

(4) 中药提取液抑制 HT1080 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

(见图 4)

图 4 中药提取液抑制 HT1080 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 HT1080 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 12, 24 和 48 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 HT1080 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

(5) 中药提取液抑制 HeLa 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

(见图 5)

图 5 中药提取液抑制 HeLa 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 HeLa 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 12, 24 和 48 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 HeLa 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

(6) 中药提取液抑制 MDA-MB-231 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

(见图 6)

图 6 中药提取液抑制 MDA-MB-231 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 MDA-MB-231 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 24, 48 和 72 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 MDA-MB-231 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

(7) 中药提取液抑制 HepG2 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果

(见图 7)

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

图 7 中药提取液抑制 HepG2 细胞株体外增殖动态检测及抑制效果观察。A 为细胞生长及药物作用实时动态图。B 为由实时细胞分析系统自动检测计算的 HepG2 细胞中加入中药提取液后，药物在作用 48 和 72 小时时间点的 IC50 值及 IC50 拟合曲线。从图中可见，中药提取液对 HepG2 细胞有明显的抑制细胞增殖作用，抑制作用呈现药物浓度依赖性。

2. 中药提取液对细胞株的细胞毒作用

Cell	IC50 (mg/ml)			
	12hrs	24hrs	48hrs	72hrs
A549 (5K/well)	2.92	2.09	2.83	/
HT29 (10K/well)	/	/	22.6	8.65
PC3 (10K/well)	/	7.68	7.57	7.68
HT1080 (2.5K/well)	4.58	4.22	2.33	/
HeLa (2.5K/well)	3.06	2.62	2.62	/
MDA-MB-231 (4K/well)	/	4.36	3.90	3.96
HepG2 (10K/well)	/	/	9.22	13.6

(七) 实验预示的结论及可能的问题和建议

1. 实验检验了中药提取液对人非小细胞肺癌细胞株 (A549)，人大肠癌细胞株 (HT29)，人前列腺细胞株 (PC3)，人成纤维肉瘤细胞株 (HT1080)，人宫颈癌细胞株 (Hela)，人乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231)，人肝癌细胞株 (HepG2) 7 个不同器官细胞株的细胞毒作用。
2. 由于药物在不同细胞株上的作用情况不同，选择 4 个时间点 (加药后 12hr, 24hr, 48hr, 72hr)，根据各个细胞的具体状况，获得了相应时间点的 IC50 值。
3. 中药提取液对所选的 7 个细胞株的增殖都有抑制作用，呈现很好的浓度梯度，其中对 HT1080、HeLa、MDA-MB-231、A549 细胞的作用较强，对 HepG2、HT29、PC3 细胞的作用较弱。
4. 从药物开发的角度，可继续该药物对肺癌，宫颈癌，乳腺癌等癌症治疗方面的研究，同时可以考虑实验该药物对非肿瘤细胞的细胞株是否存在细胞毒性作用。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

5. 化合物机理探讨：根据化合物特异性反应图谱，中药提取液在这几个细胞株上都表现出明显的细胞毒作用，在 HT29 和 PC3 细胞上的图谱显示出 DNA Damage 的细胞毒性作用特征。

(见图 8)

图 8 化合物特异性图谱。从 xCELLigence 系统获得的实时阻抗数据可以得到化合物特异性图谱，这些图谱依赖于化合物的生物学作用机理。在这个例子中，加入不同生物学作用机理和靶点特异性的化合物，可以产生特殊的化合物图谱。针对不具有特异性作用的化合物，这些图谱可以用于以预测的方式设定一些可验证的假设。

实验记录信息

保存于艾森生物（杭州）有限公司客户数据库。

编号：1112051511P3, 1112081603P3, 1112141440P5, 1112201057P5

2. 中药提取液对细胞的迁移影响的检测

(一) 项目简介

本实验采用 xCELLigence 实时细胞分析系统，检测由贵州中药提供的某中药提取液对细胞迁移的抑制作用，采用的细胞为 A549、PC3、HT1080、Hela、MDA-MB-231、HepG2

(二) 实验仪器

本实验采用艾森和罗氏共同开发的 xCELLigence DP 实时细胞分析系统。

(三) 实验试剂、耗材

DMEM 培养基：货号 SH30022.08B, Hyclone (中国)。

改良型 RPMI-1640 培养基：货号 SH30809.01B, Hyclone (中国)。

MEM 培养基：货号 SH30024.01B, Hyclone (中国)。

F12 培养基：货号 SH30526.01, Hyclone (中国)。

血清：货号 16000-044, Gibco (美国)。

杭州高通新药筛选中心

Hangzhou high Throughput drug screening center

艾森生物

胰酶：货号 27250-018, Gibco (美国)。

DMSO：货号 D2650, Sigma (美国)。

PBS：货号 SH30256.01B, Hyclone (中国)。

移液管：货号 4487, Costar。

离心管：货号 430791, Corning。

96x E-plate: ACEA

CIM plate: ACEA

A549 (非小细胞肺癌细胞株)、PC3 (人前列腺细胞株)、HT1080 (人成纤维肉瘤细胞株)、Hela (人宫颈癌细胞株)、MDA-MB-231 (人乳腺癌细胞株)、HepG2 (人肝癌细胞株) 细胞：ATCC。

中药提取液：林秀英提供。

(四) 药品配制方法

根据客户提供的信息，中药提取液为 20 克药物得到 125ml 药汁，浓度为 160mg/ml。

实验过程中根据实际需要的浓度，用培养基稀释后使用。

(五) 实验设计及方案

实验方法：

在 CIM plate 下室按照 Layout 加入用含 10% 血清培养基配制的药物，在上室加入用无血清培养基配制的药物，于 DP 系统上检测基线。然后在上室中加入用无血清培养基重悬并且已经与各化合物共孵育 1h 的细胞，于 DP 上检测 24h-48h。

同时在 96x E-plate 上平行设立细胞的增殖对照。按照 Layout 加入含 10% 血清培养基配制的药物，于 SP 上检测基线。然后加入用 10% 血清培养基重悬并且已经与各化合物共孵育 1h 的细胞，于 SP 上检测 24h-48h。

使用的细胞浓度：A549 (60k/well)、PC3 (40k/well)、HT1080 (30k/well)、Hela (30k/well)、MDA-MB-231 (80k/well)、HepG2 (80k/well)

实验 Layout 如下：

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		A549 60k/well		A549 60k/well	
A	中药提取液	0.5mg/ml		0.5mg/ml	
B		0.17mg/ml		0.17mg/ml	
C		55.56ug/ml		55.56ug/ml	
D		18.52ug/ml		18.52ug/ml	
E		6.17ug/ml		6.17ug/ml	
F		2.06ug/ml		2.06ug/ml	
G	Control	CON		CON	
H	Serum free	SF CON		SF CON	
DP2		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		PC3 40k/well		PC3 40k/well	
A	中药提取液	64mg/ml		64mg/ml	
B		21.33mg/ml		21.33mg/ml	
C		7.11mg/ml		7.11mg/ml	
D		2.37mg/ml		2.37mg/ml	
E		0.79mg/ml		0.79mg/ml	
F		0.26mg/ml		0.26mg/ml	
G	Control	CON		CON	
H	Serum free	SF CON		SF CON	

DP3		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		HT1080 30k/well		HT1080 30k/well	

A	中药提取液	0.5mg/ml		0.5mg/ml
B		0.17mg/ml		0.17mg/ml
C		55.56ug/ml		55.56ug/ml
D		18.52ug/ml		18.52ug/ml
E		6.17ug/ml		6.17ug/ml
F		2.06ug/ml		2.06ug/ml
G	Control	CON		CON
H	Serum free	SF CON		SF CON

DP4		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		Hela 30k/well		Hela 30k/well	
A	中药提取液	0.5mg/ml		0.5mg/ml	
B		0.17mg/ml		0.17mg/ml	
C		55.56ug/ml		55.56ug/ml	
D		18.52ug/ml		18.52ug/ml	
E		6.17ug/ml		6.17ug/ml	
F		2.06ug/ml		2.06ug/ml	
G	Control	CON		CON	
H	Serum free	SF CON		SF CON	

DP5		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		MDA-MB-231 80k/well		MDA-MB-231 80k/well	
A	中药提取液	4mg/ml		4mg/ml	
B		1.33mg/ml		1.33mg/ml	
C		0.44mg/ml		0.44mg/ml	
D		0.15mg/ml		0.15mg/ml	
E		49.38ug/ml		49.38ug/ml	
F		16.46ug/ml		16.46ug/ml	

G	Control	CON	CON
H	Serum free	SF CON	SF CON

DP6		细胞迁移		细胞增殖对照	
		Line1	Line2	Line1	Line2
		HepG2 80k/well		HepG2 80k/well	
A	中药提取液	2mg/ml		2mg/ml	
B		1mg/ml		1mg/ml	
C		0.5mg/ml		0.5mg/ml	
D		0.25mg/ml		0.25mg/ml	
E		0.125mg/ml		0.125mg/ml	
F		62.5ug/ml		62.5ug/ml	
G	Control	CON		CON	
H	Serum free	SF CON		SF CON	

采集信号设置如下：

步骤	循环次数	间隔时间/次	备注
Step_1	1	1min	测量基数
Step_2	200	15min	检测药物作用下细胞的迁移曲线

实验结果

1.RTCA Plot

(1) 中药提取液对 A549 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 9)

图 9 中药提取液对 A549 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。其中，横坐标表示细胞培养及药物作用时间；纵坐标表示标准化细胞指数（NCI）。细胞指数提示细胞生长状态。在细胞迁移实验中，其值越高，反应迁移至下室的细胞数越多；在细胞增殖实验中，其值越高反映活细胞越多。加药浓度见图中所示。

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

胞增殖动态曲线。

加入的药物浓度高于 55.56ug/ml 时，对细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。而当药物浓度低于 55.56ug/ml 时，对细胞基本没有毒性作用，细胞的迁移却也受到一定的抑制，且当抑制作用呈药物浓度依赖性，因此该药物对 A549 细胞迁移有一定的抑制作用。

