

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006023.2

[51] Int. Cl.

A61K 36/815 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月25日

[11] 公开号 CN 1953761A

[22] 申请日 2005.2.25

[21] 申请号 200580006023.2

[30] 优先权

[32] 2004.2.25 [33] US [31] 60/547,061

[86] 国际申请 PCT/CN2005/000234 2005.2.25

[87] 国际公布 WO2005/082387 英 2005.9.9

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.25

[71] 申请人 港大科桥有限公司

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 苏国辉 袁伟雄 郑传忠 徐是雄

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王颖煜 李连涛

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 4 页

[54] 发明名称

使用宁夏枸杞提取物作为视网膜神经节细胞变性的神经保护剂的方法

[57] 摘要

本发明涉及宁夏枸杞提取物,其表现出对受损视网膜神经节细胞的神经保护作用。可预防和保护受治疗的主体在慢性和创伤性神经损伤或患青光眼后视网膜神经节细胞的变性。还涉及包括有效量的药物和可药用载体的组合物。

1. 减少患者视网膜神经节细胞死亡的方法，包括给患者施用用水从含宁夏枸杞原料中提取的药剂(LBE)。
2. 权利要求1的方法，其中，所述LBE是茄科植物提取物。
3. 权利要求1的方法，其中，所述LBE是基本上不含低级醇提组分的宁夏枸杞的热水提取物。
4. 权利要求1的方法，其中，所述LBE是聚阴离子，分子量小于500 kD，不溶于二氯甲烷、氯仿和甲苯的至少一种。
5. 权利要求2的方法，其中，所述LBE是基本上不含低级醇提组分的宁夏枸杞的50℃到100℃水的提取物。
6. 权利要求2的方法，其中，所述LBE是基本上不含低级醇提组分的宁夏枸杞的约70℃水的提取物。
7. 权利要求1的方法，其中，药剂与药学可接受载体联合给药。
8. 权利要求1的方法，其中，所述给药是静脉内、颅内、大脑内、皮下、肌内、鼻内或腹膜内。
9. 权利要求1的方法，其中，所述患者是人。
10. 权利要求1的方法，其中，所述给药每天进行。
11. 权利要求1的方法，其中，所述给药是口服。
12. 权利要求1的方法，其中，所述给药是局部给药。
13. 权利要求1的方法，其中，患者是患有或怀疑患有青光眼的人。
14. 权利要求13的方法，其中，所述LBE是基本上不含低级醇提组分的宁夏枸杞的50℃到100℃水的提取物。
15. 权利要求14的方法，其中，所述LBE与药学可接受载体联合给药。
16. 权利要求15的方法，其中，所述给药是口服或局部给药。
17. 权利要求16的方法，其中，LBE的给药量是约0.01-1700 mg/kg。
18. 权利要求13的方法，其中，所述LBE是基本上不含低级醇提组分的宁夏枸杞的约70℃水的提取物。
19. 权利要求18的方法，其中，所述LBE与药学可接受载体联合给药。
20. 权利要求19的方法，其中，所述给药是口服或局部给药。

使用宁夏枸杞提取物作为视网膜神经节细胞 变性的神经保护剂的方法

发明领域

本发明涉及从宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)中生产活性部分作为减少哺乳动物受损或未受损视网膜神经节细胞免受挫伤死亡的有效剂的方法。另一方面,本发明涉及保护哺乳动物慢性损伤后的视网膜神经节细胞的方法。再一方面,该组合物用于治疗与细胞损伤有关的疾病,包括青光眼和其它神经变性疾病。

发明背景

青光眼性视神经病是世界范围内不可逆性失明的最重要的原因之一,在美国是不可逆性失明的第二个最普遍的原因,是黑人失明的最普遍的原因。据估计,在1996年,全世界有将近6680万人患有患有原发性青光眼,到2000年有670万人将双目失明(Quigley, 1996; Quigley & Pease, 1996)。根据世界卫生组织(WHO)1997年作出的估计,青光眼疑似病例总数约1亿零5百万。根据Foster和Johnson 2001年所作的统计,中国估计有940万名40岁和更老的人患有青光眼性视神经病。在这个数字中,520万人(55%)至少一只眼睛失明,170万人(18.1%)双目失明。由于这种神经病变经常是逐渐降低视力而没有症状,因此,患有青光眼的个体在青光眼早期和在他们不可逆地失明前是无法鉴定的。如果早期被检测到并得以治疗,青光眼的视野丧失是可以被预防的。

青光眼的主要病理学特征是视网膜神经节细胞(RGC)死亡,视神经乳头凹陷和萎缩,导致视力下降(Leske, 1983; Osborne 等人, 1999; Quigley & Green, 1979)。RGC经由丘脑(中脑)内的外侧膝状体核延伸它的轴通过视神经到视皮层(Frost 等人, 1979; So 等人, 1978 和 1985; Woo 等人, 1985)。与中枢神经系统(CNS)的其它神经元类似,一旦受损,RGC就无法再生。因此,在任何类型的眼病包括青光眼中预防RGC变性是十分重要的。

青光眼患者视网膜神经节细胞死亡通常由眼内压升高引起,尽管

这对于该疾病的进行并不是必需的(Sarfarazi, 1997)。因此, 目前对于青光眼患者的所有治疗方法都以降低眼内压(IOP)为目标。虽然眼降压剂广泛用于治疗青光眼性视神经病, 然而, 它们在治疗很大比例的患有青光眼性视神经病的人群中是无效的。很多患有青光眼性视神经病的人具有正常 IOP。30-50 %患有开角型青光眼的人最初并没有眼高压, 15-50 %患有青光眼性视神经病的患者没有升高的 IOP。在某些青光眼性视神经病患者中不存在升高的 IOP 暗示着存在至少一种不同于升高的眼内压的促成与青光眼性视神经病相关的视神经病的机制(Levin, Current Opinion in Ophthalmology 8: 9-15, 1997; Levin, Mediguide to Ophthalmology 8: 1-5, 1999)。因此, 大量的努力已经朝向在正常或高 IOP 患者中开发治疗青光眼性视神经病的适当方法, 以及治疗多种与升高的 IOP 无关的其它视神经病的适当方法。

上述所有方法可以延缓 RGC 的进行性丧失, 但不能阻止这些神经元的死亡。虽然一些神经保护剂是可利用的, 但是对于能更有效的预防各种眼病包括青光眼的 RGC 丧失的其它化合物仍然存在着很大的需求。

对天然和实验性视神经病机制的认识, 包括轴突横断、视神经钳夹伤和视神经缺血, 可促进对青光眼性视神经病和影响视网膜神经节细胞轴突的其它视神经病包括缺血性视神经病、炎性视神经病、压迫性视神经病和创伤性视神经病的适当疗法的进展。这些病症中的每一种都很有可能引起凋亡。负责启动视网膜神经节细胞凋亡的机制还没有明确地确定。然而据推测, 亲神经因子的逆向转运减少、内源性视神经营养因子的水平降低或数个其它机制中的任何一个都有可能启动凋亡。

已经建立了多个动物模型来模拟青光眼的致病条件, 包括眼高压、眼缺血和视神经横断。视神经横断已经长期用作动物模型来研究 RGC 的存活和再生(Cheung 等人, 2002; Cho 等人, 1999 和 2001; Lu 等人, 2003; You 等人, 2002)。对 RGC 的这种挫伤中断了视网膜和脑之间的联系, 导致视力永久性丧失。通过该模型了解防止 RGC 不可逆丧失的机制, 这对于开发对抗各种眼病包括青光眼的新的治疗介入是有益的。

