



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103547262 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201280018883. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 04. 20

A61K 31/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/05 (2006. 01)

10-2011-0037180 2011. 04. 21 KR

A61P 25/28 (2006. 01)

A61P 3/06 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2012/003066 2012. 04. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/144854 KO 2012. 10. 26

(71) 申请人 庆熙大学校 产学协力团

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 郑圣显 权海燕

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

甘草查耳酮 A 的新用途

(57) 摘要

本发明涉及包含作为用于预防、改善或治疗 AMPK 相关疾病的活性成分的甘草查耳酮 A 的药物或食物组合物,所述 AMPK 相关疾病具体为涉及脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝或退行性疾病(特别是痴呆)的疾病。根据本发明的药物或食物组合物可显著降低脂肪细胞分化、在脂肪细胞中脂肪蓄积以及肝脏细胞中脂肪生成,并且可表现激活肝细胞中 AMPK 的效果。因此,本发明的药物或食物组合物可有效用于 AMPK 相关疾病,具体为涉及脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝或退行性疾病(特别是痴呆)的疾病。



1. 用于预防或治疗 AMP 激活性蛋白激酶 (AMPK) 相关疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的甘草查耳酮 A。
2. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述 AMPK 相关疾病选自以下组中:脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病和退行性疾病。
3. 权利要求 1 或 2 的药物组合物,其中,相对于所述组合物的总重量,所述甘草查耳酮 A 的含量为 1-50wt%。
4. 用于预防或改善 AMPK- 相关疾病的食物组合物,其包含作为活性成分的甘草查耳酮 A。
5. 权利要求 4 的食物组合物,其中所述 AMPK 相关疾病选自以下组中:脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病和退行性疾病。
6. 权利要求 4 或 5 的食物组合物,其中,相对于所述组合物的总重量,所述甘草查耳酮 A 的含量为 1-50wt%。
7. 预防或治疗 AMPK 相关疾病的方法,所述方法包括向需要预防或治疗上述 AMPK 相关疾病的个体施用治疗有效量的甘草查耳酮 A。

甘草查耳酮 A 的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉及甘草查耳酮 A 的新用途。

背景技术

[0002] 由于生活方式的改变,特别是脂肪摄取的增加、缺乏运动等,所谓的“生活方式相关疾病”如肥胖症、高脂血症、糖尿病、高血压等快速增多。此处,肥胖症是牵涉如遗传、营养、环境和社会因素的多种因素的复杂综合征。高脂血症是由于肥胖症而发生的血液中胆固醇和甘油三酯的量增加,其导致高血压、心血管疾病、卒中等的发展。此外,过量的脂肪摄入可导致肝脏脂肪生成、甘油三酯的释放与分解减少等,由于体内高血胆固醇和脂肪的蓄积,导致脂肪肝,即肝脏中脂肪的蓄积以及如动脉硬化等的心血管疾病。

[0003] 脂肪肝中蓄积的脂肪大部分为甘油三酯,并且脂肪肝可大概分为由于过量饮酒而导致的酒精性脂肪肝疾病和由于肥胖症、糖尿病、高脂血症、药物等而导致的非酒精性脂肪肝疾病。非酒精性脂肪肝疾病主要发生在经历肥胖症、高胰岛素血症、糖尿病等的人中,并且是由于胰岛素抵抗或过度脂肪分解而导致血液中游离脂肪酸水平升高而造成的。

[0004] 现在,基本没有药物可用于药理学上治疗脂肪肝疾病,并且仅推荐锻炼和饮食。因此,需要开发用于脂肪肝疾病的治疗剂。

[0005] 脂代谢紊乱是由胰岛素抵抗以及脂肪或胆固醇的过度摄取导致。血液低密度脂蛋白胆固醇或血液中甘油三酯的水平升高以及高密度脂蛋白胆固醇水平降低是动脉粥样硬化的原因。在这些情况下,急需开发在改善脂质代谢、抑制脂肪蓄积等中有效的药物和食物。

[0006] AMP 激活性蛋白激酶 (AMPK) 是通过细胞内 AMP:ATP 比的改变激活的蛋白质,并且是通过抑制 ATP- 消耗途径和激活 ATP- 产生途径在促进能量代谢中起关键效果的代表性蛋白质。已知 AMPK 的激活可增加脂肪酸氧化、抑制甘油三酯在肝脏中蓄积以及防止或治疗 2 型糖尿病、代谢综合征、肥胖症、癌症、退行性疾病 (特别是痴呆) 等 (AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. Biochem J 418(2), 261-275 (2009), Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. J Am Soc Nephrol 2010 Mar.; (21) 3:406-12)。

[0007] 固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 是作为束缚于内质网膜的无活性前体合成,当其 N 末端分开,转位至细胞核并且连接至固醇调控元件 (SRE) 时激活。它们中,已知 SREBP1 主要调节甘油三酯的合成。调节脂肪生成的基因包括脂肪酸合酶 (FAS)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD1)、甘油 -3- 磷酸酰基转移酶 (GPAT) 等以及 SREBP1。已知过氧化物酶体增殖激活受体 - γ (PPAR γ) 是对于脂肪细胞分化的重要转录因子。此外,已知 PPAR γ 与 C/EBP (CCAAT/ 增强子结合蛋白) 的相互作用对于成熟脂肪细胞具有重要意义,并且调节脂肪细胞特异蛋白 (如脂肪细胞蛋白 2, 即 aP2) 和脂代谢酶的表达,。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本发明提供用于预防或治疗脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症或脂肪肝疾病的药物或食物组合物。

