

## 贵州百灵企业集团制药股份有限公司 关于糖宁通络胶囊研发项目的进展公告

本公司及董事会全体成员保证公告内容真实、准确和完整，公告不存在虚假记载、误导性陈述或者重大遗漏。

风险提示：鉴于药物研发的复杂性、风险性和不确定性，各阶段研究均具有风险性，公司将及时履行信息披露义务，请投资者注意投资风险。

- 1、本研究项目为临床前动物试验结果，存在和临床试验结果不一致的风险；
- 2、本研究项目存在不能达到研究目标的可能性风险；
- 3、本次研发进展不会对公司目前经营产生重大影响。

贵州百灵企业集团制药股份有限公司（以下简称“公司”）于2015年1月26日与香港大学签订了《合作研究合同》，公司委托香港大学研究开发“糖宁通络胶囊治疗糖尿病及并发症作用机理的研究”项目，相关公告详见2015年1月27日公司指定信息披露媒体《证券时报》、《中国证券报》和巨潮资讯网（<http://www.cninfo.com.cn>）。

近日公司收到香港大学关于《TNTL 有效部位及其化学衍生物(BL03)研究纪要（第二次）》。现将相关情况公告如下：

### 一、糖宁通络（TNTL）论文进展

- 1、TNTL 在肥胖和糖尿病上的整体效应和作用机制：经过连续四

年多的艰苦研究，一篇论文被世界著名杂志《科学》系列杂志《科学进展》正式接受，并于北京时间八月十五日（美国时间八月十四日）正式出版：

Science Advances 科学进展

SBP2 deficiency in adipose tissue macrophages drives insulin resistance in obesity 脂肪组织巨噬细胞中的 SBP2 缺乏驱动肥胖症中的胰岛素抗性（影响因子 12.804）：

肥胖与糖尿病、心脑血管病以及恶性肿瘤的发生发展也密切相关。促炎活化和脂肪组织巨噬细胞（ATM）的积累与增加肥胖症患者胰岛素抵抗的风险关系密切。在这里，我们描述了硒代半胱氨酸插入序列结合蛋白质 2(SBP2)在维持肥胖的胰岛素的敏感性的新作用。SBP2 在饮食诱导的肥胖的小鼠 ATM 中受到抑制并与脂肪组织炎症相关。SBP2 的丢失引发了 ATM 的代谢激活，诱导细胞内活性氧含量和炎性体，随后促进 IL1bata 相关的局部增殖和促炎性巨噬细胞的浸润。敲除特定 ATM 的肥胖小鼠中的 SBP2，可通过增加脂肪组织炎症和扩张来促进胰岛素抵抗。再表达 SBP2 改善胰岛素敏感性。最后，一种特异性诱导 ATM 中 SBP2 表达的草药配方 TNTL 可以通过实验改善胰岛素敏感性临床观察显示其改善了高血糖症糖尿病患者。该研究将 ATM 中的 SBP2 鉴定为治疗肥胖症中胰岛素抵抗的新靶点，对药物开发及评价现有药物十分关键，意义重大。

2、TNTL 在糖尿病眼病上的效果和作用机制

Cell Communication and Signaling 细胞通讯与信号

OMICs Approaches-Assisted Identification of Macrophages-Derived MIP-1 $\gamma$  as the Therapeutic Target of Botanical Products TNTL in Diabetic Retinopathy 用组学方法辅助鉴定巨噬细胞衍生的MIP-1 $\gamma$  作为糖尿病视网膜病变中植物性产物 TNTL 的治疗靶点（影响因子 5.111）:

视网膜内皮细胞功能障碍的炎症反应被认为在糖尿病视网膜病变（DR）中起重要作用。到目前为止，抗炎治疗作为 DR 治疗获得了不令人满意的结果。本研究旨在探索一种草药配方糖宁通络（TNTL）作为 DR 治疗中的一种新型抗炎药。我们观察到高剂量的 TNTL 在小鼠 I 型糖尿病模型中具有降血糖作用，而在非低血糖剂量下它抑制 DR 发生率。TNTL 恢复血 - 视网膜屏障完整性，抑制视网膜新生血管形成，并减弱视网膜神经节细胞变性。对有或没有 TNTL 的高血糖小鼠视网膜组织进行转录组学分析，发现炎症视网膜微环境受到显著抑制。TNTL 处理抑制视网膜中的促炎性巨噬细胞，导致内皮细胞迁移失活，内皮细胞单层完整性恢复和防止渗漏。细胞因子阵列分析表明，TNTL 可显著抑制促炎巨噬细胞分泌 MIP1 $\gamma$ 。TNTL 预防内皮功能障碍可能是通过抑制 MIP1 $\gamma$  / CCR1 轴介导的。更具体地，TNTL 抑制促炎巨噬细胞释放 MIP1 $\gamma$ ，其反过来抑制内皮细胞中 CCR1 相关信号传导途径的活化。我们的研究表明，TNTL 可能是 DR 的替代治疗，也是视网膜微环境中针对 DR 靶向 MIP1 $\gamma$  / CCR1 轴的潜在候选药物的主要来源。

3、“Science Advances 科学进展”的论文发表后，在香港大学

李嘉诚医学院的媒体采访中，已有数家新闻报纸报道了这一发现，认为该发现为肥胖和糖尿病提供了新的治疗靶点和新的药物治疗的可能性。

## 二、香港大学研究发现与进度情况：

TNTL derivatives TNTL 化合物系列

1、 Aim of study: to screen isolated and synthetic compounds from TNTL which can up-regulate SBP2 expression in macrophages and/or can re-skew M1 macrophages potentially M2 phenotype.

目的：考察 TNTL 化合物系列是否能够升高巨噬细胞 SBP2 表达，或者使其从促炎性表型转变为抗炎性表型。

2、 Methods: BMDM was primarily isolated from C57/BL/J mice and cultured into M1-like macrophages (ATM-like phenotype). Chemical derivatives of TJ (FT000-FT040) was given to the M1-like macrophages for 24 hours at the doses of 10 $\mu$  M. Cells were then collected and RNA extracted to proceed for qPCR analysis on related gene expression.

方法：我们在原代巨噬细胞中用药物处理，用流式细胞术考察其 M1/M2 表型变化，再用 qPCR 检测其 SBP2 及促炎性和抗炎性细胞因子的表达。

3、 Findings: In the previous stage, the FT009 and 030 were found to have significant increase in SBP2 expression (Fig. 1) ,

while FT013, 015, 016, 018, 019, 025, 033 were found to have the potential effect of skewing M1-like macrophages into M2-like phenotype (Fig.2).

之前的研究表明，有几个化合物（FT013, 015, 016, 018, 019, 025, 033）是有潜力的。但由于巨噬细胞体外模型具有一定的不稳定性，我们将这些化合物进行重复实验。