(2) 中药提取液对 PC3 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 10)

图 10 中药提取液对 PC3 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。加药浓度见图中所示。

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

该实验说明加入不同浓度的细胞提取液，对细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。但在中药提取液浓度低于 7.11mg/ml 时，在药物的作用下，细胞迁移量高于 control，有刺激迁移的作用。

(3) 中药提取液对 HT1080 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 11)

图 11 中药提取液对 HT1080 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。加药浓度见图中所示。

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

加入的药物浓度高于 18.52ug/ml 时，对细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。而当药物浓度低于或等于 18.52ug/ml 时，对细胞基本没有毒性作用，细胞的迁移却也受到一定的抑制，且当抑制作用呈药物浓度依赖性，因此该药物对 A549 细胞迁移有一定

的抑制作用。

(4) 中药提取液对 HeLa 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 12)

图 12 中药提取液对 HeLa 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。加药浓度见图中所示。

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

加入的药物对细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。该药物对细胞迁移无明显的抑制作用。

(5) 中药提取液对 MDA-MB-231 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 13)

图 13 中药提取液对 MDA-MB-231 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。加药浓度见图中所示。

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

在实验前期 (20hr 前)，加入药物对 MDA-MB-231 细胞的迁移有一定的刺激作用。且当药物浓度低于 0.15mg/ml 时，对细胞没有明显的毒性作用，此时，加入药物量越高，对细胞迁移的刺激作用越强。加入的药物浓度高于 0.4mg/ml 时，对细胞有比较明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。

(6) 中药提取液对 HepG2 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。

(见图 14)

图 14 中药提取液对 HepG2 细胞株体外迁移能力的抑制作用检测。左图为药物抑制细胞迁移曲线，右图为

平行进行的药物对细胞增殖影响的实时动态图。加药浓度见图中所示。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

左图显示细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞迁移能力的反应曲线，Control 为阴性对照，显示正常的细胞迁移动态曲线。

右图是细胞在中药提取液作用下的药物浓度依赖性细胞增殖抑制作用，Control 为阴性对照，显示正常的细胞增殖动态曲线。

加入的药物对细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。该药物对细胞迁移无明显的抑制作用。

(7) HT29 细胞株体外迁移能力检测。

(见图 15)

图 15 HT29 细胞株体外迁移能力检测。如图所示，细胞浓度分别为 80k/well, 40k/well, 20k/well, 10k/well 时，HT29 没有明显的细胞迁移能力，因此无法进行药物对细胞迁移能力的抑制作用检测。

(七) 实验预示的结论及可能的问题和建议

1. 实验检验了中药提取液对人非小细胞肺癌细胞株 (A549)，人大肠癌细胞株 (HT29)，人前列腺细胞株 (PC3)，人成纤维肉瘤细胞株 (HT1080)，人宫颈癌细胞株 (HeLa)，人乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231)，人肝癌细胞株 (HepG2) 7 个不同器官细胞株体外迁移能力的抑制作用，同时平行检测药物对细胞增殖的影响作用，检测细胞增殖的目的是检测药物对细胞迁移能力的抑制不是由其细胞毒性引起的。
2. 高浓度的中药提取液对 A549 和 HT1080 细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。而低浓度时，药物对细胞迁移有一定的抑制作用。
3. 中药提取液对 HeLa 和 HepG2 细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。而低浓度时，药物对细胞迁移无明显的抑制作用。该药物对细胞迁移无抑制作用。
4. 高浓度的中药提取液对 PC3 和 MDA-MB-231 细胞有明显的毒性作用，这种毒性作用下由于上室细胞死亡或者活性降低，迁移至下室的细胞数量减少。而低浓度时，药物对细胞迁移有一定的刺激作用。

实验记录信息

保存于艾森生物 (杭州) 有限公司客户数据库。

编号：1112211551D12, 1112211605P4,1112271558D12,1112271559P4,1112311454P6,
1112311452D12, 1201101537D12, 1201101540P2,1202021535D12,1202021539P1

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

4. 中药提取物对心肌细胞的影响检测

1. 项目简介

本实验采用实时心肌细胞分析系统，在原代新生大鼠心肌细胞上，对贵州中药提供的中药提取液进行药物心脏安全性的检测及评估。本实验所采用的评估参数为时间依赖性的体外心肌细胞跳动频率、心肌细胞跳动幅度以及心肌细胞跳动节律和波型。

2. 背景介绍

2.1. 研究背景

艾森生物是一家致力于研发和制造本公司拥有自主专利的以阻抗技术为基础的实时细胞检测仪的高科技生物公司。艾森公司所创新设计的安装于微孔板底部的微电极传感器，可用于实时、无标记检测细胞状态，具有高通量、高精度、高灵敏度及可定量检测等优点。

由心脏疾病或药物心脏毒性引起的心脏功能损伤威胁着人类的健康和安全。深入揭示重大心脏疾病发生机制，并在此基础上探讨新的有效防治措施，以及在新药开发过程中，揭示部分药物心脏毒性是心脏研究工作者面临的重大挑战。艾森生物与罗氏共同开发的实时心肌细胞分析系统（xCELLigence RTCA Cardio System），可动态监测心肌细胞兴奋收缩偶联反应，并实时短时程/长时程检测并记录心肌细胞跳动电信号。当化合物作用于心肌细胞影响细胞形态和活性，或者导致相关通道开放程度改变，或者引起收缩兴奋传导性发生变化时，可以通过实时心肌细胞分析系统进行实时监测。

该系统可用于筛选影响心肌细胞收缩兴奋传导性变化的药物，包括离子通道和非离子通道靶点药物。艾森公司使用小鼠胚胎干细胞诱导的心肌细胞（CorAt, Axiogenesis）和人 iPS 细胞诱导的心肌细胞对超过 50 种已知化合物进行了验证，稍后又用原代大鼠心肌细胞做了补充验证。研究结果表明，实时心肌细胞分析系统能够可靠和定量检测心律失常化合物以及非 ERG 通道和电压门控性钙通道化合物对心肌细胞的作用。因此，本系统可作为一个早期药物开发过程中的化合物的心脏毒性筛查的工具，进行相关药物高通量筛选和药物毒性研究。

工作内容：

本项目的目标是使用阻抗检测系统，进行药物心脏安全性的检测及评估，评估和鉴定化合物引起的原

代大鼠心肌细胞跳动率变化的能力。

本项目中每种化合物使用 7 个不同浓度进行测试，在检测前后选定不同时间点监测细胞跳动状态，通过观察中药提取液对原代大鼠心肌细胞的剂量依赖性作用来评估其对原代心肌细胞跳动的影响作用。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

2.2.系统介绍

实时心肌细胞分析系统 (xCELLigence RTCA Cardio System) 延续了艾森生物现有的自主专利产权的基于细胞的微电子阻抗检测系统 (包括 RTCA SP, MP, DP 系统) 功能, 可用于功能性地检测心肌细胞跳动和进行药物心肌细胞毒性检测。该系统的核心是将微电子细胞传感器陈列集成到 96 孔培养板

(Cardio-Plate 96) 的底部, 它大大提高了数据采集率, RTCA 心肌细胞分析系统除了拥有类似 RTCA SP, MP 和 DP 系统的长时间检测细胞生长增殖的功能以外, 还能够检测心肌细胞进行兴奋收缩偶联形成的细胞跳动。

RTCA 心肌细胞分析系统由下列部件构成 (见下图):

- A: 实时细胞分析系统控制台 (RTCA Cardio Control Unit)
- B: 实时细胞分析仪 (RTCA Cardio Analyzer)
- C: 细胞检测工作台 (RTCA Cardio Station)
- D: 检测板 (Cardio-Plate 96)

(见图 16)

将细胞接种至 96 孔心肌细胞检测板中, 使细胞贴附于电子传感器表面。RTCA 检测工作台放在二氧化碳细胞培养箱中 (5%CO₂, 37°C), 心肌细胞检测板置于 RTCA 检测工作台上, 并与分析仪和实时细胞分析系统控制台接通。通过检测工作台和分析仪可实时地检测传感器表面的电阻抗信号, 测得的电阻抗信号由 RTCA 实时细胞分析系统控制台和 Cardio 软件进行分析, 实时定量地提供细胞的生物学状态, 包括细胞数量、活力、形态以及细胞骨架动力学变化等信息。

原代大鼠心肌细胞

原代大鼠心肌细胞模型, 可用于许多心肌细胞形态、生化、电生理以及药理学方面的研究。该模型是一种成熟的用于研究药物转运、毒性以及电生理特性的方式。将新生 24h 内的大鼠 10 只, 75%的乙醇消毒后沿胸骨正中入剪, 注意避免剪破消化道以预防污染。无菌剪取心室部位, 仔细玻璃心房及大血管组织, 迅速置于预冷的无血清 DMEM 中, 反复冲洗 3 遍, 洗去残留的血细胞, 将其剪成 0.5mmx0.5mmx0.5mmx

大小的组织块，放入小玻璃瓶中，加入 1.5ml 的 0.07% 的胰蛋白酶和 0.07% 的胶原酶 I 进行消化，收集消化后的上清液，加适量（与上清液等体积）含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化酶的作用，重复上述消化步骤直至组织块消失。经 200 目孔径网筛滤除未消化组织，上清液离心 5min（800r/min），弃上清液，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹散沉淀细胞，接种于培养瓶中，二氧化碳细胞培养箱中（5%CO₂，

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

37℃）中静置培养 60min（差速贴壁），收集未贴壁的细胞，将其以每孔 15000 个细胞的密度接种至明胶处理过的 96 孔心肌细胞检测板中，置于 Cardio 系统上进行检测。

3. 实验设计与方案

4.