[0010] 技术方案

[0011] 令人惊奇的, 本发明人发现甘草查耳酮 A 激活肝细胞中的 AMP 激活性蛋白激酶 (AMPK)、刺激脂肪分解、抑制脂肪生成、抑制前脂肪细胞分化为脂肪细胞并且抑制脂肪细胞中的脂肪生成并完成了本发明。

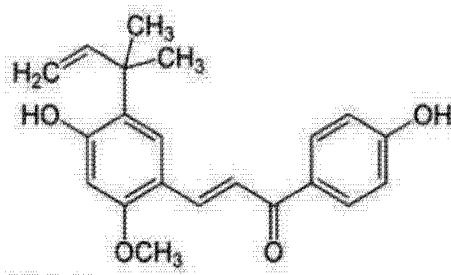
[0012] 在本发明的实施方案中, 本发明提供包含作为活性成分的甘草查耳酮 A 的用于预防或治疗 AMPK- 相关疾病的药物组合物。

[0013] 在本发明的另一实施方案中, 本发明提供包含作为活性成分的甘草查耳酮 A 的用于预防或治疗 AMPK- 相关疾病的食物组合物。

[0014] 在本说明书中, 所述 AMPK- 相关疾病是指选自脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病和退行性疾病 (特别是痴呆) 中的一种或多种疾病。

[0015] 本发明中作为所述药物或食物组合物的活性成分的甘草查耳酮 A { (2E)-3-[5-(1,1-二甲基-2-丙烯基)-4-羟基-2-甲氧基苯基]-1-(4-羟基苯基)-2-丙烯-1-酮 } 是甘草 (*Glycyrrhizae radix*) 中主要黄酮之一, 并且其化学结构如下:

[0016]



[0017] 尽管甘草查耳酮 A 的生理功能未知, 甘草查耳酮 A 已长期被用作潜在抗癌剂 (Chen et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 38(7)pp. 1470-1475, 1994)。此外, 已知其抗癌效果 (E. J. Park et al., *Planta Med.* 64, pp. 464, 1998), 抗炎效果 (韩国专利公开号 10-2010-0077553), 对糖尿病肾病的预防和治疗效果 (韩国专利公开号 10-2010-0135424) 等, 但尚未报道其 AMPK 激活效果以及对脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症或脂肪肝疾病的治疗效果。

[0018] 在本发明中, 甘草查耳酮 A 可以其药学可接受的盐的形式使用, 并且也可以溶剂合物或前药的形式使用。

[0019] 在本发明中, 甘草查耳酮 A 可通过本领域熟知的方法从天然物质 (如甘草、芜菁等) 中分离, 以及可通过本领域技术人员通常使用的方法人工合成。

[0020] 本发明的药物组合物中甘草查耳酮 A 的含量可根据疾病的病症和严重性、病人的状态等适当地调节, 并且相对于所述组合物的总重量, 其含量可为 1-50wt%, 优选 1-5wt%, 但不限于此。

[0021] 作为活性成分包含在本发明的药物组合物中的甘草查耳酮 A 可与药学可接受载体、赋形剂或稀释剂一起配制。对于此配方的其他信息, 请参考文献, 如 Remington's

Pharmaceutical Science(最新版), Mack Publishing Company, Easton PA 等。

[0022] 在本发明的实施方案中,所述包含根据本发明的甘草查耳酮 A 的药物组合物可被配制为口服剂型,如散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂等;外用药物,栓剂,无菌注射溶液等。

[0023] 可包含于所述药物组合物的载体、赋形剂和稀释剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等,但不限于此。

[0024] 此外,本发明的药物组合物可包含普遍使用的稀释剂、赋形剂,或其他药学可接受添加剂如填充剂、膨胀剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂。

[0025] 用于口服给药的固体制剂可包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且除了甘草查耳酮 A,其可通过与一种或多种赋形剂混合而制备,所述赋形剂如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等。此外,除简单赋形剂外,还可使用如硬脂酸镁、滑石等的润滑剂。

[0026] 用于口服的液体制剂可包括混悬剂、溶液、乳剂、糖浆剂等,并且除了通常使用的如水、液状石蜡等的简单稀释剂,其还可包含多种赋形剂,如润湿剂、甜味剂、增香剂、防腐剂等。

[0027] 用于胃肠外给药的制剂可包括已灭菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干剂和栓剂。所述非水溶剂和混悬剂的实例可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)、可注射酯(如油酸乙酯(ethylolate))等,但不限于此。栓剂的基本材料可包括 witepsol、聚乙二醇、吐温 61、可可脂、月桂酸甘油酯、甘油明胶等,但不限于此。

[0028] 本发明的药物组合物的优选剂量取决于病人的病症和体重、疾病的严重性、药物的种类、给药途径和持续时间等,但可为由本领域技术人员适当选择的治疗有效量。为了期望的效果,基于作为活性成分的甘草查耳酮 A 的含量,本发明的组合物的剂量对于成年男性可为每天 10mg/kg 至 30mg/kg,优选 5mg/kg 至 10mg/kg。

[0029] 每天的剂量可一天内一次或数次给药。然而,本发明的范围不限于所述给药剂量和频率。

[0030] 本发明的药物组合物可通过多种途径向哺乳动物给药,所述哺乳动物如大鼠、小鼠、牛和人,所述给药途径如口服给药或腹膜内、直肠内、静脉内、肌肉内、皮下、子宫内或脑室内注射。