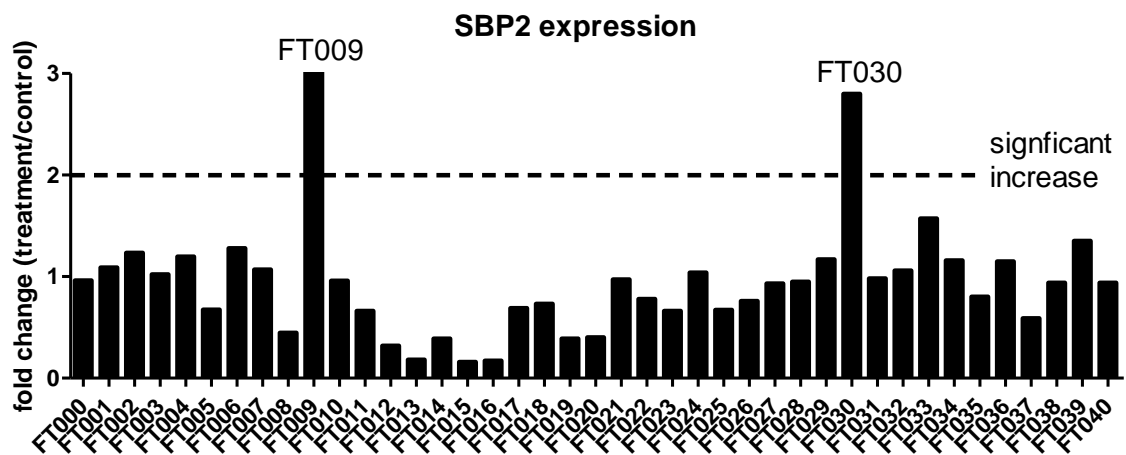
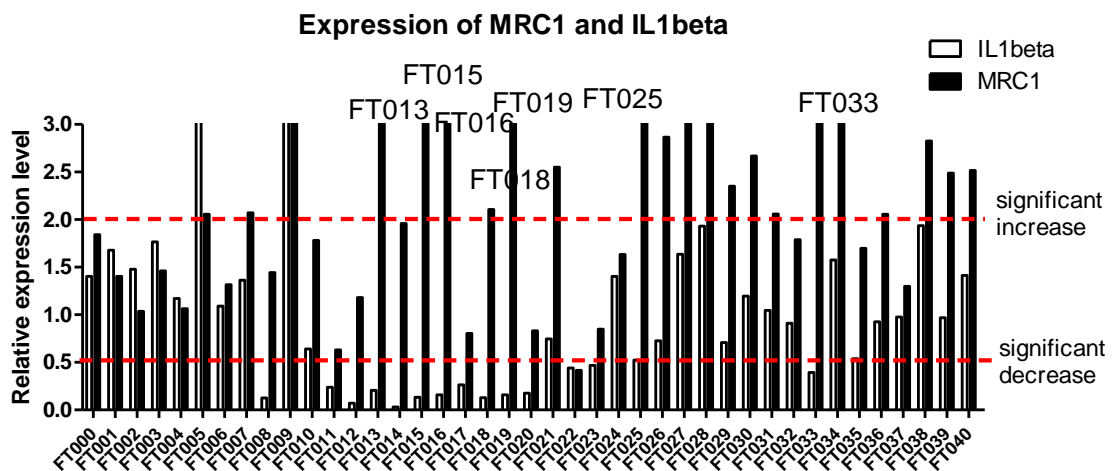


Fig.1 Expression of SBP2 in BMDMs



## Fig. 2 Expression of MRC1 and IL1beta in BMDMs

Here, we continue to validate the above-mentioned compounds on their effects in SBP2 elevation and macrophage phenotypic re-skewing. As shown in Fig. 3, the FT009 and FT030 compounds that were previously mentioned to have induced expression of SBP2, did not show significant changes in the repeated experiment. However, another compound FT013 and FT016 had significant fold change. The inconsistency in the experiments suggested the non-stable effect of the compounds, or a false-positive effect.

重复的结果与上次结果不太一致。发现只有 013 和 016 显著升高 SBP2。

For the M1 to M2 re-skewing, the compounds that were shown effective were repeatedly tested. None of them were observed consistent result in the first experiment in qPCR of IL1beta and MRC1 gene. The M1/M2 ratio was calculated using the result from the flow cytometry, where M1 population was marked as F4/80+ CD86+, and M2 population was marked as F4/80+ CD206+. As shown in fig. 5, the M1/M2 was reduced very dramatically in FT015.

