

说明书

发明名称: 一种治疗肌萎缩侧索硬化症的中药组合物及其应用

[0001] 本申请要求于2023年03月02日提交中国专利局、申请号为202310190284.4、发明名称为“一种治疗肌萎缩侧索硬化症的中药组合物及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及中药技术领域，尤其涉及一种具有治疗肌萎缩侧索硬化症的中药组合物及其应用。

背景技术

[0003] 肌萎缩侧索硬化(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种病因未明、主要累及大脑皮质、脑干和脊髓运动神经元的神经系统变性疾病，以进行性发展的骨骼肌无力、萎缩、肌束颤动、延髓麻痹和锥体束征为主要临床表现。该病生存期通常3~5年，该病约5~10%为家族性(Familial ALS, FALS)，90~95%为散发性(Sporadic ALS, SALS)，全球ALS发病率约1.59人/10万人，患病率4.42人/10万人，2020年通过对医保大数据的分析显示，我国ALS患病总人数约4万人，属于罕见病。本病起病隐匿，发病风险随年龄增长而增加，病情呈进行性发展，为致死性疾病；症状出现后恶化程度快，目前已与癌症、艾滋病、白血病和类风湿性关节炎被WHO列为五大绝症。临床诊断困难，误诊漏诊率高，治疗费用昂贵，一项中国西南地区ALS患者的经济负担调查显示，该病的人均年总费用达8.54万元人民币，远高于我国居民平均年收入水平(35128元，2021年)。随着病情进展，ALS病人失去生活自理能力，给家庭社会带来沉重负担，亟需寻找有效治疗措施和药物延缓病情发展、提高患者生活质量。

[0004] ALS主要病理表现为大脑皮层双侧中央前回巨大锥体细胞部分或完全消失，脑干运动神经核变性，中枢神经轴索变性和肌肉的神经源性萎缩。生理情况下，运动神经元胞体内合成的神经递质沿轴突运输到末梢，并经骨骼肌的神经-肌肉接头将兴奋传递给骨骼肌，从而引起骨骼肌的兴奋和收缩。当基因突变、谷氨酸兴奋性毒性、氧化应激、线粒体功能障碍等因素导致运动神经元损伤、神

经-肌肉接头功能障碍，进而神经递质传递受阻，肌肉损伤及其收缩被抑制，导致ALS发生。ALS发病机制涉及神经元突触前病变至神经肌肉接头损伤的各个环节，且相互联系、相互影响，最终导致以运动神经系统损伤为主的病变。

[0005] 对于ALS这类罕见病应早期诊断，早期治疗，尽可能延长患者生存期。欧洲药品管理局发布的《ALS治疗药物临床指导原则》提出ALS的主要治疗目标是提高存活率、延缓疾病进展及改善ALS症状(肌力及相关功能)。2019年国家卫生健康委印发《罕见病诊疗指南》推荐ALS治疗药物为利鲁唑和依达拉奉。利鲁唑是一种谷氨酸抑制剂，常见不良反应为疲乏和恶心，个别患者可出现肝转氨酶升高，平均可延长患者约3个月存活期，且短期服用效果不明显，服用时间超过6个月才能对预后有改善。依达拉奉是一种自由基清除剂，主要适用于发病2年内、用力肺活量(FVC)大于预测值80%的早期患者，临床获益有限，亦有临床研究证实长期(8.9~13.9个月)注射依达拉奉对于疾病改善并无助益。2022年新获批苯丁酸钠联合牛磺酸二醇复方制剂，临床疗效有待进一步验证，说明书记载常见不良反应为腹泻、腹痛、恶心及上呼吸道感染。以“肌萎缩侧索硬化”为检索词在药渡数据库中共检索到247条记录，其中申请上市的药物仅Masitinib(马赛替尼)、Tofersen及Arimoclomol，占比1%，处于临床Ⅲ期的药物占比6%，Ⅱ期占比13.4%，临床前研究占比31.6%，无进展状态占比9.7%，终止状态占比11.3%。Masitinib被证明具有延缓疾病进展的作用，然而该品种安全性仍需进一步验证。Tofersen并未达到主要终点，仅观察到对疾病进展有减少的趋势。

[0006] ALS根据肌力下降、肌肉萎缩等临床症状，属于中医“痿证”范畴，传统中医药对“痿”的含义概括为两方面：一是指病名，又称“痿躄”，《素问·痿论》中将其分为“五痿”即“皮痿”“脉痿”“筋痿”“肉痿”“骨痿”。二是指症状，《素问·阴阳别论》提出“三阴三阳发病，为偏枯痿易，四肢不举”，刘河间在《素问玄机原病式》曰：“痿，谓手足痿弱，无力以运行也”，描述“痿”为四肢筋脉弛软无力运动的一种病症。对于该病病机认识，历代医家多以《内经》五脏致痿为总纲，形成肺热津伤、湿热浸淫、脾胃虚弱、肝肾亏虚等病机认识，其中散在从奇经治痿的论述，为该类疑难疾病治疗提供了可供借鉴的临床治验。

- [0007] 战国时期《内经》《难经》提出痿有虚实、五脏之分，确立“治痿独取阳明”治法，提出痿证与冲、督、带脉有关，成为从奇经治痿的肇始；唐宋时期从脏腑虚损论治痿证，形成以补虚药为主的治疗用药思想；金元时期重视脾胃肝肾在痿证中的重要病机地位，丰富辨证分型及治疗方药；明清医家从元气虚衰、奇经络脉、大气虚损论治痿证，推动了中医药痿证研究进一步发展。历代医家从五脏治痿积累了丰富的经验，从内因外因、虚证实证辨析，多集中在肺热津伤、湿热浸淫、脾胃虚弱、肝肾亏虚等导致筋肉失于濡养，筋脉迟缓肢体痿软，形成“治痿独取阳明”、清肺润燥、清化湿热、补益脾胃、补益肝肾等治法及代表方药，尤以补益元气、滋补肝肾居多。
- [0008] 但纵观古籍记载，历代医家从奇经络脉治痿仅在《内经》和明清时期有散在论述，却未进一步应用发展，以致在很长历史时期内，奇经络脉对本病发病的影响及其在治疗中的作用未能引起足够重视，也未进行系统研究，直至清代名医叶天士、徐玉台等人提出“筋痿、骨痿，皆属奇经络脉”（《清代名医医话精华·徐玉台》），然语焉不详，未能深究其理。实则奇经八脉蓄溢十二经气血，具有统筹全身阴阳气血盛衰的作用，从调理奇经、通畅络脉入手，有利于阐释本病中医病机，有望探索出新的治疗策略，对于提高该类患者的生活质量、改善临床症状方面具有重要的意义。
- [0009] 综上，ALS作为一种严重威胁患者生命的罕见疾病，面临着临床缺乏治疗药物、疗效不确切、副作用明显、新药研发困难等严峻问题，因此针对有效改善临床症状、提高生活质量，研发创新药物已经迫在眉睫，成为临床亟待解决的重大课题。
- [0010] 发明内容
- [0011] 吴以岭院士提出“从奇经论治运动神经元病”学术观点，为包括ALS在内的多种神经肌肉类疾病提供了系统的理论指导。奇经亏虚、八脉失养，可导致人体十二经脉、五脏六腑皆失气血阴阳温煦润养，痿废之变，尤其与督脉密切相关。此外痿证与脏腑虚损有关，提出“五脏分证”，从ALS的临床症状与体征入手，将奇经功能失调与脏腑功能失常综合分析，主要病机如元精亏损，肺胃津亏，肺热叶焦，胃热阴亏等。结合“三焦分治”，上焦宜举，或清燥救肺，益

气生津以助肺宣发敷布之力，或补气升陷，以助大气斡旋之功，或补益心血以荣百脉；治中焦宜化，或健脾助运以资生化之源，或清化湿热以畅中焦壅滞之机；治下焦宜填，温理奇阳，以振真元之颓废，温填真精，以滋耗损之阴血。上述观点为痿证治疗提供了新的思路，对ALS疾病治疗具有重要指导价值。奇经八脉在痿证论治中具有重要且独特的价值，尤其督脉，内充肾精所化脊髓，入脑则成脑髓，督脉循行联络肾与脑，贯通上下，又与ALS病变部位吻合。吴以岭院士创新提出的“奇经治痿、五脏分证、三焦分治”，从奇经督脉论治痿证，既突出中医奇经八脉理论特色，又吸取了现代医学对本病的认识，融会贯通中西医学，使病机探讨与治疗更切于临床并有效指导临床。

- [0012] 吴以岭院士自20世纪80年代始致力于络病理论及其应用研究，将病程较长、反复发作、迁延难愈的一类疾病均归为络病研究的范畴，ALS属于络病范畴。络病理论指出络脉作为从经脉支横别出、逐层细分、纵横交错、遍布全身，广泛分布于脏腑组织的网络系统，是维持生命活动和保持人体内环境稳定的网状结构，依据行气血功能不同分为经络之络和脉络之络，形成围绕气络学说和脉络学说两大学科分支。其中气络学说提出气在经中为经气，经气入络即为络气，“经气”通过气络面弥散到脏腑肌肤、四肢百骸，发挥络属调节、温煦充养、防御卫护、信息传导、自稳调控等功能。气络病变主要涉及脑髓督络、内分泌代谢、免疫功能异常等病变。
- [0013] 气络作为具有独特功能的网络结构与正经、脑髓发生着直接的联系，正如《灵枢·邪气脏腑病形》曰：“十二经脉，三百六十五络，其血气皆上于面而走空窍”。同时络脉也是奇经脑髓与肌肉筋脉、四肢百骸联系的重要通路。气络与脑督络关系密切，形成以脑为气机升降之巅的神经调控高级中枢，以脊髓为气机升降之通路，以脑髓气络调控脏腑、外控肢节的复杂生命运动的神经系统调控机制。
- [0014] 督脉与现代医学脊髓在解剖部位和功能方面密切相关，督脉循行于背部正中与脊相重，上通于脑，下联于肾，成为“精气升降之通路”。
- [0015] 脑神调控运动功能的发挥有赖作为元精元气升降通路的督脉实现，“细络”与现代神经解剖学及组织学描述的脊神经从脊髓分出，然后逐级分支到达机体内部。

外的论述极其一致。可见，脊髓与督脉循行一致，从脊髓分支而出的细络显然属于督络。

[0016] 可见，元气由肾中真精所化生，循督(髓)而入络于脑，真元之气在脑之气络的功能体现了脑神的作用，脑神随督络气机将其调控之神机下达五脏六腑、四肢百骸，从而形成与脑、脊髓神经调控运动功能之间密切的联系。若元精不足、真元亏虚、督络失养、气络失荣则可导致痿证，ALS作为一组中枢神经系统变性疾病，基本病理主要表现为大脑运动皮质的锥体细胞消失，脊髓前角和脑干的运动神经元脱失并出现异常的细胞病理改变、皮质脊髓束变性，进而导致肌肉萎缩，可见ALS发病部位主要在脑与脊髓，与脑髓循行部位极为吻合，真元颓废气阳虚乏、脑髓失养则肢体痿软无力、肌肉萎缩、神倦懒言，故ALS属气络-脑髓督络病变。

[0017] 首次提出“真元不足，督络失养”ALS中医病机特点。真元不足为发病之本：真元之气即元气，由元精所化生，循经脉行三焦，布散五脏六腑。真元之气作为人体生命活动的根本动力，激发脏腑组织的功能活动，通过中枢神经的调节功能来实现，ALS病位在脑髓，先天之精不足，则直接引起元气元阳的亏虚，加之该病多发生于中老年人，年老精气耗竭，真元颓废，脏腑功能下降，加之调养失宜，或感受外邪，或劳力外伤，或情志失调，或饮食不节，或房劳过度，则元气损伤更甚，脑髓不充，失其所司，导致相应功能失常，故真元不足为发病治本。

[0018] 就临证表现而言，真元颓废则阳主动、主振奋向上之功能减退，全身活动部位则会出现无力运转活动，表现为肢体无力、行走困难、神倦懒言、气短等。“阳化气、阴成形”，阳虚日久，阴气无从化生。一身元阳、元气不足，鼓动无力、气血生化乏源，布散受阻，无以充养肌肉皮肤，进而导致肌肉无力、萎缩。阳气虚乏，筋脉失于温煦濡养，可见肌张力增高，肌肉僵硬等症状。本病亦常见延髓麻痹吞咽困难等症状，则是真元不足，清阳不升，浊阴不降，气机乖乱，咽门不利所致。

[0019] 督络失养是病机关键：ALS病位在脑髓，奇经之督脉，其循行路线恰在骨髓与脑，真元之气根源于肾，统于督脉，督脉及其分支督络虚损，真元之气不足

，不仅统率、督促全身阳气的作用减弱，其循行部位受累尤甚，脊髓与脑皆失温养而发病。督络循行贯脊循项而入脑，督络失充则见颈项无力，甚或腰脊无力，腰膝酸痛；奇经亏损，督络失养，则统率、督促全身阳气的作用减弱，神倦懒言，肌肉失于温煦、濡养则可见肌肉跳动；督络失充，清阳不升，上窍失司则可出现构音不清、吞咽困难、饮水呛咳。

[0020] 综上所述，真元之气的温煦、推动、营养作用是脏腑功能活动正常发挥的根本，督络贯穿于脊，上通于脑，为阳脉之海，具有总督主导其他经络及脏腑活动的作用，脑随督络气机之升降络属皮肉筋骨，调节肢体运动功能。若真元之气虚乏，督络失养，元气不达肌肉，则肌肉失去元气激发而无力运动。督络虚损，奇阳虚乏，全身阳气作用减弱，其循行部位受累尤甚，脊髓与脑皆失温养而发病，这与ALS上下运动神经元损伤及延髓麻痹的病理极为吻合。由此可见，从奇经督络探讨ALS病因病机，为该病的治疗开拓新的研究思路。

