



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101960997 B
(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201010236081. 7
(22) 申请日 2010. 07. 22
(30) 优先权数据
12/507, 545 2009. 07. 22 US
(73) 专利权人 彦臣生技药品股份有限公司
地址 中国台湾台北市
(72) 发明人 黄中洋 陈嘉南 陈威戎 黄伟展
纪俐伶
(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
代理人 王允方
(51) Int. Cl.
C12N 9/00 (2006. 01)

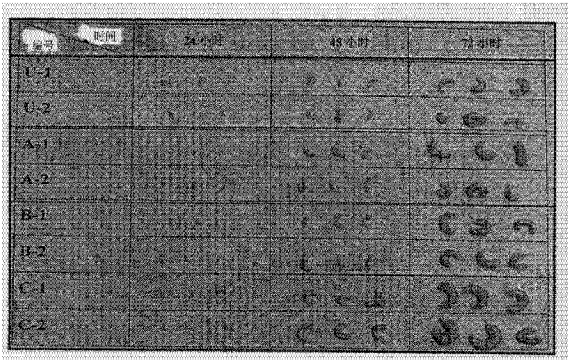
(56) 对比文件
EP 0529962 A2, 1993. 03. 03,
AU 2007216781 A1, 2009. 04. 02,

审查员 赵桂芹

权利要求书11页 说明书41页 附图12页

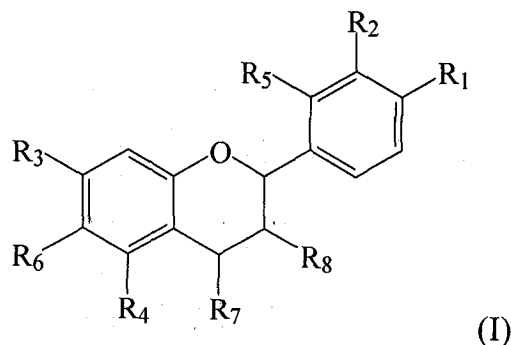
(54) 发明名称
组蛋白去乙酰化酶抑制剂于改变蜂王浆中
MRJP3 蛋白质的新颖用途

(57) 摘要
本发明提供改变蜂王浆中 68 千道尔顿 (kDa) 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例的方法、制备相比于对照组蜂王浆, 含 68kDa 与 64kDa 蛋白质比例经改变的 MRJP3 的蜂王浆的方法、以及由前述方法所制得的蜂王浆。本发明还提供促进蜂王子生长的方法, 所述方法包括以本发明的蜂王浆喂食蜂王子。本发明另外提供培育个体较正常大的蜂王子、蜂王蛹和蜂王的方法。



1. 一种培育相比于对照组幼虫,重量至少大 50%的蜜蜂幼虫的方法;所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲蜜蜂幼虫;其中对照组的幼虫所食用的蜂王浆是由未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂分泌;

其中所述 HDAC 抑制剂选自下列式 (I) 化合物的群组或其医药上可接受的盐、立体异构体、对映异构体、前药和溶剂合物、蜂胶和蜂胶素的群组,



其中

R_1 和 R_2 各自独立为 OH、OC(=O) 烷基、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基、N- 炔基、O- C_{3-8} 环烷基、S- C_{3-8} 环烷基、N- C_{3-8} 环烷基、O- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、S- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、N- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、烷基、烯基、炔基、 C_{3-8} 环烷基、不饱和 5 元至 10 元单环或双环或包含至少一个选自下列群组的杂原子: N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环;或 R_1 与 R_2 一起形成二氧戊环;

R_3 和 R_4 各自独立为 OH、OC(=O) 烷基、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基、N- 炔基、O- C_{3-8} 环烷基、S- C_{3-8} 环烷基、N- C_{3-8} 环烷基、O- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、S- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、N- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、烷基、烯基、炔基、 C_{3-8} 环烷基、不饱和 5 元至 10 元单环或双环或包含至少一个选自下列群组的杂原子: N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环;

R_5 是 C_{4-16} 烷基或 C_{4-16} 烯基,其中烷基或烯基未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、卤素、CN、NO、 N_3 、 NH_2 、CHO、 OR_9 、 SR_9 、 NR_9 或 $COOR_9$ 取代;

R_6 是 C_{2-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基,其中烷基或烯基未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、卤素、CN、NO、 N_3 、 NH_2 、CHO、 OR_9 、 SR_9 或 NR_9 取代;或

R_5 或 R_6 之一为氢、卤素或 OH,另一者为 C_{4-16} 烷基或 C_{4-16} 亚烷基,其未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、 NH_2 、卤素、CN、NO 或 N_3 取代;

R_7 或 R_8 各自独立为氢、卤素、OH、 NH_2 、COOH、CHO、CN、NO、未经取代或经 OH、 NH_2 、COOH、卤素、CN、NO 或 CHO 取代的 C_{1-6} 烷基、=O、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基或 N- 炔基;或

R_7 和 R_8 一起形成双键、 C_{3-6} 环烷基或包含至少一个选自下列群组的杂原子: N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环;

R_9 是苯基、 $C(=O)R^{10}$ 、 $C(=O)OR^{10}$ 或苄基;且

R^{10} 是 OH、NHOH、 NH_2 、 C_{1-6} 烷基、苯基或苄基。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中蜜蜂幼虫的重量增加约 50%至 5 倍、50%至 2 倍、

50%至3倍、1至5倍、2至5倍或1至3倍。

3. 如权利要求1所述的方法,其中喂饲蜂王浆72小时后的幼虫重量增加大于1倍(100%)。

4. 如权利要求1所述的方法,其中喂饲蜂王浆72小时后的幼虫重量增加大于1.5倍。

5. 如权利要求1所述的方法,其中喂饲蜂王浆72小时后的幼虫重量增加约2到5倍。

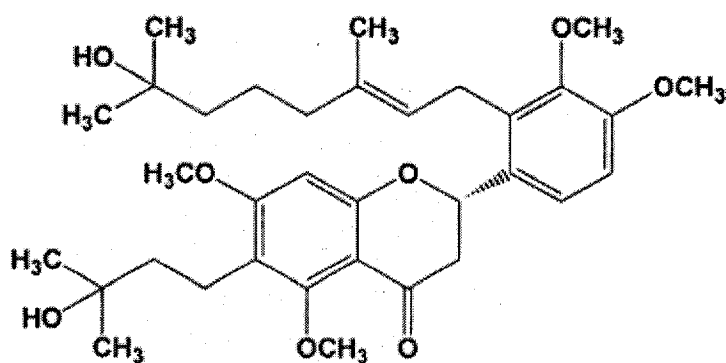
6. 如权利要求1所述的方法,其中喂饲蜂王浆72小时后的幼虫重量增加约3到5倍。

7. 如权利要求1所述的方法,其中蜂王浆中MRJP3蛋白质的68kDa对64kDa的比例改变。

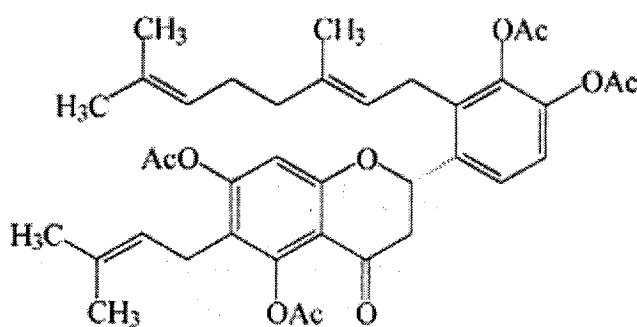
8. 如权利要求7所述的方法,其中蜂王浆中MRJP3蛋白质的68kDa对64kDa的比例,相对于对照组,增加约1.5至12倍、1.5至5倍、2至6倍、2至10倍、4至12倍或2至4倍。