同时，只有 015 能够改变 M 细胞表型。由于升高 SBP2 并非改变巨噬细胞唯一条件，同时，源化合物 FT000 并无在体内外证实 SBP2

为其治疗靶点，我们以与疾病更相关的巨噬细胞表型为筛选标准，选定 015 进行重复。

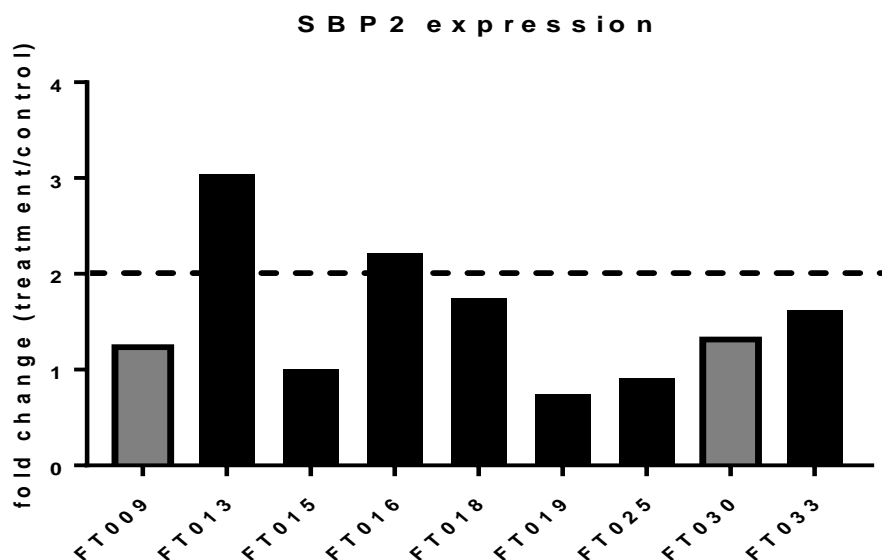


Fig.3 Expression of SBP2 in BMDMs of selected compounds

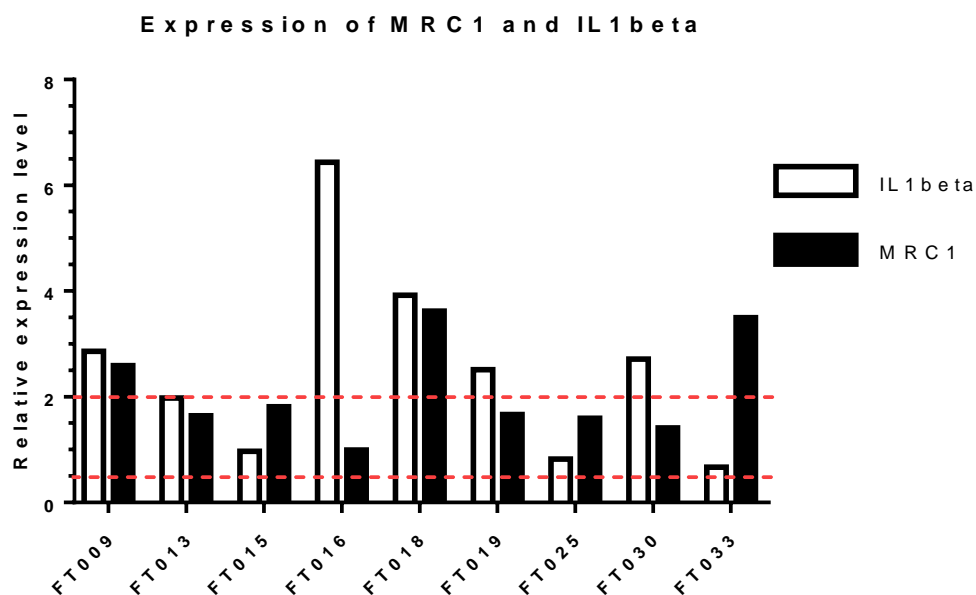


Fig.4 Expression of IL1beta and MRC1 in BMDMs for selected compounds

To further validate the result in the last part, different dosage of FT015 compound was added to the BMDMs. The flow

cytometry showed significant M1/M2 ratio improvement in 1  $\mu$  M, 2  $\mu$  M and 5  $\mu$  M, while the 10  $\mu$  M and 20  $\mu$  M group showed slightly decrease but not significant changes. This is inconsistent with the flow result performed last time, with 10  $\mu$  M as the only dosage for FT015. The samples were undergone gene expression analysis, and the IL1beta and MRC1 gene expression pattern suggested the successful induction of re-skewing M1 to M2 by FT015 at 10  $\mu$  M and 20  $\mu$  M.