[0031] 本发明的药物组合物可用于 AMPK 相关疾病的预防或治疗。即,本发明的药物组合物可用于选自脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病和退行性疾病(特别是痴呆)中的一种或多种疾病的预防或治疗。在此,高脂血症包括与高脂血症相关的病症,并且所述与高脂血症相关的病症包括动脉粥样硬化、心绞痛、颈动脉疾病、脑动脉硬化、黄色瘤、CHD、缺血性中风、血管成形术后再狭窄、外周血管疾病、间歇性跛行、心肌梗塞(如坏死减少)、血脂异常、餐后脂血症等。所述退行性疾病可为痴呆,优选阿尔茨海默型痴呆。

[0032] 本发明还提供甘草查耳酮 A 用于预防或治疗上述疾病的用途。

[0033] 本发明还提供甘草查耳酮 A 用于制备预防或治疗上述疾病的药物的用途。

[0034] 本发明还提供用于预防和治疗上述 AMPK 相关疾病的方法,所述方法包括向个体给药治疗有效量的甘草查耳酮 A,所述个体,例如需要预防或治疗上述 AMPK 相关疾病的哺

乳动物,包括人。

[0035] 本发明还提供包含作为活性成分的甘草查耳酮 A 的用于预防或治疗 AMPK- 相关疾病的食物组合物。本发明的食物组合物可用作健康功能食物。如在此所使用,术语“健康功能食物”是指按照健康功能食物法 (Health Functional Food Act) 第 6727 条,通过使用对人体有益的原材料和成分生产并加工的食物。术语“功能”是指摄取食物为了在人体的结构和功能上控制营养品,或达到健康上的有用效果(如生理效果)。

[0036] 本发明的食物组合物可包含任何食物添加剂。除非另外说明,食物添加剂的适用性按照由韩国食品和药品管理局通过的韩国食品添加剂法典 (Korean Food Additives Codex) 的总则和一般检测方法中的说明和有关条目的标准确定。

[0037] 上述“韩国食品添加剂法典”中提到的条目的实例包括化学化合物,如酮、甘氨酸、柠檬酸钠、烟酸、肉桂酸等,天然添加剂如柿子颜料、甘草提取物、晶态纤维素、高粱颜料、瓜尔胶等以及混合制剂如 L- 谷氨酸钠、用于面条的碱性添加剂、防腐剂、焦油颜料制剂等。

[0038] 本发明的健康功能食物组合物可在用于预防或治疗 AMPK 相关疾病的食物和饮料中广泛使用,具体地,所述 AMPK 相关疾病如脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病或退行性疾病(特别是痴呆)。此外,本发明的健康功能食物组合物可用于多种食物、饮料、口香糖、茶、维生素复合物,健康功能食物、食物添加剂等,并且其可以散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂或饮料的形式使用,或以其他任何形式使用。

[0039] 为了预防或治疗 AMPK 相关疾病的目的,具体地,所述 AMPK 相关疾病如脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病或退行性疾病(特别是痴呆),相对于所述组合物的总重量,本发明的食物组合物可以包含 1-50wt%,优选 1-5wt% 的量的甘草查耳酮 A。

[0040] 此外,为了预防或治疗 AMPK 相关疾病的目的,具体地,所述 AMPK 相关疾病如脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病或退行性疾病(特别是痴呆),本发明的食物组合物可制备并加工为片剂、胶囊剂、散剂、液体制剂、丸剂等的形式。

[0041] 例如,片剂形式的健康功能食物可通过用常规方法将甘草查耳酮 A、赋形剂、粘合剂、崩解剂以及其他添加剂的混合物造粒,向颗粒添加助流剂并且加压塑型所得颗粒而制备,或可将所述混合物直接加压塑型而制备。此外,如果需要,所述片剂形式的健康功能食物可包含增香剂,并且如果需要,其可用合适的包衣剂包衣。

[0042] 所用术语(如赋形剂、粘合剂、助流剂、崩解剂、增味剂、增香剂等)的定义在本领域已知的文献中描述并且包括那些具有相同或相似功能的物质(韩国药典手册 (Handbook of the Korean Pharmacopoeia), MoonSung Co., 韩国药学教育协会 (Korean Association of Pharmacy Education), 第 5 版, 第 33-48 页, 1989)。

[0043] 有益效果

[0044] 本发明的甘草查耳酮 A 具有激活肝细胞中 AMPK、刺激脂肪分解、抑制脂肪生成、抑制前脂肪细胞分化为脂肪细胞,并且抑制脂肪细胞中的脂肪生成的效果。从而,所述包含甘草查耳酮 A 的药物或食物组合物具有预防、改善或治疗 AMPK 相关疾病的效果,具体地,所述 AMPK 相关疾病如脂代谢紊乱、高脂血症、代谢综合征、肥胖症、脂肪肝疾病或退行性疾病(特别是痴呆)。

附图说明

[0045] 图 1 为显示未处理组 (con)、吡格列酮处理组 (Pio) 和甘草查耳酮 A 处理组中的 3T3-L1 脂肪细胞在分化后的形态学的图。

[0046] 图 2 为显示脱色后 540nm 下甘油三酯水平的图表。

[0047] 图 3 为显示为确定在 3T3-L1 细胞中,甘草查耳酮 A 对于用于脂肪细胞分化的转录因子 (PPAR γ 和 C/EBP α) 的表达的效果的蛋白质印迹法结果的图表。