[0021] 确立“扶元起痿，养荣生肌”治法。针对ALS“真元不足，督络失养”基本病机变化，制定“扶元起痿，养荣生肌”治法。奇经病变多由于元气不足或亏损所致，治疗当扶助元气为根本，扶助真元，元气充沛，阳气旺盛，经络畅通，脏腑百骸皆得其养。因此，选用人参补元气之药，一是滋补元阳，以充督络，二是补五脏之气，精自生而形自盛；三是益气而通血脉，行气以帅血，气血充盛，血脉畅通，奇经得以补充，蓄溢十二经气血，肌腠得以濡养，从而达到扶元起痿之功。故宜阴中求阳，阳中求阴，扶元起痿同时配伍滋填真精的药物，既可滋肾补精血，又能于滋补阴精之剂中使阳生阴充，扶助元气与补肾填精合用，从而达到扶元起痿，养荣生肌的目的。

[0022] 本发明药物组合物由人参和肉苁蓉两味药物组成。其中人参味甘、微苦，性平，归脾肺心经。功能大补元气、荣养气络。痿证病机属脏腑虚损，奇经督络亏虚。人参为君药，一可大补元气，滋补元阳，主治奇经八脉之虚损；二可补肺中之气，肺气旺则四脏之气皆旺，精自生而形自盛；三可益气而通血脉，行气以帅血，气血充盛，血脉畅通，奇经得以补充，蓄溢十二经气血，肌腠得以濡养，从而达到扶元起痿之功。

- [0023] 肉苁蓉甘温味厚，归肾、大肠经。功能滋填肾精、荣养生肌。本品温而不燥，甘咸滋润，补火助阳而不伤阴，善治五劳七伤，肾虚骨瘦，是填补肾精、荣养生肌之良药。肉苁蓉于滋补阴精之剂中能使阳生阴充，精血充足，可奏长肌肉，暖腰膝之效，从而改善痿证患者畏寒肢冷，肌力减退等症状。肉苁蓉可补益肾元，温润填精，荣养生肌，与君药人参合用，生精补髓，补气养血益阳。
- [0024] 综上，本组方选用扶助真元、荣养督络之人参，承“形不足者温之以气”之旨；选用滋填真精，荣养生肌之肉苁蓉，意守“精不足者，补之以味”之意，方可达到扶元起萎，养荣生肌之目的。
- [0025] 本处方形成过程既体现了中医理论对临床组方的指导，基于临床人用经验数据深化，也体现了现代生物信息技术、实验技术的有机结合。
- [0026] 本发明药物组合物主治病证为肌萎缩侧索硬化症督元虚损证，症见肌力下降、肌肉萎缩、肌肉跳动、肌肉僵硬或萎软，构音不清、吞咽困难、呼吸气短、腰膝酸软、神倦懒言、畏寒肢冷等，舌淡，脉沉无力。真元不足则阳主动、主振奋向上之功能减退，全身活动部位则会出现无力运转活动，表现为肢体无力、行走困难、神倦懒言、气短等。一身元阳、元气不足，无以充养肌肉皮肤，则肌肉无力、萎缩。阳气虚乏，筋脉失于温煦濡养，可见肌张力增高、肌肉僵硬等症状。真元不足，清阳不升，浊阴不降，气机乖乱，咽门不利则吞咽困难。督络失养则颈项无力，甚或腰脊无力，腰膝酸痛，督络失充，清阳不升，上窍失司则可出现构音不清、吞咽困难、饮水呛咳。据此，创新提出ALS“真元不足，督络失养”的病机特点，真元不足为发病之本，督络失养为病机关键，确立“扶元起萎，养荣生肌”治法，拟定本发明药物组合物组方。
- [0027] 本发明药物组合物组方全方契中病机，选用人参大补元气、荣养气络、扶元起痿，配伍滋填真精之肉苁蓉，既可滋肾补精血，又能于滋补阴精之剂中使阳生阴充，扶助元气与补肾填精合用，从而达到扶元起萎，养荣生肌的目的。该处方是在中医理论对临床组方的指导下，基于临床人用经验数据深化，现代生物信息技术及实验技术的有机结合形成的有效组方，病因病机、治则治法、遣方用药，理、法、方、药一以贯之，契合度高，处方合理。
- [0028] 为达到上述发明目的，本发明采用了如下的技术方案：

- [0029] 本发明为一种治疗肌萎缩侧索硬化症的中药组合物，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参3-9份、肉苁蓉3-9份。
- [0030] 进一步的所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参4-6份、肉苁蓉4-6份。
- [0031] 进一步的所述中药组合物还可由以下重量份的原料组成：人参3份、肉苁蓉9份。
- [0032] 进一步的所述中药组合物也可由以下重量份的原料组成：人参6份、肉苁蓉6份。
- [0033] 进一步的所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参9份、肉苁蓉3份。
- [0034] 进一步的所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参7份、肉苁蓉4份。
- [0035] 本发明还提供了该中药组合物的制备方法，其活性成分由以下步骤制成：按处方量称取人参、肉苁蓉，加水煎煮，滤过，滤液减压浓缩为浸膏，该浸膏为所述中药组合物的活性成分。
- [0036] 本发明还提供了该中药组合物，在制备治疗肌萎缩侧索硬化症表现为肌力下降、肌肉萎缩、肌肉跳动、肌肉僵硬或萎软，构音不清、吞咽困难、呼吸气短、腰膝酸软、神倦懒言或畏寒肢冷等症状中的应用。
- [0037] 本发明还提供了该中药组合物，在制备推迟肌萎缩侧索硬化瘫痪时间、改善受损的神经功能、减轻坐骨神经病变、提高神经肌肉接头共定位程度药物中应用。
- [0038] 本发明还提供了该中药组合物，在制备延长小鼠悬挂时间，提高肌肉动作电位峰值并缩短选区时程药物中的应用。
- [0039] 本发明还提供了该中药组合物，在制备改善中枢神经系统脱髓鞘症状，提高肌力和肌纤维丰腴度，增加肌肉组织的血液供应的药物中的应用。
- [0040] 本发明还提供了该中药组合物，在制备治疗肌少症药物中的应用。
- [0041] 本发明还提供了该中药组合物，在制备改善神经电生理，降低血清丙二醛含量，促进轴突生长和髓鞘再生，保护神经功能；提高肌肉突触前标志物与乙酰胆碱受体标志物共定位程度，提高腓肠肌卫星细胞阳性数量以及髓鞘标志物(MBP)、提高神经肌肉接头结构的完整性，增加神经突标志物(Tuj-1)以及突触囊

泡蛋白(SV2A)的表达量,可促进髓鞘再生,改善脱髓鞘引起的行为学改变,改善运动神经元对肌肉的信号传递,延缓肌萎缩侧索硬化症等疾病进展药物中的应用。

[0042] 进一步的,本发明提供了一种药物,其包括如前所述的中药组合物或如前所述制备方法制得的中药组合物。

[0043] 本发明保护的中药组合物剂型为胶囊剂、片剂、颗粒剂、注射剂、丸剂、散剂、喷剂或口服液。

[0044] 为使上述剂型能够实现,需在制备这些剂型时加入药学可接受的辅料,例如:例如:填充剂、崩解剂、润滑剂、助悬剂、粘合剂、甜味剂、矫味剂、防腐剂、基质等。填充剂包括:淀粉、预胶化淀粉、乳糖、甘露醇、甲壳素、微晶纤维素、蔗糖等;崩解剂包括:淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、低取代羟丙纤维素、交联羧甲基纤维素钠等;润滑剂包括:硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠、滑石粉、二氧化硅等;助悬剂包括:聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素、蔗糖、琼脂、羟丙基甲基纤维素等;粘合剂包括,淀粉浆、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素等;甜味剂包括:糖精钠、阿斯帕坦、蔗糖、甜蜜素、甘草次酸等;矫味剂包括:甜味剂及各种香精;防腐剂包括:尼泊金类、苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸及其盐类、苯扎溴铵、醋酸氯己定、桉叶油等;基质包括:PEG6000, PEG4000, 虫蜡等。

[0045] 进一步的,本发明中药组合物的颗粒剂由以下步骤制成:

[0046] (1)按处方量称取人参、肉苁蓉,加水煎煮完成后,水提液滤过,滤液浓缩至浸膏,备用;

[0047] (2)取上述浸膏,用喷雾干燥机喷雾干燥,收集喷雾粉,备用;

[0048] (3)将步骤(2)所得喷雾粉加适量辅料制粒,按照常规方法制成颗粒剂。

[0049] 进一步的,本发明中药组合物的颗粒剂的制备方法为:

[0050] (1)按处方量称取人参、肉苁蓉,加水煎煮三次,第一次加10倍量水,第二、三次各加8倍量水,每次煎煮1.5小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃)的浸膏备用;

[0051] (2)取上述浸膏,用喷雾干燥机喷雾干燥,收集喷雾粉,备用;

- [0052] (3)将步骤(2)所得喷雾粉加适量辅料制粒，按照常规方法制成颗粒剂。
- [0053] 进一步的，本发明还提供了一种疾病的治疗方法，其包括给予如前所述的中药组合物、或给予如前所述制备方法制得的中药组合物或给予如前所述的药物。
- [0054] 所述治疗包括如下至少一项：
- [0055] 推迟肌萎缩侧索硬化瘫痪时间、改善受损的神经功能、减轻坐骨神经病变、提高神经肌肉接头共定位程度；
- [0056] 延长小鼠悬挂时间，提高肌肉动作电位峰值并缩短选区时程；
- [0057] 改善中枢神经系统脱髓鞘症状，提高肌力和肌纤维丰腴度，增加肌肉组织的血液供应；
- [0058] 改善神经电生理，降低血清丙二醛含量、促进轴突生长和髓鞘再生，保护神经功能、提高肌肉突触前标志物与乙酰胆碱受体标志物共定位程度、提高腓肠肌卫星细胞阳性数量以及髓鞘标志物(MBP)、提高神经肌肉接头结构的完整性、增加神经突标志物(Tuj-1)以及突触囊泡蛋白(SV2A)的表达量、促进髓鞘再生、改善脱髓鞘引起的行为学改变或改善运动神经元对肌肉的信号传递，延缓肌萎缩侧索硬化症的疾病进展。
- [0059] 本发明提供的中药组合物的活性成分的制备方法，工艺简单，操作方便，安全环保，能够最大程度的保留中药中的活性成分，保证药物的功效。

附图说明

- [0060] 图1 TN-2242系列化合物在谷氨酸损伤模型中的EC50；
- [0061] 图2 TN-2242系列化合物在谷氨酸损伤模型中的存活率(*P<0.05)；
- [0062] 图3生存曲线-不分性别；
- [0063] 图4生存曲线-雌性；
- [0064] 图5空白对照组(雌)比目鱼肌HE染色20×；
- [0065] 图6空白对照组(雄)比目鱼肌HE染色20×；
- [0066] 图7模型对照组(雌)比目鱼肌HE染色20×；
- [0067] 图8模型对照组(雄)比目鱼肌HE染色20×；
- [0068] 图9阳性对照组(雌)比目鱼肌HE染色20×；
- [0069] 图10阳性对照组(雌)比目鱼肌HE染色20×；

- [0070] 图11本发明药物组合物低剂量组(雌)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0071] 图12本发明药物组合物低剂量组(雄)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0072] 图13本发明药物组合物中剂量组(雌)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0073] 图14本发明药物组合物中剂量组(雄)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0074] 图15本发明药物组合物高剂量组(雌)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0075] 图16本发明药物组合物高剂量组(雄)比目鱼肌HE染色 $20\times$ ；
- [0076] 图17空白对照组(雌)腓肠肌HE染色 $10\times$ ；
- [0077] 图18空白对照组(雄)腓肠肌HE染色 $10\times$ ；
- [0078] 图19模型对照组(雌)腓肠肌HE染色 $10\times$ ；
- [0079] 图20模型对照组(雄)腓肠肌HE染色 $10\times$ ；
- [0080] 图21腓肠肌肌肉突触前标志物(synaptotagmin-2)与乙酰胆碱受体(nAChR)标志物(α -BTX)共染免疫荧光；
- [0081] 图22腓肠肌肌肉卫星细胞标志物(Pax7)与层粘连蛋白(Laminin 2 α)共染免疫荧光结果；
- [0082] 图23脊髓中髓鞘碱性蛋白(MBP)免疫荧光；
- [0083] 图24脊髓中神经突指标(Tuj-1)免疫荧光。

具体实施方式

- [0084] 下面结合具体实施例对本发明所述内容做进一步详细的说明。
- [0085] 实施例1
- [0086] 处方：人参600g肉苁蓉600g
- [0087] 制备方法：
- [0088] 按处方量称取人参、肉苁蓉，加水煎煮三次，第一次加10倍量水，第二、三次各加8倍量水，每次煎煮1.5小时，滤过，滤液减压浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃)的浸膏，滤过，备用；取上述浸膏，用喷雾干燥机喷雾干燥，进风温度 $175^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，出风温度 $100^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，收集喷雾粉，备用。将喷雾粉、麦芽糊精混匀制粒，得颗粒，备用。取上述颗粒，分装，每袋5g，即得。
- [0089] 实施例2
- [0090] 处方：人参300g肉苁蓉900g

[0091] 制备方法:

[0092] 按处方量称取人参、肉苁蓉,加水煎煮两次,第一次加10倍量水,第二次加8倍量水,每次煎煮1.5小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃)的浸膏,滤过,备用;取上述浸膏,用喷雾干燥机喷雾干燥,进风温度175℃±5℃,出风温度100℃±5℃,收集喷雾粉,备用。将喷雾粉、麦芽糊精混匀制粒,装入胶囊。

[0093] 实施例3

[0094] 处方: 人参900g肉苁蓉300g

[0095] 制备方法:

[0096] 按处方量称取人参、肉苁蓉,加水煎煮三次,第一次加8倍量水,第二、三次各加10倍量水,每次煎煮2小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃)的浸膏,滤过,备用;取上述浸膏,用喷雾干燥机喷雾干燥,进风温度175℃±5℃,出风温度100℃±5℃,收集喷雾粉,备用。将喷雾粉、麦芽糊精混匀制粒,按常规方法制成片剂。

[0097] 实施例4

[0098] 处方: 人参700g肉苁蓉400g

[0099] 制备方法:

[0100] 按处方量称取人参、肉苁蓉,加水煎煮两次,每次加10倍量水,每次煎煮2小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为1.05~1.10(60℃)的浸膏,滤过,按常规方法制备成口服液即可。