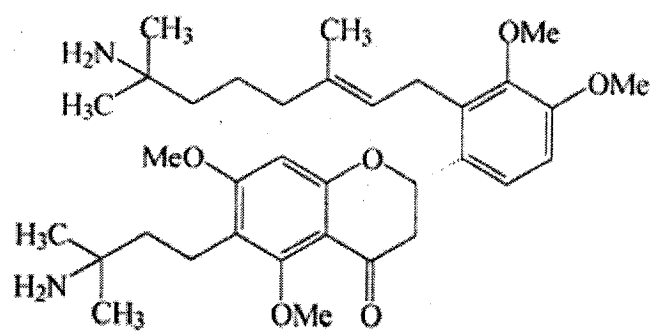
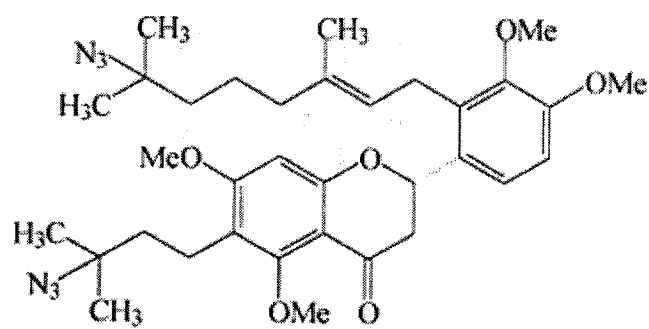
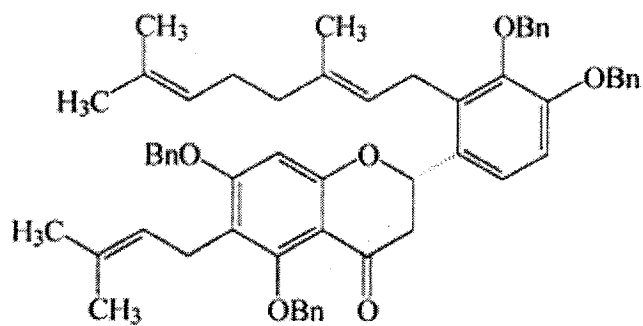
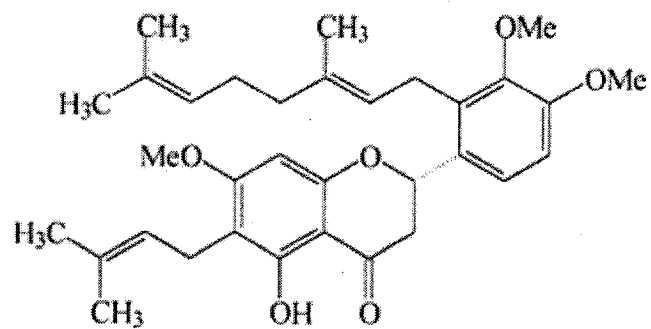
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述HDAC抑制剂是台湾绿蜂胶、蜂胶素A、蜂胶素B、蜂胶素C、蜂胶素D、蜂胶素E、蜂胶素F、蜂胶素G、蜂胶素H、蜂胶素I、蜂胶素J、或NBM-HD-1。

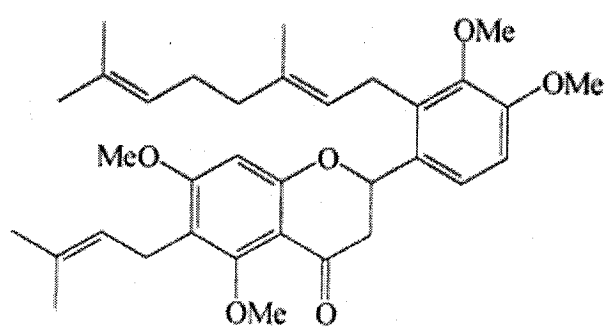
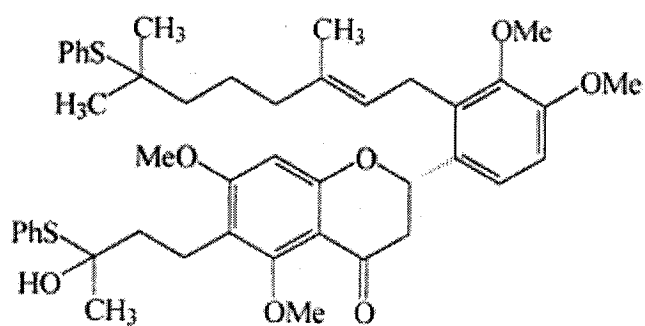
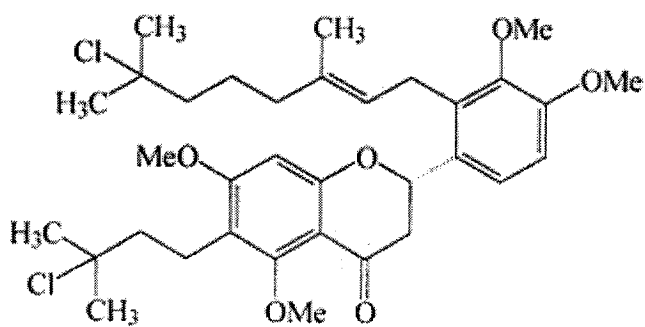
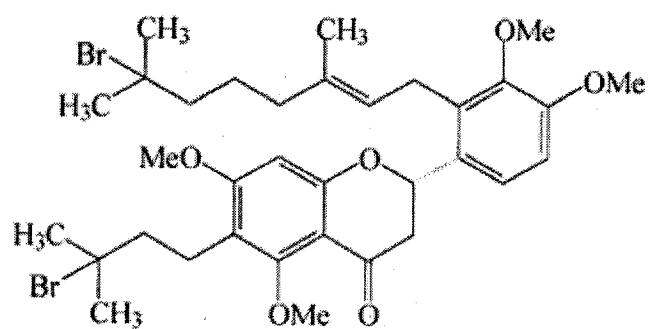
10. 如权利要求1所述的方法,其中HDAC抑制剂选自下列群组:

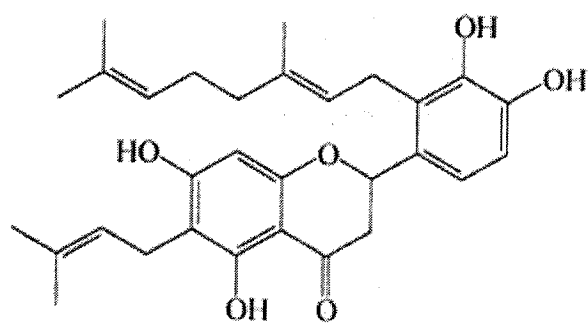
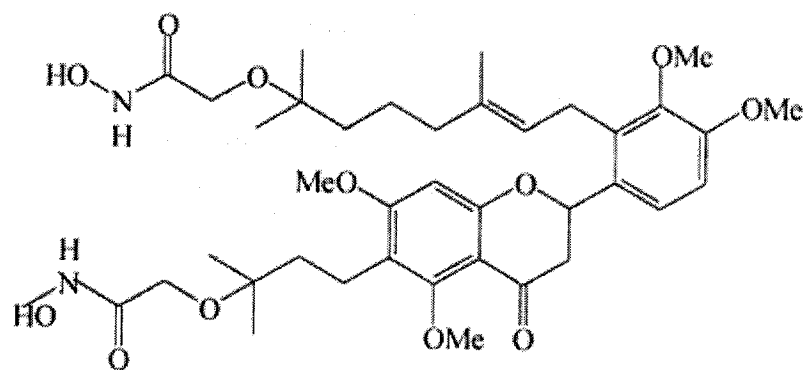
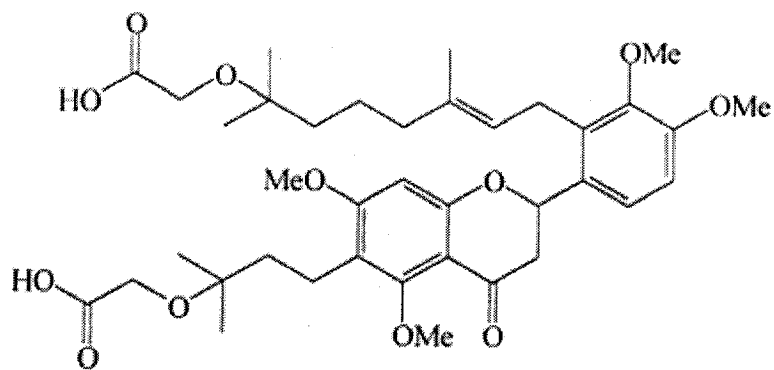
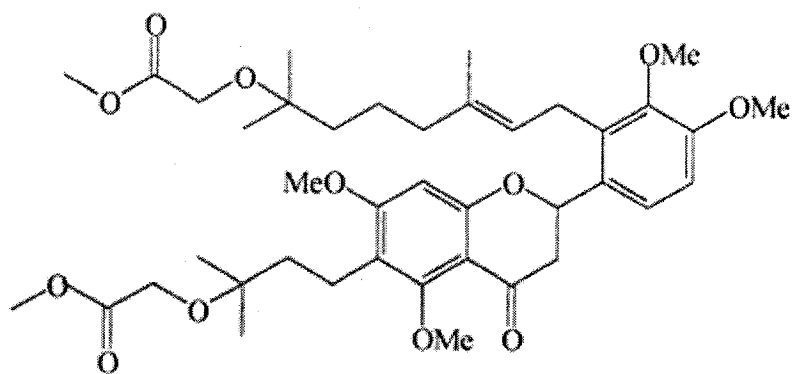