3.1. 实验仪器：

本实验采用艾森和罗氏共同开发的实时心肌细胞分析系统。

Product Name	Cat.No.	Description
RTCA Cardio Station	6417019001	RTCA Cardio Station for screening of cardiomyocytes
RTCA Cardio Analyzer	6416993001	RTCA HT Analyzer (incl.Power Cable and Serial Cable)
RTCA Cardio Control Unit	6200184001	Basic Notebook HP 6930p,pre-installed RTCA Cardio Software
E-Plate Cardio 96	6417051001	1×6 plates
E-Plate Cardio 96	6417035001	6×6 plates

3.2. 实验试剂、耗材：

DMEM 培养液：货号 SH30022.08B，Hyclone（中国）。

血清：货号 16000-044，Gibco（美国）。

胰酶：货号 27250-018，Gibco（美国）。

胶原酶：货号 17101-015，Gibco（美国）。

DMSO：货号 D2650，Sigma（美国）。

HBSS solution：14175，Gibco（美国）。

明胶：货号 48732，Sigma（美国）。

PBS：货号 SH30256.01B，Hyclone（中国）。

3.3.药品配制方法

根据客户提供的信息，中药提取液为 20 克药物得到 125ml 药汁，浓度为 160mg/ml。实验过程中根据实际需要的浓度，用培养基稀释后，加入细胞中。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

3.4.实验设计及方案

培养原代新生大鼠心肌细胞，每孔接种 17000 个细胞，接种后置于实时心肌细胞分析系统中按照以下步骤和参数检测（见采集信号设置表），并于 48 小时换液，换液 2 小时待细胞信号稳定后，按化合物相应浓度加入细胞孔内。加药后将细胞重置检测系统中进行实时采集心肌细胞跳动信号。每个化合物采用 2 个或 2 个以上复孔。

		C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
A											
B	中药提取液	7.32 μg/ml	21.95 μg/ml	65.84 μg/ml	0.20 mg/ml	0.59 mg/ml	1.78 mg/ml	5.33 mg/ml	5.33 mg/ml	16.00 mg/ml	CON
C											

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

采集信号设置如下：

步骤	循环次数	间隔时间/次	监测时间/次	备注
0	10	1 分钟	20 秒	测基线
1	48	1 小时	20 秒	细胞贴壁和生长
2	8	15 分钟	20 秒	换液
3	10	1 分钟	20 秒	加药前
4	60	1 分钟	20 秒	加药后

5	12	5 分钟	20 秒	
6	100	15 分钟	20 秒	
7	50	1 小时	20 秒	

3.5.数据分析

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

3.5.1 计算各个时间点的细胞跳动频率 (beating rate), 并绘制跳动曲线 (beating rate vs.time)

3.5.2 分析用参数包括:

- 时间依赖性跳动频率 Time dependent beating rate
- 标准化跳动频率 Normalized beating rate
- 时间依赖性跳动幅度 Time dependent amplitude
- 标准化跳动幅度 Normalized amplitude
- 加药前后细胞整体活性状态 Cell Index
- 时间依赖性跳动节律异常 Time dependent beating rhythm irregularity
- 时间依赖性跳动相似率 Time dependent beating similarity

分析参数定义

每一个细胞跳动相对应一次心肌细胞的肌肉细胞兴奋收缩偶联。该跳动包括顺序出现的正性波峰 (Positive Peaks, +P) 和负性波峰 (Negative Peaks, -P), 单位时间内出现正性波峰和负性波峰的值反映了心肌细胞的跳动特性及其细胞状态。

(见图 17)

心肌细胞跳动模式及相关主要参数说明:

幅度 (Amplitude)

负性波峰和正性波峰之间的细胞指数差值 (图中所示 $Amp-1$, $Amp-2$, $Amp-3$, ..., $Amp-m$)。

跳动期 (Beating Period):

如上图所示, 在一次扫描期 (Sweep Duration) 中正性波峰数目为 m (+P1, +P2, +P3, ..., +Pm), 负性波峰数目为 n (-P1, -P2, -P3, ..., -Pn)。一个正性波峰和负性波峰之间的时间被定义为跳动期 (Beating Period)。

对于每一次跳动, 用上升期 (Rising Time), 下降时间 (Falling Time), IBD_{50} , 上升斜率 (Rising Slope), 和下降斜率 (Falling Slope) 等参数来描述跳动的上升和下降过程。

(见图 18)

3.5.3 心肌细胞模型中参数和数据分析方法

RTCA 心肌细胞分析软件提供有 12 个用于分析心肌细胞跳动特性的参数。在本报告中, 选取适用

参数杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

进行结果分析。

(见图 19)

参数	单位	方法	参数描述
跳动频率 (Beating Rate)	beatings/ min	Positive Peak Counts 计算正性波峰	一分钟内所有正性波峰数
		Negative Peak Counts 计算负性波峰	一分钟内所有负性波峰数
		Positive Peak Period Based 基于正性波峰期	计算每个正性-正性波峰之间的跳动频率
		Negative Peak Period Based 基于负性波峰期	计算每个负性-负性波峰之间的跳动频率
标准化跳动 频率 (Normalized Beating Rate)	N/A	Positive Peak Counts 计算正性波峰	当选择标准化跳动频率时, 出现下拉菜单, 从中选择标准化时间点。 标准化跳动频率为选择时间点的跳动频率与标准化时间点的跳动频率的比值。
		Negative Peak Counts 计算负性波峰	
		Positive Peak Period Based 基于正性波峰期	
		Negative Peak Period Based 基于负性波峰期	
幅度 (Amplitude)	Same as Cell Index	WP-Whole Peak	从一个负性波峰到下一个正性波峰的跳动幅度
		PP-Positive Peak	从基线到正性波峰的幅度
		NP-Negative Peak	从基线到负性波峰的幅度
标准化幅度 (Normalized)	N/A	WP-Whole Peak	当选择标准化跳动幅度时, 出现下拉菜单, 从中选择标准化时间点。 标准化跳动幅度为选择时间点的跳动幅
		PP-Positive Peak	
		NP-Negative Peak	

Amplitude)		度与标准化时间点的跳动幅度的比值。
------------	--	-------------------

4 实验结果

中药提取液仅在 16mg/ml 的浓度下对细胞活性产生影响，其它浓度对细胞活性无影响。该提取液对心肌细胞跳动的影响为：短期内对大鼠原代心室肌细胞跳动频率、幅度和节律没有明显的影响作用，作用时间较长后对心室肌细胞有一定的心脏毒性作用。尤其在高浓度（16mg/ml），在作用 2 小时后会可引起心肌细胞

参数杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

跳动频率降低，作用 6 小时后引起细胞跳动完全停止。

低浓度的药物（5.33 和 1.78mg/ml）在加药后 2-12 小时区间内引起心肌细胞跳动频率略降低并幅度增大，12 小时时候跳动恢复正常。

药物浓度低于 0.59mg/ml 对心肌细胞跳动无明显影响。

4.1 中药提取液对新生大鼠原代心肌细胞活性影响

（见图 20）

中药提取液：（H2O ctrl, blank ct, 7.32ug/ml, 21.95ug/ml,65.84ug/ml,0.20mg/ml, 0.59mg/ml,1.78mg/ml,5.33mg/ml,16.00mg/ml）

中药提取液抑制原代心肌细胞活性动态检测。上图为细胞生长及药物作用实时动态图。其中，横坐标表示细胞培养及药物作用时间；纵坐标表示标准化细胞指数（NCI）。细胞指数提示细胞生长状态。其值越高反映活细胞越多。箭头所指为加药时间，加药浓度见图中所示。该图显示细胞在药物作用下的药物浓度依赖性动态反应曲线，ctrl 为阴性对照，显示正常的细胞生长动态曲线。（注：H2O ctrl 对照孔加入 10%（与最高浓度的药物原液量相同）的 H2O）

从中药提取液对新生大鼠原代心肌细胞活性影响的结果可见，当给予高浓度药物时（16mg/ml），一段时间后细胞指数迅速下降，反映高浓度药物具有明显细胞毒性，可导致细胞形态变化、贴壁不良甚至死亡。

而当药物浓度低于 5.32mg/ml 时，药物对细胞活性的影响不明显。但是此浓度的药物却会引起心肌细胞在跳动频率和跳动幅度上一定程度的变化。

4.2 原代心肌细胞随加药后时间的跳动曲线变化

（见图 21）

4.3 中药提取液对新生大鼠原代心肌细胞毒性作用小结

($\mu\text{g/ml}$)	1600	5330	1780	590	200	65.84	21.95	7.32	CON
Before treatment	√	√	√	√	√	√	√	√	√
10min	√	√	√	√	√	√	√	√	√
30min	√	√	√	√	√	√	√	√	√
1h	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2h	X	√	√	√	√	√	√	√	√
6h	XX	X	X	√	√	√	√	√	√
12h	XX	X	X	√	√	√	√	√	√
18h	XX	X	X	√	√	√	√	√	√
24h	XX	X	X	√	√	√	√	√	√

注：药物对细胞跳动的影响，XX，无跳动；X，明显异常；√，正常跳动。

4.4 中药提取液影响跳动频率 (Beating rate) 的作用

(见图 22)

该图为心肌细胞跳动频率的中药提取物药物浓度和时间依赖性变化量效关系。使用的参数为标准化跳动频率 (Normalized Beating Rate, NBR)，参数计算方法为选择时间点的跳动频率与标准化时间点 (0min) 的跳动频率的比值。

其中图 A 为加药 1h 以内细胞跳动频率的变化过程；图 B 为药物在加药前 10min 至加药后 24h 之间全程细胞跳动频率变化过程。

从图中可见，加药前 10min 内细胞跳动频率一致，均一性好。加药后短期内药物对细胞跳动无明显影响，2hr 后高浓度药物引起细胞跳动频率降低，直至 6hr 后跳动完全停止，5.33mg/ml 药物在一段时间内引起跳动频率略降低，药物浓度小于 1.78mg/ml 对细胞跳动则无明显影响。说明该药物高浓度时对有明显的影响心脏跳动作用，低浓度对心脏跳动作用无严重影响。

4.5 中药提取液影响跳动幅度 (Amplitude) 的作用

(见图 23)

该图为心肌细胞跳动幅度的药物浓度和时间依赖性变化。使用的参数为标准化跳动幅度 (Normalized Amplitude, NA)，参数计算方法为选择时间点的跳动幅度与标准化时间点 (0min) 的跳动频率的比值。