[0101] 实施例5

[0102] 人参600g肉苁蓉600g

[0103] 加10倍量水煎煮两次,滤过,减压浓缩成浸膏,烘干的喷雾粉。

[0104] 对比例1

[0105] 人参1200g

[0106] 加10倍量水煎煮两次,滤过,减压浓缩成浸膏,烘干的喷雾粉。

[0107] 对比例2

[0108] 肉苁蓉1200g

- [0109] 加10倍量水煎煮两次，滤过，减压浓缩成浸膏，烘干的喷雾粉。
- [0110] 对比例3
- [0111] 人参860g淫羊藿340g
- [0112] 加10倍量水煎煮两次，滤过，减压浓缩成浸膏，烘干的喷雾粉。
- [0113] 对比例4
- [0114] 人参600g淫羊藿600g
- [0115] 加10倍量水煎煮两次，滤过，减压浓缩成浸膏，烘干的喷雾粉。
- [0116] 对比例5
- [0117] 人参1000g肉苁蓉200g
- [0118] 加10倍量水煎煮两次，滤过，减压浓缩成浸膏，烘干的喷雾粉。
- [0119] 对比例6
- [0120] 人参200g肉苁蓉1000g
- [0121] 加10倍量水煎煮两次，滤过，减压浓缩成浸膏，烘干的喷雾粉。
- [0122] 试验例1：多种提取物及其不同配伍对ALS相关细胞模型的干预作用研究
- [0123] 1试验目的
- [0124] 本研究以谷氨酸损伤大鼠嗜铬瘤细胞PC-12为载体，测定各提取物和不同配伍组对谷氨酸损伤PC-12细胞模型生存活性的干预作用，确定后续研究的提取物或者配伍组。
- [0125] 2实验材料
- [0126] 2.1待筛选样品

供试品号	供试品	含量	批号
TN-2242-1	本发明药物组合物 (实施例 5)	1.99g 生药/g 药粉	220325-1
TN-2242-2	对比例 1	2.06g 生药/g 药粉	220325-2
TN-2242-3	对比例 2	2.71g 生药/g 药粉	220325-3
TN-2242-4	对比例 3	2.63g 生药/g 药粉	220325-4
TN-2242-5	对比例 4	2.66g 生药/g 药粉	220325-5
TN-2242-6	对比例 5	2.25g 生药/g 药粉	220325-6
TN-2242-7	对比例 6	2.50g 生药/g 药粉	220325-7
来源	石家庄以岭药业股份有限公司		
有效期	暂定至 2023 年 03 月 24 日		
保存条件	常温、干燥		

- [0127] 2.2试剂及工具药
- [0128] 2.2.1造模药：L-谷氨酸
- [0129] 2.2.2试剂及试剂盒：DMEM培养基、DMSO、胰酶、双抗、胎牛血清、PBS、MTS试剂盒
- [0130] 2.3实验系统
- [0131] 2.3.1细胞株名称及来源
- [0132] 大鼠嗜铬瘤细胞PC-12：本公司细胞实验室冻存。
- [0133] 2.3.2仪器系统
- [0134] SW-CJ-2FD洁净工作台，苏州安泰空气技术有限公司。
- [0135] Protect-2FD-S洁净工作台，赛默飞世尔科技(中国)有限公司。
- [0136] Olympus CKX53显微镜，奥林巴斯公司。
- [0137] Thermo3111二氧化碳培养箱，赛默飞世尔科技有限公司。
- [0138] Infinite M200PRO型酶标仪，瑞士TECAN公司。
- [0139] AMQAX1000细胞计数仪，赛默飞世尔科技有限公司。
- [0140] DK-98-Ⅱ电热恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司。
- [0141] Sorvall ST 16/16R高速冷冻离心机，赛默飞世尔科技有限公司。
- [0142] BPN-CH二氧化碳培养箱，上海一恒科学仪器有限公司。

[0143] 3. 试验方法

[0144] 3.1 主要试剂配制:

[0145] 各提取物及配伍成分均溶于DMSO中配制成500mg/ml的母液, -20℃保存备用。

[0146] 3.2 实验分组及干预方法:

[0147] 取对数生长期细胞, 接种于细胞培养板中(细胞密度 1×10^5 个/mL), 待细胞融合至80%时弃去旧培养基, 将细胞分为以下几组(每组平行设置6个复孔):

[0148] 3.2.1 待筛选样品实验分组

[0149] (1) 空白对照组(Control): 用无血清的培养基继续培养。

[0150] (2) 模型组(Model): 用含20mM谷氨酸的无血清培养基继续培养。

[0151] (3) 溶剂组(DMSO): 加入含0.1% DMSO、20mM谷氨酸的无血清的培养基继续培养。

[0152] (4) 药物组: 加入500 μ g/ml, 50 μ g/ml, 5 μ g/ml等各浓度、20mM谷氨酸的各药物无血清培养基培养。

[0153] 4. 指标检测

[0154] 生存活性

[0155] 生存活性测定采用96孔板, 利用MTS检测试剂, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

[0156] 5 统计方法

[0157] 试验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, EC_{50} 由GraphPad Prism 8软件统计得出, 统计学分析采用T-TEST。

[0158] 6. 结果

[0159] TN-2242系列化合物从500 μ g/ml, 50 μ g/ml, 5 μ g/ml, 500ng/ml, 50ng/ml, 5ng/ml依次加入到谷氨酸损伤的PC12细胞中, 24h后MTS检测细胞存活率计算得到各化合物抑制谷氨酸对神经细胞损伤的 EC_{50} , 结果如图1所示。其中本发明药物组合物 EC_{50} 值最低, 为1.225 μ g/ml。其余各提取物以及配伍组 EC_{50} 值见表1。

[0160] 表1 TN-2242系列化合物在谷氨酸损伤模型中的 EC_{50}

名称	TN-2242-1	TN-2242-2	TN-2242-3	TN-2242-4	TN-2242-5	TN-2242-6	TN-2242-7
EC ₅₀ (μg/ml)	1.225	117.8	113	1.656	2.08	50.99	53.01

[0161] 之后以本发明药物组合物EC₅₀值为参考，检测各提取物以及配伍组在1ug/ml浓度下对谷氨酸损伤的PC12的保护作用。结果显示(图2，表2)，本发明药物组合物优于对比例1-6。

[0162] 表2 TN-2242系列化合物在谷氨酸损伤模型中的存活率

	空白	溶剂	模型	TN-2242-1	TN-2242-2	TN-2242-3	TN-2242-4	TN-2242-5	TN-2242-6	TN-2242-7
				1 μg/ml						
存活率/%	100±3.5	97.32±1.66	57.70±1.43	78.16±3.00	64.01±2.19	63.95±2.57	73.87±2.34	70.90±1.76	68.84±1.04	67.14±1.32

[0163] 以上试验结果可见本发明药物组合物在谷氨酸损伤模型中的保护作用优于其他提取物和配伍组。

[0164] 7.记录保管

[0165] 除计算机或自动化仪器直接采集的数据外，其它所有在实际研究中产生的数据均记录在表格或记录纸上，并随时整理装订。

[0166] 8.资料归档

[0167] 8.1保存单位：河北以岭医药研究院有限公司新药评价中心

[0168] 8.2地址：石家庄高新技术开发区天山大街238号

[0169] 试验例2：本发明药物组合物对肌萎缩侧索硬化SOD1-G93A转基因小鼠生存时间的影响

[0170] 试验目的

[0171] 通过SOD1-G93A转基因小鼠，观察本发明药物组合物对肌萎缩侧索硬化症的治疗作用。

[0172] 1实验材料

[0173] 1.1供试品

[0174] 1.1.1名称：本发明药物组合物，通过实施例1制得,缩写：TMC-073。供试品号：GLPTN-2106。

- [0175] 1.1.2性状：本品为黄棕色粉末，气微香，味微苦。
- [0176] 1.1.3功能主治：肌萎缩侧索硬化症
- [0177] 1.1.4临床用量及给药途径：18g生药/日，口服。
- [0178] 1.1.5规格：3.1g生药/g粉。
- [0179] 1.1.6来源和批号：石家庄以岭药业股份有限公司，210701。
- [0180] 1.1.7保存条件：常温干燥。
- [0181] 1.1.8有效期：暂定至2022年07月27日。
- [0182] 1.2阳性药及主要试剂
- [0183] 1.2.1阳性药：利鲁唑(riluzole)：商品名力如太，50mg/片，用于治疗肌萎缩侧索硬化症，可延长患者存活期和/或推迟气管切开的时间。临床成人口服50mg(1片)/次，一日2次。由Sanofi Winthrop Industrie生产，赛诺菲(北京)制药有限公司分装，批号：0KP4C，有效期至2023年05月。
- [0184] 1.2.2主要试剂：灭菌注射用水，石家庄四药有限公司，批号1911143205，有效期至2021.11.13。批号2007023202，有效期至2022.07.01。
- [0185] 1.3实验系统
- [0186] 1.3.1动物种系：B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J(Stock Number:002726)由美国The Jackson Laboratory提供，江苏集萃药康生物科技股份有限公司进行保种和代繁育，并进行子代鼠SOD1-G93A转基因小鼠的鉴定。同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠为阴性对照鼠。
- [0187] 1.3.2动物级别：SPF级。
- [0188] 1.3.3动物性别和数量：B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J小鼠150只；同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠20只，雌雄均用。
- [0189] 1.3.4动物年龄：53日龄。
- [0190] 1.3.5动物体重：雄鼠22.8g-34.4g，雌鼠16.9g-25.3g。
- [0191] 1.3.6动物来源：购自美国The Jackson Laboratory，由江苏集萃药康生物科技股份有限公司进行繁殖。

- [0192] 1.3.7动物合格证号及发证单位、接收日期：合格证编号320727210100625138，许可证号SCXK(苏)2018-0008，发证单位江苏集萃药康生物科技股份有限公司，接收日期2021年08月11日。
- [0193] 1.3.8饲养条件：小鼠笼养，饲养在河北省中西医结合医药研究院新药评价中心，许可证号：SYXK(冀)2020-006。光照12小时/天，温度20~26℃，相对湿度40~70%。
- [0194] 1.3.9检疫过程：新动物检疫5天，期间观察动物是否饮水和摄食正常、健康状况良好，无疾病和死亡征兆。
- [0195] 1.3.10饲料：SPF大小鼠维持饲料，拟由北京科澳协力饲料有限公司提供，饲料生产许可证号：京饲证(2018)06073，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2019-0003。产品批号：21033213,有效期至：2021.08.31产品批号：21073213,有效期至：2022.01.03产品批号：21093213，有效期至：2022.03.03
- [0196] 1.3.11饮水：饮用经ROB-B实验动物饮水系统制备的洁净水，灌装饮水瓶供自由饮用，饮用水每年进行一次全项检测，主要包括微生物指标、毒理指标、感官性状和一般化学指标，委托有资质的机构进行检测；每2个月进行一次微生物限度检测，委托石家庄以岭药业股份有限公司质检科进行，检测报告由动物室保管并按年度归档保存。
- [0197] 1.3.12垫料：普通级玉米芯垫料，垫料经高温高压消毒后使用，拟由北京科澳协力饲料有限公司提供，批号：21099811。
- [0198] 1.3.13标识：小鼠耳标号进行标记。耳标厂家：创博环球(北京)生物科技有限公司。
- [0199] 2试验方法
- [0200] 2.1试验设计依据
- [0201] 2.1.1采用标准：国家食品药品监督管理局颁布的《中药、天然药物注册分类及申报资料要求》、《药物非临床研究质量管理规范》及相关文献资料确定。
- [0202] 2.1.2实验系统选择说明：人超氧化物歧化酶(SOD)基因突变转基因小鼠(B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J)被认为是目前肌萎缩侧索硬化症(ALS)的最常用且最好的动物模型。由于ALS的发病机制尚不明确，90%为散发性，10%为家族性

(FALS), 1993年Rosen发现了铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)错义突变是ALS研究中的一个重要里程碑。在FALS中SOD1突变的发现导致随后发展了ALS的动物模型, 目前广泛应用临床和基础研究的ALS转基因鼠是SOD1-G93A小鼠, 该转基因小鼠携带高拷贝人SOD1突变基因, 纯合子小鼠脊髓运动神经元减少, 出生后约3个月逐渐出现悬尾肢体震颤, 一个或多个肢体偏瘫症状等神经肌肉功能障碍, 寿命约4-5个月, 能够模拟ALS慢性进展性的病程以及部分病理和生化表现。

[0203] 2.2剂量与分组

[0204] ALS小鼠依据文献以及前期经验联合行为学检测结果与阴性对照小鼠有明显改变后, 按体重随机分组并开始给药观察, 具体分为: 模型对照组(M), 阳性药对照组(利鲁唑0.02g/kg,R), 本发明药物组合物低(073-L)、中(073-M)、高剂量组(073-H), 每组动物数30只, 另设野生型同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠为阴性对照组(C, 共20只)。具体试验分组及剂量见附表3。

[0205] 2.3给药方法

[0206] 经口灌胃给药, 与临床推荐的口服途径相一致。

[0207] 2.4供试品配制和保存

[0208] 利鲁唑按体重60kg计算临床公斤剂量约为0.002g/kg。小鼠给药剂量相当于临床剂量10倍, 约为0.02g/kg, 给药体积为10ml/kg, 给药浓度为0.02g/10ml。药物配制以其片剂研磨的药粉进行, 每片含利鲁唑50mg, 配制时取1片, 以灭菌注射用水研磨定容至25ml。

[0209] 本发明药物组合物临床拟使用剂量为18g生药/日, 本次试验设置低、中、高三个剂量: 1.5、3.0、6.0g生药/kg(分别相当于临床用量倍数的5、10、20倍)。具体见附表3。以灭菌注射用水为溶媒, 分别配制高、中、低剂量, 称取适量药物研磨。

[0210] 附表3试验分组及剂量设置表

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	规格 (g 生 药/g 粉)	制剂剂量 (g 粉/kg)	配药浓 (g 粉 /ml)	相当于临 床剂量倍 数
阴性对照组	20	——	——	——	——	——
模型对照组	30	——	——	——	——	——
阳性药对照组 (利鲁唑)	30	0.02 g/kg	50mg/片	——	25ml/片	10
低剂量	30	1.50	3.1	0.48	0.048	5
TCM-073 中剂量	30	3.00	3.1	0.97	0.097	10
高剂量	30	6.00	3.1	1.94	0.194	20