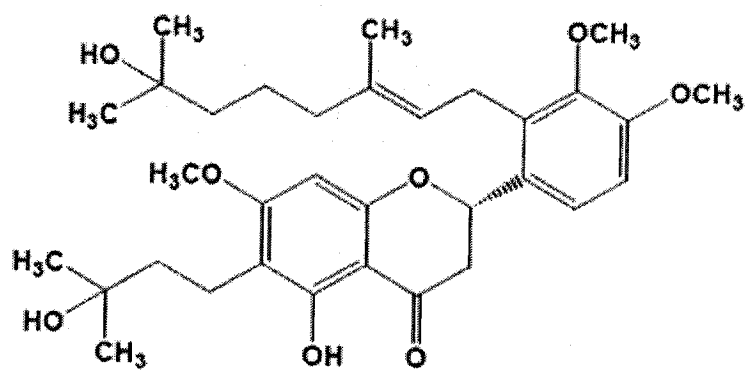
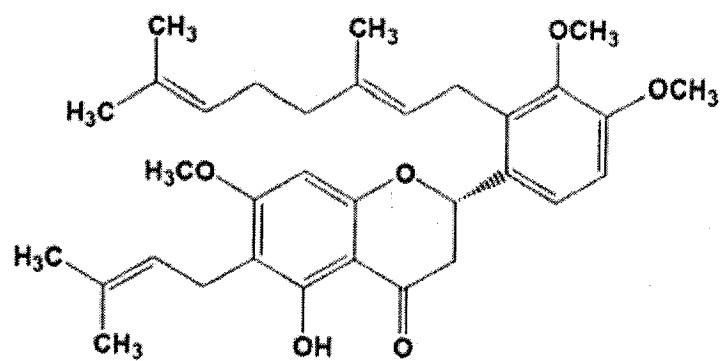
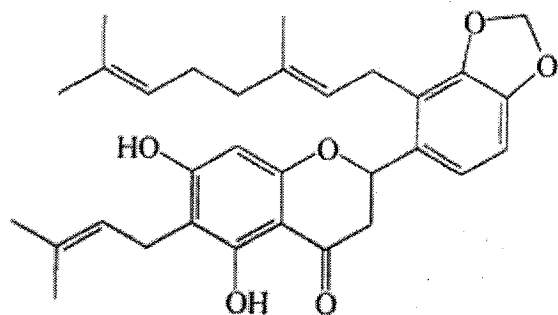
NBM-HD-1

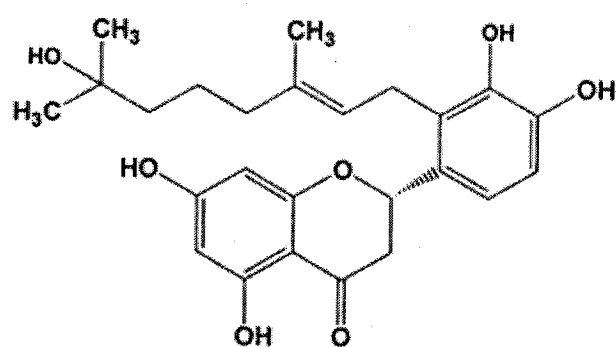
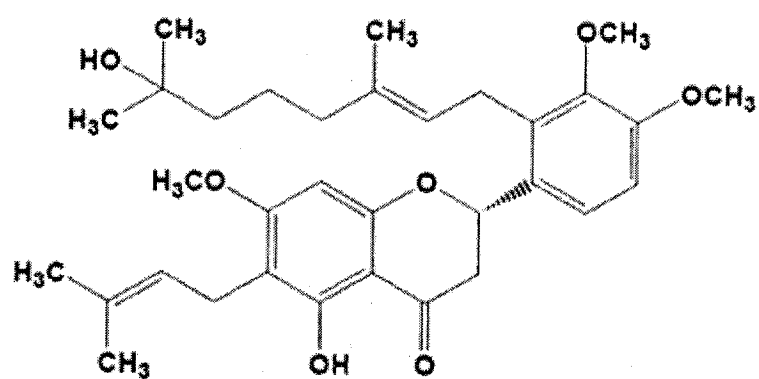
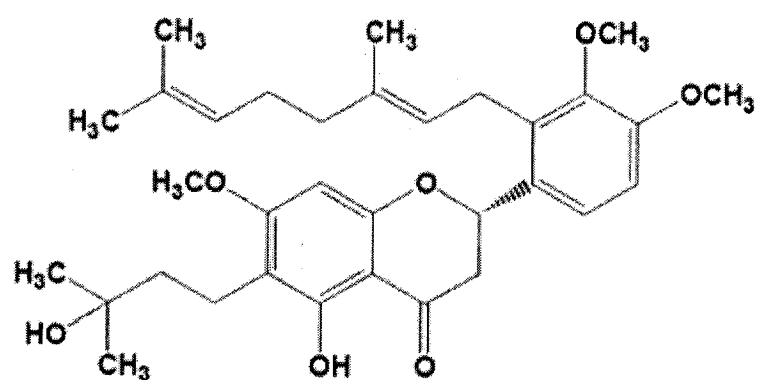