由于升高的眼内压(IOP)是青光眼的危险因素之一, 已经开发了使

用猴子或啮齿动物的基于眼高压的新动物模型(Garcia-Valenzuela 等人, 1995; Laquis 等人, 1998; McKinnon 等人, 2002; Mittag 等人, 2000; Morrison 等人, 1997; Sawada 和 Neufeld, 1999; Ueda 等人, 1998)。这些模型包括注射高血压盐水、烧灼巩膜外静脉、激光凝固小梁网、注射 S-抗原和对角膜缘静脉和巩膜外静脉进行激光凝固。在这些研究中, 已经采用了使用氩激光器对角膜缘静脉和巩膜外静脉进行的光凝固眼高压模型(Ji 等人, 2004; WoldeMussie 等人, 2001 和 2002)。

宁夏枸杞, 小红浆果, 由于它的味道和全身健康益处而在家庭烹调中通常用作传统中国食物。它也用作草药治疗多种眼病(Chinese Herbal Medicine Company, 1994; Lam 和 But, 1999)。浆果的红色是由类胡萝卜素构成的, 其中, 只有玉蜀黍黄素存在于人黄斑中。尽管宁夏枸杞由于对视觉系统的期望益处而在中国已经广泛使用了好几个世纪, 但它的作用的根本机制仍然不清楚。

本发明人认识到使用该活性的可能性, 并对那种可能性进行了必需的研究。他们发现从宁夏枸杞中分离的水提取物能够预防各种眼病的 RGC 变性。

发明简述

本发明提供了减少患者 RGC 死亡的方法, 包括如下步骤:

- (a) 提供一定量的有效提取物或其活性部分; 和
- (b) 递送治疗有效量的步骤(a)提取物到患者 RGC 的至少一个部分。

在优选的实施方案中, 步骤(a)提取物来自宁夏枸杞。

最便利地, 步骤(a)的有效提取物通过口服、局部或注射给药递送, 其中, 化合物制成包含治疗有效浓度的有效提取物和适合对患者口服给药的药学可接受载体的药物剂型。

本发明另一个方面是通过本发明方法减少患者 RGC 死亡的药物剂型, 该剂型包含一定量的宁夏枸杞的有效提取物或活性部分, 及其药学可接受的盐, 以治疗有效浓度, 和药学可接受的载体。

本发明的目的是提供减少患者 RGC 死亡的方法, 该患者对增加比率的 RGC 敏感。

本发明进一步的目的是提供用于减少患者 RGC 死亡的药物剂型,

该患者对增加的 RGC 死亡敏感。

有利的是，在其它临床适应症中已经显示了宁夏枸杞提取物对于人类是相对安全和无毒的。

本发明的其它目的、优点和特征通过下面说明书的描述将是显而易见的。

附图的简要说明

图 1 证明了从宁夏枸杞提取的不同部分对成年仓鼠(6-8周, 60-80 g)视神经横断后 RGC 的神经保护作用。

图 2 说明了 LBE2 对视神经横断后 RGC 的存活的保护作用。

图 3 显示了具有眼高压的 Spraque-Dawley 大鼠(10-12周, 250-280 g)的 RGC 丧失。

图 4 显示了激光凝固后接受 LBE2 的 SD 大鼠的眼内压(IOP)。

图 5 说明了作为慢性毒性试验，在视神经横断模型中喂饲 LBE2 之前和之后的成年仓鼠(6-8周, 60-80 g)的体重变化。在损伤前和损伤 7 天后测量仓鼠体重。

图 6 表明了作为慢性毒性试验，在眼高压模型中喂饲 LBE2 之前和之后的 Spraque-Dawley 大鼠(10-12周, 250-280 g)的体重变化。在激光凝固前测量大鼠体重。

图 7 显示了 Spraque-Dawley 大鼠幼仔(3-5周)的体重变化。用 10 g/kg LBE2 喂养大鼠 2 周(每组 n = 8)。记录口服给药 LBE2 之前和之后的大鼠体重变化。

图 8 表明了 Spraque-Dawley 大鼠(10-12周)的体重变化。用不同剂量的 LBE2 喂养大鼠 2 周(每组 n = 8)。记录口服给药 LBE2 之前和之后的大鼠体重变化。没有记录到动物死亡。

发明的详细描述

通过给视神经横断后的仓鼠每天口服给药和通过检查 LBE2 对于保护眼高压 Spraque-Dawley 大鼠 RGC 的效果来研究本发明的活性提取物包括 LBE2 的神经保护。

作为下列研究的结果而完成了本发明：

检查宁夏枸杞的四种不同提取物对视神经横断后仓鼠的受损 RGC

的作用，证实了宁夏枸杞的 LBE2 对 RGC 具有最大的神经保护作用；

通过给视神经横断后仓鼠口服给药不同剂量的 LBE2，检查对受损 RGC 的神经保护作用，证实了 LBE2 对挫伤后 RGC 存活的作用；

在 LBE2 处理的具有眼高压的 Spraque-Dawley 大鼠中观察 RGC 丧失百分率，与对照组比较，证实了 LBE2 的神经保护作用；

与用或未用 LBE2 处理的对照组比较接受激光凝固的 Spraque-Dawley 大鼠的眼内压(IOP)变化，以调查宁夏枸杞的 LBE2 对降低 IOP 的作用；

检查动物的体重和死亡率，以调查在视神经横断后或在眼高压模型中，LBE2 对标准状态动物的可能的急性和慢性毒性。

本发明的 LBE2 在下述实验中的剂量对于 Spraque-Dawley 大鼠来说是 0.01 - 1000 mg/kg 每天口服给药，对于仓鼠来说是 0.17 - 1700 mg/kg。

与病症例如青光眼性视神经病有关的视网膜神经节细胞(RGC)死亡可由多于一种机制引起，包括但不限于兴奋性中毒、活性氧种类信号反应或催化反应，或高的细胞内钙浓度。本发明显示了宁夏枸杞提取物能够有效降低哺乳动物慢性损伤和创伤损伤的 RGC 死亡，而不明显依赖于任何特定的死亡机制。

宁夏枸杞是一种著名的中草药，它具有“补肾生精 (producing essence)，养肝明目”的功效。已经广泛用作增进营养的食物 2400 年了。宁夏枸杞提取物或活性部分尤其用于本发明的方法。

本文所用的“宁夏枸杞”指的是宁夏枸杞提取物。它也称作枸杞子(fructus lycii)和枸杞子(Gou Qi Zi)。植物枸杞属的成员是能够提供与本发明组合物中的枸杞子提供的生理效应相类似生理效应的物质，优选自：枸杞子；宁夏枸杞；枸杞 (Chinese Mill)；土库曼枸杞 (Lycium Turcomanicum Turcz)；西北枸杞 (Lycium potaninii Pojank)；毛蕊枸杞 (Lycium dasystemum Pojank)；Lycium europaeum (non L.)；滨藜叶枸杞 (Lycium halimifolium (Mill.))；Lycium lanceolatum (Veillard.)；Lycium megistocarpum (Dun.)；Lycium ovatum.；Lycium subglobosum.；Lycium trewianum. L. vu；Lycium europeum；Lycium halamifolium；滨藜叶枸杞恂 (Lycium halmifolium)；Lycium vulgare。

本发明的活性剂是热水(即高于 50℃)提取物，它基本上不含低级醇

溶性组分。活性剂是聚阴离子，分子量小于 500 kD，不溶于二氯甲烷、氯仿和甲苯至少之一。它优选提取自宁夏枸杞，但也可存在于茄科的其它植物中。根据下列实施例所列的数据，优选的提取物是 50℃ 到 100℃ 的水提取物，最优选是约 70℃ 的提取物。

通过下列方法分离宁夏枸杞提取物或活性部分。首先，用乙醇提取宁夏枸杞的干燥果实，得到乙醇提取物(LBE1)。分离和蒸发乙醇后，干燥醇提取过的果实，并用热水(70℃)浸泡，浓缩所得提取物，干燥成粉末，称为 LBE2。用沸水(100℃)进一步提取剩余的残渣，得到粉末 LBE3。将剩余的果实残渣用 5% NaOH 浸泡过夜，接着透析 60 小时，并干燥；所得的残渣被称为 LBE4。