- [0211] 2.5供试品的给予
- [0212] 用注射器抽取相应药液进行灌胃给药，给药体积10ml/kg，其中模型对照组、阴性对照组给予相应体积的灭菌注射用水；每周根据最近一次称量的体重调整每只动物给药量。
- [0213] 2.6模型小鼠的判定
- [0214] 2.6.1悬尾试验：观察肢体伸反射表现，正常小鼠提尾至空中可见双侧后肢自然伸直，小鼠运动神经元病起时可见提尾后后肢屈曲。评分标准如下：
- [0215] 0分——未见双后肢屈曲。
- [0216] 1分——可见一侧后肢屈曲，另一侧屈曲不明显。
- [0217] 2分——可见双侧后肢屈曲。评分为2分的小鼠判定为处于症状期小鼠。当所有ALS小鼠都评分达到2分后，停止悬尾试验。
- [0218] 2.6.2悬挂试验：将小鼠置于3目网筛上，迅速反转，小鼠倒挂于网筛后计时，以90s为限，记录不足90s的小鼠及实际时间。当ALS小鼠出现死亡后，停止悬挂试验。ALS小鼠出现进行性的运动功能丧失，表现为提尾后肢屈曲，其异常程度与肌肉萎缩和肌肉力量的丧失程度是相匹配的。本次试验根据悬尾试验结果判定转基因小鼠是否有发病迹象。同时结合文献调研以及前期试验经验，继续对逐只小鼠进行悬尾和悬挂试验观察。
- [0219] 2.7观测的指标、时间和内容
- [0220] 2.7.1一般观察与评价方法

- [0221] 试验期间观察动物精神状态、病情进展、存活情况等情况。记录每只动物的出生时间、给药起始时间、体重、死亡时间，计算动物的平均存活时间，给药后不同时间的动物累计死亡率。
- [0222] 死亡终点判定方法：从伦理学角度考虑，按文献^[9]报道小鼠侧卧平板上25s不能自主翻身至正常体式则判定小鼠死亡。
- [0223] 2.7.2行为学指标
- [0224] 试验给药阶段进行神经系统功能评价(Snow评分法，每周2次)，神经系统评分的具体标准：
- [0225] 1.0分--将小鼠悬吊时出现后肢伸展异常或震颤；
- [0226] 1.5分--一侧后肢无力；
- [0227] 2.0分--双侧后肢无力、步态异常；
- [0228] 2.5分--一侧肢体明显无力；
- [0229] 3.0分--双侧肢体明显无力；
- [0230] 3.5分--一侧后肢瘫痪；
- [0231] 4.0分--双侧后肢瘫痪；
- [0232] 5.0分--将小鼠仰卧后20秒内不能翻转。
- [0233] 以给药后到首次出现神经功能评分 ≥ 3.5 分的时间作为瘫痪出现时间，计算动物的平均瘫痪症状出现时间，给药后不同时间出现瘫痪动物的百分率以及各组药物的瘫痪延迟率，延迟率计算公式如下：
- $$\text{延迟率}(\%) = \frac{\text{给药组瘫痪时间} - \text{模型组瘫痪时间}}{\text{模型组瘫痪时间}} \times 100\%$$
- [0234] 2.7.3小鼠剔除标准
- [0235] 实验过程中观察小鼠的一般健康状况及运动功能变化情况，若在常规发病时间段外出现了死亡或死亡不满足于ALS疾病的运动功能渐进性减弱规律，将其视为非ALS死亡；按ALS模型判定标准未见发病变化；此类小鼠的测量数据均被剔除，不参与最终的数据统计分析。
- [0236] 2.8相关工作人员通知
- [0237] 购买动物时通知动物室，在动物出现异常情况时通知病理室进行处理。

- [0238]2.9统计方法
- [0239]试验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用SPSS 25.0统计软件,生存分析采用Log Rank和Tarone-Ware检验两种方法进行分析,生存曲线由Graphpad prism 8.0绘制。瘫痪时间、行为学评分等指标首先进行正态性检验,符合正态分布的数据,均数比较用单因素方差分析,若方差齐,两两比较采用最小显著差法,若方差不齐则采用Dunnett's T3检验;如不符合正态分布,则用非参数检验进行统计分析。
- [0240]2.10仪器系统
- [0241]JJ2000电子天平,常熟市双杰测试仪器厂。
- [0242]赛多利斯BSA2201电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。
- [0243]BT224S赛多利斯精密分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。
- [0244]3结果
- [0245]3.1对生存时间的影响
- [0246]由附表4及附图3可见,试验各给药组的生存时间与模型组比较未见显著差异($P > 0.05$),在平均生存天数上各给药组均略有延长。对不同性别的动物生存时间进行分析,详见附图4:雌性小鼠低、高剂量的平均生存天数与模型组相比显著延长;雄性小鼠的平均生存天数与模型组相比未见差异。
- [0247]附表4生存时间

组别	不分性别		雄性		雌性		
	N	生存时间（天）	N	生存时间（天）	N	生存时间（天）	
模型对照组	30	138.9±10.9	15	137.3±11.9	15	140.6±9.9	
阳性药对照组（利鲁唑）	26	141.4±9.9	12	140.4±13.0	14	142.3±6.6	
TCM-073	低剂量	29	143.0±10.1	15	138.8±10.8	14	147.6±7.1*
	中剂量	30	142.6±9.2	15	139.3±10.1	15	145.8±7.2
	高剂量	29	143.6±10.2	15	137.3±5.7	15	149.9±10.0*

注:与模型组比: * $P < 0.05$ 。

- [0248]3.2对瘫痪时间的影响
- [0249]以给药后到首次出现神经功能评分 ≥ 3.5 分的时间作为瘫痪出现时间,计算动物的平均瘫痪症状出现时间。若动物未出现瘫痪评分直接死亡,为保证分析动物

数量，以死亡当天的时间作为瘫痪出现时间，结果见附表5。阳性药对照组以及各给药组均可显著推迟瘫痪出现时间($P<0.05$)，对不同性别动物瘫痪出现时间进行分析，雌性与雄性小鼠的中、高剂量组均可显著推迟瘫痪出现时间。

[0250] 附表5瘫痪时间

组别	不分性别		雄性		雌性	
	N	瘫痪时间(天)	N	瘫痪时间(天)	N	瘫痪时间(天)
模型对照组	30	129.5±12.6	15	122.5±12.7	15	136.5±7.9
阳性药对照组(利鲁唑)	26	134.8±14.2*	12	129.2±18.9	14	139.6±5.7
TCM-073	低剂量	136.9±10.5*	15	132.1±11.5	14	142.1±6.0
	中剂量	137.7±11.1**	15	132.9±12.7*	15	142.6±6.7*
	高剂量	138.4±8.4*	15	132.7±4.4*	15	144.2±7.6*

注：与模型组比：* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

[0251] 3.3对悬挂时间以及神经功能评分的影响

[0252] 由附表6、附表7可见，中剂量组在给药D39、46，高组剂量在给药D31、34与模型组比较神经功能损伤显著降低($P<0.05$)。阳性药对照组在与高剂量组在给药D46与模型组比较悬挂时间显著延长($P<0.05$)。

[0253] 附表6神经功能评分

组别	N	神经功能评分				
		31d	34d	39d	42d	46d
阴性对照组	20	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
模型对照组	30	2.2±0.4	2.2±0.5	2.3±0.5	2.3±0.5	2.4±0.6
阳性药对照组(利鲁唑)	26	2.2±0.4	2.2±0.4	2.2±0.5	2.3±0.5	2.2±0.4
TCM-073	低剂量	2.1±0.2	2.1±0.3	2.2±0.4	2.2±0.3	2.2±0.3
	中剂量	2.1±0.4	2.1±0.4	2.1±0.4*	2.2±0.4	2.2±0.4*
	高剂量	2.0±0.1*	2.0±0.1*	2.1±0.2	2.1±0.3	2.2±0.3

注：与模型组比：* $P<0.05$ 。

[0254] 附表7悬挂时间

组别	N	悬挂时间(s)				
		31d	34d	39d	42d	46d
阴性对照组	20	90.0±0	90.0±0	90.0±0	90.0±0	90.0±0
模型对照组	30	49.5±31.4	45.4±32.0	40.4±33.3	30.8±30.7	20.0±22.3
阳性药对照组(利鲁唑)	26	63.3±29.2	57.6±32.6	46.5±29.8	40.8±30.7	33.8±27.2*
TCM-073	低剂量	57.1±29.7	48.7±24.3	40.3±19.5	34.4±24.2	24.7±19.9
	中剂量	57.6±30.7	53.7±29.6	45.4±30.2	35.1±29.5	28.2±29.2
	高剂量	49.9±30.0	52.7±27.8	47.8±22.8	39.2±24.9	30.7±22.2*

注：与模型组比：*P<0.05。

[0255] 4结论

[0256] 试验采用ALS的经典模型SOD1-G93A转基因小鼠，在70日龄开始给药观察，评价不同剂量本发明药物组合物的治疗作用。结果显示，受试药各剂量组均可推迟瘫痪出现时间，其中中、高剂量组(3.0g, 6.0g生药/kg)可不同程度改善SOD1-G93A转基因小鼠受损的神经功能，高剂量组(6.0g生药/kg)可延长小鼠悬挂时间，各给药组对延长生存时间未见明显治疗作用。

[0257] 5记录保管

[0258] 除计算机或自动化仪器直接采集的数据外，其它所有在实际研究中产生的数据均记录在表格或记录纸上，并随时整理装订。所有数据记录都由操作人、核实人签字，并注明记录日期。递交最终报告时，所有原始资料、文件等相关材料均交由资料档案室保存。

[0259] 试验例3：本发明药物组合物对后肢悬吊小鼠骨骼肌废用性肌萎缩的影响

[0260] 试验目的

[0261] 通过对小鼠后肢悬吊建立肌萎缩模型模拟临床肌少症，观察本发明药物组合物是否在骨骼肌肌萎缩方面有保护和治疗作用。

[0262] 1实验材料

[0263] 1.1供试品：本发明药物组合物，制备同试验例2，简写为TMC-073。

[0264] 1.2阳性对照品及主要试剂

[0265] 1.2.1阳性对照品：乳清蛋白粉，美国斐尔特制药集团股份有限公司生产，置于阴凉干燥处，避免阳光直射。供试品号：GLPTN-2106-D2，批号：03172023B，有效期至2023年03月17日。

[0266] 1.2.2主要试剂：

[0267] 灭菌注射用水，石家庄四药有限公司，批号2009053201，有效期至2022.09.04。

[0268] 10%中性缓冲福尔马林固定液，北京益利精细化学品有限公司，批号20220406，有效期至2023.04.05。

- [0269] 异氟烷：北京友诚嘉业生物科技有限公司，批号G45780，有效期至2024.12.30。
- [0270] 1.3实验系统
- [0271] 1.3.1动物种系：C57BL/6J。
- [0272] 1.3.2动物级别：SPF级。
- [0273] 1.3.3动物性别和数量：购入动物数量100只(雄性各半)，试验中实际使用动物数量96只。
- [0274] 1.3.4给药开始时动物年龄：方案要求5-7周龄，实际5-7周龄。
- [0275] 1.3.5给药开始时动物体重：方案要求雄鼠22-24g，雌鼠21-23g，实际体重：雄鼠20.7-24.6g，雌鼠16.6-19.5g。
- [0276] 1.3.6动物来源：购于北京维通利华实验动物技术有限公司。
- [0277] 1.3.7动物合格证号及发证单位、接收日期：合格证编号110011220106187852、110011220106187965，许可证号SCXK(京)2021-0006，发证单位是北京维通利华实验动物技术有限公司，接收日期2022年06月22日。
- [0278] 1.3.8饲养条件：小鼠笼养，饲养在河北省中西医结合医药研究院新药评价中心，许可证号：SYXK(冀)2020-006。光照12小时/天，温度20~26℃，相对湿度40~70%。
- [0279] 1.3.9检疫过程：新到动物检疫期7天，检疫期间未发现动物饮水、摄食和健康的异常状况。
- [0280] 1.3.10饲料：SPF大小鼠维持饲料，北京科澳协力饲料有限公司，饲料生产许可证号：京饲证(2018)06073，合格证号：1112622200083240，批号：22043213。
- [0281] 1.3.11垫料：普通级玉米芯垫料，北京科澳协力饲料有限公司提供，经高温高压消毒后使用，批号：22049811。
- [0282] 1.3.12饮水：经ROB-B实验动物饮水系统制备洁净水，瓶装饮水，供自由饮用。
- [0283] 1.3.13标识：采用耳标编号。耳标厂家：创博环球(北京)生物科技有限公司。
- [0284] 2试验方法
- [0285] 2.1试验设计依据

- [0286] 2.1.1采用标准：国家食品药品监督管理局颁布的《中药注册分类及申报资料要求》、《药物非临床研究质量管理规范》及相关文献资料确定。
- [0287] 2.1.2实验系统选择说明：骨骼肌具有快速适应外界环境变化的特点，在运动减退、制动、长期卧床和失重等去负荷状态下，表现为肌肉量减少和/或肌肉强度下降或肌肉生理功能减退。通过对小鼠后肢悬吊造成废用性肌肉萎缩，可表现出明显肌少症的特征，用来模拟研究人类肌少症的防治，是一种有用的替代方法。
- [0288] 2.1.3阳性对照品选择说明：目前对于肌少症的治疗主要有药物方案(主要为睾酮、生长激素)、补充蛋白质、抗阻训练等。补充睾酮、生长激素等药物方案可能会出现体液潴留、前列腺癌变、红细胞增多症等副作用，在临床尚没有广泛应用。给予营养补充蛋白质、抗阻训练是目前临床常用的对症治疗方法。因此本试验选择乳清蛋白粉作为阳性对照品。研究显示乳清蛋白成人用量为0.5-1g/kg.day，可改善肌少症患者的肌肉力量和功能，因此本试验设置小鼠用量为10g/kg.day(相当于临床用量的10倍)。
- [0289] 2.2剂量与分组
- [0290] 100只小鼠，根据体重选取96只，按体重随机分组，具体为：空白对照组，模型对照组，阳性对照组(乳清蛋白粉)及TCM-073低剂量组(1.50g生药/kg)、TCM-073中剂量组(3.00g生药/kg)、TCM-073高剂量组(6.00g生药/kg)，每组动物数16只，雌雄各半。具体试验分组及剂量见附表8。
- [0291] 表8试验分组及剂量设置表