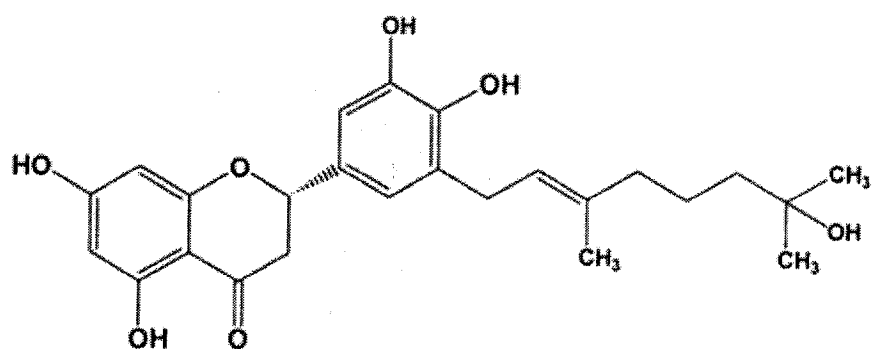




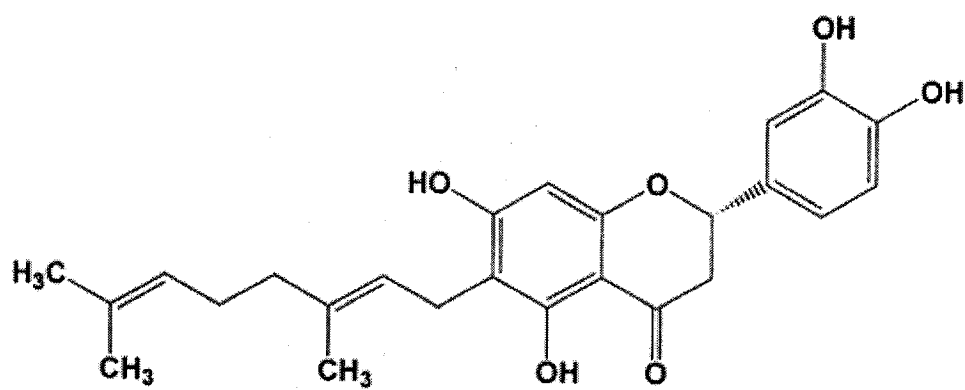




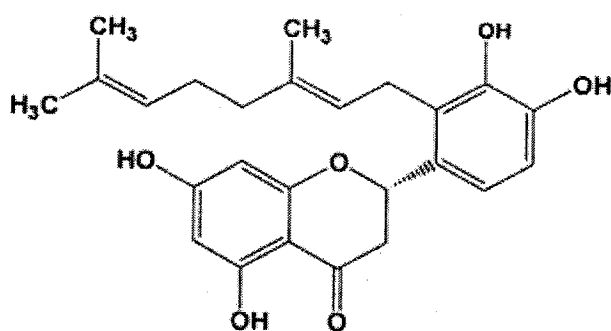
蜂胶素 A



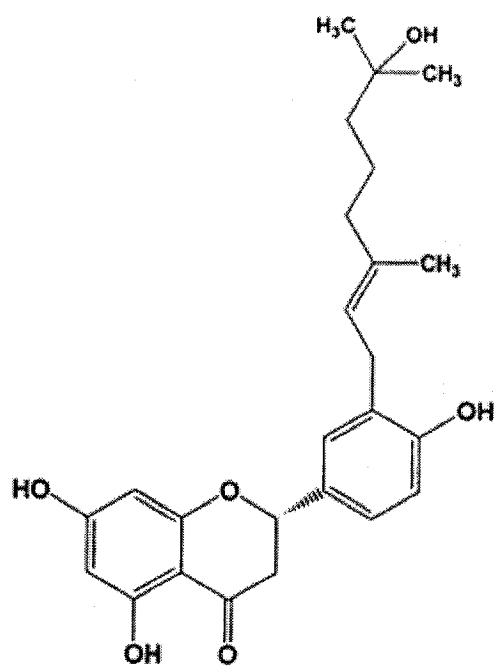
蜂胶素 B



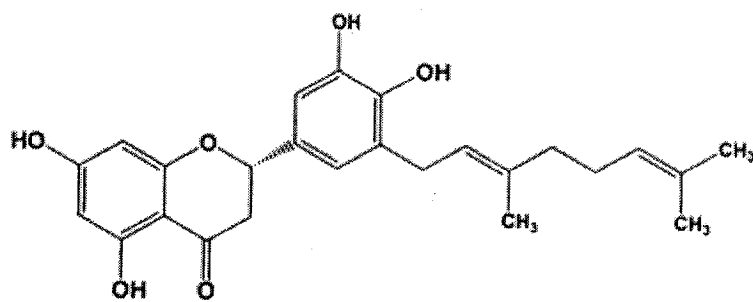
蜂胶素 C



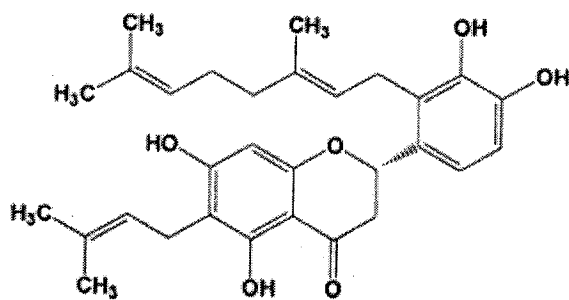
蜂胶素 D



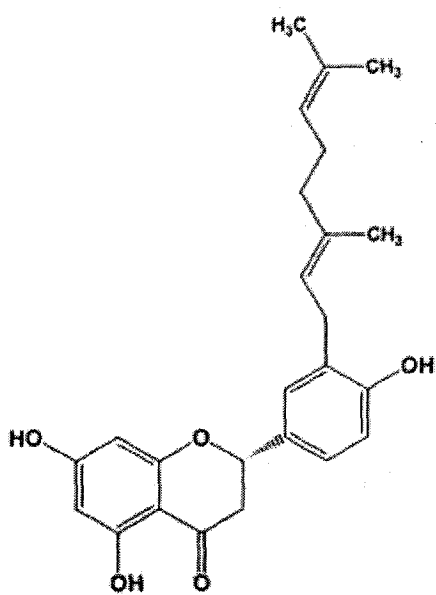
蜂胶素 E



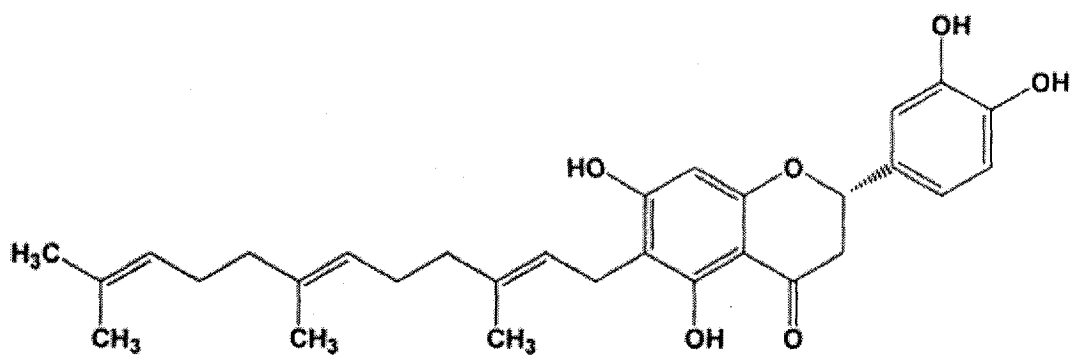
蜂胶素 F



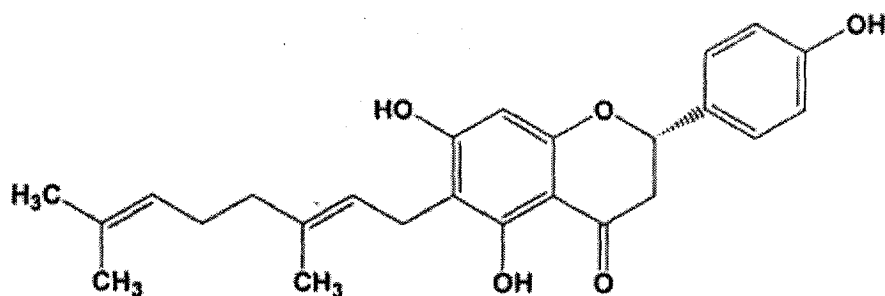
蜂胶素 G



蜂胶素 H



蜂胶素 I



蜂胶素 J

11. 如权利要求 1 所述的方法,其中蜜蜂幼虫可由工蜂喂饲由其分泌的蜂王浆或由人类喂饲收集自工蜂的蜂王浆。

12. 一种培育相比于对照组蜂蛹重量至少大 50% 的蜂蛹、或相比于对照组蜂王重量至少大 50% 的蜂王的方法;所述方法包括以如权利要求 1 的一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲幼虫,而获得由所述幼虫发育而成的蛹或蜂王,其中对照组的蛹或蜂王由食用未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂所分泌的蜂王浆的蜜蜂幼虫发育而成。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中蜜蜂幼虫可由工蜂喂饲由其分泌的蜂王浆或由人类喂饲收集自工蜂的蜂王浆。

14. 一种方法,其包括如权利要求 1 的一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,以生产相比于对照组蜂王浆,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质比例经改变的蜂王浆。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中 MRJP3 蛋白质的 68kDa 对 64kDa 的比例,相对于对照组,增加约 1.5 至 12 倍、1.5 至 5 倍、2 至 6 倍、2 至 10 倍、4 至 12 倍或 2 至 4 倍。

16. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂选自如权利要求 8 所述的式 (I) 化合物或其医药上可接受的盐、立体异构体、对映异构体、前药和溶剂合物的群组。

17. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂选自如权利要求 8 所述的式 (II) 化合物或其医药上可接受的盐、立体异构体、对映异构体、前药和溶剂合物的群组。

18. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂是台湾绿蜂胶、蜂胶素 A、蜂胶素 B、蜂胶素 C、蜂胶素 D、蜂胶素 E、蜂胶素 F、蜂胶素 G、蜂胶素 H、蜂胶素 I、蜂胶素 J、SAHA 或 NBM-HD-1。

19. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂选自如权利要求 11 所述的化合物的群组。

20. 一种如权利要求 14 所述的方法所制得的蜂王浆,包括相对于对照组蜂王浆,其中 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例改变。

21. 如权利要求 20 所述的蜂王浆,其中蜂王浆中 MRJP3 蛋白质的 68kDa 对 64kDa 的比例,相对于对照组,增加约 1.5 至 12 倍、1.5 至 5 倍、2 至 6 倍、2 至 10 倍、4 至 12 倍或 2 至 4 倍。

22. 一种改变蜂王浆中 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例的方法,其包括以如权利要求 1 的一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,以生产相比于对照组蜂王浆,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质比例经改变的蜂王浆。

23. 一种调控工蜂 mrjp3 基因的表观遗传的方法,其包括如权利要求 1 的一种 HDAC 抑

制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲工蜂,以调控工蜂的 mrjp3 基因表达。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中表观遗传为 HDAC 活性的抑制。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂于改变蜂王浆中 MRJP3 蛋白质的 新颖用途

技术领域

[0001] 本发明涉及促进蜂王子（蜂王幼虫）、蜂王蛹和蜂王生长的方法，所述方法是通过以组蛋白去乙酰化酶抑制剂（HDACi）或含有（一或多种）HDAC 抑制剂的混合物或配方喂饲年轻工蜂。具体来说，经喂饲 HDACi 的年轻工蜂所分泌的蜂王浆中，68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质间的比例发生改变。

背景技术

[0002] 蜜蜂是现代农业中最具价值的生物物种之一，其生产多种蜂产品，例如蜂王浆、蜂蜜、蜂胶与花粉，而这些产品提供给人类丰富的营养来源（赫尔纳（Hellner M.）等人，2008）。因此，研究蜜蜂的生长、演化与发育是相当重要的课题。

[0003] 蜜蜂的社会属于母系社会，且由蜂王所领导。在蜂群当中，工蜂与蜂王均由受精卵孵化而成；而雄蜂则是由无受精的卵子孵化生长而成（温斯顿（Winston M.L.），1987）。蜂王将单一的卵产于蜂巢的个别巢房当中，在三到四天内，产下的卵可孵化出幼虫。孵化出的幼虫由年轻工蜂负责喂食，并在巢房中经由数个发育阶段成长。当幼虫进入化蛹期间时，工蜂会封闭巢房的开口。通常蜂王会在 16 天内自巢房羽化而出，而工蜂和雄蜂各需 21 天和 24 天。蜂王个体较大，其寿命是一般工蜂的 10-15 倍。受精卵将发育为工蜂或蜂王，此受到蜂群的调控。原则上，一群蜂只会有一只蜂王。此外，蜂王所食用的食物也有别于同一蜂群中的其它蜂只；蜂王终其一生以蜂王浆为食物，而工蜂只在发育初期食用蜂王浆。部分学者则认为工蜂在发育期仍食用蜂王浆，只是其所食用的蜂王浆与蜂王所食用的蜂王浆化学组成可能不同。无论如何，蜂王浆可视为是延续蜂群最重要的物质（罗宾逊（Robinson G.E.）等人，1987）。