[0048] 图 4 为显示为确定在 3T3-L1 细胞中,甘草查耳酮 A 对于用于脂肪细胞分化的转录因子 (PPAR γ 和 C/EBP α) 的表达 (图 4A) 以及脂肪生成基因 (SREBP1、FAS、SCD1 和 GPAT) 和脂肪酸氧化相关基因 (CPT-1) 的表达的效果 (图 4B) 的 RT-PCR 结果的图表。

[0049] 图 5 为显示甘草查耳酮 A 对 AMPK 和 ACC 磷酸化效果的图表。

[0050] 图 6 显示为确定甘草查耳酮 A 抑制用于脂肪生成的转录因子 (SREBP1、SCD1 和 FAS) 表达以及刺激脂肪分解基因 (PPAR α 和 CD36) 表达的 RT-PCR 结果的图表。

具体实施方式

[0051] 在下文中,本发明会根据实施例和实验实施例详细说明。然而,这些实施例和实验实施例是对本发明的说明,并且本发明的范围不限于这些实施例和实验实施例。

[0052] 制备实施例

[0053] 甘草查耳酮 A 购自 Sigma-Aldrich (产品号 :68783, MO, 美国) 以进行下述实验。

[0054] 实施例

[0055] 实施例 1 :甘草查耳酮 A 抑制脂肪细胞分化以及抑制脂肪细胞中脂肪生成的效果的确定

[0056] (1) 孵育前脂肪细胞

[0057] 3T3-L1 前脂肪细胞 (ATCC 号 :CL-173) 购自美国模式培养物保藏库 (American type culture collection, ATCC)。3T3-L1 前脂肪细胞在包含 10% 胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (100U/ml) 的达尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 中, 37°C 下 5%CO₂ 的 CO₂ 培养箱中培养。

[0058] (2) 诱导分化为脂肪细胞

[0059] 在 6 孔板中接种 3T3-L1 细胞并且在细胞融合后期时,用包含 0.5mM 地塞米松、10 μ g/ml 胰岛素和 0.5mM IBMX (3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤) 的激素混合物处理,并且每两天换一次培养基。4 天后用 5 μ g/ml 的胰岛素替换所述培养基,然后 2 天后用普通培养基替换,从而诱导其分化为脂肪细胞。在脂肪细胞分化期间,所述细胞用 5 μ m 和 10 μ m 甘草查耳酮 A 处理,并且将用 10 μ m 吡格列酮处理的细胞作为阳性对照组。

[0060] (3) 甘草查耳酮 A 抑制脂肪细胞分化效果的确定 :脂肪细胞形态学的观察

[0061] 已分化的脂肪细胞用 1x PBS 洗三次并且用 10% 甲醛固定 1 小时。然后,所得的细胞用油红 O 染色 2 小时,用三蒸水洗,并在显微镜下观察 (图 1)。移除所述细胞中的水后,细胞用 100% 异丙醇脱色,然后在 540nm 下检测甘油三酯水平 (图 2)。

[0062] 如图 1 和 2 所示,确证了甘草查耳酮 A 以浓度依赖性方式抑制脂肪细胞的分化。

[0063] (4) 甘草查耳酮 A 抑制用于脂肪细胞分化的转录因子的表达的效果的确定 :蛋白提取和蛋白质印迹法

[0064] 已分化的 3T3-L1 脂肪细胞用裂解缓冲液 (50mM tris-HCl, pH 7.5, 1mMEDTA、0.25% 蔗糖、0.4mg/ml 地高辛和 1.5mM PMSF) 均质化, 并且将蛋白在 4℃, 12,000rpm 下离心 20 分钟。

[0065] 蛋白浓度使用 Bio-Rad 测定试剂 (Bio-Rad, 美国) 检测。将 30 μg 所述分析过的蛋白用 SDS-PAGE 分离, 转移至凝胶膜, 用 5% 脱脂奶室温封闭 1 小时, 然后与 1:1000 稀释的一抗 (PPAR-γ, Santa cruz, 7273; C/EBPα, Santa cruz, 61; 肌动蛋白, Santa cruz, 1616) 在 4℃ 下过夜反应。随后, 该膜用 Tris 缓冲盐水吐温 -20 (TBST) 洗三次, 然后与 1:2000 稀释的二抗 (Santa Cruz, sc-2313; sc-2005; sc-2033) 在室温下反应 1 小时。

[0066] 然后, 该膜用 TBST 洗三次, 并且将其用 ECL 溶液 (Amersham, 瑞典) 曝光至 X-射线胶片。蛋白质印迹法结果在图 3 中显示。

[0067] 如图 3 所示, 确证了甘草查耳酮 A 以浓度依赖性方式抑制用于脂肪细胞分化的转录因子的表达, 从而抑制脂肪细胞分化。

[0068] (5) 甘草查耳酮 A 抑制用于脂肪细胞分化的转录因子和脂肪分解的基因的表达的效果的确定: RNA 提取和 RT-PCR

[0069] 使用异硫氰酸胍-水饱和的苯酚/氯仿提取步骤从已分化的 3T3-L1 脂肪细胞中提取总 RNA。水层的总 RNA 用异丙醇沉淀, 并且检测所提取的 RNA 在 260nm 和 280nm 波长下的光密度并且定量。将 1 μg 的总 RNA 用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶和 oligo(dT)15 引物反转录。所述引物的类型的序列如表 1 所示。