组别		动物数 (只)	剂量 (g 生药 /kg)	规格 (g 生药/g 粉)	制剂剂量 (g 粉 /kg)	配药浓度 (g 粉 /ml)	相当于临床剂 量倍数
空白对照组		16	——	——	——	——	——
模型对照组		16	——	——	——	——	——
阳性对照组		16	10			1	10
TCM-073	低剂量	16	1.50	3.1	0.48	0.048	5
	中剂量	16	3.00	3.1	0.97	0.097	10
	高剂量	16	6.00	3.1	1.94	0.194	20

- [0292] 2.3模型建立

- [0293] 除空白对照组动物，其余各组小鼠通过固定装置将小鼠的尾部固定在笼子顶部(小鼠躯干与地面的夹角 $<30^{\circ}$)，使小鼠能够 360° 的旋转和移动，通过后肢抬离地面来移除负重制作后肢骨骼肌废用性肌萎缩模型，来模拟临床肌少症。
- [0294] 后肢悬吊期间，每笼1只小鼠，共悬吊14天，之后解除悬吊，放下后肢，进行自主恢复9天。
- [0295] 2.4给药方法
- [0296] 经口灌胃给药，与临床推荐的口服途径相一致。
- [0297] 2.5供试品配制和保存
- [0298] TCM-073临床拟使用剂量为18g生药/日，本次试验设置低、中、高三个剂量：1.50、3.00、6.00g生药/kg(分别相当于临床用量的5、10、20倍)。具体见附表1。以灭菌注射用水为溶媒，分别配制高、中、低剂量，称取适量药物研磨混匀，定容至相应的体积，现用现配。
- [0299] 2.6供试品的给予
- [0300] 用注射器抽取相应药液进行灌胃，给药体积10ml/kg，其中模型对照组、空白对照组给予相应体积的灭菌注射用水。后肢悬吊当天开始给药，连续给药23天。
- [0301] 2.7观测的指标、时间和内容
- [0302] 2.7.1一般观察
- [0303] 后肢悬吊期间，确保动物在悬吊过程中仅能通过前肢运动进行饮食和饮水，动物是否有任何痛苦。
- [0304] 记录动物悬吊第1、14天、自主恢复第7天及剖检当日的体重。
- [0305] 2.7.2行为学指标检测
- [0306] 在动物后肢悬吊第13天及自主恢复第6天进行抓力测试。
- [0307] 抓力测定仪水平放置，使抓力板呈现水平运动，测量记录小鼠后肢抓力值，每只小鼠测定3次，取三次平均值，评价药物对动物肢体力量影响程度。
- [0308] 2.7.3肌肉相关指标检测
- [0309] 2.7.3.1后肢肌肉血流激光多普勒成像

- [0310] 末次给药次日，小鼠麻醉，俯卧位，剪开左后肢皮肤，暴露腓肠肌表面的一条突出血管(小隐静脉)。记录此血管2分钟的血流量值。
- [0311] 2.7.3.2肌肉湿重
- [0312] 后肢血流检测完毕，颈椎脱臼处死小鼠。剖取小鼠左腿腓肠肌和比目鱼肌，滤纸吸干水分，称重，按如下公式计算肌肉指数：
- [0313] $\text{肌肉指数} = \text{肌肉重量(g)} / \text{体重(g)} \times 1000$
- [0314] 2.7.3.3病理组织学检测
- [0315] 剖取小鼠右腿腓肠肌和比目鱼肌，置10%中性缓冲福尔马林固定液中保存。HE染色，观察肌肉(腓肠肌、比目鱼肌)组织形态变化。
- [0316] 2.8相关工作人员通知
- [0317] 购买动物时通知动物室，在动物出现异常情况时通知病理室进行处理。
- [0318] 2.9仪器系统
- [0319] 赛多利斯BSA2201电子天平，赛多利斯(上海)贸易有限公司。
- [0320] BT224S赛多利斯精密分析天平，赛多利斯(上海)贸易有限公司。
- [0321] NVT2201ZH电子天平，奥豪斯仪器(上海)有限公司。
- [0322] BlueSpin标准型磁力搅拌器，大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。
- [0323] DEF2-002型抓力测定仪，Chatillon Force Measurement。
- [0324] MoorLDI2-HIR激光多普勒成像系统，Moor instruments Ltd。
- [0325] R500IE小动物麻醉机，深圳市瑞沃德生命科技有限公司。
- [0326] 2.10统计方法
- [0327] 试验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，统计学分析采用SPSS 26.0统计软件，首先进行正态性检验，符合正态分布的数据，均数比较用单因素方差分析，若方差齐，两两比较采用最小显著差法，若方差不齐则采用Dunnett's T3检验；如不符合正态分布，则用非参数检验进行统计分析。
- [0328] 3结果
- [0329] 3.1对体重的影响

[0330] 由附表9可见，试验期间，模型对照组小鼠体重与空白对照组小鼠体重相比未见明显差异，阳性对照组及TCM-073各剂量组小鼠体重与模型对照组相比未见明显差异。

[0331] 表9 TCM-073对后肢悬吊致废用性肌萎缩小鼠体重的影响(g)

组别	N	D1	D14	D21	D24
空白对照组	16	19.6±2.2	21.0±2.0	21.7±2.1	22.0±2.0
模型对照组	16	20.1±2.6	21.2±2.3	21.4±2.5	22.1±2.6
阳性对照组	16	20.4±2.4	21.1±1.9	21.2±2.1	21.4±2.2
TCM-073 低剂量	16	20.0±2.3	20.9±2.1	20.8±2.3	21.4±2.3
TCM-073 中剂量	16	20.1±2.1	20.9±2.0	20.9±2.2	21.2±2.3
TCM-073 高剂量	16	20.2±2.4	21.2±2.0	21.4±2.5	21.8±2.6

[0332] 3.2对后肢抓力的影响

[0333] 由附表10可见，在后肢悬吊第13天(给药D13)，对各组小鼠进行抓力测试，结果显示：与空白对照组相比，模型对照组小鼠后肢抓力降低明显(p<0.01)；其余各给药组小鼠后肢抓力与模型对照组比较可见不同程度的升高，其中阳性对照组及TCM-073高剂量组显示出明显差异(p<0.05，p<0.01)。自主恢复第6天(给药D20)，抓力测试结果显示，模型对照组小鼠后肢抓力仍明显低于空白对照组(p<0.05)，与模型对照组相比，TCM-073高剂量组小鼠抓力明显提高(p<0.05)，其余各给药组小鼠抓力也有不同程度的提高，但无明显差异。

[0334] 表10 TCM-073对后肢悬吊致废用性肌萎缩小鼠后肢抓力的影响(N)

组别	N	D13	D20
空白对照组	16	1.78±0.21	1.95±0.24
模型对照组	16	1.51±0.15 ^{△△}	1.77±0.25 [△]
阳性对照组	16	1.63±0.20*	1.89±0.21
TCM-073 低剂量	16	1.58±0.14	1.89±0.18
TCM-073 中剂量	16	1.56±0.12	1.79±0.19
TCM-073 高剂量	16	1.71±0.14**	1.94±0.21*

注：与空白对照组比较：[△]p<0.05，^{△△}p<0.01；与模型对照组比较：*p<0.05，**p<0.01。

[0335] 3.3对后肢肌肉血流的影响

[0336] 由附表11可见，与空白对照组相比，模型对照组小鼠后肢静脉血流量明显降低($p<0.05$)，与模型对照组相比，阳性对照组小鼠后肢血流量明显增加($p<0.05$)，TCM-073各剂量组小鼠后肢血流也有不同程度增加，其中TCM-073高剂量组增加最为明显($p<0.01$)。

[0337] 表11 TCM-073对后肢悬吊致废用性肌萎缩小鼠左后肢血流量的影响

组别	N	Flux
空白对照组	16	921.5±471.7
模型对照组	16	545.2±368.0 [△]
阳性对照组	16	833.0±256.3*
TCM-073 低剂量	16	682.4±471.2
TCM-073 中剂量	16	676.6±280.1
TCM-073 高剂量	16	922.3±325.4**

注：与空白对照组比较：[△] $p<0.05$ ；与模型对照组比较：* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ 。

[0338] 3.4对后肢肌肉重量的影响

[0339] 小鼠腓肠肌及比目鱼肌湿重经体重校正换算为相应肌肉指数，结果由附表12可见，模型对照组小鼠的腓肠肌指数明显低于空白对照组($p<0.05$)，比目鱼肌指数虽低于空白对照组，但无明显差异；与模型对照组相比，阳性对照组及TCM-073各剂量组小鼠的腓肠肌指数和比目鱼肌指数均有不同程度升高，但未显示出明显差异。

[0340] 表12 TCM-073对后肢悬吊致废用性肌萎缩小鼠后肢肌肉重量指数的影响(mg/g)

组别	N	腓肠肌指数	比目鱼肌指数
空白对照组	16	5.0702±0.6604	0.9728±0.4392
模型对照组	16	4.4267±0.8391 [△]	0.8351±0.3795
阳性对照组	16	4.9233±0.7255	0.9162±0.3089
TCM-073 低剂量	16	4.8221±0.9643	1.0909±0.5874
TCM-073 中剂量	16	4.6607±0.7519	0.9695±0.4405
TCM-073 高剂量	16	4.7012±0.8769	0.9825±0.5694

注：与空白对照组比较：[△] $p<0.05$ 。

[0341] 3.5对后肢肌肉组织形态学的影响

[0342] 3.5.1本次试验病理检查结果显示，与空白对照组相比，模型对照组比目鱼肌可见轻微肌萎缩(镜下表现为肌纤维体积减小，可见成角肌纤维)，与模型对照组相比，各给药组比目鱼肌病变未见明显改善；模型对照组和各给药组腓肠肌均未见明显病变，见附图5-20。

[0343] 3.5.2对肌纤维横截面积的影响

[0344] 对肌肉组织形态学检查发现，后肢悬吊小鼠比目鱼肌的萎缩反应高于腓肠肌。利用数字病理切片浏览软件NDP.view2(U12388-01)，对各组小鼠比目鱼肌肌纤维横截面积进行测量。由附表13可见，与空白对照组相比，模型对照组小鼠目鱼肌肌纤维横截面积明显减小(p<0.01)；与模型对照组相比，阳性对照组及TCM-073高剂量组小鼠目鱼肌肌纤维横截面积均明显增大(p<0.01)，TCM-073低、中剂量组小鼠目鱼肌肌纤维横截面积也有所增大，但无明显差异。

[0345] 表13 TCM-073对后肢悬吊致废用性肌萎缩小鼠比目鱼肌纤维横截面积的影响(μm²)

组别	N	横截面积
空白对照组	11	589.6±158.5
模型对照组	12	333.8±28.5 ^{△△}
阳性对照组	14	401.5±61.9 ^{**}
TCM-073 低剂量	13	352.0±109.0
TCM-073 中剂量	12	357.8±50.3
TCM-073 高剂量	11	410.8±75.8 ^{**}

注：与空白对照组比较：^{△△}p<0.01；与模型对照组比较：^{**}p<0.01。

[0346] 4结论

[0347] 通过对小鼠后肢悬吊14天，成功建立小鼠肌少症模型。本试验条件下，本发明药物组合物能显著改善小鼠后肢悬吊所致的废用性肌萎缩，具有提高肌力和肌纤维丰腴度，增加肌肉组织的血液供应的作用。

[0348] 5讨论

[0349] 肌少症是指由于肌纤维萎缩和丧失，导致肌肉功能和质量下降的综合征。肌纤维萎缩是横纹肌营养障碍，肌肉纤维变细甚至消失等导致的肌肉体积缩小。多由肌肉本身疾患或神经系统功能障碍所致，病因主要有：神经源性肌萎缩、肌

源性肌萎缩、废用性肌萎缩和其他原因性肌萎缩。骨骼肌不断降解和合成，肌肉质量通过两者之间的平衡得以维持。当骨骼肌上的机械负荷持续下降时，骨骼肌质量和功能下降，导致废用性肌肉萎缩。废用状态下肌肉形态结构发生最直接的变化是肌纤维萎缩，主要表现为肌肉质量下降、体积减小、肌纤维横截面积减小以及肌纤维类型发生改变。肌肉功能的变化主要表现在肌肉力量下降，肌肉神经功能和抗疲劳能力等发生改变。

[0350] 本试验通过对小鼠后肢悬吊，移除后肢负重，使小鼠肌肉功能发生改变，后肢抓力明显降低。肌肉形态结构也发生明显变化，如：后肢骨骼肌重量降低，肌纤维萎缩、横截面积减小。成功模拟出了与人类临床相似的肌少症特征。

[0351] 在废用性肌肉萎缩的形成中，不同肌肉的肌纤维损失速度不同，对于肌纤维的损失，比目鱼肌损失速度与程度均大于腓肠肌。在本次试验中也观察到，后肢悬吊后的小鼠经过自主恢复，与空白对照组比较，腓肠肌组织形态学显示已无明显病变，基本恢复正常，但比目鱼肌组织形态学显示仍然可见肌纤维萎缩。对各组小鼠比目鱼肌肌纤维横截面积进行测量后比较发现，TCM-073各剂量组小鼠比目鱼肌肌纤维横截面积均大于模型对照组，其中TCM-073高剂量组(6.00g生药/kg)最为明显。同时对小鼠进行抓力测试，结果显示出，在后肢悬吊及自主恢复期间，TCM-073高剂量(6.00g生药/kg)组小鼠后肢抓力明显大于模型对照组，说明TCM-073能促进肌萎缩小鼠抓力的恢复。而肌力的大小与肌纤维的横截面积和数量有一定的关系，因此TCM-073对废用性肌萎缩小鼠后肢抓力水平的改善可能与此相关。