[0004] 蜂王浆是蜂王子与蜂王最重要的食物和养分来源，其由年轻工蜂的咽头腺与大顎腺所分泌。蜂王浆的化学组成可能会随着蜂王子的不同发育阶段而有所改变。总的来说，一般认为前述蜂王浆的成份改变是源自糖类、而非蛋白质组成的变化（派仁（Peiren N.）等人，2005）。

[0005] 已知蜂王浆包含多种可促进人体健康的物质，并具有多样药理特性（高木-土井（Takaki-Doi S.）等人，2009；曼奴（Mannoor M.K.）等人，2009；和咖思科（Gasic S.）等人，2007）。因此，蜂王浆已广泛用于促进人类健康的保健产品。最近的研究发现，蜂王浆可以促进免疫调控（维科威克（Vucelja D.）等人，2007）、抗菌（布卡（Boukara L.），2008）、滋养脑神经（桥本（Hashimoto M.）等人，2005）、抗癌和抗氧化（古蒂（Gou H.）等人，2008）。研究发现蜂王浆为乳白色浆状物质，其组成为：约 60-70% 的水分、12-15% 的蛋白质、10-12% 的糖类、3-5% 的脂肪、和多种微量元素与矿物质（斯卡塞利（Scarselli R.）等人，2005）。在蛋白质成份当中，约有 80-90% 属于水溶性蛋白质，而其余为非水溶性蛋白质。换句话说，蜂王浆中所含的蛋白质成份多为水溶性蛋白质。

[0006] 在上述水溶性蛋白质中，以 MRJP（主要蜂王浆蛋白质，Major Royal Jelly

Proteins) 家族 (MRJP 1-9) 为主 (斯密佐娃 (Schmitzova J.) 等人, 1998)。所述 MRJP 蛋白质的氨基酸序列虽已经分析, 然而, 其所负责的作用和功能尚待研究。

[0007] MRJP1 在蜜蜂脑部被发现, 其可能与蜜蜂行为有关。MRJP1 占蜂王浆中水溶性蛋白质的 44%, 而且是所有 MRJP 家族蛋白质中含量最高者 (玛勒科瓦 (Malecova B.) 等人, 2003)。目前针对 MRJP3 的研究居多, 一般认为其与免疫调控有关 (科诺 (Kohno K.) 等人, 2004)。MRJP3 占蜂王浆中整体水溶性蛋白质的 12%, 而且其含量在所有 MRJP 蛋白质 (MRJPs 1-9) 中居第二位。MRJP3 的特点在于其抗过敏和抗炎活性。此外, MRJP 的高多态性基因可导致 MRJP3 蛋白质变异体 (例如 60-70kDa 蛋白质) 的生成 (斯特芬-艾尔伯特 (Stefan Albert) 等人, 1999)。

[0008] MRJP 蛋白质提供丰富的必需氨基酸和其它营养成分 (古泽 (Furusawa T.) 等人, 2008)。蜂王浆是蜂王子唯一的营养来源, 而 MRJP 蛋白质则是蜂王浆中最重要的蛋白质。因此, 需要研发具有特殊组成的蜂王浆。

发明内容

[0009] 本发明提供一种方法, 经所述方法培育的蜜蜂幼虫相比于正常幼虫, 重量至少大 50%、大一倍 (100%)、甚至大数倍; 经所述方法培育的蜂蛹相比于正常蜂蛹, 重量至少大 50%、甚至大一至数倍; 经所述方法培育的蜂王相比于正常蜂王, 重量至少大 50%、甚至大一至数倍。

[0010] 本发明提供一种培育相比于对照组幼虫重量至少大 50%、甚至大一倍 (100%) 的蜜蜂幼虫的方法; 所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂, 并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲幼虫。其中对照组的幼虫所食用的蜂王浆是由未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂分泌。

[0011] 本发明提供一种培育相比于对照组蜂蛹重量至少大 50% 的蜂蛹、或相比于对照组蜂王重量至少大 50% 的蜂王的方法; 所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂, 并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲幼虫, 而获得由所述幼虫发育而成的蛹或蜂王, 其中对照组的蛹或蜂王由食用未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂混合物的年轻工蜂所分泌的蜂王浆的蜜蜂幼虫发育而成。

[0012] 本发明另外提供一种蜂王浆, 其所含 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例相比于对照组蜂王浆有所改变。

[0013] 本发明另外提供一种调控工蜂 mrjp3 基因的表观遗传 (epigenetics) 的方法, 其包括以 HDAC 抑制剂喂饲工蜂以调控工蜂的 mrjp3 基因表达。

附图说明

[0014] 图 1 显示喂饲台湾绿蜂胶萃取物的年轻工蜂分泌特殊蜂王浆, 所述蜂王浆诱发幼虫的快速生长。U-1 和 U-2: 对照组; A-1 和 A-2: 经 1.25g/kg 的台湾绿蜂胶萃取物处理者; B-1 和 B-2: 经 2.50g/kg 的台湾绿蜂胶萃取物处理者; C-1 和 C-2: 经 5.0g/kg 的台湾绿蜂胶萃取物处理者。

[0015] 图 2 显示喂饲蜂胶素 C 的年轻工蜂分泌特殊蜂王浆, 所述蜂王浆诱发幼虫的快速生长。U-2: 对照组; C1-2: 经 50mg/kg 的蜂胶素 C 处理者; C2-2: 经 100mg/kg 的蜂胶素 C 处

理者。

[0016] 图 3 显示喂饲蜂胶素 G 的年轻工蜂分泌的蜂王浆中所鉴别出的水溶性蛋白质的组成。所述样品在不同时间点收集。U-1 :对照组 ;T-1 :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理的阳性对照组 ;G1-1 :经 150mg/kg 蜂胶素 G 处理者 ;G2-1 :经 300mg/kg 蜂胶素 G 处理者 ;G3-1 :经 600mg/kg 蜂胶素 G 处理者。

[0017] 图 4 显示喂饲 NBM-HD-1 的年轻工蜂分泌的蜂王浆中所鉴别出的水溶性蛋白质的组成。所述样品在不同时间点收集。U-1 :对照组 ;T-1 :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理的阳性对照组 ;H1-1 :经 50mg/kg NBM-HD-1 处理者 ;H2-1 :经 100mg/kg NBM-HD-1 处理者 ;H3-1 :经 200mg/kg NBM-HD-1 处理者。

[0018] 图 5 显示二维凝胶电泳分析的结果,其目的在于分析在 72 小时自经 NBM-HD-1 处理的组别的幼虫萃取出的水溶性蛋白质。L-1 :MRJP1 ;L-2 :MRJP3 ;L-3 :MRJP2 ;L-4 :MRJP2 ;L-5 :MRJP3 ;L-6 :MRJP3 ;L-7 :MRJP3 ;L-8 :MRJP2。U1-1 :对照组 ;H3-1 :经 200mg/kg NBM-HD-1 处理者。

[0019] 图 6 显示喂饲 SAHA 的年轻工蜂分泌的蜂王浆中所鉴别出的水溶性蛋白质的组成。所述样品在 72 小时的时间点收集。U-1 :对照组 ;T-1 :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理的阳性对照组 ;G-1 :经 150mg/kg 蜂胶素 G 处理的阳性对照组 ;S1-1 :经 5mg/kg SAHA 处理者 ;S2-1 :经 15mg/kg SAHA 处理者。

[0020] 图 7 显示台湾绿蜂胶萃取物诱发年轻工蜂分泌特殊蜂王浆,所述特殊蜂王浆可抑制人类胶质瘤 Hs683 细胞的增殖。U1 :对照组 ;A1 :经 1.25g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者 ;B1 :经 2.50g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者 ;C1 :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者。

[0021] 图 8 显示台湾绿蜂胶萃取物诱发年轻工蜂分泌特殊蜂王浆,所述特殊蜂王浆可诱发老鼠神经干细胞的分化。U1 :对照组 ;A1 :经 1.25g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者 ;B1 :经 2.50g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者 ;C1 :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者 ;EGF :阳性对照。

[0022] 图 9(a) 至 (c) 显示台湾绿蜂胶萃取物诱发年轻工蜂分泌特殊蜂王浆,所述特殊蜂王浆可促进蜂王幼虫的生长和发育。U :对照组 ;T :经 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理者。

[0023] 图 10 显示喂饲 DNA 甲基转移酶抑制剂 EGCG 的工蜂分泌的蜂王浆可使幼虫快速生长。U-1 :对照组 ;E1-1 :经 50mg/ 天的 EGCG 处理者 ;E2-1 :经 100mg/ 天的 EGCG 处理者 ;E3-1 :经 150mg/ 天的 EGCG 处理者。