本发明的提取物基本上不含低级(C₁₋₅)醇溶性物质，由水溶性多糖组成。LBE2 是最优选的提取物，但包含活性 LBE2 的任何提取物都可以使用，尽管更大含量对于达到相同活性水平可能是必需的。

本发明应用的青光眼类型包括但不限于：原发性开角型青光眼、常压青光眼、色素性青光眼、假脱落青光眼、急性闭角型青光眼、绝对性青光眼、慢性青光眼、先天性青光眼、青少年型青光眼、狭角型青光眼、慢性开角型青光眼和单纯型青光眼。

本文所用的“提取物”指的是从特定来源的植物或其部分(例如果实、根、皮、叶)获得的物质。保留提取源中包含的物质生物活性的任何提取方法都可以用于生产本发明所用的提取物。优选地，本发明组合物的成分提取成水溶液。提取优选在常压条件下进行，优选在较高温度下进行(优选在 50℃ 到 100℃ 范围内，最优选约 70℃)。提取物优选是干燥粉末的形式。优选通过蒸发浓缩成粉末。可以理解的是，现有技术已知的生产可与前述优选提取物所产生的治疗效力相比的提取物的任何方法都可以用于本发明目的。

此外，术语“提取物”也指从宁夏枸杞或其它天然来源的果实或其它部分分离的活性成分，其它天然来源包括但不限于植物的所有品种、物种、杂种或属，不论活性成分的确切结构或制备方法或分离方法。术语“提取物”也意欲包括具有上述生物特性或治疗适应症的提取物的盐、络合物和/或衍生物。术语“提取物”也意欲涵盖具有相同或相似特性的产生与本发明相同或相似生物学效应的合成或生物生成的类似物和同系物。

打算用于本文的纯化组合物包括纯化提取物部分，该部分具有本文所述的性质，来源于天然或变异体形式的任何植物或品种，优选宁夏枸杞，和来源于任何来源，无论是天然的、合成的或重组的。

本文所用的“药物组合物”指的是包含治疗有效量的化合物或组合物的连同适当的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂和/或载体一起的剂型，组合物包含上述本发明的提取物。该组合物的物理形式，即固体、液体等，不受限制。

“治疗有效量”指的是足以预防和保护 RGC 不变性或延缓其变性程度的宁夏枸杞提取物的量。当然，什么构成治疗有效量将取决于多种因素，包括例如患者的大小、年龄和病症，以及递药方式。确定有效剂量在本领域普通技术人员的能力范围内。

优选地，患者是正在经历或有发展成与 RGC 死亡有关的病症风险的人，包括青光眼性视神经病、缺血性视神经病、炎性视神经病、压迫性视神经病和创伤性视神经病。所有上述病症都与 RGC 的轴突部分损伤有关，与细胞体相对。

宁夏枸杞提取物通常减少 RGC 死亡至少约 16%。然而，预期 RGC 死亡的减少中只有 10% 或 5% 将提供给受治疗患者的视力。在人类患者中，视网膜神经节细胞死亡的减少可通过函数分析和结构分析的外推法进行估计。

函数分析包括评估视觉功能尤其是视觉灵敏度和视野随时间的改变。有理由推测，在宁夏枸杞提取物治疗开始以后，RGC 死亡速度的降低可能与视觉功能随时间的丧失速度降低相关。结构分析包括用眼底镜或其它装置目视或测量视神经乳头或视神经纤维层，以评价视神经盘萎缩、盘凹陷或神经纤维丧失。

在一个优选实施方案中，治疗有效量的宁夏枸杞提取物将给人类患者局部施用，该患者具有侵袭视网膜神经节细胞的疾病的症状或有发展成该疾病的风险。也可以使用其它给药方式。本发明的方法优选用于治疗患有侵袭视网膜神经节细胞轴突的疾病的患者，包括但不限于青光眼性视神经病、缺血性视神经病、炎性视神经病、压迫性视神经病和创伤性视神经病。

组合物的药学可接受形式包括药学可接受的载体。该药学可接受的载体是本领域技术人员公知的，不受限制。另外，该药学可接受的

载体可为水溶液或非水溶液、混悬液和乳液。非水溶剂的实例是丙二醇，聚乙二醇，植物油例如橄榄油，和可注射的有机酯例如油酸乙酯。含水载体包括水、醇/水溶液、乳液或混悬液，包括盐水和缓冲介质。胃肠外赋形剂包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏注射液或 Axed 油。静脉赋形剂包括液体和营养素补充剂、电解质补充剂例如基于林格氏右旋糖的那些，等等。也可存在防腐剂和其 它添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、调节剂(collating agent)和惰性气体等。

控释或缓释组合物包括在亲脂性贮库(例如脂肪酸、蜡、油)中的剂型。本发明还包括了用聚合物(例如 Polyoxamers、polyoxamines、聚乙二醇)包衣的微粒组合物，和与针对组织特异性受体的抗体、配体或抗原相结合的提取物，或与组织特异性受体的配体相结合的提取物。本发明组合物的其它实例掺入了微粒、防护涂层、蛋白酶抑制剂或渗透促进剂，用于各种给药途径包括胃肠外、肺部、鼻腔和口服。合适的辅料是例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇等及其组合。另外，如果需要的话，该组合物可以包含增强活性成分效力的少量辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂。

活性提取物可以制成中性的药学可接受的盐形式的治疗组合物。药学可接受的盐包括酸加成盐，它是与无机酸形成的，例如盐酸或磷酸，或与有机酸形成的，例如乙酸、草酸、酒石酸和扁桃酸等。从游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，和衍生自有机碱，例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸和普鲁卡因等。

在本发明的治疗方法和组合物中，提供了活性组分的治疗有效剂量。将选择基于患者特性(年龄、体重、性别、病症、并发症、其它疾病等)的量，这是本领域公知的。此外，当进行进一步的常规研究时，将出现更多的关于治疗不同患者的不同病症的适当剂量水平的具体信息，普通技术人员考虑到治疗内容、患者的年龄和一般健康状况能够确定适当的剂量。一般而言，静脉注射或输注的剂量可低于腹膜内、肌肉或其它给药途径的剂量。根据循环半衰期和所用剂型可改变给药方案。组合物以与剂型相容的方式以治疗有效量给药。给药所需的活性成分的精确定量根据执业医师的判断，对各个个体是独特的。然而，

合适的剂量可为约 0.01 mg/kg - 1700 mg/kg, 更优选约 0.01 - 1000 mg/kg, 最优选约 10 mg/kg 活性成分/千克个体体重/天, 这取决于给药途径。最初给药的合适方案也是可变的, 可典型地通过注射或其它给药途径最初给药, 接着每一小时或数小时间隔重复剂量给药。或者, 考虑进行足以维持 10 纳摩尔到 10 毫摩尔的血药浓度的持续静脉内输注。

下列实施例中提供的数据证明了本发明。下列实施例显示了宁夏枸杞提取物保护轴突受损的 RGC (axotomized RGC) 免于细胞死亡。由于在大多数视神经病包括青光眼性视神经病、炎性视神经病、压迫性视神经病和创伤性视神经病中都涉及对 RGC 的轴突损伤, 有理由推测, 通过用宁夏枸杞提取物处理个体将保护正在经历或有发展成这些病症之一的风险的个体的 RGC。

提出下列实施例以更全面地阐述本发明的优选实施方案。然而, 它们决不能解释成限制本发明的宽范围。

实施例

动物

本实验操作符合美国国立卫生研究所 (National Institutes of Health, U.S.A.) 对于保护和利用实验动物的指南。进行所有努力以使所用动物和它们的痛苦最小化。