[0352] 毛细血管在向骨骼肌输送氧气和营养物质中起着关键作用。骨骼肌中的毛细血管网络会随着生理或病理条件的变化而发生变化。长期不活动不仅会导致骨骼肌纤维减少而且还会导致骨骼肌毛细血管退化。小隐静脉是腓肠肌表面的一条突出血管，收集小腿浅层静脉血流，小腿后群肌浅层肌肉有腓肠肌、比目鱼肌和跖肌。本试验用激光多普勒成像仪对小隐静脉血流量进行监测，显示出TCM-073高剂量(6.00g生药/kg)能明显增加废用性肌萎缩小鼠小腿骨骼肌的血液供应。

- [0353] 因此，本发明药物组合物可能是从增加肌肉组织血流供应，增加肌纤维丰腴度等方面，对肌少症的肌力降低和肌肉萎缩起到了一定的保护和治疗作用。
- [0354] 6其它情况说明
- [0355] 为保证试验小鼠处于相同周龄范围内，雌性小鼠在实际接收时的体重范围为17-19g，加之雌性小鼠自身生长缓慢，开始给药时的体重未达到方案预期的体重范围，考虑该体重不会对本试验结果产生明显影响，故按计划正常开展试验。
- [0356] 7记录保管
- [0357] 除计算机或自动化仪器直接采集的数据外，其它所有在实际研究中产生的数据均记录在表格或记录纸上，并随时整理装订。所有数据记录都由操作人、核实人签字，并注明记录日期。递交最终报告时，所有原始资料、文件等相关材料均交由资料档案室保存。
- [0358] 7.1保存单位：河北以岭医药研究院有限公司新药评价中心
- [0359] 7.2地址：石家庄市天山大街238号
- [0360] 试验例4：本发明药物组合物对肌萎缩侧索硬化SOD1-G93A转基因小鼠治疗作用的机制研究
- [0361] 试验目的
- [0362] 通过SOD1-G93A转基因小鼠，探究本发明药物组合物对肌萎缩侧索硬化症治疗作用的机制。
- [0363] 1实验材料
- [0364] 1.1供试品：本发明药物组合物，制备同试验例2，简写为TMC-073。
- [0365] 1.2阳性药及主要试剂
- [0366] 1.2.1阳性药：利鲁唑(riluzole)：商品名力如太，50mg/片，用于治疗肌萎缩侧索硬化症，可延长患者存活期和/或推迟气管切开的时间。临床成人口服50mg(1片)/次，一日2次。由Sanofi Winthrop Industrie生产，赛诺菲(北京)制药有限公司分装，批号：0KP4C，有效期至2023年05月。
- [0367] 1.2.2主要试剂：灭菌注射用水，石家庄四药有限公司，批号2007023202，有效期至2022.07.01。
- [0368] 1.3实验系统

- [0369] 1.3.1动物种系：B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J(StockNumber:002726)由美国The Jackson Laboratory提供，江苏集萃药康生物科技股份有限公司进行保种和代繁育，并进行子代鼠SOD1-G93A转基因小鼠的鉴定。同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠为阴性对照鼠。
- [0370] 1.3.2动物级别：SPF级。
- [0371] 1.3.3动物性别和数量：B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J小鼠80只；同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠20只，雌雄均用。
- [0372] 1.3.4动物年龄：7-8周龄。
- [0373] 1.3.5动物体重：给药开始时动物体重雄鼠23.9g-31.3g，雌鼠17.7g-25.4g。
- [0374] 1.3.6动物来源：购自美国The Jackson Laboratory，由江苏集萃药康生物科技股份有限公司进行繁殖。
- [0375] 1.3.7动物合格证号及发证单位、接收日期：合格证编号320727210100609023，许可证号SCXK(苏)2018-0008，发证单位江苏集萃药康生物科技股份有限公司，接收日期2021年10月13日。
- [0376] 1.3.8饲养条件：小鼠笼养，饲养在河北省中西医结合医药研究院新药评价中心，许可证号：SYXK(冀)2020-006。光照12小时/天，温度20~26℃，相对湿度40~70%。
- [0377] 1.3.9检疫过程：新动物适应性饲养至少5天，期间观察动物是否饮水和摄食正常、健康状况良好，无疾病和死亡征兆。
- [0378] 1.3.10饲料：SPF大小鼠维持饲料，由北京科澳协力饲料有限公司提供，饲料生产许可证号：京饲证(2018)06073，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2019-0003。产品批号：21073213,有效期至：2022.01.03
- [0379] 1.3.11饮水：饮用经ROB-B实验动物饮水系统制备的洁净水，灌装饮水瓶供自由饮用，饮用水每年进行一次全项检测，主要包括微生物指标、毒理指标、感官性状和一般化学指标，委托有资质的机构进行检测；每2个月进行一次微生物限度检测，委托石家庄以岭药业股份有限公司质检科进行，检测报告由动物室保管并按年度归档保存。

- [0380] 1.3.12垫料：普通级玉米芯垫料，垫料经高温高压消毒后使用，由北京科澳协力饲料有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2020-0010。批号：21099811。
- [0381] 1.3.13标识：小鼠耳标号进行标记。耳标厂家：创博环球(北京)生物科技有限公司。
- [0382] 2试验方法
- [0383] 2.1试验设计依据
- [0384] 2.1.1采用标准：国家食品药品监督管理局颁布的《中药注册分类及申报资料要求》、《药物非临床研究质量管理规范》及相关文献资料确定。
- [0385] 2.1.2实验系统选择说明：人超氧化物歧化酶(SOD)基因突变转基因小鼠(B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J)被认为是目前肌萎缩侧索硬化症(ALS)的最常用且最好的动物模型。由于ALS的发病机制尚不明确，90%为散发性，10%为家族性(FALS)，1993年Rosen发现了铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)错义突变是ALS研究中的一个重要里程碑。在FALS中SOD1突变的发现导致随后发展了ALS的动物模型，目前广泛应用临床和基础研究的ALS转基因鼠是SOD1-G93A小鼠，该转基因小鼠携带高拷贝人SOD1突变基因，纯合子小鼠脊髓运动神经元减少，出生后约3个月逐渐出现悬尾肢体震颤，一个或多个肢体偏瘫症状等神经肌肉功能障碍，寿命约4-5个月，能够模拟ALS慢性进展性的病程以及部分病理和生化表现。
- [0386] 2.2剂量与分组
- [0387] ALS小鼠依据文献以及前期经验联合行为学检测结果与阴性对照小鼠有明显改变后，按体重随机分组并开始给药观察，具体分为：模型对照组(M)，阳性药对照组(利鲁唑0.02g/kg,R)，TCM-073低(073-L)、中(073-M)、高剂量组(073-H)，每组动物数16只，另设野生型同窝别未携带人突变SOD1基因的小鼠为阴性对照组(C，共20只)。具体试验分组及剂量见附表14。
- [0388] 附表14试验分组及剂量设置表

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	规格 (g 生药/g 粉)	制剂剂量 (g 粉/kg)	配药浓 (g 粉/ml)	相当于临床剂量倍 数
阴性对照组	20	——	——	——	——	——
模型对照组	16	——	——	——	——	——
阳性药对照组 (利鲁唑)	16	0.02 g/kg	50mg/片	——	25ml/片	10
低剂 量	16	1.50	3.1	0.48	0.048	5
TCM-073 中剂 量	16	3.00	3.1	0.97	0.097	10
高剂 量	16	6.00	3.1	1.94	0.194	20

- [0389] 2.3给药方法
- [0390] 经口灌胃给药，与临床推荐的口服途径相一致。
- [0391] 2.4供试品配制和保存
- [0392] 利鲁唑按体重60kg计算临床公斤剂量约为0.002g/kg。小鼠给药剂量相当于临床剂量10倍，约为0.02g/kg，给药体积为10ml/kg，给药浓度为0.02g/10ml。药物配制以其片剂研磨的药粉进行，每片含利鲁唑50mg，配制时取1片，以灭菌注射用水研磨定容至25ml，可根据动物数量进行取用。
- [0393] TCM-073临床拟使用剂量为18g生药/日，本次试验设置低、中、高三个剂量：1.5、3.0、6.0g生药/kg(分别相当于临床用量倍数的5、10、20倍)。具体见附表14。以灭菌注射用水为溶媒，分别配制高、中、低剂量，称取适量药物研磨。
- [0394] 2.5供试品的给予
- [0395] 用注射器抽取相应药液进行灌胃给药，给药体积10ml/kg，其中模型对照组、阴性对照组给予相应体积的灭菌注射用水；每周根据最近一次称量的体重调整每只动物给药量。
- [0396] 2.6模型小鼠的判定
- [0397] 根据前期试验经验，并结合文献调研和该品系小鼠发病特征，于小鼠70日龄开始给药。
- [0398] 2.7观测的指标、时间和内容
- [0399] 给药30天后进行电生理指标检测后取材进行后续检测。
- [0400] 2.7.1电生理指标

[0401] 动物麻醉后俯卧，将记录电极插入后肢腓肠肌肌腹中，连接刺激器刺激腰段脊旁坐骨神经，给予刺激，Powerlab生理记录仪观察记录复合肌肉动作电位峰值，波幅，选区时程。

[0402] 2.7.2血清丙二醛(MDA)指标

[0403] 小鼠摘眼球取血，静置至上清析出，于4℃，3000rpm，离心10min，分离血清，EP管分装后超低温冰箱(-80℃)保存，待测MDA含量。并根据MDA含量计算各组药物对氧化损伤的抑制率，计算公式如下：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{模型组 MDA 含量} - \text{给药组 MDA 含量}}{\text{模型组 MDA 含量}} \times 100\%$$

[0404] 2.7.3形态学观察指标

[0405] HE染色观察腓肠肌和坐骨神经；甲苯胺蓝染色观察脊髓运动神经元形态和数目。

[0406] 2.7.4免疫荧光

[0407] 根据所采小鼠脊髓以及肌肉组织量，进行神经肌肉接头、干细胞再生、小胶质细胞衰老以及髓鞘与神经突损伤和修复程度检测。如肌肉突触前标志物(synaptotagmin-2)与乙酰胆碱受体(nAChR)标志物(α -BTX)共染；卫星细胞标志物(Pax7)与层粘连蛋白(Laminin 2 α)共染。髓鞘标志物髓鞘碱性蛋白(MBP)。神经突标志物(beta-III Tubulin又称Tuj-1)。

[0408] 2.7.5分子生物学指标

[0409] 根据所采小鼠脊髓组织量，进行髓鞘和突触方面的分子生物学指标检测。如髓鞘和突触相关指标：髓鞘碱性蛋白(MBP)、突触囊泡相关蛋白(SV2A)。

[0410] 2.8相关工作人员通知

[0411] 购买动物时通知动物室，在动物出现异常情况时通知病理室进行处理。

[0412] 2.9统计方法

[0413] 试验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，统计学分析采用SPSS 25.0统计软件，行为学评分以及组织检测指标等指标首先进行正态性检验，符合正态分布的数据，均数比较用单因素方差分析，若方差齐，两两比较采用最小显著差法，若

方差不齐则采用Dunnett's T3检验；如不符合正态分布，则用非参数检验进行统计分析。

- [0414] 2.10仪器系统
- [0415] JJ2000电子天平，常熟市双杰测试仪器厂。
- [0416] BT224S赛多利斯精密分析天平，赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。
- [0417] NVT2201ZH电子天平，奥豪斯仪器(上海)有限公司
- [0418] 梅特勒ME104E分析天平，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。
- [0419] DT2000电子天平，常熟市双杰测试仪器厂。
- [0420] PowerLab生理记录仪，埃德仪器国际贸易(上海)有限公司。
- [0421] 倒置荧光共聚焦显微镜，蔡司。
- [0422] 梅特勒电子天平，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。
- [0423] SYG-4数显恒温水浴锅，常州朗越仪器制造有限公司。
- [0424] Gene Speed 1580R高速冷冻离心机，基因有限公司。
- [0425] TECAN Infinite M200Pro酶标仪，瑞士TECAN公司。
- [0426] WS-350P微孔板快速振荡器，Wiggens Labortechnik GmbH。
- [0427] SE260垂直电泳槽，Ge Healthcare UK Ltd
- [0428] EPS301电泳仪，Ge Healthcare Bio-SciencesAB
- [0429] eBlot L1快速湿转仪，金斯瑞生物科技有限公司。
- [0430] WD-9405DN数显水平摇床，北京六一生物科技有限公司。
- [0431] Odyssey clx近红外双色激光成像系统，LI-COR。
- [0432] 多样品组织研磨机，上海净信实业发展有限公司。
- [0433] ZWYR-240恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司。
- [0434] CHB-202恒温金属浴，杭州博日科技有限公司。
- [0435] BPN-CH二氧化碳培养箱，上海一恒科学仪器有限公司。
- [0436] 3结果
- [0437] 3.1对肌肉动作电位的影响
- [0438] 由附表15,16,17可见，模型对照组与阴性对照组相比动作电位峰值显著降低($P<0.001$)，波幅显著降低($P<0.001$)，选区时程显著延长($P<0.001$)。阳性药及各

给药组的动作电位峰值与模型组比较均可见显著提高(P<0.05, P<0.01); 在动作电位波幅上阳性药(P<0.05)、TCM-073低(P<0.05)及高剂量组(P<0.01)与模型组相比显著提高; 在选区时程上阳性药(P<0.05)及各给药组与模型组相比均显著缩短(P<0.01)。

[0439] 附表15动作电位峰值

组别	不分性别		雄性		雌性		
	N	峰值	N	峰值	N	峰值	
阴性对照组	20	13.8±2.2	10	14.6±2.5	10	13.0±1.7	
模型对照组	16	6.5±2.5###	8	7.3±2.9##	8	5.8±2.0###	
阳性药对照组（利鲁唑）	16	9.6±3.3**	8	8.8±2.2	8	10.4±4.0**	
TCM-073	低剂量	16	8.9±2.1**	8	8.0±1.7	8	9.8±2.3**
	中剂量	16	8.8±3.3**	8	7.7±2.9	8	9.9±3.6**
	高剂量	16	9.3±3.0**	8	7.6±2.3	8	10.9±2.7**

###P<0.001,★P<0.05,★★P<0.01,#阴性对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