其中图 A 为加药 1h 以内细胞跳动幅度的变化过程；图 B 为药物在加药前 10min 至加药后 24h 之间全程细胞跳动幅度变化过程。

从图中可见，加药前 10min 内细胞跳动幅度稳定，加药后短期内药物对细胞跳动幅度无明显影响，2hr 后高浓度 16mg/ml 药物引起细胞跳动频率降低，直至 6hr 后跳动完全停止，5.33mg/ml 药物引起跳动频率略增高，药物浓度小于 1.78mg/ml 对细胞跳动则无明显影响。说明该药物高浓度时对有明显的影响心脏跳动作用，低浓度对心脏跳动作用无严重影响。

杭州高通新药筛选中心

艾森生物

Hangzhou high Throughput drug screening center

4.6 中药提取液影响新生大鼠原代心肌细胞跳动频率和幅度的 IC50

(见图 24)

上图 4 个时间点的 IC50 拟合曲线 (beating rate/Amplitude)

加药后时间	Beating rate		Amplitude	
	IC50 (mg/ml)	Square R	IC50 (mg/ml)	Square R
6hr	6.88	0.985	9.88	0.983
12hr	7.00	0.990	10.65	0.987
24hr	6.68	0.970	7.72	0.539

根据细胞跳动频率和幅度计算 3 个时间点 IC50 值 (beating rate/Amplitude)。

5. 实验预示的结论及可能的问题和建议

5.1 该药物在高浓度时 (16mg/ml) 迅速影响细胞活性，导致细胞死亡。

5.2 该中药以浓度依赖的方式影响原代新生大鼠心肌细胞跳动的频率和幅度。高浓度 (16mg/ml) 时会导致细胞在 6hr 左右以后停止跳动；而中等浓度 (5.33mg/ml; 1.78mg/ml) 时可以引起细胞在 6hr 左右以后跳动频率略变慢，幅度略增大。说明该药物高浓度时对有明显的影响心脏跳动作用，低浓度对心脏跳动作用无严重影响。

5.3 未见药物引起的特异性离子通道相关心肌细胞跳动波形。

以上结果仅供参考，具体机制还需进一步筛选研究。

实验记录信息

保存于艾森生物（杭州）有限公司客户数据库。

编号：1112121715CD。

0-1	PCT/RQ/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	PCT-SAFE	01/0. 20. 5. 19
0-1-1	软件版本		
0-2	国际申请号	PCT/CN2012/086605	
0-3	申请人或代理人的档案号	ZB12-04F	

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	3
1-2	行号:	25
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CCTCC 中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2011年 4月 02日 (02. 04. 2011)
1-3-4	保藏号	CCTCC P201102
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	是
0-4-1	授权官员	李莉

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权 利 要 求

1. 一种含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物，其特征在于，该组合物的原料为奇珍草。
2. 根据权利要求1所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物，其特征在于，所述的“该组合物的原料为奇珍草，是指：采用奇珍草全株脱水、干燥、粉碎得到的粉末；或者该奇珍草的提取物。
3. 根据权利要求2所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物，其特征在于，所述的该奇珍草的提取物是指以下方式得到的提取物中的一种：
奇珍草水煎液，浓缩、干燥得到的粉末；
奇珍草水煎液，经乙醇提取得到的醇提液，或其再浓缩、干燥得到的粉末；
奇珍草全株或奇珍草水煎液经有机溶剂萃取得到的萃取液，或其再浓缩、干燥得到的粉末；
奇珍草全株或奇珍草水煎液经二氧化碳超临界萃取得到的萃取液，或其再浓缩、干燥得到的粉末；
奇珍草全株或奇珍草水液提取得到挥发油。
4. 根据权利要求1或2或3所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物，其特征在于，所述的含有天然阿霉素与人环氧酶的药用组合物中，还含有制药领域所允许的辅料。
5. 根据权利要求4所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物，其特征在于，所述的制药领域所允许的辅料是指：作为片剂时的赋形剂、调味剂或抗氧化剂，作为胶囊时的抗氧化剂或稳定剂；作为口服液或糖浆时的调味剂、稳定剂或抗氧化剂，作为外用药的膏剂时的乳化剂或凡士林；作为注射剂时的乳化剂、溶剂或稳定剂。
6. 权利要求1所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物的制备方法，其特征在于，步骤如下：
 - (1). 奇珍草全株洗净；
 - (2). 将步骤(1)得到干净奇珍草全株脱水、干燥、粉碎得到的粉末；
所述的粉末的粒度为 125um，5.8um，120 目的细筛；
所述的步骤(2)或者采用以下各步骤之一提取奇珍草的提取物：
 - (2)-1. 奇珍草水煎液，或其再浓缩、干燥得到粉末；
 - (2)-2. 奇珍草水煎液，经乙醇提取得到的醇提液，或其再浓缩、干燥得到的粉末
 - (2)-3. 奇珍草全株或奇珍草水煎液经有机溶剂萃取得到的萃取液，或其再浓缩、干燥得到的粉末；

- (2)-4.奇珍草全株或奇珍草水煎液经二氧化碳超临界萃取得到的萃取液，或其再浓缩、干燥得到的粉末；
- (2)-5.奇珍草全株提取挥发油；
- (3).将步骤(2)、步骤(2)-1、步骤(2)-2、步骤(2)-3、步骤(2)-4 或(2)-5.得到的粉末和/或挥发油，与药用辅料混合；分别制成所需要的剂型；
- (4). 杀菌；
- (5). 检验；
- (6). 包装。
7. 权利要求 1 所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物在制备治疗肾炎的药物中的应用。
8. 权利要求 1 所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物在制备治疗胆囊炎及胆息肉的药物中的应用。
9. 权利要求 1 所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。
10. 权利要求 1 所述的含有天然人环氧酶及天然阿霉素或类阿霉素的药用组合物在制备治疗消炎止痛的药物中的应用。

