



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101323635 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200810058723.1

(22) 申请日 2008.07.25

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 张颖君 王一飞 廖彭莹 裴赢
杨崇仁 王东

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(56) 对比文件

CN 1696144 A, 2005.11.16, 全文.

CN 1414011 A, 2003.04.30, 全文.

NGUYEN Minh Duc, 等. Saponins From
Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* Ha
et Grushv, Collected in Central Vietnam, II.
《Chem. Pharm. Bull.》. 1994, 第 42 卷 (第 1
期), 634 - 640.

审查员 刘姝晶

(51) Int. Cl.

C07J 17/00 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

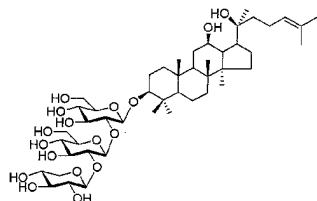
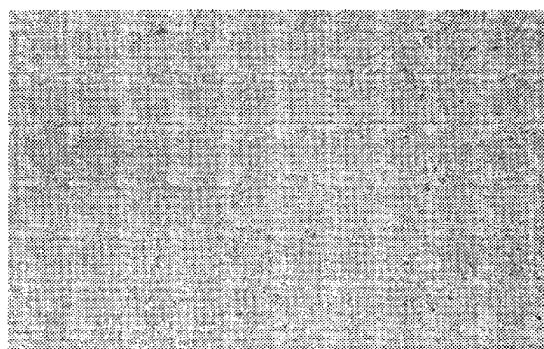
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

三七皂苷 ST-4, 其药物组合物和其制备方法
及其应用

(57) 摘要

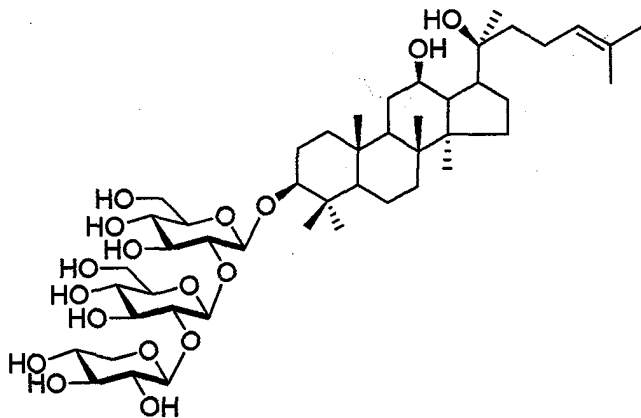
提供结构式 (I) 所示的一种新的达玛烷型三
萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4(notoginsenoside
ST-4), 及其制备方法, 并提供其在制备抗单纯
疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 药物中的应用。以单纯
疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 毒株和人胚肺成纤维细
胞 (MRC-5) 细胞实验对象, 进行本发明新化合
物三七皂苷 ST-4 的抗病毒活性实验, 结果证明
三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 感染的细胞具有治疗作
用; 并可降低 HSV-1 对 MRC-5 细胞的感染性, 可
在制备抗单纯疱疹病毒 I 型药物中得到应用。



(I)

1. 制备结构式 (I) 所示的达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4 的方法, 取三七, 经粉碎成颗粒状后, 置于高温 120℃ 下蒸制 12 小时得熟三七, 然后用工业乙醇对其回流提取四次, 回收乙醇后浓缩得浸膏, 浸膏用水溶解, 经大孔树脂柱层析, 甲醇洗脱得总皂苷, 再经 200-300 目硅胶柱层析, 85 : 15 : 1 的氯仿 - 甲醇 - 水洗脱, 共得 9 个组分, 组分 7 经硅胶柱、反相柱反复层析,