[0440] 附表16动作电位波幅

组别	不分性别		雄性		雌性		
	N	波幅	N	波幅	N	波幅	
阴性对照组	20	20.4±3.4	10	21.8±3.6	10	19.0±2.8	
模型对照组	16	8.6±3.3###	8	8.8±3.6###	8	8.3±3.1###	
阳性药对照组（利鲁唑）	16	13.0±5.0*	8	11.2±3.9	8	14.8±5.6*	
TCM-073	低剂量	16	11.4±2.8*	8	10.4±2.0	8	12.3±3.2*
	中剂量	16	12.2±6.5	8	9.7±4.2	8	14.6±7.6*
	高剂量	16	12.4±4.4**	8	9.3±3.6	8	15.5±2.6**

###P<0.001,★P<0.05,★★P<0.01,#阴性对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

[0441] 附表17动作电位选区时程

组别	不分性别	雄性	雌性
----	------	----	----

	N	选区时程	N	选区时程	N	选区时程
阴性对照组	20	0.0014±0.0001	10	0.0013±0.0001	10	0.0014±0.0001
模型对照组	16	0.0019±0.0003###	8	0.0019±0.0003###	8	0.0019±0.0002###
阳性药对照组（利鲁唑）	16	0.0017±0.0002*	8	0.0016±0.0001	8	0.0018±0.0002
TCM-073	低剂量	0.0016±0.0002**	8	0.0017±0.0003	8	0.0016±0.0001**
	中剂量	0.0016±0.0002**	8	0.0016±0.0001*	8	0.0017±0.0002
	高剂量	0.0016±0.0002**	8	0.0017±0.0001	8	0.0016±0.0003*

###P<0.001,★P<0.05,★★P<0.01,#阴性对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

[0442] 3.2对血清丙二醛(MDA)含量影响

[0443] 小鼠摘眼球取血后静置至上清析出，于4℃，3000rpm，离心10min，分离血清。试剂盒检测MDA含量并根据MDA含量计算各组药物对氧化损伤的抑制率。结果见附表18，模型对照组与阴性对照组相比MDA含量显著升高(P<0.01)，阳性药及各给药组均可显著降低MDA含量(P<0.05，P<0.01)其中TCM-073中(P<0.05)、高剂量组(P<0.01)与阳性药组相比血清丙二醛含量显著降低。

[0444] 附表18血清丙二醛(MDA)含量

组别	N	MDA (μM)	抑制率%
阴性对照组	6	20.0±0.6	48.21
模型对照组	6	38.7±1.3##	0.00
阳性药对照组（利鲁唑）	6	31.0±4.8*	20.04
TCM-073	低剂量	30.1±3.7**	22.26
	中剂量	22.7±4.5**&	41.35
	高剂量	21.8±0.6**&&	43.79

##P<0.01,★P<0.05,★★P<0.01,&P<0.05,&&P<0.01,#阴性对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组，&阳性药对照组vs.给药组

[0445] 3.3对形态学观察指标影响

[0446] HE染色坐骨神经可见模型对照组动物的主要病变为坐骨神经轴突变性伴髓鞘变性，雄性病变稍重。与模型对照组相比，阳性药对照组和TCM-073高剂量组病变稍轻，其他给药组病变未见明显改善。详见附表19。

[0447] 附表19病理报告单

试验项目:	TCM-073 对肌萎缩侧索硬化 SOD1-G93A 转基因小鼠治疗作用的机制研究
专 题 号:	TSN-2136
送检材料:	36 只小鼠的坐骨神经，所有标本经 10% 中性福尔马林固定，石蜡包埋，4 μm 厚切片，HE 染色。实验动物共分为 6 组，分别为阴性对照组、模型对照组、阳性药对照组、TCM-073 低剂量组、TCM-073 中剂量组、TCM-073 高剂量组，每组 6 只，雌雄各半。
送检目的:	HE 染色观察坐骨神经的组织形态。
送 检 人:	王璐
送检时间:	2021.12.08
检查结果	病变分级：根据病变面积和严重程度，分为轻微（+）、轻度（++）、中度（+++）、重度（++++）。
阴性对照组:	镜下观察所见： 6 例坐骨神经均未见明显病变。详见表 20。
模型对照组:	镜下观察所见： 6/6 例坐骨神经可见轴突变性伴髓鞘变性（3 例+++，3 例++），雌雄相比，雄性病变稍重。详见表 20。
阳性药对照组:	镜下观察所见： 6/6 例坐骨神经可见轴突变性伴髓鞘变性（1 例+++，4 例++，1 例+），雌雄病变程度无差别。详见表 20。
TCM-073 低剂量组:	镜下观察所见： 6/6 例坐骨神经可见轴突变性伴髓鞘变性（4 例+++，2 例++），雌雄病变程度无差别。详见表 20。
TCM-073 中剂量组:	镜下观察所见： 6/6 例坐骨神经可见轴突变性伴髓鞘变性（3 例+++，3 例++），雌雄相比，雄性病变稍重。详见表 20。
TCM-073 高剂量组:	镜下观察所见： 6/6 例坐骨神经可见轴突变性伴髓鞘变性（2 例+++，4 例++），雌雄病变程度无差别。详见表 20。

- [0448] 结论：
- [0449] 综上所述，本次试验病理检查结果显示，模型对照组动物的主要病变为坐骨神经轴突变性伴髓鞘变性，雄性病变稍重。与模型对照组相比，阳性药对照组和 TCM-073 高剂量组病变较轻，其他给药组病变未见明显改善。详见表 20。
- [0450] _____
- [0451] 附表 20 个体动物主要病变评分结果表

组别	性别	动物号	轴突变性伴髓鞘变性	组评分 (区分性别)	组评分
阴性对照组	雄	203	-	0	0
		204	-		
		206	-		
	雌	251	-	0	
		252	-		
		253	-		
模型对照组	雄	215	+++	3	2.5

	雌	219	++	2	
		224	+++		
		277	++		
		278	+++		
		283	++		
阳性药对照组	雄	217	++	2	2
		218	+++		
		232	++		
	雌	280	+	2	
		287	++		
		294	++		
TCM-073 低剂量组	雄	222	++	3	3
		226	+++		
		239	+++		
	雌	266	+++	3	
		276	+++		
		288	++		
TCM-073 中剂量组	雄	221	+++	3	2.5
		229	++		
		244	+++		
	雌	274	++	2	
		285	+++		
		295	++		
TCM-073 高剂量组	雄	216	++	2	2
		230	++		
		245	+++		
	雌	284	++	2	
		290	+++		
		297	++		

注1.病变分级：无(-)，轻微(+)，轻度(++)，中度(+++)，重度(+++++).

注2.组评分按照组内动物病变程度评级的中位数换算得出(“-”代表0分，每一个“+”代表1分，评分越高代表病变程度越严重)

[0452] 3.4对神经肌肉接头、肌肉以及髓鞘与神经突损伤和修复程度影响

- [0453] 免疫荧光检测腓肠肌肌肉突触前标志物(synaptotagmin-2)与乙酰胆碱受体(nAChR)标志物(α -BTX)结果见附图21, 模型对照组与阴性对照组相比synaptotagmin-2与 α -BTX共定位程度降低, 阳性药及各给药组均可见共定位程度提高。
- [0454] 免疫荧光检测腓肠肌卫星细胞标志物(Pax7)与层粘连蛋白(Laminin 2 α)结果见附图22, 模型对照组与阴性对照组相比Pax7阳性细胞减少, 阳性药及各给药组均可见阳性细胞增多, Laminin 2 α 标记细胞轮廓。
- [0455] 免疫荧光检测脊髓髓鞘标志物髓鞘碱性蛋白(MBP)结果见附图23, 模型对照组与阴性对照组相比MBP表达减少, 阳性药及各给药组均可见表达增多。
- [0456] 免疫荧光检测脊髓神经突标志物(beta-III Tubulin又称Tuj-1)结果见附图24, 模型对照组与阴性对照组相比Tuj-1表达减少, 阳性药及各给药组均可见表达增多。
- 3.5对脊髓髓鞘与突触相关分子生物学指标影响
- [0457] 根据所采小鼠脊髓量, 进行髓鞘和突触方面的分子生物学指标检测。包括: 髓鞘碱性蛋白(MBP)、突触囊泡相关蛋白(SV2A)结果见附表21, 22。免疫印迹结果显示在MBP表达中模型对照组与阴性对照组相比显著降低($P<0.05$), 阳性药及各给药组均可显著升高MBP含量($P<0.05$)。在SV2A表达中模型对照组与阴性对照组相比显著降低($P<0.001$), TCM-073高剂量组可显著升高SV2A含量($P<0.01$), 并且显著高于阳性药组($P<0.01$)。

[0458] 附表21脊髓MBP含量

组别		N	MBP
阴性对照组		4	1.00 $\pm$ 0.00
模型对照组		4	0.36 $\pm$ 0.03#
阳性药对照组 (利鲁唑)		4	0.99 $\pm$ 0.62*
TCM-073	低剂量	4	0.80 $\pm$ 0.36*
	中剂量	4	0.64 $\pm$ 0.15*
	高剂量	4	0.96 $\pm$ 0.24*

$P<0.05$, * $P<0.05$, #阴性对照组vs.模型对照组, *给药组vs.模型对照组

[0459] 附表22脊髓SV2A含量

组别	N	SV2A
阴性对照组	4	1.00±0.00
模型对照组	4	0.31±0.16###
阳性药对照组（利鲁唑）	4	0.41±0.15
TCM-073	低剂量	0.39±0.15
	中剂量	0.53±0.27
	高剂量	0.79±0.16**&&

###P<0.001,**P<0.01,&&P<0.01,#阴性对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组，&阳性药对照组vs.给药组

- [0460]4结论
- [0461]试验采用ALS的经典模型SOD1-G93A转基因小鼠，在70日龄开始给药观察，评价不同剂量TCM-073的治疗作用。结果显示，受试药各剂量组均可提高肌肉动作电位峰值并缩短选区时程，其中低、高剂量组(1.5g，6.0g生药/kg)可提高动作电位波幅。各给药组均可显著降低血清丙二醛含量(P<0.01)其中TCM-073中、高剂量组(3.0g，6.0g生药/kg)效果显著优于阳性药(P<0.05，P<0.01)。HE染色坐骨神经可见与模型对照组相比，阳性药对照组和TCM-073高剂量组(6.0g生药/kg)病变较轻，其他给药组病变未见明显改善。免疫荧光检测结果可见阳性药及各给药组均可提高神经肌肉接头共定位程度，提高腓肠肌卫星细胞阳性数量以及髓鞘标志物和神经突标志物的表达量。免疫印迹检测结果可见阳性药及各给药组均可显著升高脊髓MBP含量(P<0.05)。其中TCM-073高剂量组(6.0g生药/kg)可显著升高SV2A含量(P<0.01)，并且显著高于阳性药组(P<0.01)。
- [0462]5记录保管
- [0463]除计算机或自动化仪器直接采集的数据外，其它所有在实际研究中产生的数据均记录在表格或记录纸上，并随时整理装订。所有数据记录都由操作人、核实人签字，并注明记录日期。递交最终报告时，所有原始资料、文件等相关材料均交由资料档案室保存。
- [0464]5.1保存单位：河北以岭医药研究院有限公司新药评价中心
- [0465]5.2地址：石家庄市天山大街238号
- [0466]试验例5：本发明药物组合物对CPZ致脱髓鞘模型小鼠治疗作用的机制研究

- [0467] 试验目的
- [0468] 通过CPZ致脱髓鞘模型小鼠，观察本发明药物组合物对中枢神经系统脱髓鞘的治疗作用。
- [0469] 1实验材料
- [0470] 1.1供试品：本发明药物组合物，制备同试验例2，简写为TMC-073。
- [0471] 1.2主要试剂
- [0472] 灭菌注射用水，石家庄四药有限公司，批号2009053201，有效期至2022.09.04。
- [0473] 1.3实验系统
- [0474] 1.3.1动物种系：C57BL/6J。
- [0475] 1.3.2动物级别：SPF级。
- [0476] 1.3.3动物性别和数量：雄性，60只(从中挑选58只进行试验)。
- [0477] 1.3.4动物年龄：42-48日龄。
- [0478] 1.3.5给药开始时动物体重：24.1g-31.7g。
- [0479] 1.3.6动物来源：购自北京维通利华实验动物技术有限公司。
- [0480] 1.3.7动物合格证号及发证单位、接收日期：合格证编号110011220103270315，许可证号SCXK(京)2021-0006，发证单位北京维通利华实验动物技术有限公司，接收日期2022年03月30日。
- [0481] 1.3.8饲养条件：小鼠笼养，饲养在河北省中西医结合医药研究院新药评价中心，许可证号：SYXK(冀)2020-006。光照12小时/天，温度20~26℃，相对湿度40~70%。
- [0482] 1.3.9检疫过程：新动物适应性饲养至少5天，期间观察动物是否饮水和摄食正常、健康状况良好，无疾病和死亡征兆。
- [0483] 1.3.10饲料：SPF大小鼠维持饲料，由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2019-0010。产品批号：0112SH01140404C,有效期至：2022.07.13。0.2% cuprizone加药饲料，由小泰有泰(北京)生物科技有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2018-0006，生产日期：20220314，有效期至：2022.06.13。