实施例 1 - 在视神经横断模型中宁夏枸杞提取物对受损 RGC 的作用

研究从宁夏枸杞中分离的四种提取物的神经保护作用。对成年仓鼠(6-8周, 60-80 g)的右眼进行视神经横断, 而它们的左眼则完整留作内部对照。所有的视神经都在距离视神经盘 1.5 mm 处横断。损伤后立即用被称为荧光金(FG)的荧光染料向后标记 RGC。在处死动物前 2 天用相同方法标记左眼 RGC。到损伤后 7 天, 在深度麻醉下使仓鼠安乐死(致死剂量的戊巴比妥钠)。用 4% 多聚甲醛固定视网膜, 然后将它分成四个象限: 上、下、鼻侧和颞侧。然后将整个视网膜装载在载玻片上, 并在荧光显微镜下检查。在 200 × 200 μm 的目镜网格下, 沿着每个象限的中线从视神经盘开始到视网膜周围边缘以 500 μm 间距对标记的 RGC 进行计数。通过与它们的对侧眼比较受损眼内存活的 RGC 数

量, 来表示各种处理以后的存活 RGC 百分数。

到视神经横断后 7 天, 有 $36.3 \pm 0.92\%$ 的存活 RGC 保留在赋形剂处理的对照组内(图 1)。从宁夏枸杞中分离的所有四种提取物, 被称为 LBE1、LBE2、LBE3 和 LBE4, 以 17、170 和 1700 mg/kg 受试者体重的浓度进行测试, 每组 5 只动物。从损伤的第一天起直至安乐死, 受试者每天通过鼻胃管喂饲提取物。所测试的所有浓度的 LBE1 都没有促进视神经横断后的 RGC 存活(17 mg/kg: $33.7 \pm 1.05\%$; 170mg/kg: $35.9 \pm 0.95\%$; 1700 mg/kg: $36.4 \pm 1.0\%$)。用 17 mg/kg LBE2 处理保护了 $59.0 \pm 0.88\%$ RGC 免于损伤, 而其它测试浓度的 LBE2 促进了较少百分数的 RGC 存活(170mg/kg: $42.9 \pm 0.59\%$; 1700 mg/kg: $44.6 \pm 0.79\%$)。较低浓度 LBE3 的给药没有促进 RGC 存活(17 mg/kg: $37 \pm 1.54\%$; 170 mg/kg: $33.5 \pm 1.14\%$), 而 1700 mg/kg 的 LBE3 则保留了 $46.3 \pm 1.98\%$ RGC 在视神经横断后的视网膜上。所测试的任何浓度的 LBE4 的处理都没有保护 RGC 免于损伤(17mg/kg: $34.0 \pm 1.06\%$; 170 mg/kg: $30.8 \pm 1.15\%$; 1700 mg/kg: $35.8 \pm 1.13\%$)。允许成年仓鼠在损伤实验后存活 7 天。在这四个部分中, 用 LBE2 喂饲的仓鼠具有最大数量的 RGC 存活。以上数据表示成与非手术的左眼上的总 RGC 相比的存活 RGC 的百分数(平均数 \pm SEM)。用单向 ANOVA, 随后用 Bonferroni post hoc 试验评价统计学显著性。用 * $p < 0.001$ 标记偏差为显著。

实施例 2 - LBE2 给药对视神经横断后的受损 RGC 的神经保护

视神经横断后立即每天用 LBE2 (范围从 0.17 到 1700mg/kg)喂饲成年仓鼠(6-8 周, 60-80 g)直至安乐死(每组 $n=5$)。用 FG 向后标记 RGC。沿着视网膜每个象限(上、下、鼻侧和颞侧)对标记的 RGC 进行计数。在接受赋形剂的仓鼠对照组中, 视神经横断后 7 天保留了 $31.3 \pm 0.87\%$ RGC (图 2)。在接受 17 mg/kg LBE2 的仓鼠组中, RGC 存活百分数提高到了 $59.0 \pm 0.88\%$ 。LBE2 浓度增加到 170 和 1700 mg/kg 也不像 17 mg/kg LBE2 那样有效(分别是 $42.9 \pm 0.59\%$ 和 $44.6 \pm 0.79\%$)。LBE2 浓度降低到 0.17 和 1.7 mg/kg 没有产生保护 RGC 免于损伤的保护作用(0.17 mg/kg: $36.3 \pm 0.92\%$; 1.7 mg/kg: $37.9 \pm 0.70\%$)。结果是, 与对照组相比, 确定 17 mg/kg LBE2 能够阻止 27.7% RGC 在视神经横断 7 天后存活,

从而认为 17 mg/kg 是本实验中的最佳剂量。成年仓鼠(6-8 周, 60-80g) 被允许在损伤实验后存活 7 天。数据表示成与非手术的左眼上的总 RGC 相比的存活 RGC 的百分数(平均数 \pm SEM)。用单向 ANOVA, 随后用 Bonferroni post hoc 试验评价统计学显著性。用 # $p < 0.01$ 和 * $p < 0.001$ 标记偏差为显著。

实施例 3 - 在 Spraque-Dawley 大鼠的眼高压模型中 LBE2 对 RGC 的神经保护

用 Spraque-Dawley (SD) 大鼠眼高压模型, 每组 6 只大鼠研究不同剂量 LBE2 的神经保护作用。将成年 SD 大鼠(10-12 周, 250-280 g) 分成每天接受赋形剂(对照)或 LBE2 (范围从 0.01 mg/kg 到 1000 mg/kg) 的不同组, 给药 1 周。一周后, 大鼠右眼接受光凝固, 而它们的左眼则完整留作内部对照。用赋形剂或 LBE2 继续喂饲大鼠直至安乐死。在手术显微镜下, 将氩激光凝固应用于缘静脉和 3 个巩膜外静脉(颞区的 2 个上面的和 1 个下面的)。在第一次激光外科手术中, 将 120-140 个激光斑(1000 μ V, 0.1 s)应用于缘静脉和巩膜外静脉。为了维持眼高压, 将 60-120 个斑的第二次激光外科手术应用于阻断任何脉管重新连接。使用手提眼压计测量眼内压(IOP)以监测高压状况。记录激光凝固前(作为基线水平)和每次激光凝固后 3 天(作为手术后 IOP 记录)的 IOP 水平。

在处死动物前四天, 用被称为荧光金(FG)的荧光染料向后标记 RGC, 并将其放在大鼠中脑两侧的上丘上。在第一次激光凝固后保持大鼠 2 周, 并用过量麻醉(氯胺酮和赛拉嗪)使其安乐死。剥出眼睛并固定在 4 %多聚甲醛中。将固定的眼球分成两半。上部包括视神经盘, 将 2 mm 视神经留作进一步分析。下部视网膜平装在明胶涂覆的玻璃载玻片上。在 400 倍放大率下对 FG-标记的 RGC 进行计数。沿着每个象限取 7 个相邻区域($200 \times 200 \mu\text{m}^2$), 每个有 500 μm 距离(从视神经盘到外周)。对总共 21 个预先确定的区域进行计数, 它们代表了大约 3.0 - 3.8 %的总视网膜区域(Laquis 等人, 1998)。显示了稠核或碎片细胞核的 FG-标记的 RGC 被排除在外(Nickells, 1999)。将受损眼睛中预先确定区域内的活 RGC 总数与对侧眼睛比较。数据表示为受损眼睛内 FG-标记的 RGC 丧失相对于对侧完整眼睛内 FG-标记的 RGC 丧失的相对百分数(%对侧, 平均数 \pm SEM)。