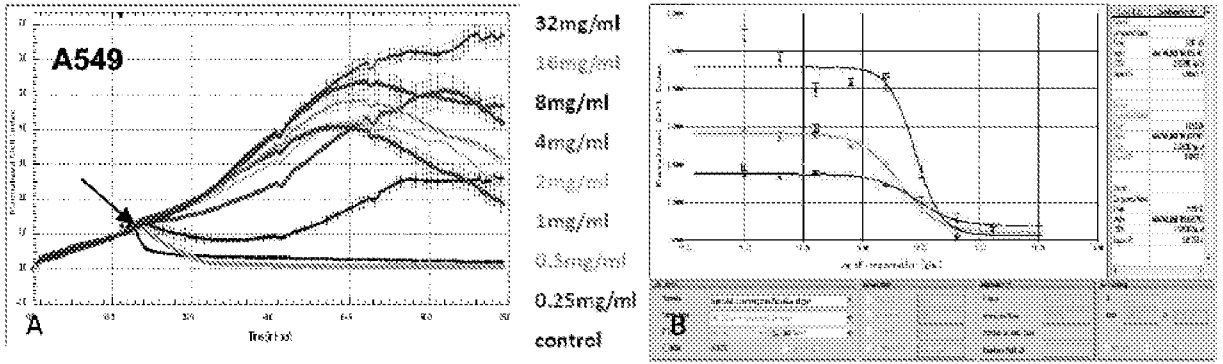


图 1

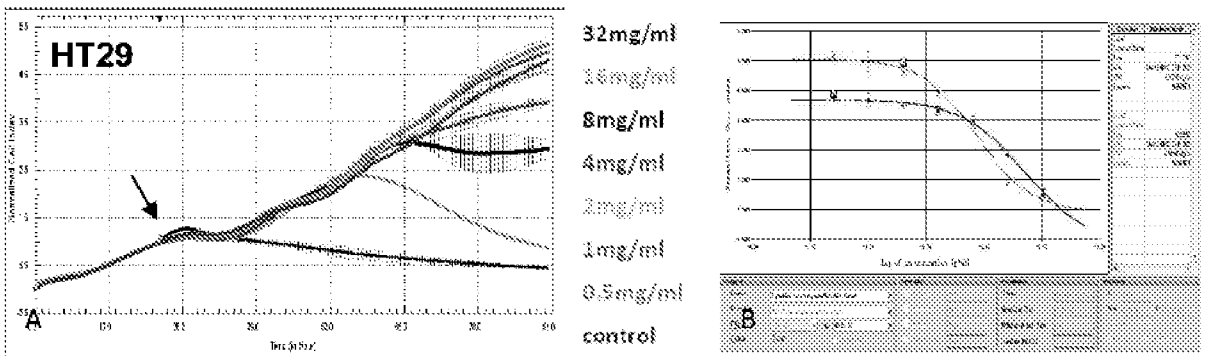


图 2

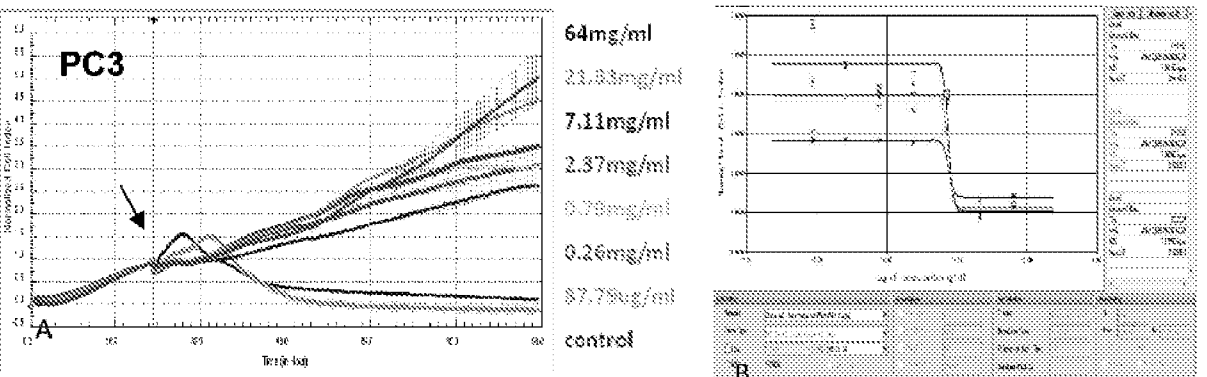
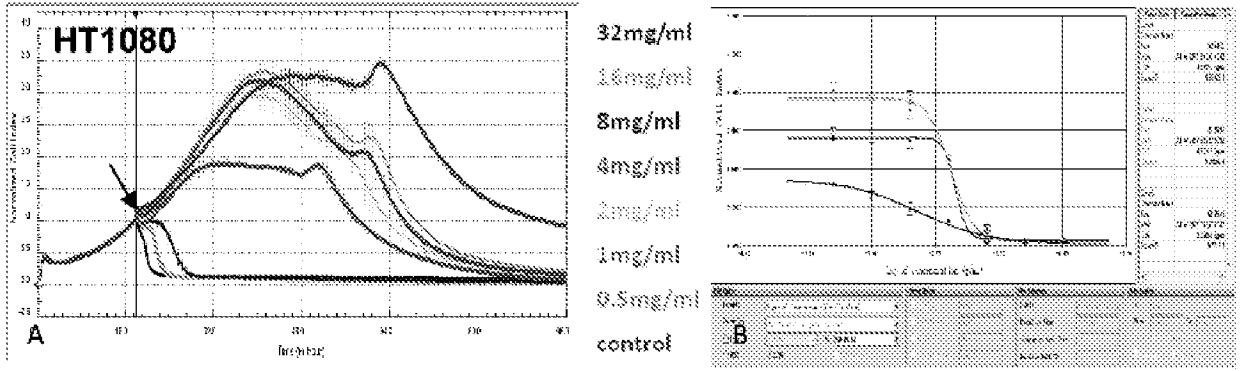
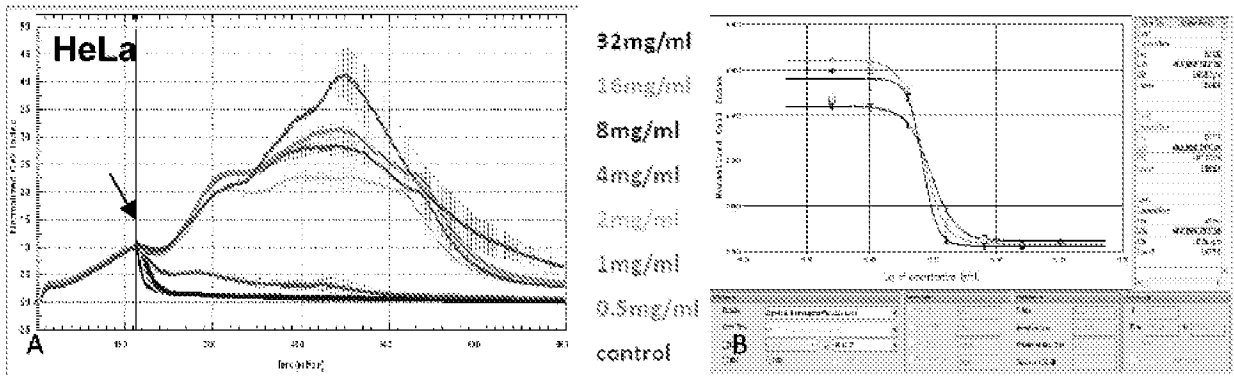


图 3



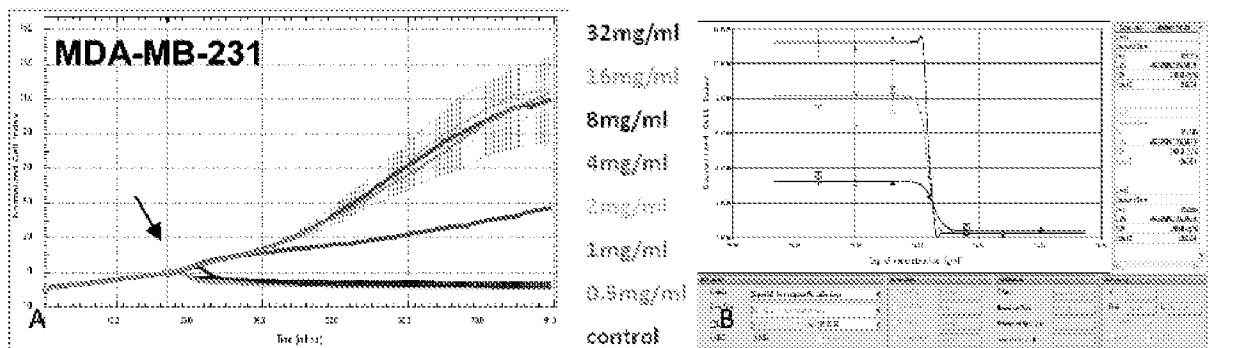
IC50 12hrs 4.58mg/ml IC50 24hrs 4.22mg/ml IC50 48hrs 2.33mg/ml