[0070] [表 1] 引物序列和退火温度

基因	正向引物(5'至 3')	反向引物(5'至 3')	退火温度(℃)
PPAR-γ	GCGCTACCGGTCTTCTATCA	TGCTGCCAAAAGACAAGCG	57
C/EBPα	GATCCTGGAACGAGAACAC	AGACTCGTGGAACACGGTGGT	57
αP2	CGAGGGTTGGTTGTTGATCTGT	ATAGCACTGTTGGCCCTGGA	57
SREBP1	GCGCTACCGGTCTTCTATCA	TGCTGCCAAAAGACAAGGG	58
SCD-1	CCCTGAACATCGAGTGTCGA	CTTGCCCAGAGATTGAGGTCCT	57
FAS	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CATCAGCAACATCATTGGGT	66
GPAT	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CAGCAACATCATTGGGT	58
CPT1	CCTGGGCATGATTGCAAG	ACAGACTCCAGGTACCTGCTCAC	60
β-actin	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCCATCTCCTGCTCAAAGTC	57

[0071] 将所述引物添加至包含 20mM tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.5mM dNTP、5 μl cDNA 和 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶的 25 μl 反应溶液中以将其各自终浓度调到 0.5 μM。PCR 进行 30 个循环, 所述循环为 95℃ 下变性 1 分钟, 退火 30 秒 (对应如表 1 所示的退火温度), 和在 72℃ 下延伸 1 分钟。然后将 PCR 产物在 100V 下用 0.5 μg/ml 溴化乙锭染色的 1% 琼脂糖凝胶中电泳。β-肌动蛋白用作扩增基因的对照组。RT-PCR 的结果在图 4 中显示。

[0073] 如图 4 所示, 可以看出, 甘草查耳酮 A 以浓度依赖性方式抑制脂肪细胞分化和脂肪生成并且刺激脂肪酸氧化。

[0074] 实施例 2: 甘草查耳酮 A 抑制肝细胞中脂肪生成以及刺激脂肪分解的效果的确定

[0075] (1) 肝细胞的孵育

[0076] 人肝细胞瘤 HepG2 细胞 (ATCC 号:HB-8065) 购自美国模式培养物集保藏库 (ATCC)。HepG2 细胞在包含 10% 胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (100U/ml) 的达尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 中, 37℃ 下 5%CO₂ 的 CO₂ 培养箱中培养。

[0077] HepG2 细胞接种于 6 孔板, 并在次日用不同浓度的甘草查耳酮 A 处理 (进行 24 小时), 以及分别进行不同时间如 0、6、12 和 24 小时 (用 20 μM 甘草查耳酮 A 处理), 从而得到样品。此外, 为确定由甘草查耳酮 A 的 AMPK 激活与脂肪生成 / 脂解机制的相互关系, 制备了用来自 Calbiochem (Darmstadt, 德国) 的 10 μM 化合物 C (AMPK 抑制剂) 预处理的样品。

[0078] (2) 甘草查耳酮 A 在 HepG2 细胞中 AMPK 激活效果的确定: AMPK 和 ACC 磷酸化的测定

[0079] HepG2 细胞用裂解缓冲液 (50mM tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA、0.25% 蔗糖、0.4mg/ml 地高辛和 1.5mM PMSF) 均质化, 并且将蛋白在 4℃, 12,000rpm 下离心 20 分钟。

[0080] 蛋白浓度使用 Bio-Rad 测定试剂 (Bio-Rad, 美国) 检测。将 30 μg 分析过的蛋白用 SDS-PAGE 分离, 转移至凝胶膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时, 然后与 1:1000 稀释的一抗 (pAMPK:Cell signaling, 2531; AMPK:Cell signaling, 2532; pACC:Cell signaling, 3661; ACC:Cell signaling, 3662; 肌动蛋白:Santa cruz, 1616) 在 4℃ 下过夜反应。随后, 该膜用 TBST 洗三次, 然后与 1:2000 稀释的二抗 (Santa Cruz, sc-2313; sc-2005; sc-2033) 在室温下反应 1 小时。然后, 该膜用 TBST 洗三次, 并且将其用 ECL 溶液 (Amersham, 瑞典) 曝光至 X-射线胶片。蛋白质印迹法结果在图 5 中显示。

[0081] 从图 5 可看出, 甘草查耳酮 A 显著地以剂量依赖和时间依赖的方式磷酸化 AMPK 和 ACC。特别地, 从图 5C 可看出, 当用 AMPK 抑制剂 (化合物 C) 预处理 HepG2 细胞时, AMPK 和 ACC 的磷酸化被抑制, 从此可看出甘草查耳酮 A 可通过 AMPK 通路起作用。

[0082] (3) 甘草查耳酮 A 抑制用于脂肪生成的转录因子 (SREBP1) 的表达和刺激脂肪分解的基因的表达的效果的确定: RNA 提取和 RT-PCR

[0083] RT-PCR 以与实施例 1 (5) 相同的方法进行, 但使用上述获得的人肝肿瘤 HepG2 细胞和表 2 的引物序列和退火条件。RT-PCR 的结果在图 6 中显示。

[0084] [表 2] 引物序列及退火温度

基因	正向引物(5'至 3')	反向引物(5'至 3')	退火温度(℃)
SREBP1	GTGGCGGCTGCATTGAGAGTGAG	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	62
SCD-1	CCCTGAACATCGAGTGTCGA	CTTGCCAGAGATTTGAGGTCTT	57
FAS	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CATCAGCAACATCATTCGGT	66
PPAR α	TCCGACTCCGTCTTCTTGAT	GCCTAAGGAAACCGTTCTGTG	54
CD36	GGGCTATAGGGATCCATTTT	CCTTTCAGATTAAACGTCGGATTG	50
GAPDH	TCCACCACCTGTTGCTGTA	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	54