重复结果表明，015 的确对于巨噬细胞表型变化有作用，并且有剂量依赖作用。因此，我们建议 015 可以作为下一个阶段考察的对象。

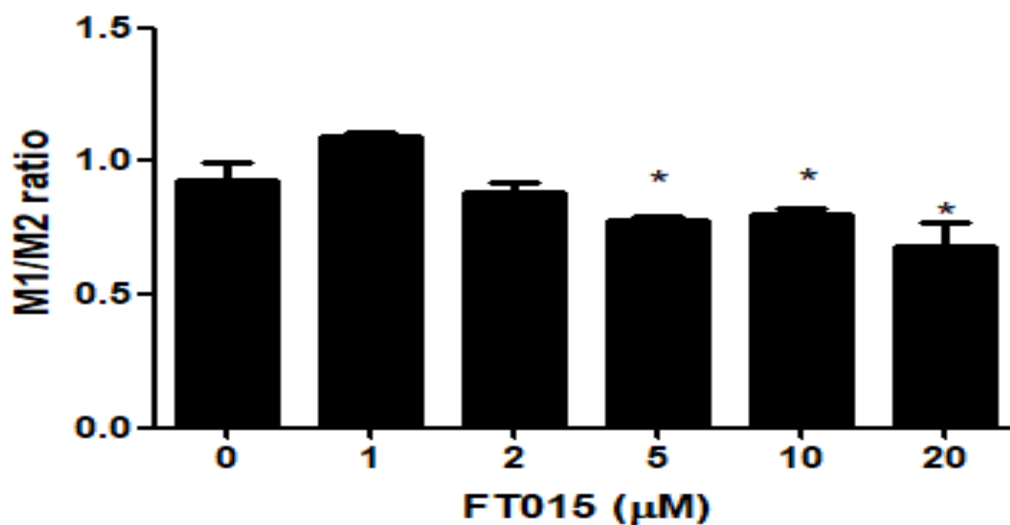
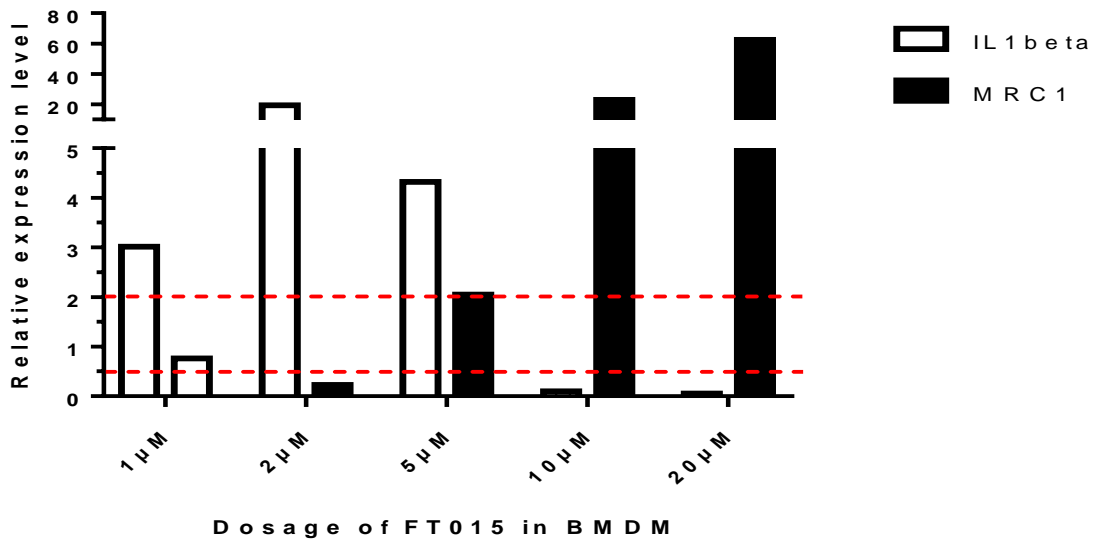