图 4



IC50 12hrs 3.06mg/ml IC50 24hrs 2.62mg/ml IC50 48hrs 2.62mg/ml

图 5



IC50 24hrs 4.36mg/ml IC50 48hrs 3.90mg/ml IC50 72hrs 3.96mg/ml

图 6

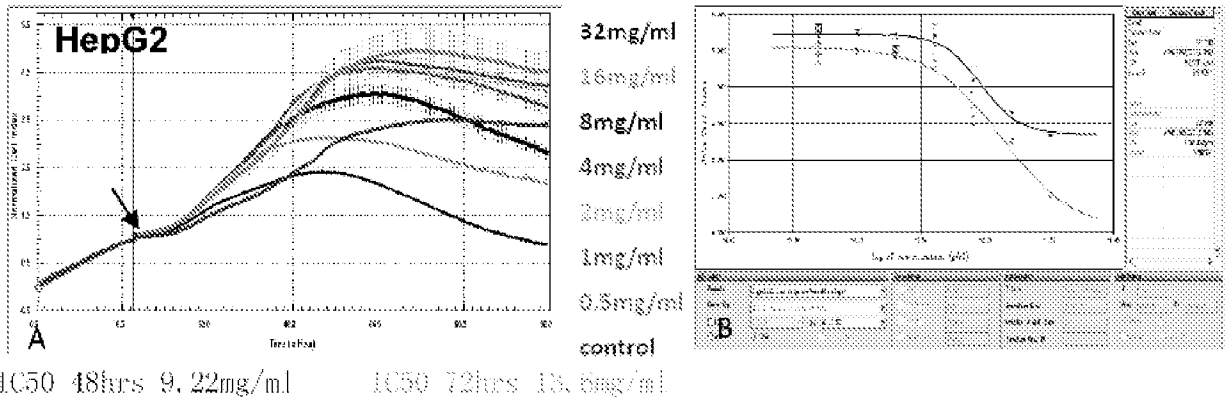


图 7

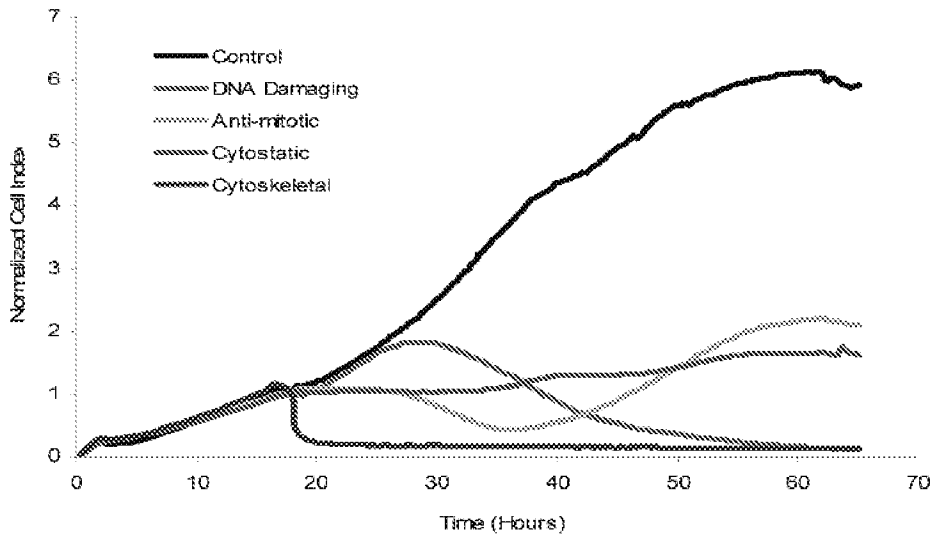


图 8

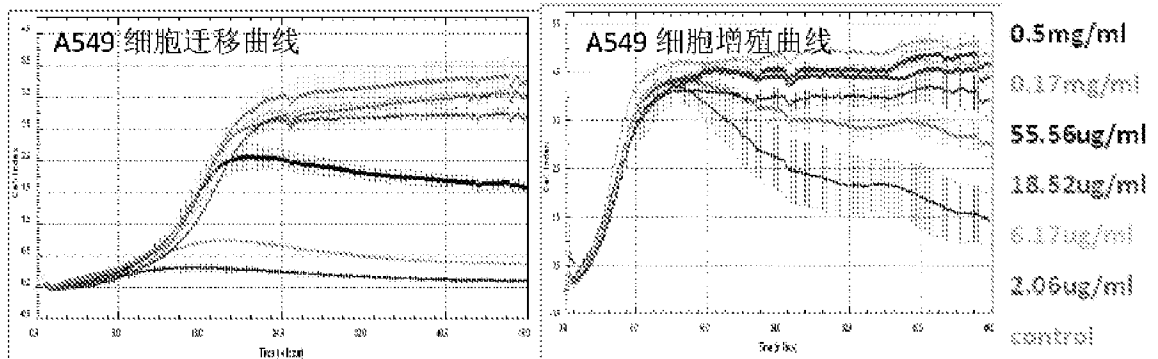


图 9

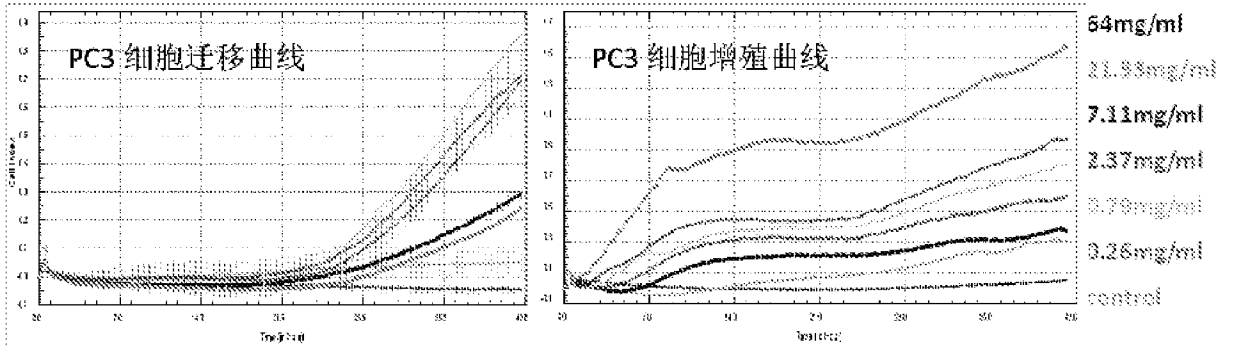


图 10

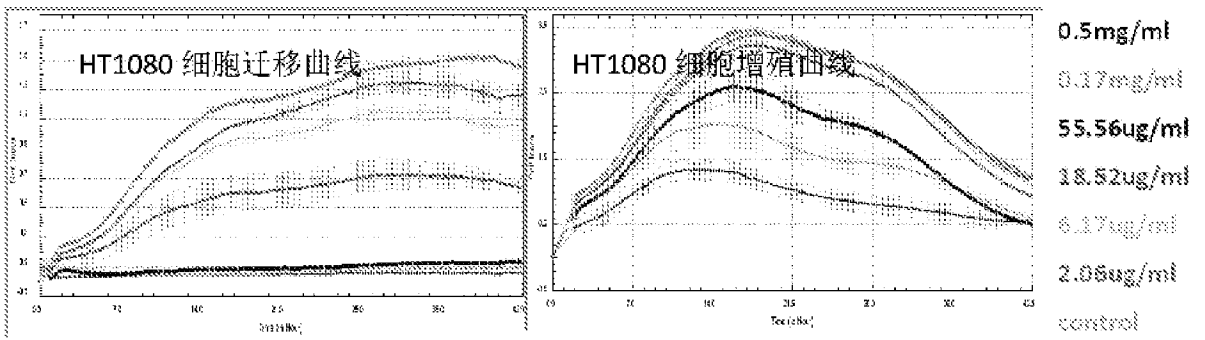


图 11

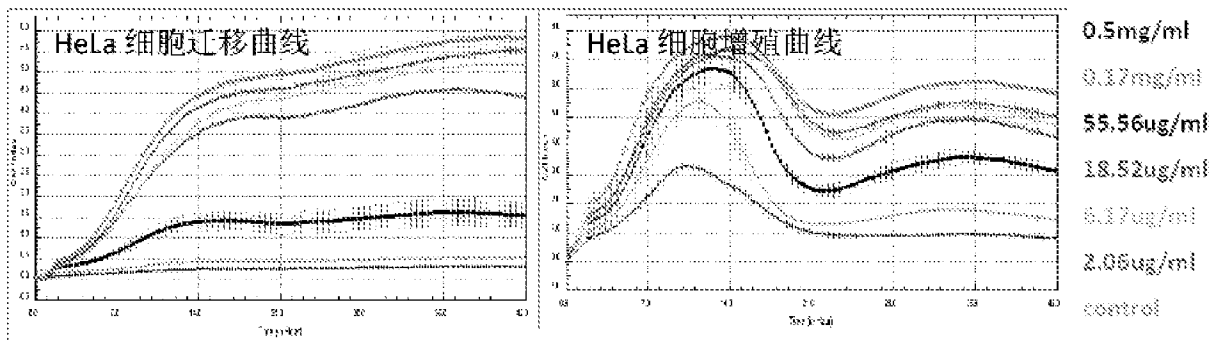


图 12

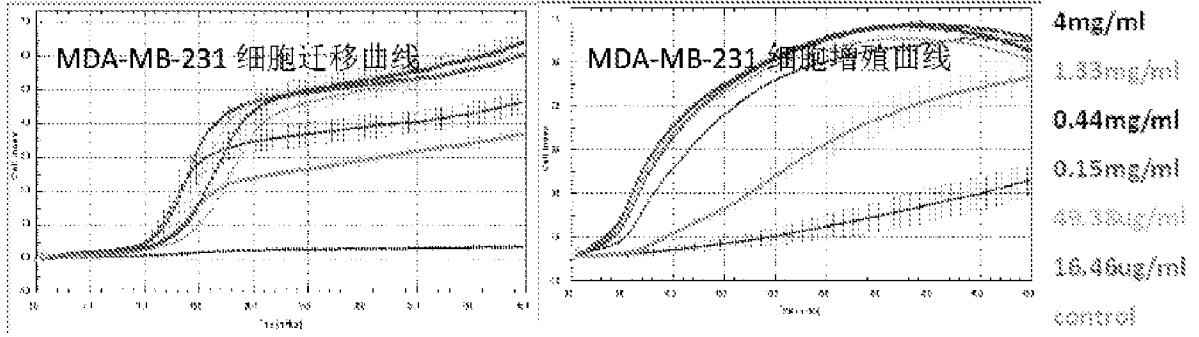


图 13

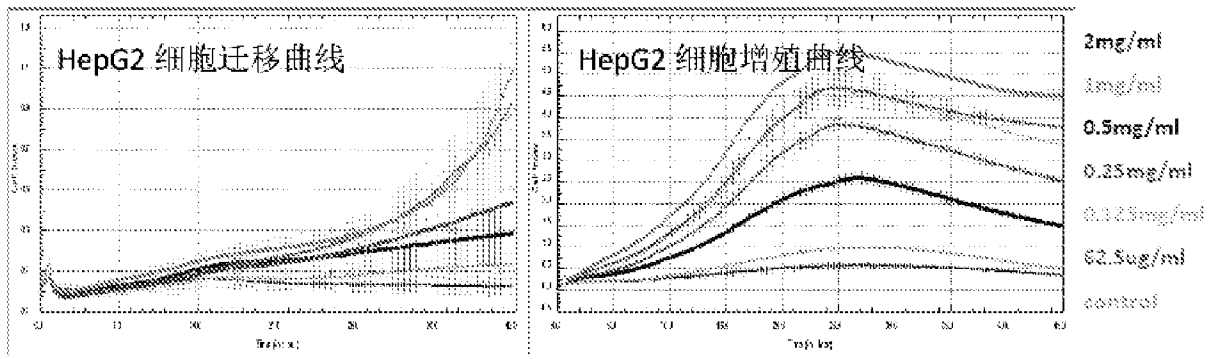


图 14

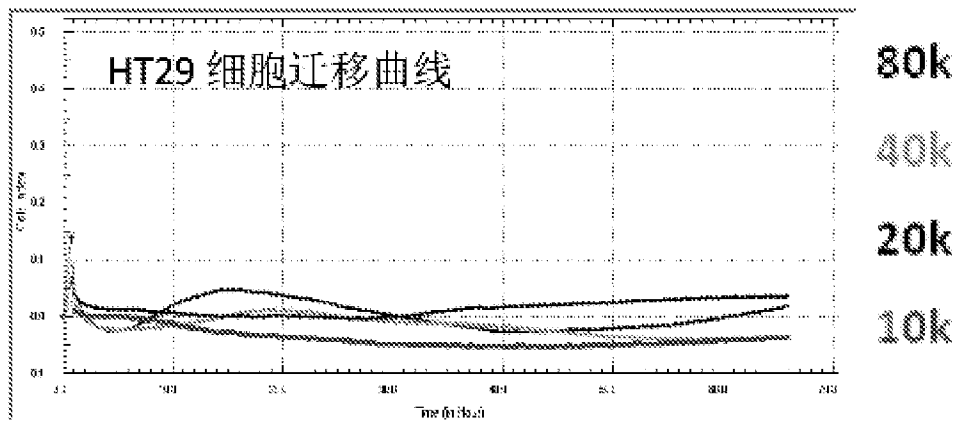


图 15

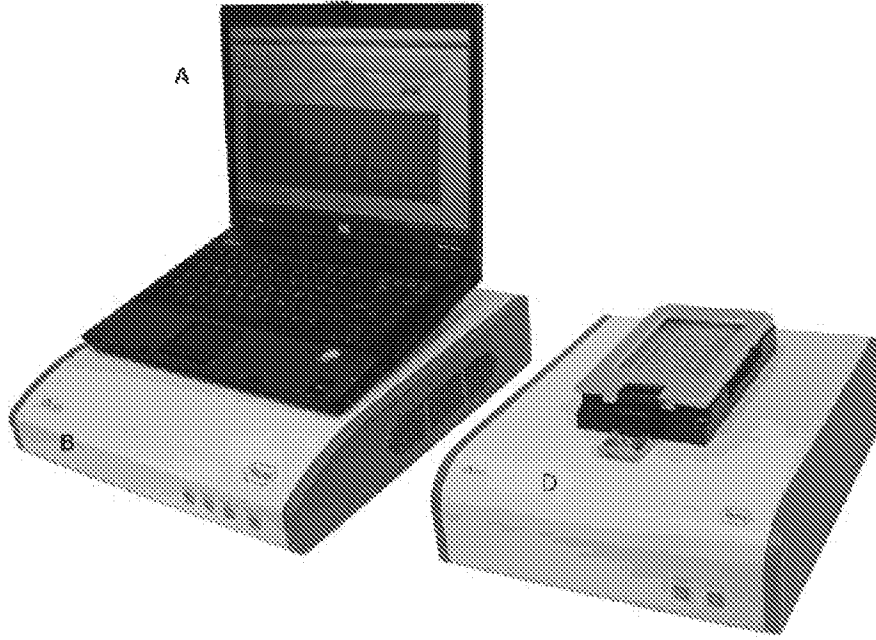


图 16

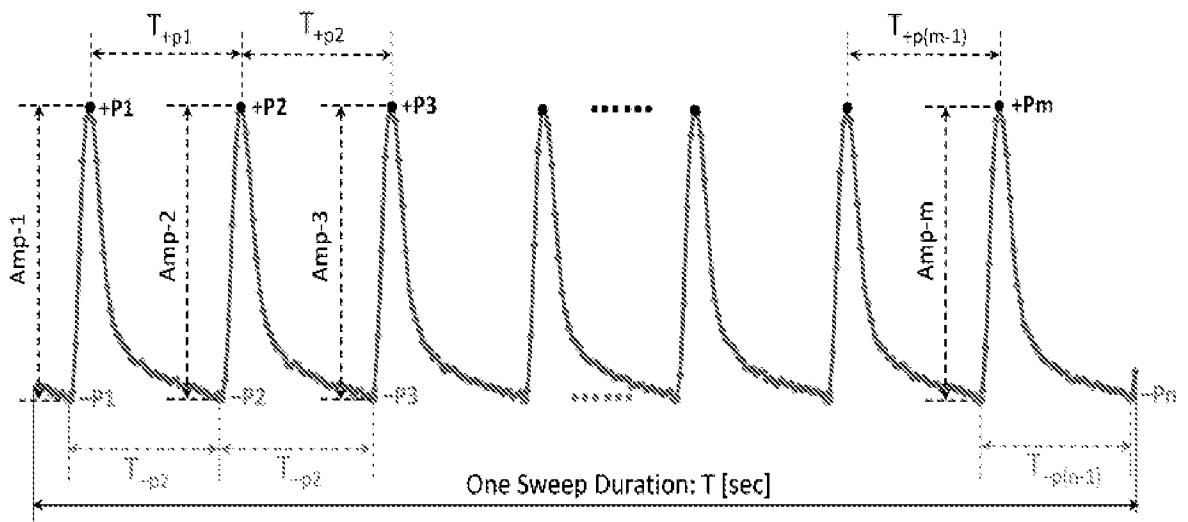


图 17

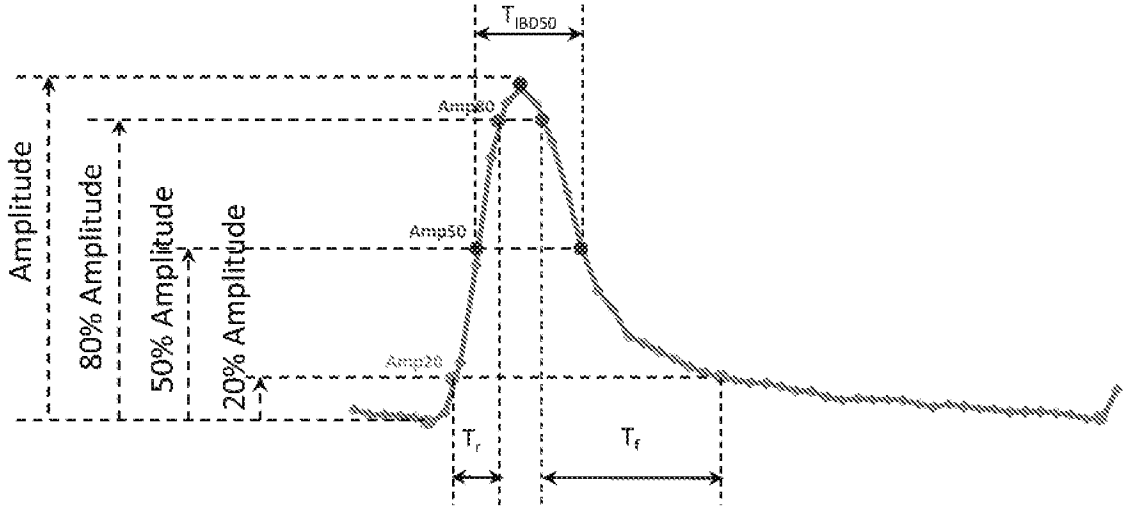


图 18

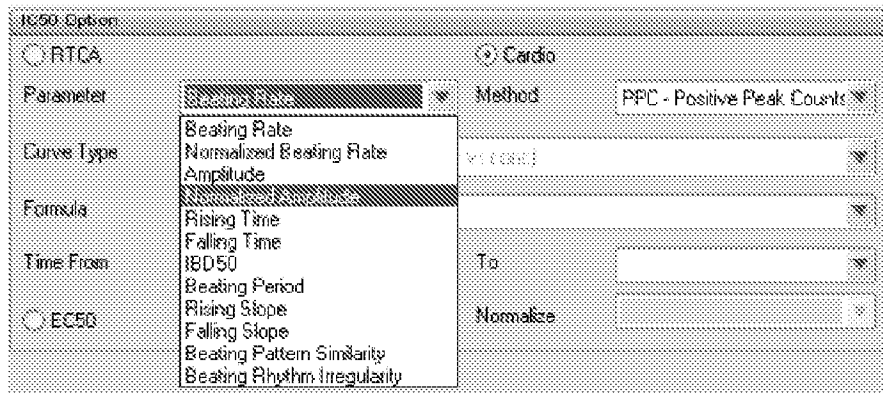


图 19

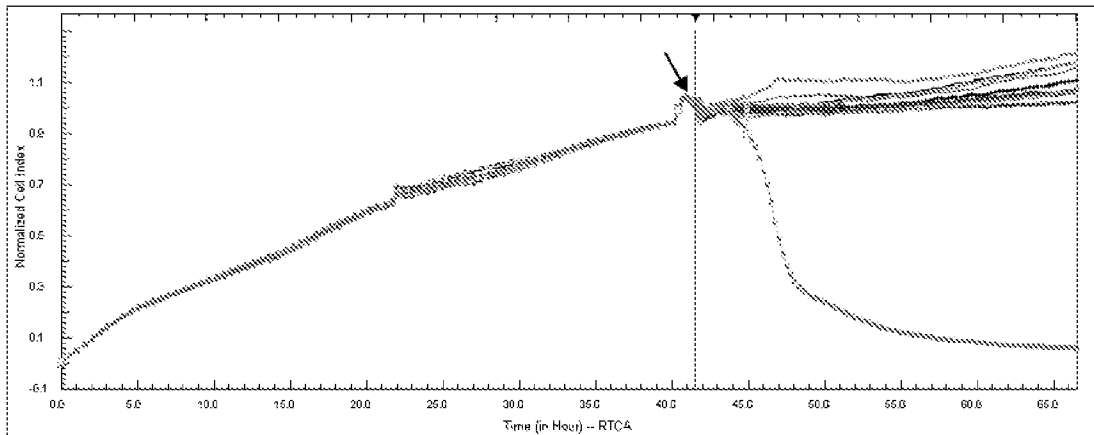


图 20

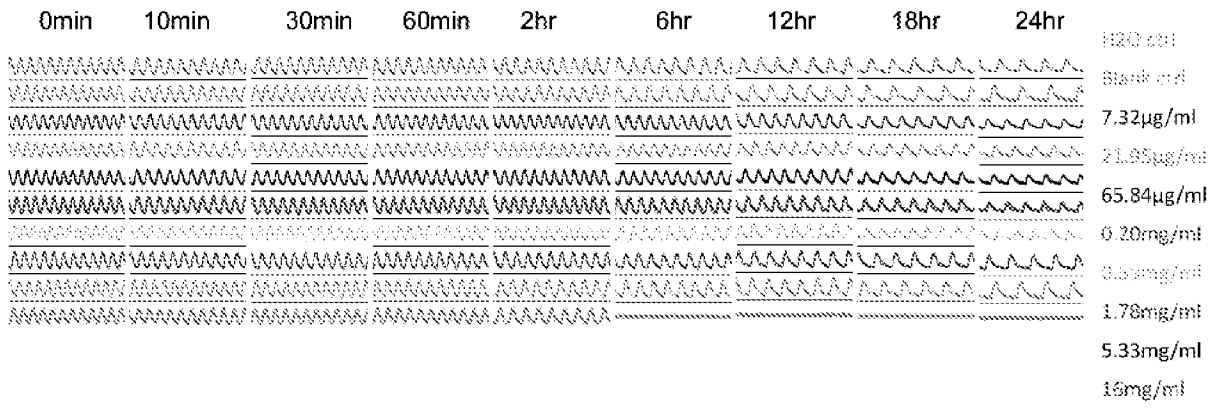


图 21

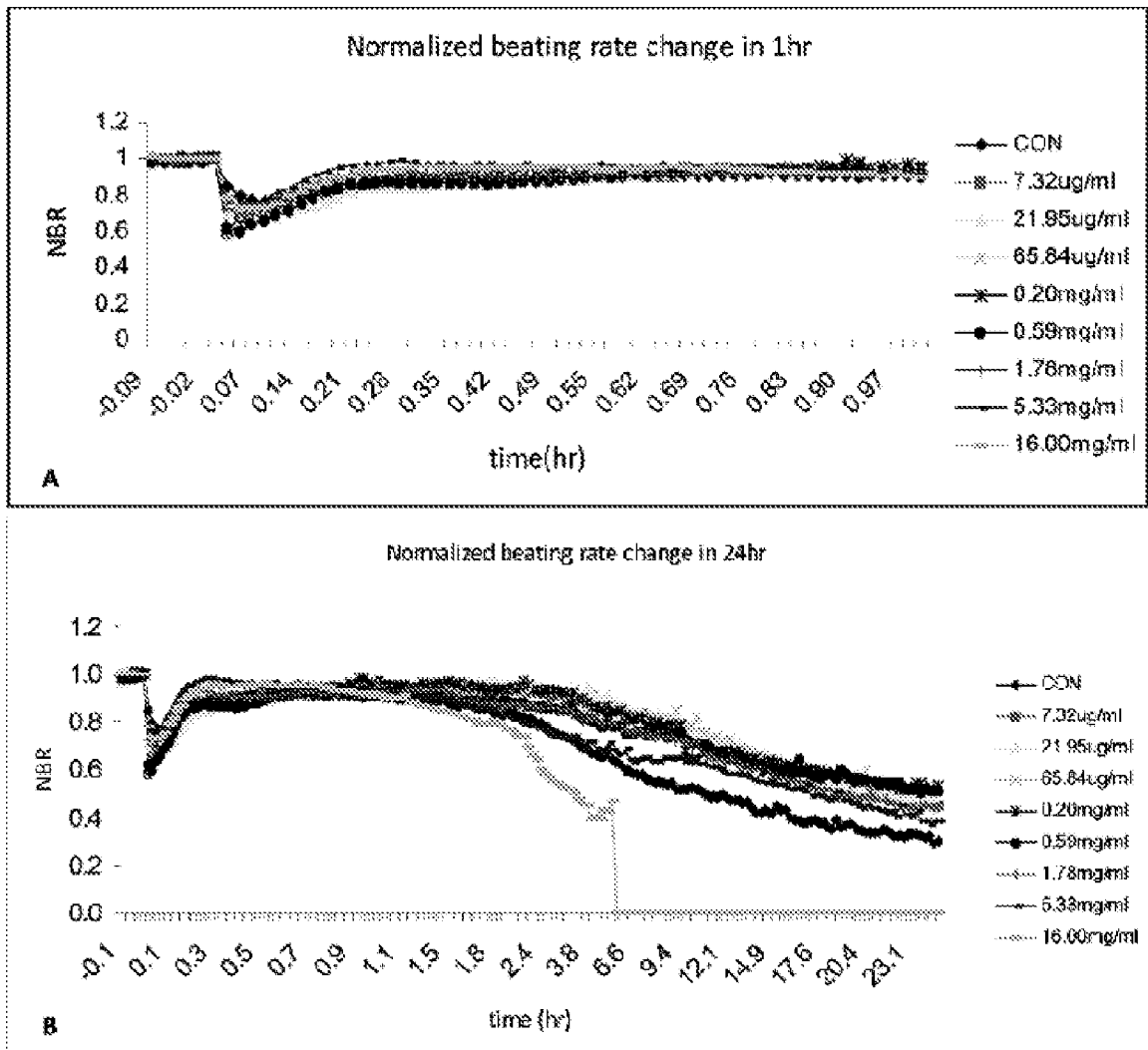


图 22

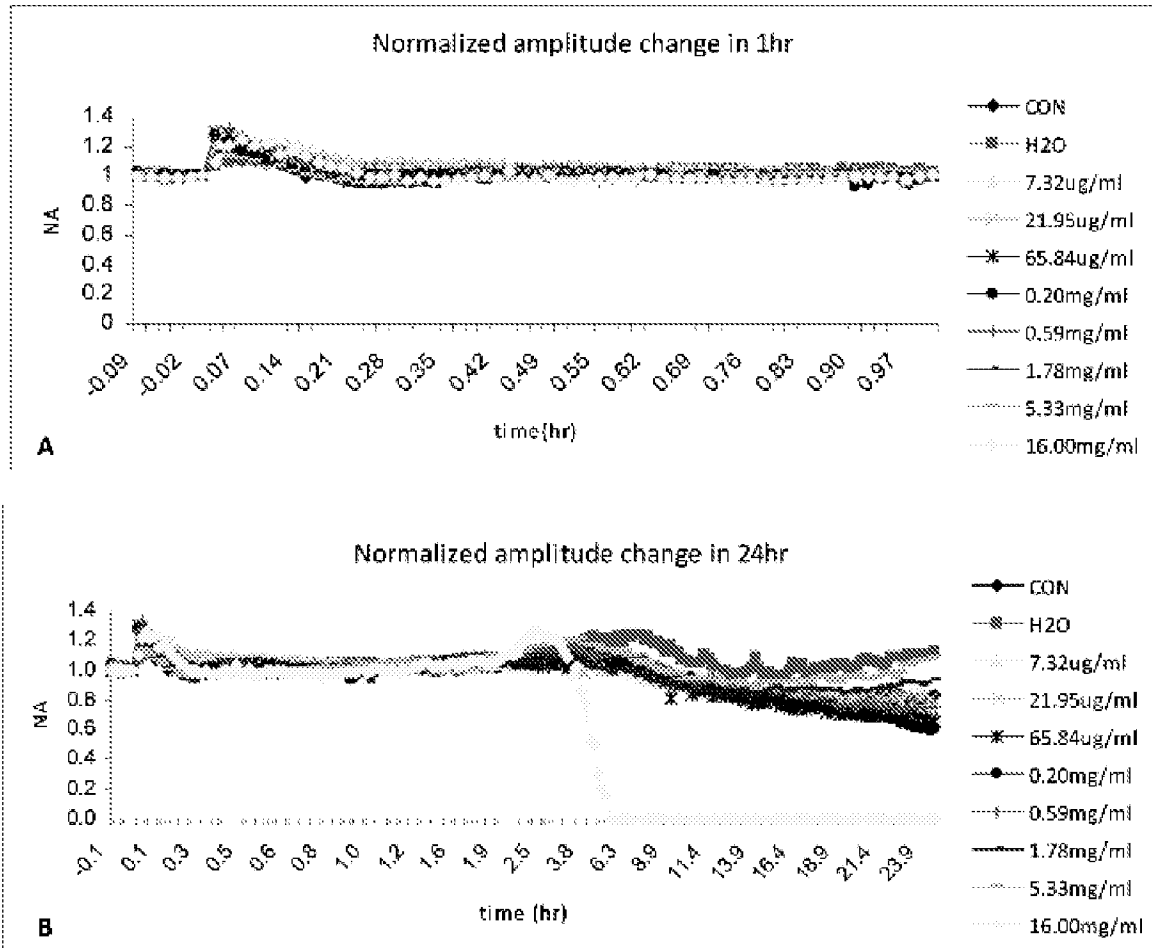


图 23

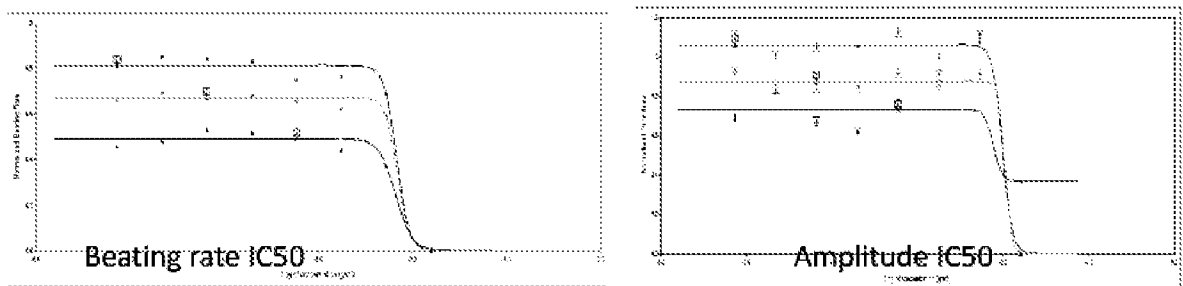


图 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/086605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: A61K, A61P

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

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