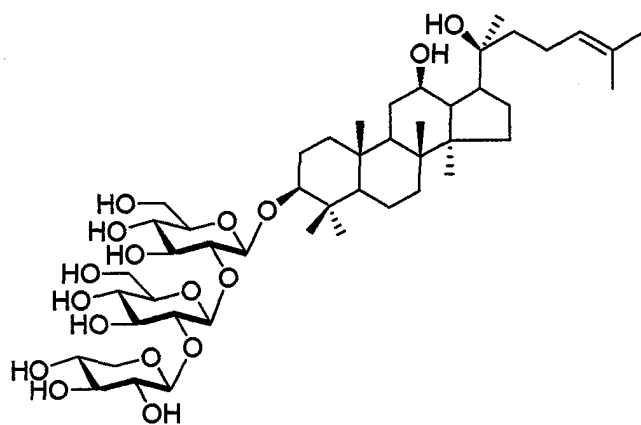
得到三七皂苷 ST-4,



(I)。

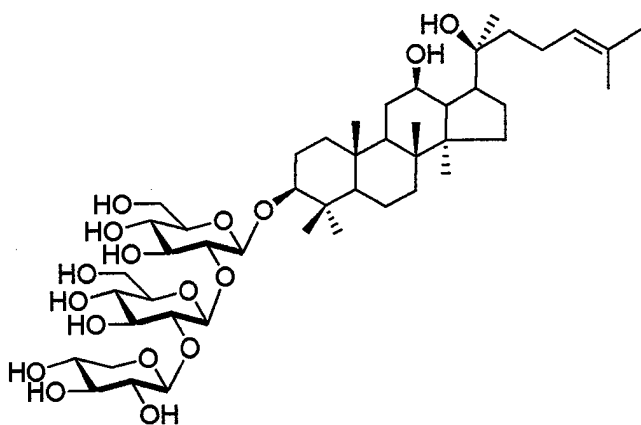
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于三七粉碎成颗粒状后, 用双层纱布包裹, 置于高温 120℃ 的高压锅, 蒸制 12 小时后得熟三七, 用工业乙醇回流提取 4 次, 减压回收溶剂浓缩后得浸膏, 将浸膏用水溶解, 用 D 101 大孔吸附树脂分两次进行柱层析, 先用水洗脱至流出液 Molish 反应呈阴性, 再用工业甲醇洗脱即得粗皂苷; 将粗皂苷用硅胶 200-300 目拌样, 经硅胶柱层析, 用 85 : 15 : 1 氯仿 - 甲醇 - 水洗脱, 共得 9 个组分, 组分 7 经硅胶柱层析, 从梯度 80 : 20 : 2 氯仿 - 甲醇 - 水逐步增加极性, 得到组分 7, 经硅胶柱层析, 再从 80 : 20 : 2 氯仿 - 甲醇 - 水逐步增加极性, 得到组分 3, 经硅胶柱层析, 从 80 : 20 : 2 氯仿 - 甲醇 - 水逐步增加极性洗脱, 得到组分 1, 组分 1 用反相 RP-18 分离, 流动相为 70 : 30 甲醇 - 水, 逐步增加甲醇浓度, 得第 10 号流分, 将此流分再行反相 RP-18 柱层析, 流动相为 75 : 25 甲醇 - 水, 逐步增加甲醇浓度, 得到的 1 号流分, 最后经 MCI CHP20P 反相柱纯化, 流动相为 80 : 20 甲醇 - 水, 逐步增加甲醇浓度, 最终得到达玛烷型四环三萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4。

3. 式 (I) 所示的达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4 在制备抗单纯疱疹病毒 1 型药物中的应用,



(I)。

4. 式 (I) 所示的达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4 在制备治疗单纯疱疹病毒 1 型相关疾病的药物中的应用,



(I)。

三七皂苷 ST-4, 其药物组合和其制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物化合物及药物领域,具体地,涉及一种新的达玛烷型三萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4 及其制备方法,以及该化合物用于制备抗单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 药物的用途。

背景技术

[0002] 单纯疱疹病毒是 DNA 病毒,属于疱疹病毒科 α 病毒亚科。根据抗原性的差别可分为 I 型和 II 型。单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 主要引起生殖器以外的皮肤、粘膜 (口腔粘膜) 和器官 (脑) 的感染。临床表现主要是粘膜或皮肤局部集聚的疱疹,偶尔也可发生严重的全身性疾病,累及内脏。单纯疱疹原发感染愈后病毒基因潜伏于神经节,当机体抵抗力低下时,病毒基因被激活并开始繁殖,病情反复发作。

[0003] 单纯疱疹病毒为典型疱疹病毒形态,球形,有包膜,颗粒直径 120-150nm,内有核衣壳,直径 100-110nm,包膜和核衣壳之间有无定形纤维组织皮质层,内有核心,核心内有病毒 DNA 和蛋白质。

[0004] 单纯疱疹病毒在全球广泛分布,人类是唯一的宿主。感染主要通过人群与易感者之间的密切接触,无季节差异。机体感染病毒后可产生抗体,抗体不能清除病毒,但可作为了解 HSV 感染流行病学的指标。