在眼高压模型中, 损伤后 2 周, 赋形剂处理的对照大鼠受损眼睛内丧失了 $17.0 \pm 1.1\%$ RGC (图 3)。用 0.01、0.1、1、10、100 或 1000 mg/kg LBE2 每天处理显示了对 RGC 存活的神经保护。用 10 mg/kg LBE2 喂饲大鼠以后, 在大鼠中没有检测到 RGC 丧失 ($0 \pm 0.9\%$, 相对于对照 $p < 0.001$)。1 mg/kg 或 100 mg/kg 浓度的 LBE2 也保护所有 RGC 免于受激光凝固引起的损伤 (1 mg/kg: $1.0 \pm 1.6\%$, $*p < 0.001$; 100 mg/kg: $2.4 \pm 1.7\%$, $p < 0.001$, 与对照组相比)。在用 1、10 或 100 mg/kg LBE2 喂饲的大鼠之间没有显著差别。在保护 RGC 对抗眼高压中, 用其它浓度的 LBE2 处理也并不像上述剂量一样有效 (0.01 mg/kg: $8.6 \pm 1.1\%$; 0.1 mg/kg: $5.5 \pm 0.5\%$; 1000 mg/kg: $10.3 \pm 0.55\%$)。从这些结果可以看出, 认为 1-10 mg/kg LBE2 是本实验的最佳剂量。数据表示成与非手术的左眼上的总 RGC 相比的 RGC 丧失的百分数 (平均数 \pm SEM)。在单向 ANOVA, 随后是 Bonferroni 多重对比试验以后, 用 # $p < 0.01$ 和 $*p < 0.001$ 标记为显著。

实施例 4 - 在 Spraque-Dawley 大鼠眼高压模型中眼内压(IOP)的变化

用激光凝固引起成年 Spraque-Dawley 大鼠 (10-12 周, 250-280 g) 眼高压。在所有组中, 用氩激光对大鼠右眼进行激光凝固, 而它们的左眼则不进行手术作为对侧对照。将氩激光凝固应用于缘静脉和 3 个巩膜外静脉 (2 个上面的和 1 个下面的)。在激光凝固前一周直至处死, 每天用赋形剂 (对照) 或浓度 0.01 mg/kg - 1000 mg/kg 的 LBE2 喂饲大鼠 (每组 $n=6$)。在激光凝固前和每次激光手术后 3 天用手提眼压计测量眼内压 (IOP), 以检测它们的高压状态。在激光应用前, 双眼的基线 IOP 都是 14.6 ± 0.4 mmHg (图 4)。用两次激光应用引起眼高压, 一次在第 7 天, 一次在第 14 天。在第 21 天使大鼠安乐死。在两次激光应用后, 受损眼睛的 IOP 水平保持在高水平 (22.6 ± 1.1 mmHg 到 24.6 ± 0.7 mmHg)。因此保持眼高压, 大约比对侧 (完整) 眼睛高 1.7 倍。在用 0.01、0.1、1、10、100 或 1000 mg/kg LBE2 处理的大鼠组中, 仍然保持升高的 IOP, 范围从 20.8 ± 0.3 mmHg 到 26.3 ± 1.2 mmHg。升高的 IOP 水平与赋形剂处理的对照大鼠一样高。该结果证明了 LBE2 处理没有降低升高的 IOP。激光凝固的处理引起眼内压升高至约 20 mmHg。虽然用 LBE2 喂饲的大鼠显示出了 RGC 丧失减少, 然而 LBE2 没有改变高

IOP。用单向 ANOVA，接着用 Tukey-Kramer post hoc 试验评价数据。

实施例 5 - LBE2 对视神经横断仓鼠的慢性毒性试验

为了研究 LBE2 对视神经横断模型中的成年仓鼠(6-8 周, 60-80 g)的可能的慢性毒性, 记录视神经横断之前和之后 7 天仓鼠的体重和死亡率(每组 n=8)。数据表示为损伤之前和之后 7 天的体重变化(图 5)。由于接受不同剂量 LBE2 的仓鼠的体重不受任何受试浓度影响, 也没有导致死亡, 因此认为 LBE2 不具有任何慢性毒性。数据获得自 3 个独立的实验。

实施例 6 - LBE2 在 Spraque-Dawley 大鼠眼高压模型中的慢性毒性试验

在引起眼高压前 7 天到此后 14 天口服接受 LBE2 的成体 Spraque-Dawley 大鼠(10-12 周, 250-280 g)中, 记录大鼠的体重和死亡率, 以检查 LBE2 的可能的慢性毒性(每组 n=6)。用 LBE2 喂饲的大鼠体重的增加与赋形剂处理的对照大鼠类似(图 6)。与对照组相比, LBE2 处理组的死亡率没有显著差别。这证明了口服 LBE2 没有显著的副作用。已经用 LBE2 喂饲和接受激光凝固后, 在安乐死前保持大鼠 2 周, 并测量大鼠体重。从该结果来看, 用 LBE2 喂饲的大鼠体重不受影响。

实施例 7 - LBE2 对正常 Spraque-Dawley 大鼠幼仔的慢性毒性试验

为了研究 LBE2 对正常 Spraque-Dawley 大鼠幼仔(4 周)是否具有任何毒性作用, 用 10 g/kg LBE2 喂饲大鼠 2 周(每组 n=8)。记录 LBE2 口服给药之前和之后的体重变化和死亡大鼠的数量。数据获得自 3 个独立的实验。结果(图 7)显示, 用提取物喂饲的大鼠体重没有显著变化, 意味着没有慢性毒性。

实施例 8 - LBE2 对正常 Spraque-Dawley 大鼠的急性毒性试验

用 LD50 值作为标准, 研究 LBE2 处理的急性毒性。把正常成年 Spraque-Dawley 大鼠(10-12 周, 250-280 g)分成接受赋形剂或不同剂量 LBE2 (0.01 mg/kg、1000 mg/kg 和 10000 mg/kg)的组。口服给药后 24 小时, 对各组死亡大鼠数量进行计数。结果(图 8)显示, 用提取物喂饲

的大鼠体重没有显著变化并且没有记录到死亡率，意味着没有急性毒性。

可以对本发明进行各种改变和修饰而不背离本发明的精神和范围。举例说明的实施方案是为了进一步例证本发明，而不是旨在限制本发明。

参考文献

以上引用并引入本文作为参考的参考文献的全部引证是：

Cheung ZH, So KF, Lu Q, Yip HK, Wu W, Shan JJ, Pang PK and Chen CF (2002): Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts (草药提取物混合物对轴突受损视网膜神经节细胞的增加的存活和再生). J Neurotrauma 19: 369-78.

Chinese Herbal Medicine Company (1994). Chinese Traditional Formulation of Herbal Medicine, 1598-1608 Scientific Publication Shanghai, China.

Cho KS, Chan PM, So KF, Yip HK and Chung SK (1999). Ciliary neurotrophic factor promotes the regrowth capacity but not the survival of intraorbitally axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters (睫状节神经细胞营养因子促进成年仓鼠眶内轴突受损视网膜神经节细胞的再生能力但不促进其存活率). Neuroscience 94: 623-8.

Cho KS, Chung SK, Yip HK and So KF (2001). Differential effects of intravitreal optic nerve and sciatic nerve grafts on the survival of retinal ganglion cells and the regeneration of their axons (玻璃体内视神经和坐骨神经移植物对视网膜神经节细胞存活和它们的轴突再生的不同影响). J Neurocytol 30: 983-91.

Frost DO, So KF and Schneider GE (1979). Postnatal development of retinal projections in Syrian hamsters: a study using autoradiographic and anterograde degeneration techniques (叙利亚仓鼠视网膜突出物的出生后发育：使用放射自显影和逆行变性技术的研究). Neuroscience 4: 1649-77.

Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J and Sharma S (1995).

Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma (在实验性青光眼过程中视网膜神经节细胞的程序性细胞死亡). Exp Eye Res 61: 33-44.

Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J and So KF (2004). CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway (诱导大鼠眼高压后 CNTF 促进视网膜神经节细胞的存活: 可能包含 STAT3 途径). Eur J Neurosci 19: 265-272.