具体实施方式

[0024] 本发明发现喂饲一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的工蜂所抚育的蜜蜂幼虫可快速成长并发育为大个体的幼虫、蛹或蜂王。所述蜜蜂幼虫可具有大于正常幼虫至少 50%、一倍(100%)甚至数倍的重量 ;所述蛹可具有大于正常蛹至少 50%甚至一至数倍的重量 ;而所述蜂王可具有大于正常蜂王至少 50%甚至一至数倍的重量。

[0025] 本发明发现一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物可通过表观遗传方式改变蜂王浆中 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例。喂饲一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂可通过表观遗传分泌特殊的蜂王浆,其中所述蜂王浆中的 68kDa 与 64kDa 蛋白质的比例经改变。蜂王浆是蜂王子和蜂王的主要食物。本发明发现特殊蜂王浆

可促进食用所述蜂王浆的蜂王子的生长,并使蜂王子和发育自所述蜂王子的蛹和蜂王的重量显著增加。

[0026] 在一方面,本发明提供一种培育相比于对照组幼虫,重量至少大 50% 的蜜蜂幼虫的方法;所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲蜜蜂幼虫;其中对照组的幼虫所食用的蜂王浆是由未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂分泌。本发明也提供一种培育相比于对照组幼虫重量至少大一倍(100%)的蜜蜂幼虫的方法;所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲蜜蜂幼虫;其中对照组的幼虫所食用的蜂王浆是由未喂饲 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物的年轻工蜂分泌。根据本发明的一个实施例,蜜蜂幼虫可由工蜂以其所分泌的蜂王浆喂饲,或由人类以收集自工蜂的蜂王浆喂饲。优选地,重量增加约 50% 至 5 倍、50% 至 2 倍、50% 至 3 倍、1 至 5 倍、2 至 5 倍或 1 至 3 倍。更优选地,重量增加约 3 至 5 倍。根据本发明的一个实施例,喂饲以前述蜂王浆的幼虫在 72 小时重量增加 1.5 倍以上。根据本发明,上述蜂王浆所包含的 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例,相比于对照组蜂王浆已经改变。

[0027] 根据本发明,自本发明蜜蜂幼虫发育而成的蛹和蜂王,相比于对照组的蛹和蜂王,分别具有较高的重量。因此,本发明提供一种培育相比于对照组蜂蛹重量至少大 50% 的蜂蛹、或相比于对照组蜂王重量至少大 50% 的蜂王的方法;所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并以所述年轻工蜂所分泌的蜂王浆喂饲幼虫,而获得由所述幼虫发育而成的蛹或蜂王;其中对照组的蛹或蜂王由食用未喂饲以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂混合物的年轻工蜂所分泌的蜂王浆的蜜蜂幼虫发育而成。根据本发明的一个实施例,蜜蜂幼虫可由工蜂以其所分泌的蜂王浆喂饲,或由人类以收集自工蜂的蜂王浆喂饲。

[0028] 在一方面,本发明提供一种改变蜂王浆中 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例的方法,其包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,以生产相比于对照组蜂王浆,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质比例经改变的蜂王浆。

[0029] 在另一方面,本发明提供一种生产蜂王浆的方法,其中相比于对照组蜂王浆,所述蜂王浆所含 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例经改变,所述方法包括以一种 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲年轻工蜂,并收集由所述年轻工蜂所生产的蜂王浆。

[0030] 在另一方面,本发明提供一种蜂王浆,其所含 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比例相比于对照组蜂王浆经改变。

[0031] 根据本发明,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比率可增加约 1.5 至 12 倍、1.5 至 5 倍、2-6 倍、2-10 倍、4-12 倍或 2-4 倍(相比于对照组)。更优选地,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比率可增加约 1.5 至约 5 倍或 2 至 10 倍(相比于对照组)。更优选地,68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的比率可增加约 2 至 4 倍或约 4 至 10 倍(相比于对照组)。

[0032] 在另一方面,本发明提供一种调控工蜂 mrjp3 基因的表观遗传的方法,其包括以 HDAC 抑制剂或数种 HDAC 抑制剂的混合物喂饲工蜂,以调控工蜂的 mrjp3 基因表达。根据本发明,前述表观遗传可以是对 DNA 甲基化或 HDAC 的抑制。DNA 甲基化是一种表观遗传改变,其不改变 DNA 序列、可经遗传、并可改变基因表达。DNA 甲基化是可诱发可遗传的基

因沉默 (gene silencing) 的共价修饰,其可以两种方式之一诱发沉默现象。其一,甲基化作用可直接干扰转录因子与 DNA 上辨识位置间的结合;其二,甲基-CpG 结合区域蛋白质 (methyl-CpG binding domain proteins, MBPs) 可通过聚集协阻抑物 (co-repressor) 复合物 (其内含组蛋白去乙酰化酶或组蛋白甲基转移酶) 来强化前述沉默现象 (朱莉基弗 (Juile C. Kiefer), 2007)。HDAC 抑制剂既可改变年轻工蜂的 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白质的表达,推测 HDAC 抑制剂可调控组蛋白的过度乙酰化 (hyperacetylation),又可影响年轻工蜂的多态性 mrjp3 基因剪接 (gene splicing) 和转译作用。

[0033] 本发明同时发现,相似于 HDAC 抑制剂的作用结果, DNA 甲基转移酶抑制剂 (例如没食子酸表儿茶素酯, EGCG) 同样可调控工蜂 mrjp3 基因的表现遗传,而使该工蜂所分泌的蜂王浆经喂饲蜂王子后,达到促进蜂王子生长的效果。

[0034] 本文中,术语“烷基”代表直链或具支链烃链;烷基优选为 C_{1-10} 烷基。优选地,烷基的碳数选自 1 至 8 组成的群组;更优选地,其是 C_{1-6} 烷基或 C_{1-4} 烷基。烷基的实例包括甲基 ($-CH_3$)、乙基 ($-CH_2CH_3$)、丙基 ($-CH_2CH_2CH_3$)、异丙基 ($(CH_3)_2CH$) 和丁基 ($-C_4H_9$)。

[0035] 本文中,术语“烯基”代表直链或具支链不饱和烃基,其中不饱和是双键。根据本发明,烯基包括一或多个双键。烯基优选为 C_{2-16} 烯基。更优选地,烯基的碳数选自 2 至 12 组成的群组。烯基的实例包括乙烯基 ($-CH=CH_2$)、丙烯基 ($-CH=CHCH_3$ 或 $-CH_2CH=CH_2$)、丁烯基 ($-CH_2CH=CHCH_3$ 或 $-CH=CHCH_2CH_3$ 或 $-CH_2CH_2CH=CH_2$)、 $-CH_2CH=C(CH_3)CH_3$ 、 $-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_3$ 和 $-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_3$ 。

[0036] 本文中,术语“环烷基”代表脂肪族环 (饱和碳环)。优选地,环烷基的碳数选自 3 至 8 组成的群组;更优选地,环烷基的碳数选自 5 至 6 组成的群组。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0037] 本文中,术语“不饱和碳环”包括由碳原子和氢原子组成的环取代基,而且环状部分是不饱和环,例如芳基或环烯基等。术语“环烯基”包括属于具有一或多个双键的环烷基的烯基,例如环丙烯基 (例如 1-环丙烯基)、环丁烯基 (例如 1-环丁烯基)、环戊烯基 (例如 1-环戊烯基、2-环戊烯基和 3-环戊烯基)、环己烯基 (例如 1-环己烯基、2-环己烯基和 3-环己烯基)、环庚烯基 (例如 1-环庚烯基)、环辛基 (例如 1-环辛基) 等。尤其优选为 1-环己烯基、2-环己烯基和 3-环己烯基。术语“芳基”包括单一或稠合环 (其中至少一个环是芳香族),例如苯基、萘基和四氢萘基。

[0038] 本文中,术语“5 元或 6 元杂环”是具有 5 个或 6 个原子的环状环,其中环中的至少一个原子是杂原子。5 元或 6 元杂环可以是芳香族或非芳香族,其饱和或不饱和。优选地,杂原子选自 N、O 和 S。杂环的实例包括 (但不限于) 呋喃基 (如 2-呋喃基、3-呋喃基)、噻吩基 (如 2-噻吩基、3-噻吩基)、吡咯基 (如 1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基)、咪唑基 (如 1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基)、吡唑基 (如 1-吡唑基、3-吡唑基、4-吡唑基)、三唑基 (如 1,2,4-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,4-三唑基)、四唑基 (如 1-四唑基、2-四唑基、5-四唑基)、噁唑基 (如 2-噁唑基、2-噁唑基、5-噁唑基)、异噁唑基 (如 3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基)、噻唑基 (如 2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基)、噻二唑基、异噻唑基 (如 3-异噻唑基、4-异噻唑基、5-异噻唑基)、吡啶基 (如 2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基)、哒嗪基 (如 3-哒嗪基、4-哒嗪基)、嘧啶基 (如 2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基)、呋咕基 (如 3-呋咕基)、吡嗪基 (如 2-吡嗪基)、噁二唑基 (如 1,3,4-噁