[0005] 单纯疱疹病毒感染在人群中广泛存在,初次原发感染绝大多数形成隐性感染,无临床症状,感染后产生中和抗体,60%-90%的人群中抗体检测为阳性,但不能清除病毒。少数感染者出现黏膜、皮肤复发性疱疹病灶,新生儿或免疫力低下者感染后可发展为疱疹性脑炎或全身性感染。唇疱疹为单纯疱疹病毒 1 型常见的皮肤感染,局部出现疱疹病灶,一般自愈,可复发。也可引起皮肤疱疹、湿疹。眼角膜炎为单纯疱疹病毒常见的黏膜感染,单纯疱疹病毒 1 型感染引起角膜炎,发病率较高。原发性感染多为急性树枝状角膜炎,愈后经常反复发作,病变深入角膜基层组织,发展为角膜溃疡,影响视力,甚至导致失明,发作病程长达数月。新生儿或免疫力低下者感染疱疹病毒,可侵染神经系统,引发脑炎,病情严重、未治疗病人病死率高达 70%,治疗后也多发生后遗症。严重者可引起全身性单纯疱疹病毒感染,病死率极高。

[0006] 目前临床治疗主要采用局部皮肤护理治疗,同时结合一些口服抗病毒药物等。临床适用的中成药主要是利用其清热解毒的药效结合治疗。中药三七药理作用广泛,曾有报道以三七为主要原料的“云南白药”可用于治疗带状疱疹等疾病。但三七皂苷类单体化合物对单纯疱疹病毒 I 型的抑制作用未见有过报道。

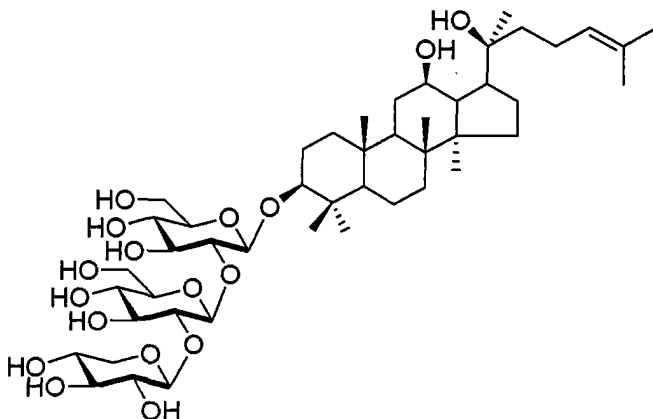
发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种新的达玛烷型三萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 及其制备方法,以及该化合物用于制备抗单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 药物的用途。

[0008] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0009] 如结构式(I)所示的达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4,

[0010]



(I)。

[0011] 药物组合物,含有三七皂苷 ST-4 和药物学上可接受的载体。

[0012] 制备化合物三七皂苷 ST-4 的方法,取三七,经粉碎成颗粒状后,置于高温 120℃ 下蒸制 12 小时得熟三七,然后用工业乙醇对其回流提取四次,回收乙醇后浓缩得浸膏,浸膏用水溶解,经大孔树脂柱层析,甲醇洗脱得总皂苷,再经 200-300 目硅胶柱层析,85 : 15 : 1 的氯仿-甲醇-水洗脱,共得 9 个组分,组分 7 经硅胶柱、反相柱反复层析,得到三七皂苷 ST-4。

[0013] 更具体的方法为:三七粉碎成颗粒状后,用双层纱布包裹,置于高温 120℃ 的高压锅,蒸制 12 小时后得熟三七,用工业乙醇回流提取 4 次,减压回收溶剂浓缩后得浸膏,将浸膏用水溶解,用 D101 大孔吸附树脂分两次进行柱层析,先用水洗脱至流出液 Molish 反应呈阴性,再用工业甲醇洗脱即得粗皂苷;将粗皂苷用硅胶 200-300 目拌样,经硅胶柱层析,用 85 : 15 : 1 氯仿-甲醇-水洗脱,共得 9 个组分,组分 7 经硅胶柱层析,从梯度 80 : 20 : 2 氯仿-甲醇-水逐步增加极性,得到组分 7,经硅胶柱层析,再从 80 : 20 : 2 氯仿-甲醇-水逐步增加极性,得到组分 3,经硅胶柱层析,从 80 : 20 : 2 氯仿-甲醇-水逐步增加极性洗脱,得到组分 1,组分 1 用反相 RP-18 分离,流动相为 70 : 30 甲醇-水,逐步增加甲醇浓度,得第 10 号流分,将此流分再行反相 RP-18 柱层析,流动相为 75 : 25 甲醇-水,逐步增加甲醇浓度,得到的 1 号流分,最后经 MCI CHP20P 反相柱纯化,流动相为 80 : 20 甲醇-水,逐步增加甲醇浓度,最终得到达玛烷型四环三萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4。

[0014] 三七皂苷 ST-4 在制备抗单纯疱疹病毒 1 型药物中的应用。

[0015] 三七皂苷 ST-4 在制备治疗单纯疱疹病毒 1 型相关疾病的药物中的应用。

[0016] 本发明的新化合物三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 是一种从五加科人参属药用植物三七的炮制品中分离提取的新的三萜皂苷类有效成分,经试验证明可显著抑制单纯疱疹病毒 I 型,具体地说是以经炮制的三七为原料提取分离的一种新的达玛烷型三萜皂苷。