WPI, EPODOC, CNKI, CNTXT, CNPAT, CNABS, CPRSABS, CJFD, SIPONPL, CSCD, DWPI, SIPOABS, VEN: qizhencao, salvia plectranthoides, salvia, Cyclooxygenase, adriamycin, nephritis, cholecystitis, polyps, inflammation, analgesia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Xiaoming et al., Studies on the Chemical Constituents from Salvia Plectranthoides Griff, JOURNAL OF HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, June 2002, vol. 31, no. 3, page 254, paragraph 1.2	1-6
X	LIU, Xiaolong et al., Development and Utilization of Medicinal Plant Resources of Salvia in Anhui, CHINA JOURNAL OF CHINESE MATERIA MEDICA, February 1996, vol. 21, no. 2, page 73, paragraphs 1.9-1.10	7-10
A	The whole document	8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
06 March 2013 (06.03.2013)

Date of mailing of the international search report
16 May 2013 (16.05.2013)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
ZHAI, Yu
Telephone No.: (86-10) **62411066**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/086605

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/537 (2006.01) i

A61P 1/16 (2006.01) i

A61P 13/12 (2006.01) i

A61P 29/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A. 主题的分类
参见附加页
按照国际专利分类(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)
IPC A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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,CNKI,CNTXT,CNPAT,CNABS,CPRSABS,CJFD,SIPONPL,CSCD,DWPI,SIPOABS,VEN (奇珍草 qizhencao, 长冠鼠尾草 salvia plectranthoides, 鼠尾草属 salvia, 人环氧酶(环加氧酶) Cyclooxygenase, 阿霉素 adriamycin, 肾炎 nephritis, 胆囊炎 cholecystitis, 息肉 polyps, 炎症 inflammation, 止痛 analgesia)

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
X	王晓明等, 长冠鼠尾草的化学成分研究, 华中科技大学学报, 6月2002, 第31卷, 第3期, 第254页第1.2段	1-6
X	刘晓龙等, 安徽鼠尾草属药用植物资源及开发利用, 中国中药杂志, 2月1996, 第21卷, 第2期, 第73页1.9—1.10段	7-10
A	全文	8

其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

<p>* 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, 或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(如具体说明的) “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</p>	<p>“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</p>
---	---

国际检索实际完成的日期 06.3月2013(06.03.2013)	国际检索报告邮寄日期 16.5月2013(16.05.2013)
--------------------------------------	--

ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 翟羽 电话号码: (86-10) 62411066
---	--

主题的分类

A61K36/537(2006.01)i

A61P1/16(2006.01)i

A61P13/12(2006.01)i

A61P29/00(2006.01)i

A61P35/00(2006.01)i