Lam KW and But P (1999). The content of zeaxanthin in Gou QI Zi, a potential health benefit to improve visual acuity (枸杞子中的玉蜀黍黄素的含量, 改善视力的潜在的健康益处). Food Chem 67: 173-176.

Laquis S, Chaudhary P and Sharma S (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes (高压眼内视网膜神经节细胞死亡模式). Brain Res 784: 100-104.

Laquis S, Chaudhary P and Sharma SC (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes (高压眼内视网膜神经节细胞死亡模式). Brain Res 784: 100-4.

Leske MC (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review (开角型青光眼的流行病学: 综述). Am J Epidemiol 118: 166-91.

Lu Q, Cui Q, Yip HK and So KF (2003). c-Jun expression in surviving and regenerating retinal ganglion cells : effects of intravitreal neurotrophic supply (存活和再生视网膜神经节细胞中的 c-Jun 表达: 玻璃体内神经营养补给的作用). Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 5342-8.

McKinnon SJ, Lehman DM, Tahzib NG, Ransom NL, Reitsamer HA, Liston P, LaCasse E, Li Q, Korneluk RG and Hauswirth WW (2002). Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model (在大鼠青光眼模型中杆状病毒 IAP 重复-包含-4 保护视神经轴突). Mol Ther 5: 780-7.

Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM and Tatton WG (2000) Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat

glaucoma model (在大鼠青光眼模型中 3 到 4 个月升高的眼内压后的视网膜损伤). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3451-3459.

Morrison J, Moore C, Deppmeier L, Gold B, Meshul C and Johnson E (1997). A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage (长期压力引起的视神经损伤的大鼠模型). *Exp Eye Res* 64: 85-96.

Nickells RW (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death (青光眼视网膜神经节细胞的凋亡: 参与细胞死亡的分子途径的最新资料). *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1: S151-61.

Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Bae JH, Melena J and Nash MS (1999). Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know (青光眼的神经节细胞死亡: 你实际上知道哪些)? *Br J Ophthalmol* 83: 980-6.

Quigley HA and Green WR (1979). The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes (人青光眼凹陷和视神经损伤的组织学: 21 只眼睛的临床病理学对比). *Ophthalmology* 86: 1803-30.

Quigley HA and Pease ME (1996). Change in the optic disc and nerve fiber layer estimated with the glaucoma-scope in monkey eyes (猴子眼睛内用青光眼范围估计的视神经盘和神经纤维层的变化). *J Glaucoma* 5: 106-16.

Quigley HA (1996). Number of people with glaucoma worldwide (世界范围内患有青光眼的人数). *Br J Ophthalmol* 80: 389-93.

Sawada A and Neufeld A(1999). Confirmation of the rat model of chronic moderately elevated intraocular pressure (长期适度升高的眼内压的大鼠模型的确认). *Exp Eye Res* 69: 525-531.

So KF, Campbell G and Lieberman AR (1985). Synaptic organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the adult hamster. An electron microscope study using degeneration and horseradish peroxidase tracing techniques (成年仓鼠的背外侧膝状核的突触结构。使用变性和辣根过氧化物酶示踪技术的电子显微镜研究). *Anat Embryol (Berl)* 171: 223-34.

So KF, Schneider GE and Frost DO (1978). Postnatal development of retinal projections to the lateral geniculate body in Syrian hamsters (叙利亚仓鼠视网膜突出物到外侧膝状体的出生后发育). Brain Res 142: 343-52.

Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H and Ozawa H (1998). Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink (前眼房注射印度墨汁后由激光小梁光凝固引起的大鼠实验性青光眼模型). Jpn J Ophthalmol 42: 337-344.

WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M and Wheeler LA (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension (在激光诱导的慢性眼高压大鼠中溴莫尼定对视网膜神经节细胞的神经保护). Invest Ophthalmol Vis Sci 42: 2849-55.

WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M, Ruiz G and Wheeler LA (2002). Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats (在不同视网膜损伤大鼠模型中美金刚的神经保护作用). J Glaucoma 11: 474-80.

Woo HH, Jen LS and So KF (1985). The postnatal development of retinocollicular projections in normal hamsters and in hamsters following neonatal monocular enucleation: a horseradish peroxidase tracing study (正常仓鼠和新生单眼剔除术后仓鼠的视网膜丘突出物的出生后发育: 辣根过氧化物酶示踪研究). Brain Res 352: 1-13.

You SW, Bedi KS, Yip HK and So KF (2002). Axonal regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve pre-lesions and attachment of normal or pre-degenerated peripheral nerve grafts (视神经预-损伤和附着了正常或预-变性的周围神经移植物后视网膜神经节细胞的轴突再生). Vis Neurosci 19: 661-8.