[0017] 本发明首先对五加科人参属植物三七的炮制品进行了系统的化学研究,利用多种分离手段,包括大孔树脂柱层析、硅胶柱层析、反相硅胶柱层析等,深入研究了三七炮制品

的化学成分,从中分离鉴定了 31 个化学成分,其中 1 个新的达玛烷型三萜皂苷的结构鉴定为 $3\beta, 12\beta, 20(S)$ -三羟基-达玛-24-烯-3- O - β -D-木吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 [$3\beta, 12\beta, 20(S)$ -trihydroxydammar-24-ene-3- O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside], 命名为三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4)。

[0018] 本发明以单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 毒株和人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 细胞为实验对象,观察三七皂苷 ST-4 的抗单纯疱疹病毒 1 型活性。

[0019] 结果证明,(1) 三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 感染的细胞具有一定的预防作用;(2) 三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 感染的细胞具有治疗作用;(3) 三七皂苷 ST-4 可降低 HSV-1 对 MRC-5 细胞的感染性。

[0020] 基于上述研究结果,本发明证实了三七皂苷 ST-4 具有预防和治疗单纯疱疹病毒 1 型感染引起的疾病的用途,可用于制备抗单纯疱疹病毒 1 型的药物。本发明提供了用于治疗单纯疱疹病毒 1 型相关疾病的药物组合物,包括有效治疗剂量的作为活性成分的三七皂苷 ST-4,以及药物学上可接受的载体。

[0021] 本发明所述的治疗单纯疱疹病毒 1 型相关疾病的药物组合物,由三七皂苷 ST-4 与药学上可接受的载体制备的药物剂型包括片剂、胶囊、口服液、针剂或粉针剂。由于新达玛烷型三萜皂苷(三七皂苷 ST-4)可从三七及相关药材中提取分离,而片剂、胶囊、口服液、针剂或粉针剂等药物剂型的制备也是本领域的常规知识,因此,由三七皂苷 ST-4 与相应载体制备的各种药物剂型也能够由本领域技术人员容易实现。

[0022] 上文所述的药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,例如:稀释剂、赋形剂如水等,填充剂如淀粉、蔗糖等;黏合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂黏土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、以及和聚乙二醇等。另外还可以在组合物中加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0023] 本发明化合物可以组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时,可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、胶囊等,制成液体制剂如水或油悬浮剂或其他液体制剂如糖浆、酞剂等;用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等。优选的形式是片剂、胶囊和注射剂。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合,然后将其制成所需的剂型。

[0024] 本发明的药物组合物优选含有重量比为 0.1%~99.5%的活性成分,最优选含有重量比为 0.5%~95%的活性成分。

[0025] 本发明化合物的施用量可根据用药途径、患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化,其日剂量可以是 0.01~10mg/kg 体重,优选 0.1~5mg/kg 体重。可以一次或多次施用。

[0026] 本发明的有益效果在于:新达玛烷型三萜皂苷(三七皂苷 ST-4)对 HSV-1 感染的细胞具有预防和治疗作用。三七皂苷 ST-4 可降低对 MRC-5 细胞的感染性。将三七皂苷 ST-4 用于制备治疗单纯疱疹病毒 1 型相关疾病的药物,具有重要的开发应用前景。

附图说明

- [0027] 图 1 为正常细胞对照组的显微镜图 (10x10 倍) ;
[0028] 图 2 为病毒感染对照组的显微镜图 (10x10 倍) ;
[0029] 图 3 为加药治疗组的显微镜图 (10x10 倍)。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明做进一步阐述,但不对其有任何限制。

[0031] 实施例 1. 一种新的达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 的分离提取:

[0032] 5kg 三七购于云南,将其粉碎成颗粒状后,用双层纱布包裹,置于高压锅中,将温度控制在高温 120℃,蒸制 12 小时后即得熟三七。用工业乙醇回流提取 (5L×4),减压回收溶剂浓缩后得总浸膏 778g。将浸膏用水溶解,用 D101 大孔吸附树脂 (90×8.5cm) 分两次进行柱层析,先用水洗脱至流出液 Molish 反应呈阴性,再用工业甲醇洗脱即得粗皂苷 440g。