二唑-2-基)、1-吡咯啉基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吡咯烷、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、1-咪唑啉基、2-咪唑啉基、4-咪唑啉基、1-咪唑烷基、2-咪唑烷基、4-咪唑烷基、1-吡唑啉基、3-吡唑啉基、4-吡唑啉基、1-吡唑烷基、3-吡唑烷基、4-吡唑烷基、N-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-哌啶基、哌嗪基、2-哌嗪基、3-哌嗪基、吗啉基、四氢吡喃基或其类似物。

[0039] 本文中,术语“卤素”代表氟、氯、溴和碘。

[0040] 本文中,术语“医药上可接受的盐”包括与有机或无机酸或碱所形成的盐。医药上可接受的酸加成盐包括与矿物酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸)或有机酸(例如柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、三氟乙酸、琥珀酸、草酸、甲酸、反丁烯二酸、苹果酸、草酰乙酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对-甲苯磺酸、苯磺酸和羟乙基磺酸)形成的盐。医药上可接受的碱盐包括铵盐、碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)和有机碱盐(包括伯胺、仲胺和叔胺盐)。

[0041] 本文中,术语“前药”代表化合物在身体内转变(例如在血液中水解)成其具有医疗效果的活性形式。

[0042] 本文中,术语“溶剂合物”代表包括本发明化合物与溶剂的复合物,其中他们反应或他们自其沉淀或结晶。

[0043] 本文中,术语“立体异构体”是异构体分子,其分子连接相同但分子的空间排列不同。

[0044] 本文中,术语“对映异构体”代表彼此仅具有对映结构关系但无法令其互相重叠一致的立体异构体,如一个人的左手与右手是相同但相反的。

[0045] 本文中,术语“工蜂”是缺乏蜂群蜂王的完全繁殖能力的雌蜂;在大多数情况下,其与蜂王的非繁殖活动增加有关。蜂卵个别产卵于蜡质蜂巢的巢室中,其由工蜂制造并成型。蜂王子起初喂食工蜂生产的蜂王浆,接着喂食蜂蜜和花粉。例外是蜂王子缓慢喂食蜂王浆,其将发育成蜂王。在巢室内结茧前,蜂王子进行数次蜕变并变成蛹。雄蜂自未受精的卵孵化出,雌蜂(蜂王和工蜂)自受精卵孵化出。蜂王可选择使卵受精,此通常取决于产卵处的蜂巢。年轻工蜂清洁蜂巢并喂食蜂王子。当蜂王浆生产腺萎缩,他们开始建造蜂巢室。当他们较年长时,他们进行蜂群内的其它任务,例如采花蜜和花粉并捍卫蜂巢。接着,工蜂认巢飞行,最后离开蜂巢并担任外勤蜂。

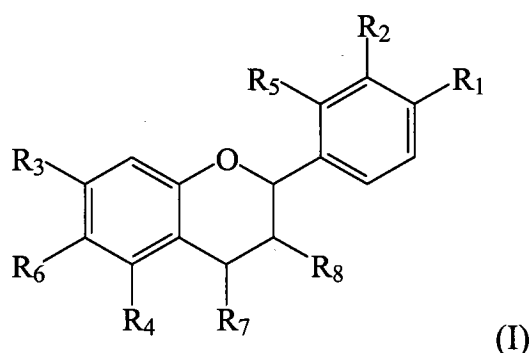
[0046] 本文中,术语“蜂王浆”是蜜蜂分泌物,其用于滋养蜂王子。其分泌自位于年轻工蜂头部的下咽头腺(hypopharyngeal gland)并用于喂食蜂群中的蜂王子。

[0047] 根据本发明,HDAC是一种酶,其通过选择性去乙酰化位于接近核心组蛋白氨端的赖氨酸 ϵ -氨基而影响转录。HDAC抑制剂正成为治疗实体和血液恶性疾病的新一类抗癌剂。本发明出乎意料地发现HDAC抑制剂可影响年轻工蜂生产的蜂王浆的MRJP3的68kDa和64kDa的表达。根据本发明,HDAC抑制剂包括(但不限于)四类HDAC抑制剂:短链脂肪酸、羟肟酸、苄酰胺和环状肽,如医药研究评论(Medicinal Research Reviews),第26卷,第4期,第397-413页,2006所报导;如美国国家癌症研究所期刊(Journal of the National Cancer Institute),第92卷,第15期,2000年8月2日,第1210-1216页所提及以羟肟酸为主的杂合极性化合物(HPC);美国专利第6,174,905号、EP 0847992、JP 258863/96和日本申请案第10138957号所述的苄酰胺衍生物;W001/38322中的化合物;苄酰胺M344(人类遗传学(Hum Genet),2006,120,第101-110页);丁酸钠(sodium butyrate)(人类分子

遗传学 (Human Molecular Genetics), 2004, 第 13 卷, 第 11 期, 第 1183-1192 页); 曲古抑菌素 A (Trichostatin A) (分子癌症 (Molecular Cancer) 2006, 5 : 8 ; 此文献可自 <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/8> 得到); 美国专利第 7, 169, 801 号揭示的具有式 Z-Q-L-M 或 Z-L-M 的化合物; 美国专利第 6, 888, 027 号所述的包括 PXD101 的磺酰胺化合物; 欧洲专利第 1301184 号所述的丙戊酸 (valproic acid) 和其衍生物; N,N' - 六亚甲基二乙酰胺 (hexamethylene bisacetamide, HMBA); 美国专利第 6, 087, 367 号和 RE 38506 所述的与 HMBA 有关的化合物; 美国专利第 7, 399, 787 号所揭示的与 HMBA 有关的化合物, 例如辛二酰苯胺异羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid) (SAHA); 血液 (Blood), 2003 年 10 月 1 日, 第 102 卷, 第 7 期, 第 2615-2622 页所报导的 NVP-LAQ824 (羟肟酸衍生物) 和 NVP-LAQ824 (4- 氨基甲基肉桂异羟肟酸的衍生物); 通过诱发细胞凋亡诱导生长抑制和肿瘤细胞株退化并作为抗癌剂进行第一期临床试验测试的 LBH589 (血液 (Blood), 105 (4) : 1768-76, 2005 年 2 月 15 日); 美国专利申请案第 11/855416 号和第 12/418373 号提及的化合物; 蜂胶; 蜂胶素和美国公开案第 20080242648 号提及的化合物, 包括 N- 羟基-N' -3- 吡啶基辛二酰胺 (pyroxamide)、M- 羧基肉桂酸双羟酰胺 (CBHA)、曲古抑菌素 A (TSA)、曲古抑菌素 C、水杨酰异羟肟酸 (SBHA)、壬二酰双异羟肟酸 (azelaic bishydroxamic acid) (ABHA)、壬二酰 -1- 异羟肟酸盐 -9- 苯胺 (AAHA)、6-(3- 氯苯基脲基) 己酸异羟肟酸 (3C1-UCHA)、奥克氟汀 (oxamflatin)、A-161906、斯瑞泰德 (scriptaid)、PXD-101、含有异羟肟酸的环状肽 (CHAP)、ITF-2357、MW2796、MW2996、托普辛 A (trapoxin A)、FR901228 (FK 228 或缩酚酸肽 (Depsipeptide))、FR225497、阿匹西汀 (apicidin)、CHAP、HC- 毒素、WF27082、查米多星 (chlamydocin)、丁酸钠、异戊酸盐、戊酸盐、4- 苯基丁酸盐 (4-PBA)、4- 苯基丁酸钠盐 (PBS)、丁酸精氨酸、丙酸盐、丁酰胺、异丁酰胺、苯乙酸盐、3- 溴丙酸盐、三丁酸甘油酯 (tributyrin)、丙戊酸、丙戊酸盐、CI-994、MS-27-275 的 3' - 氮衍生物、MGCD0103 和德普地辛 (Depudecin)。其中所引用的公开文献并入本文中作为参考。

[0048] 根据本发明的一个具体实施例, 用于本发明的 HDAC 抑制剂是下式 (I) 所代表的化合物:

[0049]



[0050] 其中

[0051] R_1 和 R_2 各自独立为 OH、OC(=O) 烷基、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基、N- 炔基、O- C_{3-8} 环烷基、S- C_{3-8} 环烷基、N- C_{3-8} 环烷基、O- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、S- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、N- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、烷基、烯基、炔基、 C_{3-8} 环烷基、不饱和 5 元至 10 元单环或双环或包含至少一个选自下列群组的杂原子: N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环; 或 R_1 与 R_2 一起形成二氧戊

环；

[0052] R_3 和 R_4 各自独立为 OH、 $OC(=O)$ 烷基、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基、N- 炔基、O- C_{3-8} 环烷基、S- C_{3-8} 环烷基、N- C_{3-8} 环烷基、O- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、S- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、N- 不饱和 5 元至 10 元单环或双环、烷基、烯基、炔基、 C_{3-8} 环烷基、不饱和 5 元至 10 元单环或双环或包含至少一个选自下列群组的杂原子：N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环；