- [0484] 1.3.11饮水：饮用经ROB-B实验动物饮水系统制备的洁净水，灌装饮水瓶供自由饮用，饮用水每年进行一次全项检测，主要包括微生物指标、毒理指标、感官性状和一般化学指标，委托有资质的机构进行检测；每2个月进行一次微生物限度检测，委托石家庄以岭药业股份有限公司质检科进行，检测报告由动物室保管并按年度归档保存。
- [0485] 1.3.12垫料：普通级玉米芯垫料，垫料经高温高压消毒后使用，由北京科澳协力饲料有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(京)2020-0010。批号：22019811,22049811。
- [0486] 1.3.13标识：小鼠耳标号进行标记。耳标厂家：创博环球(北京)生物科技有限公司。
- [0487] 2试验方法
- [0488] 2.1试验设计依据
- [0489] 2.1.1采用标准：国家食品药品监督管理局颁布的《中药注册分类及申报资料要求》、《药物非临床研究质量管理规范》及相关文献资料确定。
- [0490] 2.1.2实验系统选择说明：口服双环己铜草酰二腈(Cuprizone, CPZ)可在几天内诱导少突胶质细胞凋亡，紧随其后的是大脑中的天然免疫细胞，即星形胶质细胞和小胶质细胞，最终导致不同的白质和灰质脑区脱髓鞘。因此，该模型反映了进行脱髓鞘病程的几个重要特征。通过CPZ模型，可以用来开发和研究与脱髓鞘病理相关的药物与机制。有文献显示雌激素具有抵抗CPZ导致脱髓鞘的作用，因此在本试验中仅采用雄性动物进行造模。给6-8周龄小鼠口服含0.2%CPZ饲料6周可诱导急性脱髓鞘。之后改喂正常饲料2周，小鼠会发生自发性内源性髓鞘再生，在此期间给予待评价药物可评估其加速正在进行的髓鞘再生过程。
- [0491] 2.2剂量与分组
- [0492] 小鼠在0.2%CPZ饲料喂养6周并且联合Weaver's 15分评分结果与溶媒对照小鼠有显著差别后，按评分结果与体重随机分组并开始给药观察，具体分为：溶媒对照组(C)，模型对照组(M)，TCM-073低(073-L)、中(073-M)、高剂量组(073-H)，溶媒对照组10只，其余各组每组12只。具体试验分组及剂量见附表23。

[0493] 附表23试验分组及剂量设置表

组别	动物数 (只)	剂量 (g 生药/kg)	规格 (g 生药/g 粉)	制剂剂量 (g 粉/kg)	配药浓度 (g 粉 /ml)	相当于临 床剂量倍 数	
溶媒对照组	10	——	——	——	——	——	
模型对照组	10	——	——	——	——	——	
TCM-073	低剂量	10	1.50	3.1	0.48	0.048	5
	中剂量	10	3.00	3.1	0.97	0.097	10
	高剂量	10	6.00	3.1	1.94	0.194	20

[0494] 2.3给药方法

[0495] 经口灌胃给药，与临床推荐的口服途径相一致。

[0496] 2.4供试品配制和保存

[0497] TCM-073临床拟使用剂量为18g生药/日，本次试验设置低、中、高三个剂量：1.5、3.0、6.0g生药/kg(分别相当于临床用量倍数的5、10、20倍)。具体见附表23。以灭菌注射用水为溶媒，分别配制高、中、低剂量，称取适量药物研磨。

[0498] 2.5供试品的给予

[0499] 用注射器抽取相应药液进行灌胃给药，给药体积10ml/kg，其中模型对照组、溶媒对照组给予相应体积的灭菌注射用水。

[0500] 2.6模型小鼠的判定

[0501] 2.6.1 Weaver’ s 15分评分法：将尾巴活动分为3个等级，肢体活动分为4个等级，通过累积分数得出评分(见附表24)。若出现死亡则总分记为15分。文献调研提示0.2%CPZ饲料喂食6周后小鼠出现急性脱髓鞘症状。

[0502] 附表24 Weaver’ s 15分评分法

观察部位	临床症状	分值
尾巴	无 症 状	0
	尾巴张力减低或尾巴远端瘫痪	1
	尾巴全瘫	2
四肢	无 症 状	0
	步态不稳	1
	肢体轻瘫，行走时肢体拖曳	2
	肢体全瘫，行走时肢体外翻	3

注：根据尾巴和每个肢体的瘫痪情况逐一评价，通过累加得出总分

- [0503] 2.7观测的指标、时间和内容
- [0504] 试验给药阶段每周进行神经系统功能评价(Weaver's 15分评分法), 给药14天后进行转棒和旷场测试。
- [0505] 2.7.1转棒
- [0506] 进行转棒测试以评估每只小鼠的感觉运动协调能力。设置速度为30rpm, 持续120s。记录每只小鼠在转棒上持续时间。
- [0507] 2.7.2旷场
- [0508] 旷场试验的设备由旷场反应箱、数据自动采集和处理系统组成。旷场反应箱正上方架一摄像头, 拍摄范围覆盖整个旷场内部。首先将小鼠放入旷场反应箱内中心区域, 同时开始进行摄像和计时。记录小鼠5min内的自发活动总距离。
- [0509] 2.8相关工作人员通知
- [0510] 购买动物时通知动物室, 在动物出现异常情况时通知病理室进行处理。
- [0511] 2.9统计方法
- [0512] 试验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计学分析采用SPSS 25.0统计软件, 行为学评分以及组织检测指标等指标首先进行正态性检验, 符合正态分布的数据, 均数比较用单因素方差分析, 若方差齐, 两两比较采用最小显著差法, 若方差不齐则采用Dunnett's T3检验; 如不符合正态分布, 则用非参数检验进行统计分析。
- [0513] 2.10仪器系统
- [0514] 赛多利斯BSA2201电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。
- [0515] BT224S赛多利斯精密分析天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。
- [0516] IITC大小鼠转棒疲劳仪, IITC生物科学。
- [0517] ANY-maze小动物行为学仪器, 江苏赛昂斯生物科技有限公司。
- [0518] 3结果
- [0519] 3.1对神经系统功能的影响
- [0520] 由附表25可见, 模型对照组与溶媒对照组相比在给药第7天和第14天时神经评分显著提高($P < 0.001$)。各给药组在第7天时未见降低神经评分作用; 在第14天时, TCM-073中($P < 0.05$)及高剂量组($P < 0.01$)与模型组相比神经评分显著降低。

[0521] 附表25神经评分

组别	N	神经评分 7 天	神经评分 14 天
溶媒对照组	10	0±0	0±0
模型对照组	12	1.25±0.45###	1.50±0.52###
TCM-073	低剂量	1.25±0.45	1.08±0.51
	中剂量	1.17±0.39	0.83±0.58*
	高剂量	1.08±0.51	0.58±0.51**

###P<0.001,*P<0.05,**P<0.01,#溶媒对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

[0522] 3.2对转棒持续时间影响

[0523] 转棒测试用来评估每只小鼠的感觉运动协调能力。设置速度为30rpm，持续120s。记录每只小鼠在转棒上持续时间。结果见附表26，模型对照组与溶媒对照组相比转棒上持续时间含量显著缩短(P<0.001)，各给药组均可显著延长转棒上持续时间(P<0.05，P<0.01)。

[0524] 附表26转棒持续时间

组别	N	持续时间 (s)
溶媒对照组	10	118.30±3.53
模型对照组	12	55.00±28.98###
TCM-073	低剂量	87.42±29.94*
	中剂量	90.67±28.56*
	高剂量	104.08±26.71**

###P<0.001,*P<0.05,**P<0.01,#溶媒对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

[0525] 3.3对旷场试验影响

[0526] 将小鼠放入旷场反应箱内中心区域，同时开始进行摄像和计时。记录小鼠5min内的自发活动总距离，平均速度和转圈次数。在脱髓鞘模型中，髓鞘脱失会导致小鼠神经信号传导异常，出现自主活动增加和转圈次数增多等焦虑和暴躁的症状。结果见附表27，模型对照组与溶媒对照组相比活动距离显著加长(P<0.05)，平均速度显著加快(P<0.05)，转圈速度显著增多(P<0.05)，各给药组均可显著缩短运动距离，减慢平均速度并减少转圈次数(P<0.05，P<0.01)。

[0527] 附表27旷场实验数据

组别	N	距离	平均速度	转圈次数	
溶媒对照组	8	22.60±6.32	0.038±0.011	22.50±8.78	
模型对照组	10	32.10±8.10#	0.054±0.013#	33.90±6.62#	
TCM-073	低剂量	12	23.76±7.27*	0.040±0.012*	25.00±7.73*
	中剂量	12	23.13±8.15*	0.039±0.014*	26.08±6.44*
	高剂量	12	22.08±4.83**	0.037±0.008**	22.58±2.57**

###P<0.001,★P<0.05,★★P<0.01,#溶媒对照组vs.模型对照组，★给药组vs.模型对照组

- [0528] 4结论
- [0529] 试验采用CPZ诱导脱髓鞘模型小鼠，评价不同剂量本发明药物组合物的治疗作用。结果显示，受试药中、高剂量组可显著降低神经评分(P<0.05，P<0.01)。行为学指标中受试药各给药组均可显著延长转棒持续时间；缩短旷场活动距离，降低平均速度并减少转圈次数(P<0.05，P<0.01)。提示本发明药物组合物具有保护髓鞘脱失导致神经功能受损的作用。
- [0530] 5记录保管
- [0531] 除计算机或自动化仪器直接采集的数据外，其它所有在实际研究中产生的数据均记录在表格或记录纸上，并随时整理装订。所有数据记录都由操作人、核实人签字，并注明记录日期。递交最终报告时，所有原始资料、文件等相关材料均交由资料档案室保存。
- [0532] 5.1保存单位：河北以岭医药研究院有限公司新药评价中心
- [0533] 5.2地址：石家庄市天山大街238号
- [0534] 5.3邮编：050035
- [0535] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种具有治疗肌萎缩侧索硬化症的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参3-9份、肉苁蓉3-9份。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参4-6份、肉苁蓉4-6份。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参3份、肉苁蓉9份。
- [权利要求 4] 如权利要求1所述的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参6份、肉苁蓉6份。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参9份、肉苁蓉3份。
- [权利要求 6] 如权利要求1所述的中药组合物，其特征在于，所述中药组合物由以下重量份的原料组成：人参7份、肉苁蓉4份。
- [权利要求 7] 权利要求1-6任一所述的中药组合物的制备方法，其特征在于，所述中药组合物的活性成分由以下步骤制成：
按处方量称取人参、肉苁蓉，加水煎煮，滤过，滤液减压浓缩为浸膏，该浸膏为所述中药组合物的活性成分。
- [权利要求 8] 权利要求1-6任一所述的中药组合物或权利要求7所述的制备方法制得的中药组合物在制备治疗肌萎缩侧索硬化症的药物中的应用。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的应用，其特征在于，所述肌萎缩侧索硬化症表现为肌力下降、肌肉萎缩、肌肉跳动、肌肉僵硬或萎软，构音不清、吞咽困难、呼吸气短、腰膝酸软、神倦懒言或畏寒肢冷的一项或多项。
- [权利要求 10] 权利要求1-6任一所述的中药组合物在制备推迟肌萎缩侧索硬化瘫痪时间、改善受损的神经功能、减轻坐骨神经病变、提高神经肌肉接头共定位程度药物中应用。

- [权利要求 11] 如权利要求1-6任一所述的中药组合物在制备延长小鼠悬挂时间，提高肌肉动作电位峰值并缩短选区时程药物中的应用。
- [权利要求 12] 如权利要求1-6任一所述的中药组合物在制备改善中枢神经系统脱髓鞘症状，提高肌力和肌纤维丰腴度，增加肌肉组织的血液供应的药物中的应用。
- [权利要求 13] 如权利要求1-6任一所述的中药组合物在制备治疗肌少症药物中的应用。
- [权利要求 14] 如权利要求1-6任一所述的中药组合物在制备改善神经电生理，降低血清丙二醛含量、促进轴突生长和髓鞘再生，保护神经功能、提高肌肉突触前标志物与乙酰胆碱受体标志物共定位程度、提高腓肠肌卫星细胞阳性数量以及髓鞘标志物(MBP)、提高神经肌肉接头结构的完整性、增加神经突标志物(Tuj-1)以及突触囊泡蛋白(SV2A)的表达量、促进髓鞘再生、改善脱髓鞘引起的行为学改变或改善运动神经元对肌肉的信号传递，延缓肌萎缩侧索硬化症的疾病进展药物中的应用。
- [权利要求 15] 药物，其包括权利要求1-6任一项所述的中药组合物或权利要求7所述制备方法制得的中药组合物。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的药物，其特征在于，其剂型为胶囊剂、片剂、颗粒剂、注射剂、丸剂、散剂、喷剂或口服液。
- [权利要求 17] 如权利要求16所述的药物，其特征在于，所述颗粒剂由以下步骤制成：
(1)按处方量称取人参、肉苁蓉，加水煎煮完成后，水提液滤过，滤液浓缩至浸膏，备用；
(2)取上述浸膏，用喷雾干燥机喷雾干燥，收集喷雾粉，备用；
(3)将步骤(2)所得喷雾粉加适量辅料制粒，按照常规方法制成颗粒剂。
- [权利要求 18] 如权利要求16所述的药物，其特征在于，所述颗粒剂由以下步骤制成：

- (1)按处方量称取人参、肉苁蓉，加水煎煮三次，第一次加10倍量水，第二、三次各加8倍量水，每次煎煮1.5小时，滤过，滤液减压浓缩至相对密度为1.05～1.10(60℃)的浸膏备用；
- (2)取上述浸膏，用喷雾干燥机喷雾干燥，收集喷雾粉，备用；
- (3)将步骤(2)所得喷雾粉加适量辅料制粒，按照常规方法制成颗粒剂。

[权利要求 19] 疾病的治疗方法，其包括给予权利要求1-6任一项所述的中药组合物、或给予权利要求7所述制备方法制得的中药组合物或给予权利要求15-18任一项所述的药物。

[权利要求 20] 根据权利要求19所述的治疗方法，其特征在于，所述治疗包括如下至少一项：

推迟肌萎缩侧索硬化瘫痪时间、改善受损的神经功能、减轻坐骨神经病变、提高神经肌肉接头共定位程度；

延长小鼠悬挂时间，提高肌肉动作电位峰值并缩短选区时程；

改善中枢神经系统脱髓鞘症状，提高肌力和肌纤维丰腴度，增加肌肉组织的血液供应；

改善神经电生理，降低血清丙二醛含量、促进轴突生长和髓鞘再生，保护神经功能、提高肌肉突触前标志物与乙酰胆碱受体标志物共定位程度、提高腓肠肌卫星细胞阳性数量以及髓鞘标志物(MBP)、提高神经肌肉接头结构的完整性、增加神经突标志物(Tuj-1)以及突触囊泡蛋白(SV2A)的表达量、促进髓鞘再生、改善脱髓鞘引起的行为学改变或改善运动神经元对肌肉的信号传递，延缓肌萎缩侧索硬化症等疾病进展。