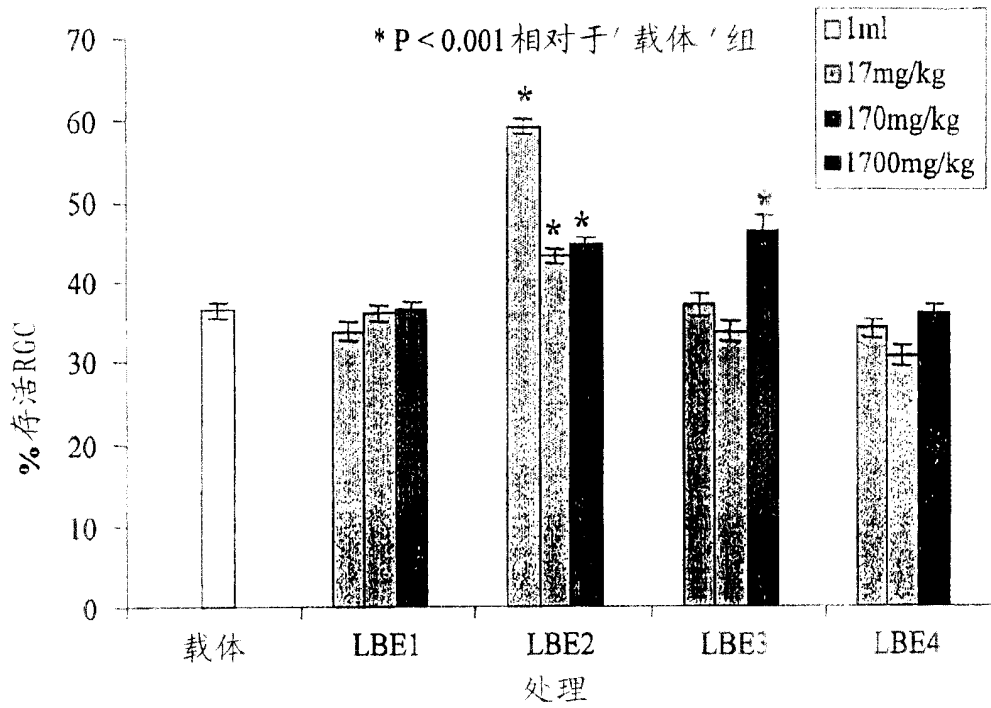


图 1

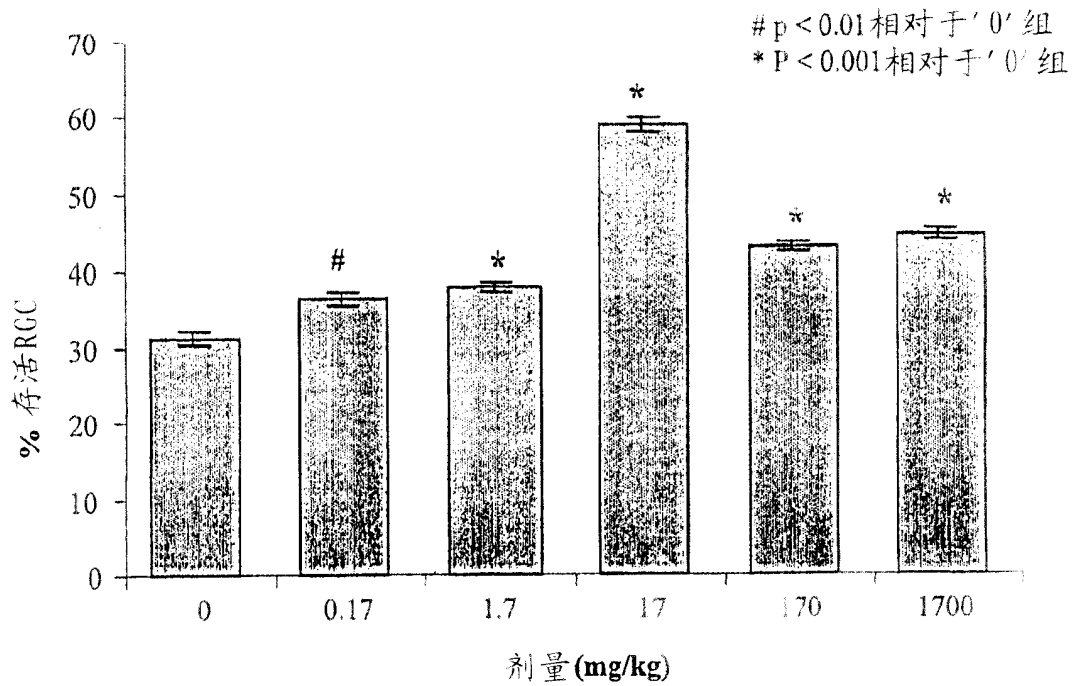


图 2

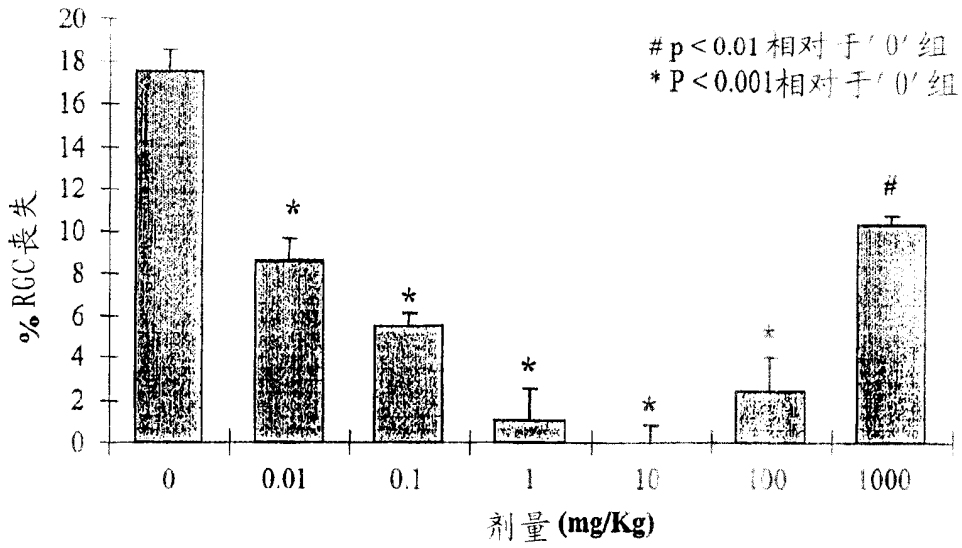


图 3

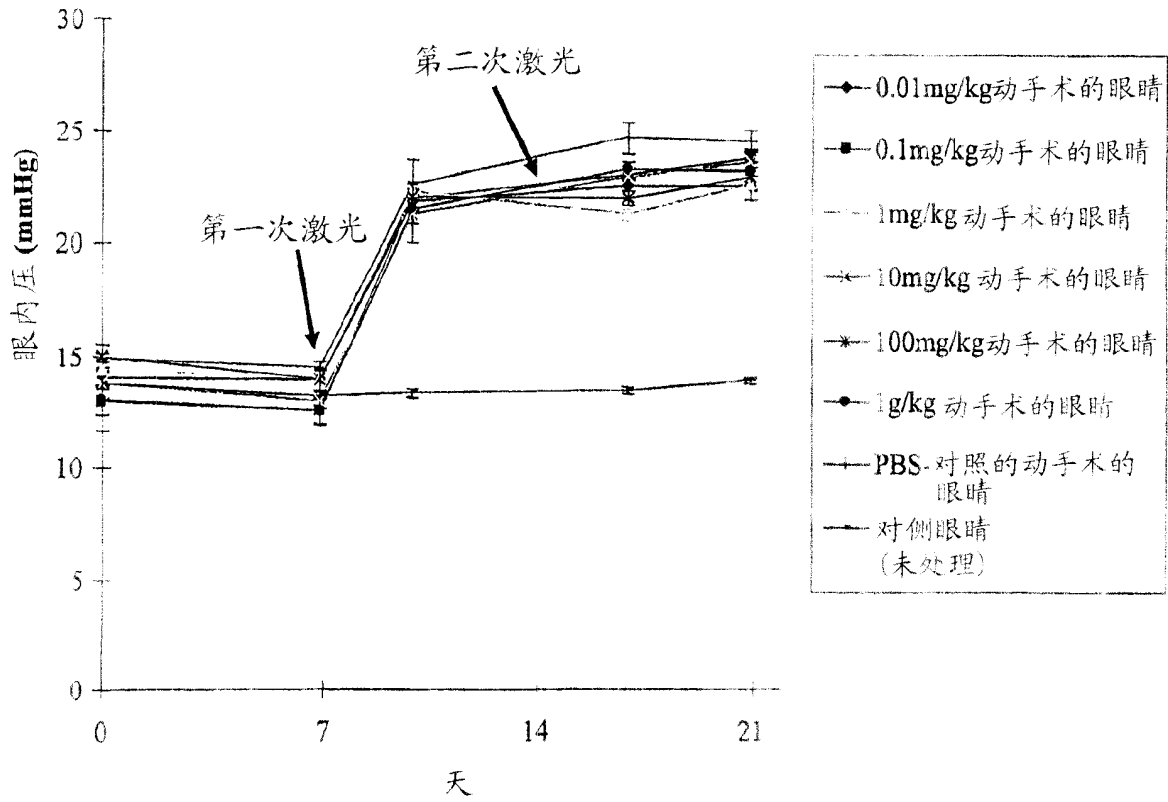


图 4