[0033] 将粗皂苷用硅胶 (200-300 目) 约 500g 拌样,经硅胶 (200-300 目) 柱层析,用氯仿-甲醇-水 (85:15:1) 洗脱,共得 9 个组分。组分 7 (38g) 经硅胶柱层析,从梯度氯仿-甲醇-水 (80:20:2) 逐步增加极性,得到组分 7 (7.6g),再经硅胶柱层析,也是从氯仿-甲醇-水 (80:20:2) 逐步增加极性,得到组分 3 (5.2g),再经硅胶柱层析,从氯仿-甲醇-水 (80:20:2) 逐步增加极性洗脱,得到组分 1 (1.4g)。此组分用反相 RP-18 分离,流动相为甲醇-水 (70:30),逐步增加甲醇浓度,得第 10 号流分。将此流分再行反相 RP-18 柱层析,流动相为甲醇-水 (75:25),逐步增加甲醇浓度,得到的 1 号流分,最后经 MCI CHP20P 反相柱纯化,流动相为甲醇-水 (80:20),逐步增加甲醇浓度,最终得到新的达玛烷型四环三萜皂苷化合物三七皂苷 ST-4 (31mg)。

[0034] 达玛烷型三萜皂苷三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 的结构鉴定:

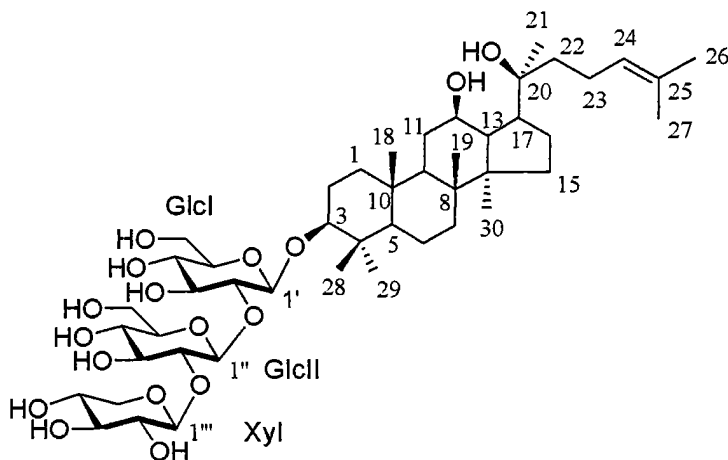
[0035] 三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 为白色无定形粉末,高分辨质谱 HRESIMS 显示 m/z 915.5323 $[M-H]^-$ (calcd. for 915.5317, $C_{47}H_{79}O_{17}$),由此推出其分子式为 $C_{47}H_{80}O_{17}$ 。负离子 FAB-MS 给出 784 $[M-132]^-$, 622 $[M-132-162]^-$ 特征碎片峰,表明末端五碳糖基和六碳糖基的存在,并且五碳糖应为末端糖基。同时, 1H NMR 谱中,观察到 δ_H 4.92 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), δ_H 5.51 (d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), δ_H 5.39 (d, $J = 6.5$ Hz, H-1''') 三个端基质子信号; ^{13}C NMR 谱中,观察到 δ_C 104.8, δ_C 103.2, δ_C 106.5 三个端基碳信号,以及 δ_C 62.9, δ_C 63.0, δ_C 67.5 三个仲碳信号,提示该化合物中可能存在两个葡萄糖基和一个木糖基。在 HMBC 谱中,观察到 δ_H 4.92 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1') 与 δ_C 88.9 (C-3); δ_H 5.51 (d, $J = 7.5$ Hz, H-1'') 与 δ_C 83.0 (C-2') 以及 δ_H 5.39 (d, $J = 6.5$ Hz, H-1''') 与 δ_C 84.6 (C-2'') 的相关,由此证明了该化合物的糖基连接方式。

[0036] 与三七皂苷 Ft₁ 的碳谱数据比较,发现二者结构相近。唯一区别是三七皂苷 Ft₁ 中 C-17, C-21, C-22 的化学位移分别为 δ_C 50.7, 22.8, 43.2; 而该化合物中 C-17, C-21, C-22 的化学位移则分别为 δ_C 54.8, 27.1, 35.9。由此确证该化合物与三七皂苷 Ft₁ 的不同在于 C-20 位构象,三七皂苷 Ft₁ 的 20 位为 R 构象,而该化合物应为 S 构象。

[0037] 综上所述,该化合物的结构鉴定为 3 β , 12 β , 20(S)-三羟基-达玛-24-烯-3-O- β -D-木吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡

萄吡喃糖苷 [3 β ,12 β ,20(S)-trihydroxydammar-24-ene-3-O- β -D-xylopyranosyl-1-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside], 命名为三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4), 化学结构式如式 (I) 所示。

[0038]