Fig. 6 Flow cytometry result of FT015 on macrophage phenotype



### Expression of M R C 1 and IL 1 beta by FT 0 1 5



4、Conclusion: We find that FT015 may be the potential compound to change macrophage phenotype from M1 to M2, which are potentially contributing to the anti-diabetic effect.

结论：FT015 可能是一个能够改变巨噬细胞表型的化合物，并潜在地具有抗糖尿病作用。相关作用须在动物实验上具体验证。

### 三、进展总结

1、基于糖宁通络胶囊临床有效性，研究团队设计了前期课题，验证了对糖尿病眼病和 I、II 型糖尿病的药理作用，探讨了相关的作用机制。已有两篇高水平的研究论文被国际著名杂志接受，正式出版。研究发现糖宁通络能减肥和减轻糖尿病耐药性，对其降血糖、降血脂、改善胰岛素抵抗等作用进行了深入的考察，并对其作用机制进行了一系列的深入研究，进一步发现糖宁通络胶囊改善 II 型糖尿病的新机制刚好就是脂肪组织上的肥大细胞，脂肪组织中的 MII 细胞逐渐转变为促炎性的 MI 细胞，是糖尿病发病及难治性的病理学基础之一，糖宁通络胶囊可以使 MI 转化为 MII，抗糖尿病的作用机制可能来自于

MII 对脂肪组织的微环境的改善，最后找到了糖宁通络胶囊的分子靶点，即 SBP2，该蛋白是一个硒结合蛋白，已经报导在糖尿病患者中表达下调，但意义不明，研究证明了糖宁通络胶囊通过 SBP2 达到减肥降糖的作用，虽然 SBP2 是一种硒结合蛋白，但单纯补充硒并不能达到同样的目的，说明糖宁通络这一苗药复方具有不可替代性，也是通过临床有效的传统复方找到的新的作用机制和作用靶点，在世界上为肥胖和糖尿病提供了一个新的作用靶点，具有重大意义，值得进一步深入研究和扩大研究范围。如果说，前期认为糖宁通络作用于肥大细胞或硒结合蛋白还是一种猜测或假设的话，而当论文正式出版时，各种最新的研究技术已经证明了糖宁通络作用于肥大细胞或硒结合蛋白与肥胖和糖尿病的关系，是一种因果关系。

2、在本阶段，瞄准糖宁通络胶囊的分子靶点，开始了对从糖宁通络浸膏中分离纯化得到的原型化合物 FT000 的 40 个衍生物进行了活性筛选验证，之前的研究表明，FT013, 015, 016, 018, 019, 025, 033 有潜力，重复验证仅有 FT013, 016 明显升高 SBP2，但 015F 可改变巨噬细胞表型，进一步验证说明 T015 可能是一个能够改变巨噬细胞表型的化合物，并潜在地具有抗糖尿病作用。

3、相关作用将在接下来的动物实验上进一步验证。

4、基于新发现 SBP2 靶点和糖宁通络原方及衍生物的研究结果，已经申请了“一种治疗胰岛素抵抗的靶点及其应用”的发明专利，并于 2019 年 8 月 13 日获得受理通知书。

#### 四、后期计划

在接下来的研究中，香港大学将进一步利用体内外模型，比较研究糖宁通路，其提取物和其 FT013、FT016 和 FT015 衍生物的作用特点和作用机制。

公司将对该项目的后续进展及时履行信息披露义务。

特此公告。

贵州百灵企业集团制药股份有限公司

董 事 会

2019 年 8 月 16 日