[0086] 如图 6 所示, 可以看出用于脂肪生成的转录因子 (SREBP1、SCD-1 和 FAS) 的表达被持续不同时间以及不同浓度 (图 6A 和 6B) 的甘草查耳酮 A 减少, 并且脂肪分解基因 (PPAR α 和 CD36) 的水平增加 (图 6C 和 6D)。

[0087] 此外, 当 HepG2 细胞用 AMPK 抑制剂 (化合物 C) 预处理以研究甘草查耳酮 A 对脂肪生成和脂肪分解的基因的效果是否与 AMPK 相关时, 确证了脂肪生成基因 (SREBP-1、SCD1

和 FAS) 水平增加 (图 6E) 并且脂肪分解基因的水平降低 (图 6F), 从此可以看出甘草查耳酮 A 可通过 AMPK 途径起作用。

[0088] 本发明已通过参考其优选实施方式详细描述。然而, 本领域技术人员理解, 可对这些实施方式进行改变而不脱离后附权利要求书及其等效方案规定的本发明的原则和范围。

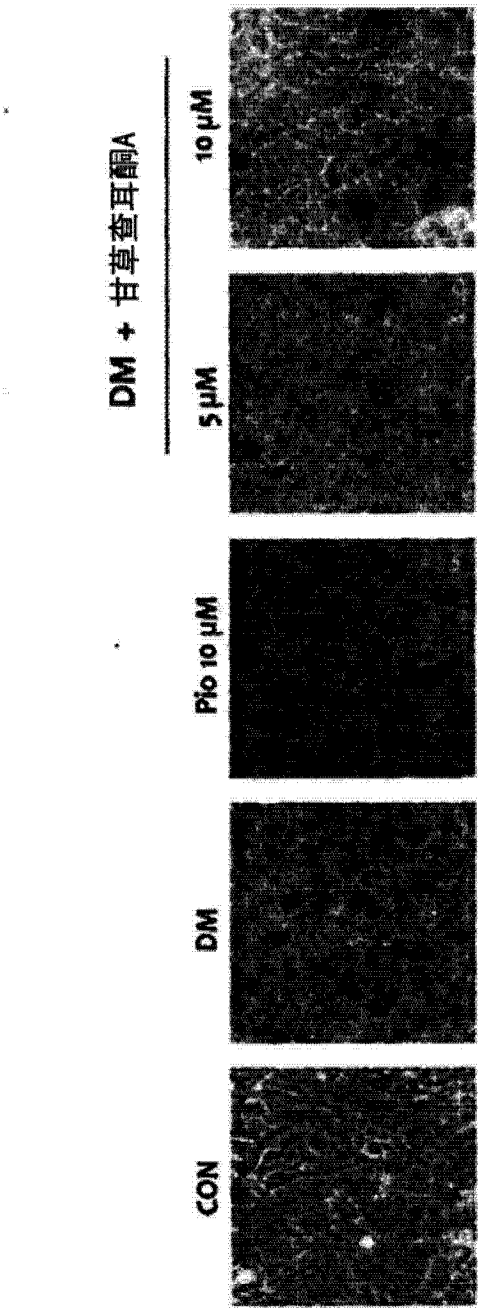


图 1