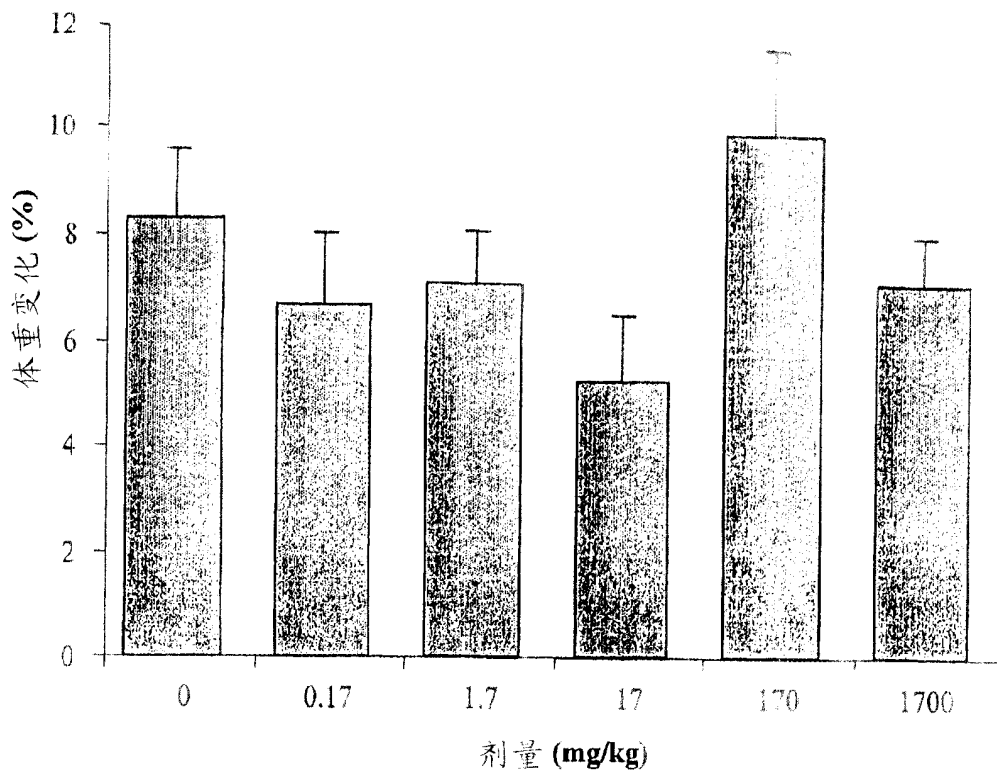


图 5

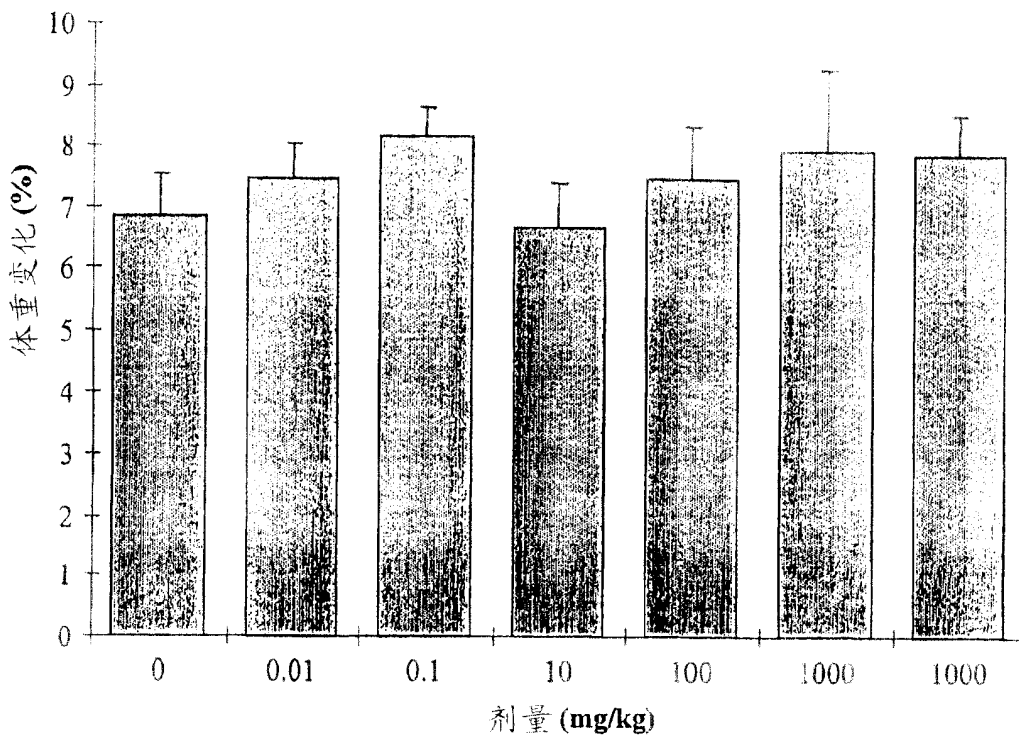


图 6

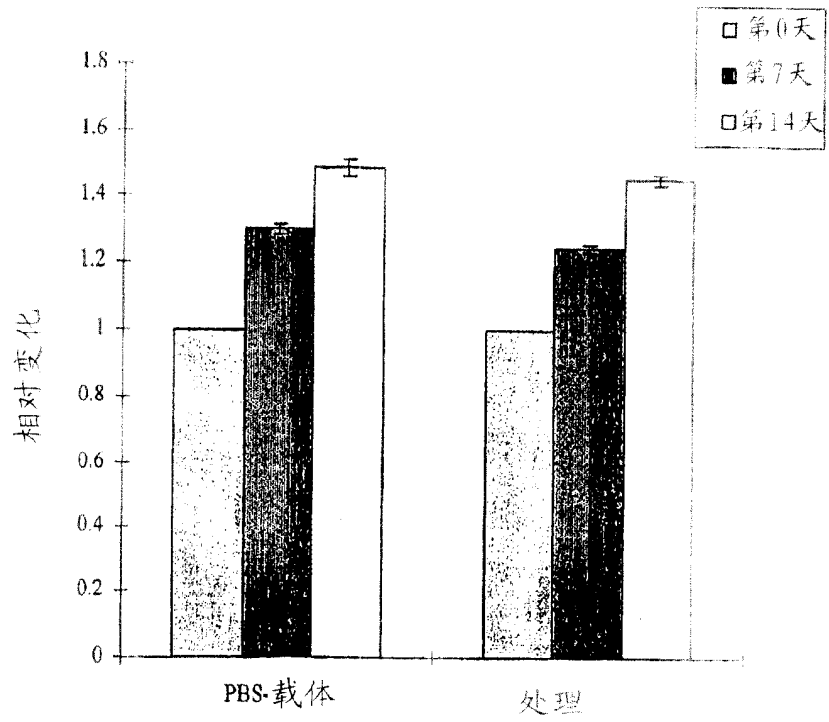


图 7

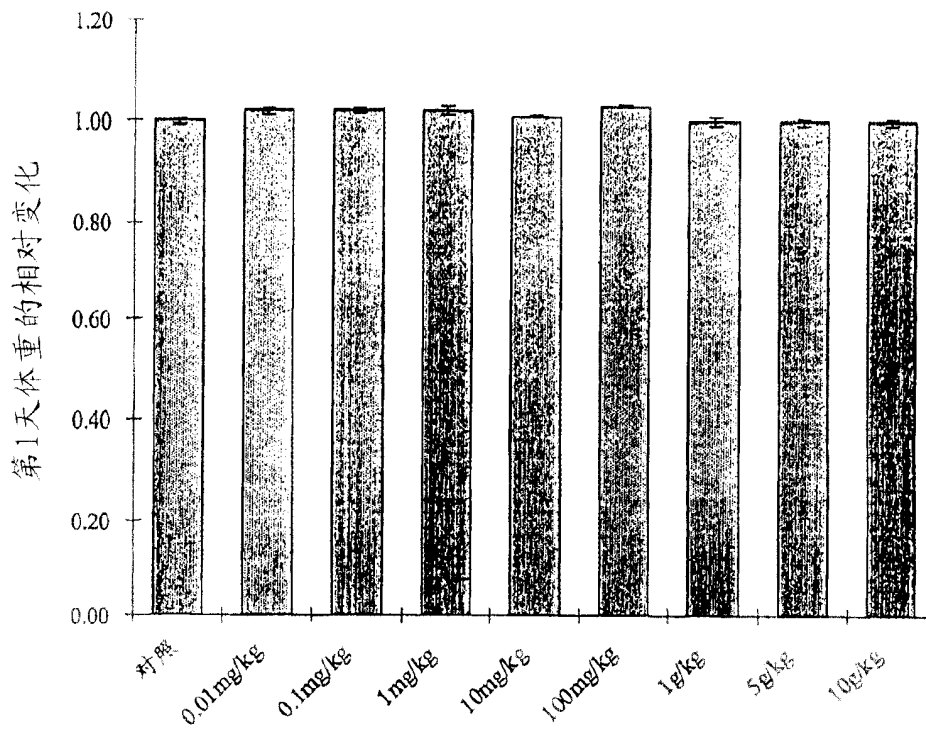


图 8