[0039] 式 (I) 三七皂苷 ST-4 的化学结构式

[0040] 三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4): 分子式为 $C_{47}H_{80}O_{17}$, 易溶于甲醇、吡啶等有机溶剂, 熔点 187-191 $^{\circ}C$, 旋光值 $[\alpha]_D^{26} +3.5^{\circ}$ (c 0.21, MeOH), 红外光谱数据为 3422, 2942, 2878, 1637, 1452, 1376, 1307, 1077, 1043, 896 cm^{-1} , FAB-MS(negative)m/z 916[M] $^{-}$, 784[M-132] $^{-}$, 622[M-132-162] $^{-}$; HRESIMS(negative)m/z 915.5323[M-H] $^{-}$ (calcd. for 915.5317, $C_{47}H_{79}O_{17}$). 1H -NMR(500MHz, in ppm, in C_5D_5N) 和 ^{13}C -NMR(125MHz, δ in ppm, in C_5D_5N) 波谱数据见表 1。

[0041] 表 1 新化合物三七皂苷 ST-4 的 1H 和 ^{13}C -NMR 化学位移值 (δ in ppm, J in Hz, in C_5D_5N)

[0042]

No.	¹ H NMR data	¹³ C NMR data	No.	¹ H NMR data	¹³ C NMR data
1	0.75 1.49 m	m, 39.2	25		130.8
2	2.18 1.81 m	m, 26.8	26	1.66 s	25.9
3	3.29 (4.5 11.5)	dd 88.9	27	1.63 s	17.8
4		39.8	28	1.29 s	28.2
5	0.69 m	56.4	29	1.11 s	16.7
6	1.51 1.38 m	m, 18.5	30	0.96 s	17.1
7	1.47 1.24 m	m, 35.2	Glc-1'	4.92 d (8.0)	104.8
8		40.0	Glc-2'	4.11 m	83.0
9	1.39 m	50.4	Glc-3'	4.35 m	78.4
10		37.0	Glc-4'	4.13 m	71.1
11	2.03 1.53 m	m, 32.1	Glc-5'	3.95 m	78.7
12	3.95 m	71.2	Glc-6'	4.57br. d (7.5), 4.35 m	62.9
13	2.02 m	48.6	Glc-1' '	5.51 d (7.5)	103.2
14		51.8	Glc-2' '	4.19 m	84.6
15	1.60 1.06 m	m, 31.4	Glc-3' '	4.28 m	77.8
16	1.91 1.35 m	m, 26.9	Glc-4' '	4.20 m	71.8
17	2.35 m	54.8	Glc-5' '	3.87 m	78.0
18	0.78 s	16.4	Glc-6' '	4.49 br. d	63.0
19	0.96 s	15.9	Xyl-1' ' '	5.39 d (6.5)	106.5
20		73.0	Xyl-2' ' '	4.11 m	76.0
21	1.43 s	27.1	Xyl-3' ' '	4.31 m	77.8
22	2.03 1.71 m	m, 35.9	Xyl-4' ' '	4.12 m	70.8
23	2.62 2.31 m	m, 23.1	Xyl-5' ' '	4.33 m, 3.68 m	67.5
24	5.30 (7.0)	t 126.4			

[0043] 实施例 2、三七皂苷 ST-4(notoginsenoside ST-4) 对单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 感染 Vero 细胞的影响试验:

[0044] (一) 材料:

[0045] 1、器材:进口 24 孔培养板(平底)、倒置显微镜、CO₂ 细胞培养箱、微量可调加样器、培养基为 MEM(含青链双抗各 250U/ml),除菌过滤前用碳酸氢钠调 pH 至 7.0-7.2、小牛

血清经 56℃ 30min 灭活补体,除菌分装;消化液为 5%胰蛋白酶 5ml+0.01mol/L (pH7.2) PBS 93ml,除菌分装,低温保存。

[0046] 2、病毒和细胞株:单纯疱疹病毒 1 型毒株是来源于美国 ATCC (VR733),由申请人所在的实验室保存。MRC-5 细胞购自中国科学院细胞库,由申请人所在的实验室保存。MRC-5 细胞系来自 14 周龄男性胎儿的正常肺组织,是正常二倍体细胞系,是疱疹病毒敏感细胞。MRC-5 细胞用含 10%胎牛血清的 MEM 培养基连续传代 3 次保持在对数生长期,供实验用,维持液为含 2%小牛血清的 MEM 培养基。

[0047] 3、药物:将 10mg 药物先加入 100 μ l DMSO(二甲基亚砷)溶解后配成储存液,-20℃保存备用。阳性对照药无环鸟苷 (ACV) 为湖北科益药业股份有限公司产品,临用前用 MEM 维持液稀释。

[0048] (二) 三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 预防作用:

[0049] 药物稀释:1mg 样品溶于 10 μ l DMSO 配制药母液,-20℃长期保存,使用时用 MEM 维持液稀释,倍比稀释为 50 μ g/ml,25 μ g/ml,12.5 μ g/ml,6.25 μ g/ml,3.125 μ g/ml。

[0050] 阳性对照药 ACV 稀释:药物 10mg 样品溶于 100 μ l 去离子水配制药母液,4℃长期保存,使用时用 MEM 维持液稀释,稀释为 50 μ g/ml,25 μ g/ml,12.5 μ g/ml,6.25 μ g/ml,3.125 μ g/ml。

[0051] 分别以不同浓度的三七皂苷 ST-4 维持液和 ACV 维持液各 100 μ l/孔加到单层 MRC-5 细胞的孔中,每个浓度设 4 个复孔,培养 2 小时后,接种 100TCID₅₀ HSV-1 病毒液 100 μ l/孔,置于 5% CO₂ 细胞培养箱继续培养 2 小时,病毒完全吸附到细胞后,加入完全覆盖液 800 μ l,培养 72 小时,观察药物处理后的细胞对 HSV-1 感染的影响,同时设定病毒对照组、正常细胞对照组,实验重复 3 次。

[0052] 试验分析方法:72 小时后,病毒对照组的细胞不再出现空斑时,弃去维持液,以 10%甲醛溶液固定 30 分钟,然后用 5%结晶紫溶液染色后作空斑计数,计算空斑抑制率。

[0053] 空斑抑制率(%) = (病毒对照组空斑数 - 药物处理组空斑数) / 病毒对照组空斑数 \times 100%

[0054] 计算 IC₅₀(半数抑制浓度),计算方法为加权直线回归法,从而估测三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 的感染有无预防作用。

[0055] 结果显示:三七皂苷 ST-4 药物对预防 HSV-1 感染的半数有效剂量 (IC₅₀) 为:200.02 μ g/ml。

[0056] (三) 对 HSV-1 感染治疗作用:

[0057] 三七皂苷 ST-4 药物和阳性对照药物 ACV 的稀释方法同上。

[0058] 先接种 100TCID₅₀ 的 HSV-1 于 24 孔板的单层 MRC-5 细胞上,在 37℃、CO₂ 细胞培养箱吸附 2 小时,再加入相应浓度三七皂苷 ST-4 稀释液和 ACV,100 μ l/孔,每个浓度设定 4 个复孔,置于 5% CO₂ 细胞培养箱继续培养 72 小时,观察空斑形成的情况。同时设病毒对照组、正常细胞对照组,实验重复 3 次。

[0059] 试验分析方法:统计不同的药物浓度作用下的空斑形成数目,计算 IC₅₀。

[0060] 结果显示:IC₅₀ 为 50.12 μ g/ml。

[0061] (四) 对 HSV-1 感染细胞的综合作用:

[0062] 药物三七皂苷 ST-4 和阳性对照药 ACV 稀释方法如上。

[0063] 不同浓度三七皂苷 ST-4 维持液和病毒各 $100 \mu\text{l}$ 混合后, $200 \mu\text{l}$ / 孔加到 24 孔板单层 MRC-5 细胞上, 每个浓度设定 4 个复孔, 置于 5% CO_2 细胞培养箱培养 72 小时, 观察药物对 HSV-1 感染细胞的综合作用。同时设病毒对照组、正常细胞对照组, 实验重复 3 次。

[0064] 试验分析方法: 统计各药物浓度作用下的空斑形成数, 计算 IC_{50} 。

[0065] 结果显示: IC_{50} 为 $50.34 \mu\text{g/ml}$ 。

[0066] 结论:

[0067] (1) 三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 感染的细胞有一定的预防作用。

[0068] (2) 三七皂苷 ST-4 对 HSV-1 感染的细胞具有治疗作用。

[0069] (3) 三七皂苷 ST-4 可降低 HSV-1 对 MRC-5 细胞的感染性。

[0070] 实施例 3:

[0071] 片剂: 实施例 1 所得化合物三七皂苷 ST-4 10mg, 乳糖 180mg, 淀粉 55mg, 硬脂酸镁 5mg;

[0072] 制备方法: 将化合物、乳糖和淀粉混合, 用水均匀湿润, 把湿润后的混合物过筛并干燥, 再过筛, 加入硬脂酸镁, 然后将混合物压片, 每片重 250mg, 化合物含量为 10mg。

[0073] 实施例 4:

[0074] 安瓿剂: 实施例 1 所得化合物三七皂苷 ST-4 2mg, 氯化钠 10mg;

[0075] 制备方法: 将化合物和氯化钠溶解于适量的注射用水中, 过滤所得溶液, 在无菌条件下装入安瓿瓶中。

[0076] 实施例 5:

[0077] 胶囊剂: 实施例 1 所得化合物三七皂苷 ST-4 10mg, 乳糖 187mg, 硬脂酸镁 3mg;

[0078] 制备方法: 将化合物与助剂混合, 过筛, 均匀混合, 把得到的混合物装入硬明胶胶囊, 每个胶囊重 200mg, 活性成分含量为 10mg。

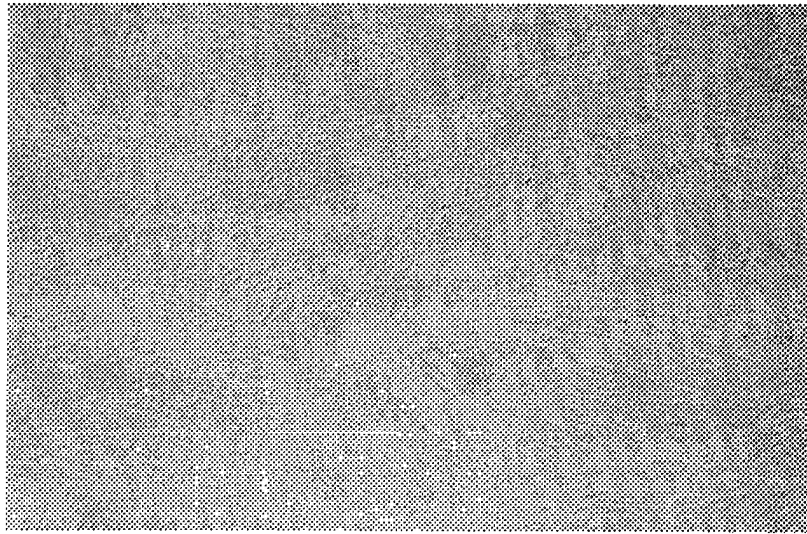


图 1

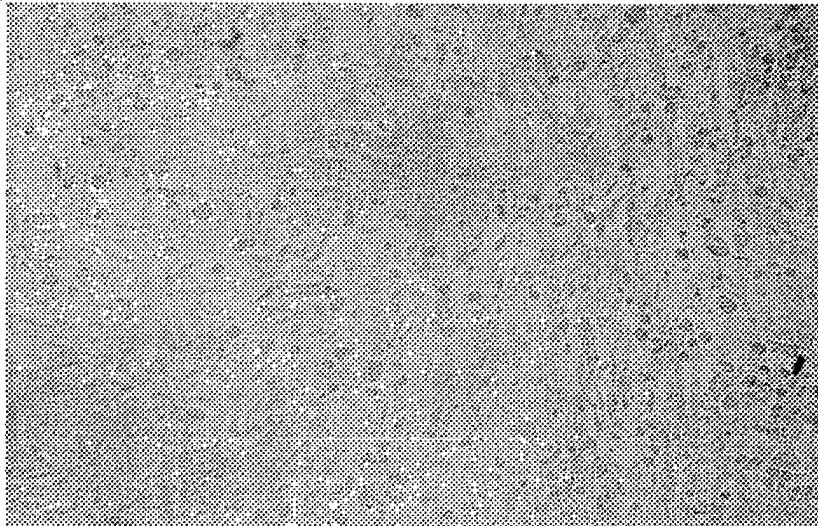


图 2

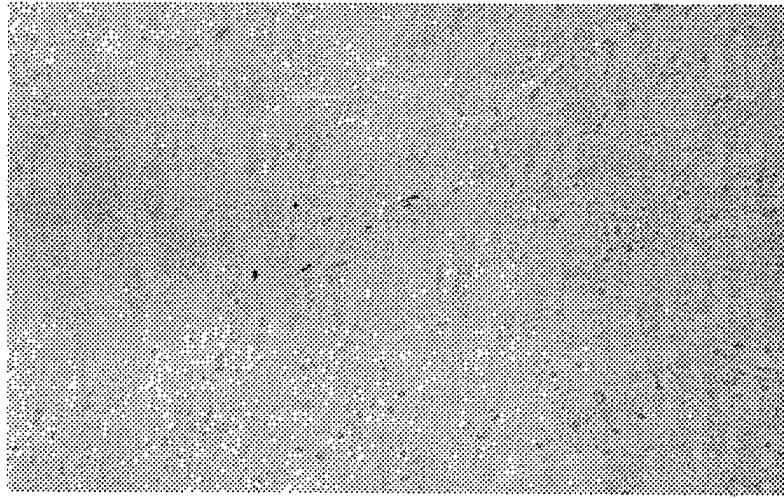


图 3