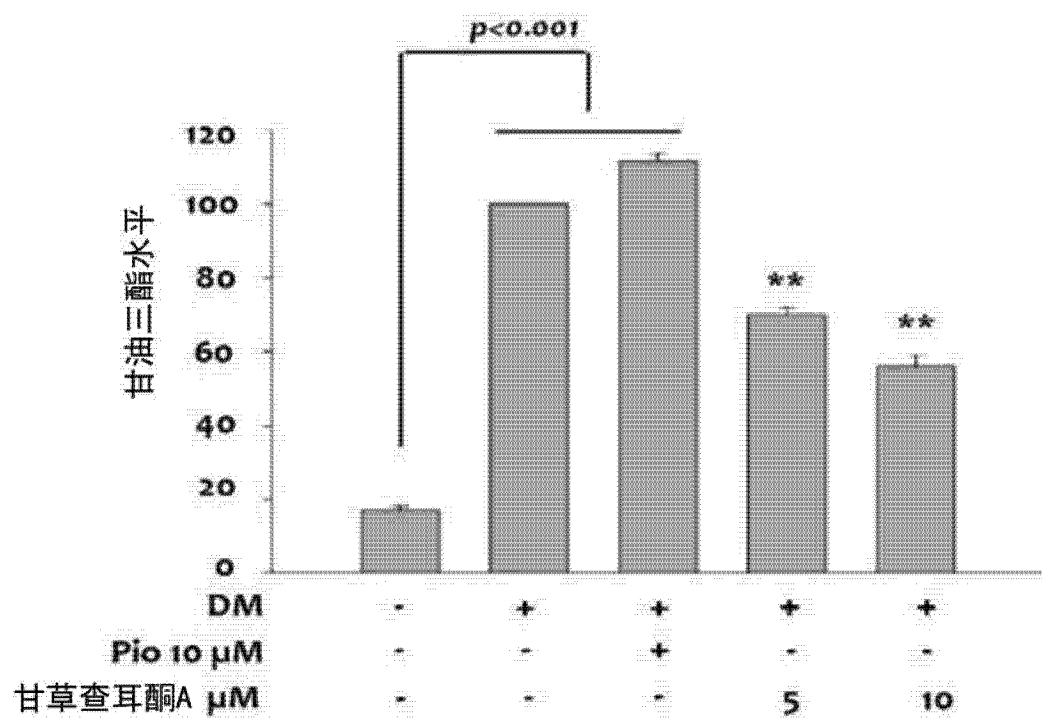


图 2

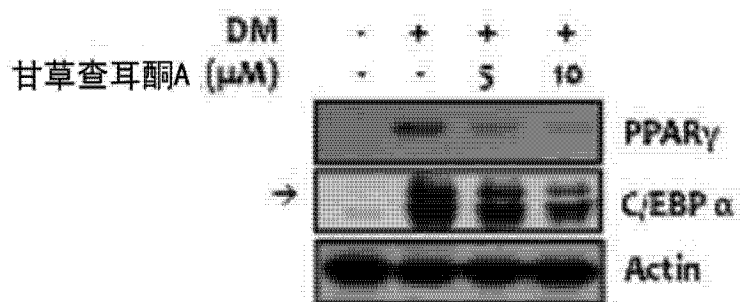


图 3

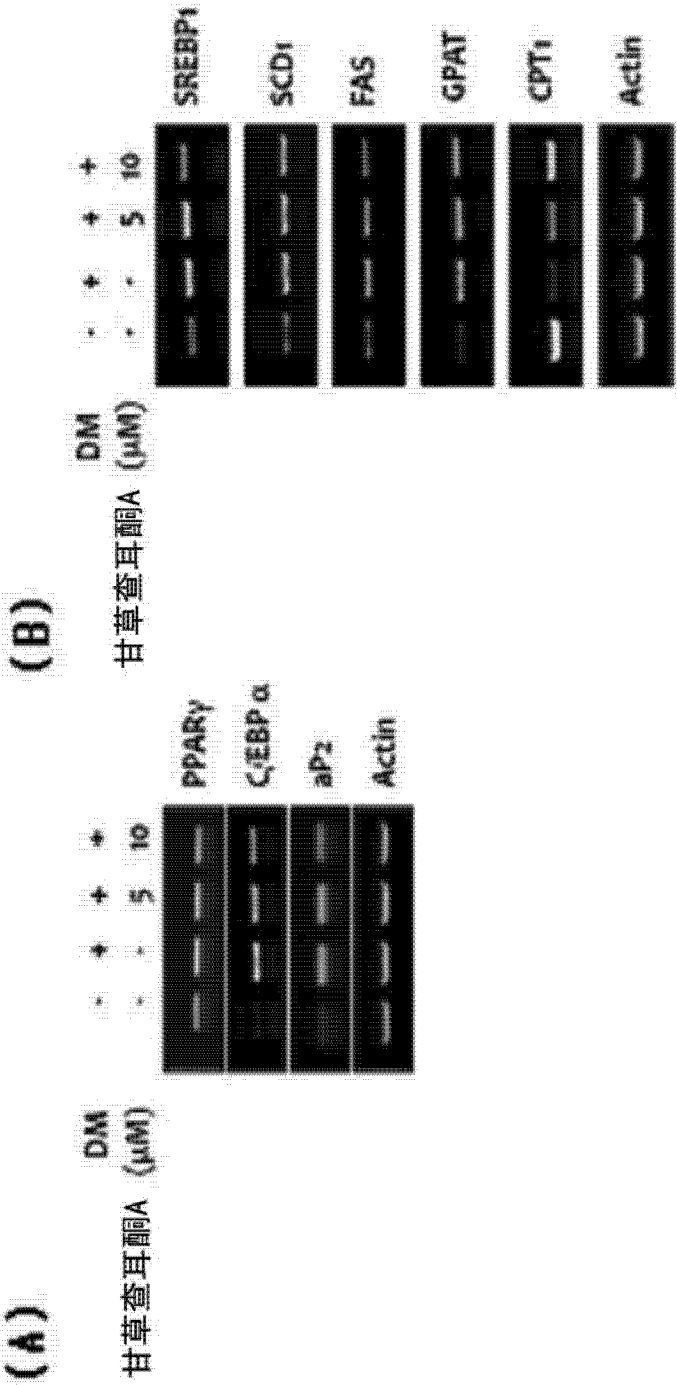


图 4

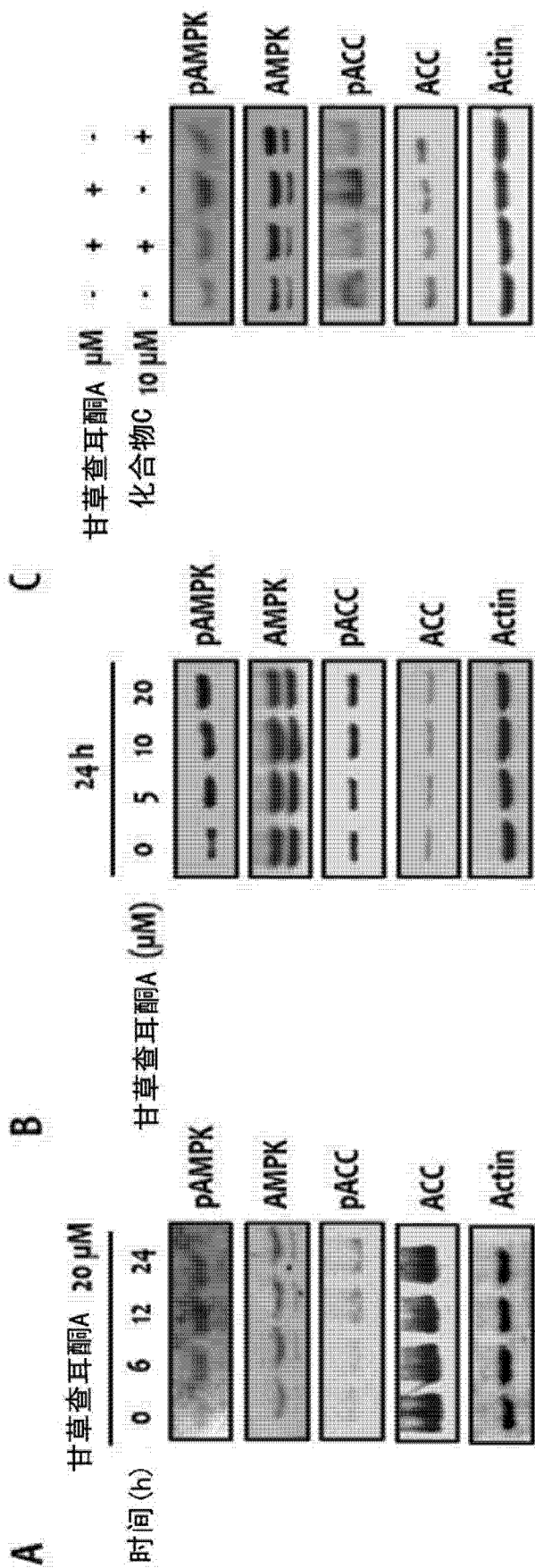


图 5

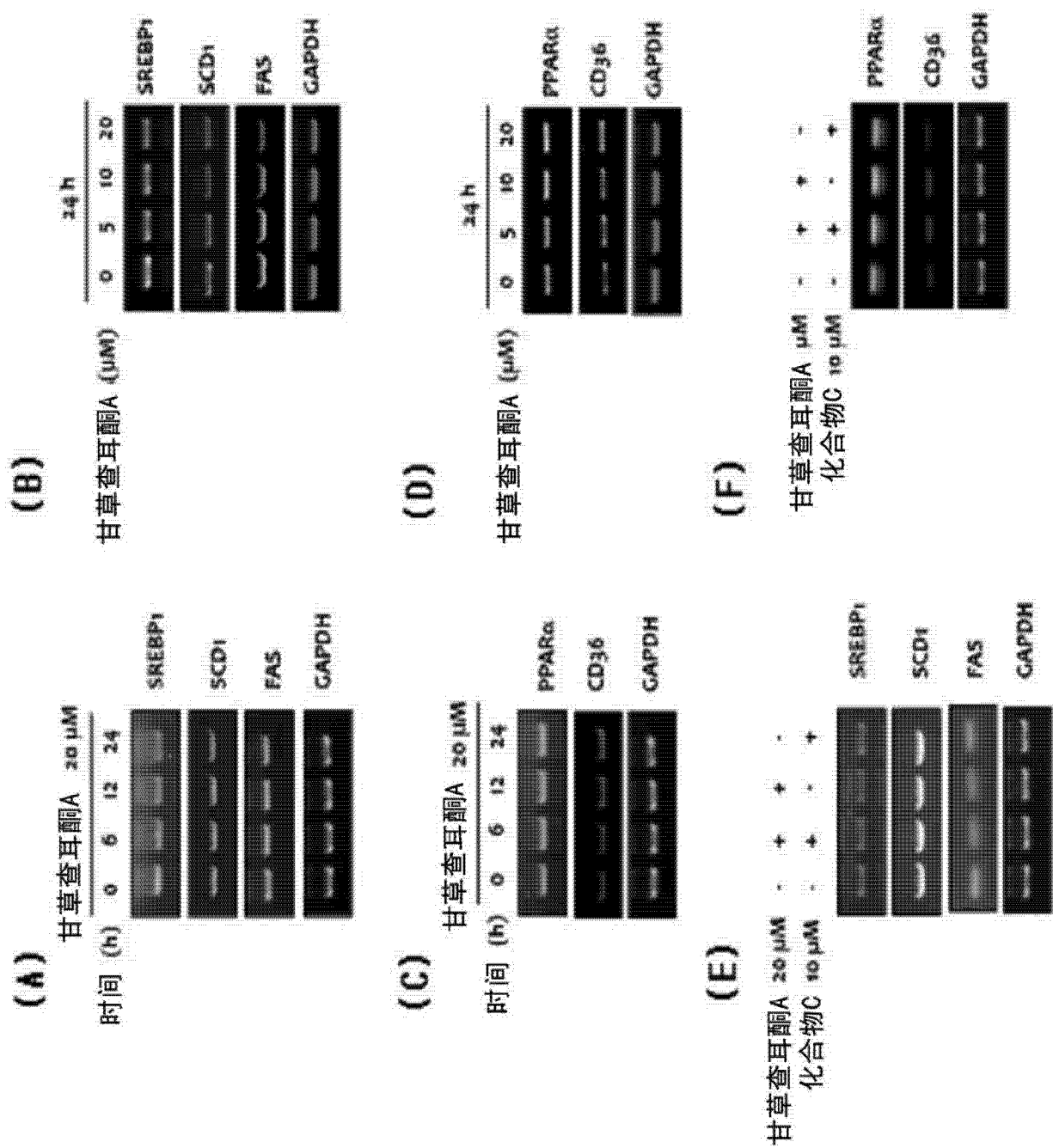


图 6