[0053] R_5 是 C_{4-16} 烷基或 C_{4-16} 烯基，其中烷基或烯基未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、卤素、CN、NO、 N_3 、 NH_2 、CHO、 OR_9 、 SR_9 、 NR_9 或 $COOR_9$ 取代；

[0054] R_6 是 C_{2-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基，其中烷基或烯基未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、卤素、CN、NO、 N_3 、 NH_2 、CHO、 OR_9 、 SR_9 或 NR_9 取代；或

[0055] R_5 或 R_6 之一为氢、卤素或 OH，另一者为 C_{4-16} 烷基或 C_{4-16} 亚烷基，其未经取代或经一或多个 C_{1-6} 烷基、OH、 NH_2 、卤素、CN、NO 或 N_3 取代；

[0056] R_7 或 R_8 各自独立为氢、卤素、OH、 NH_2 、 $COOH$ 、CHO、CN、NO、未经取代或经 OH、 NH_2 、 $COOH$ 、卤素、CN、NO 或 CHO 取代的 C_{1-6} 烷基、 $=O$ 、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基、O- 烯基、S- 烯基、N- 烯基、O- 炔基、S- 炔基或 N- 炔基；或

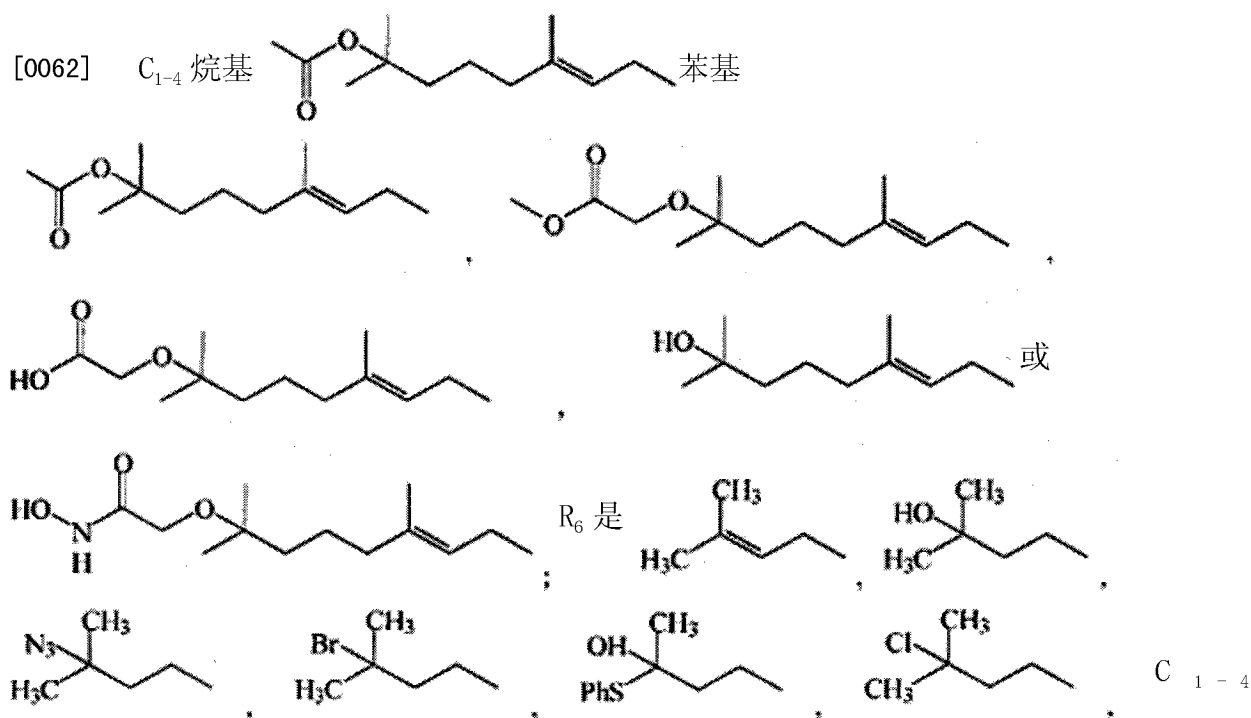
[0057] R_7 和 R_8 一起形成双键、 C_{3-6} 环烷基或包含至少一个选自下列群组的杂原子：N、O 和 S 的饱和或不饱和 5 元至 10 元杂环；

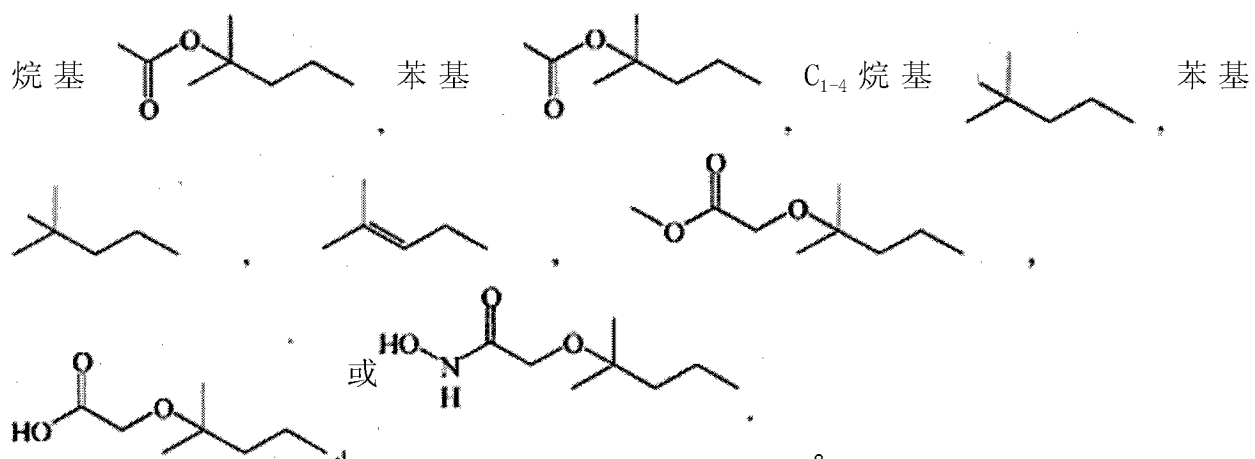
[0058] R_9 是苯基、 $C(=O)R^{10}$ 、 $C(=O)OR^{10}$ 或苄基；且

[0059] R^{10} 是 OH、 $NHOH$ 、 NH_2 、 C_{1-6} 烷基、苯基或苄基；

[0060] 和其医药上可接受的盐、立体异构体、对映异构体、前药或溶剂合物。

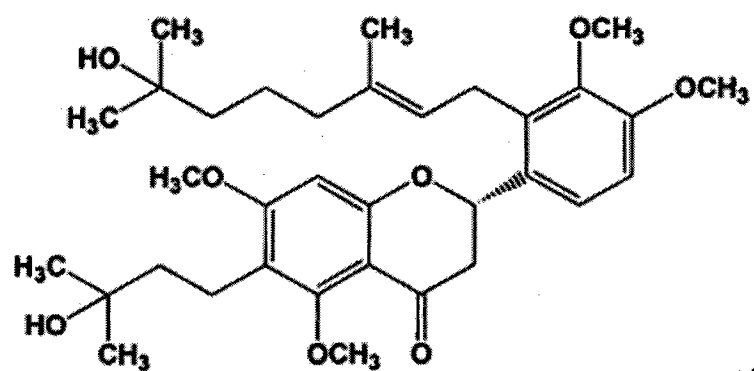
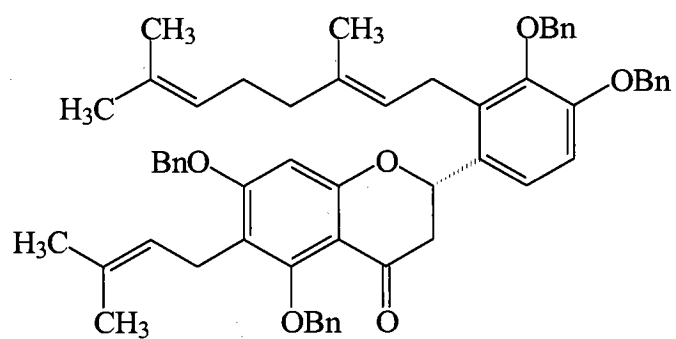
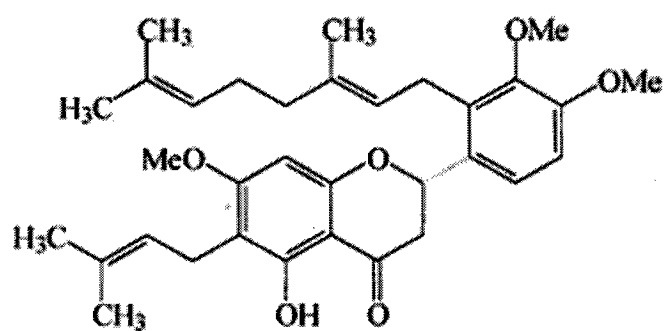
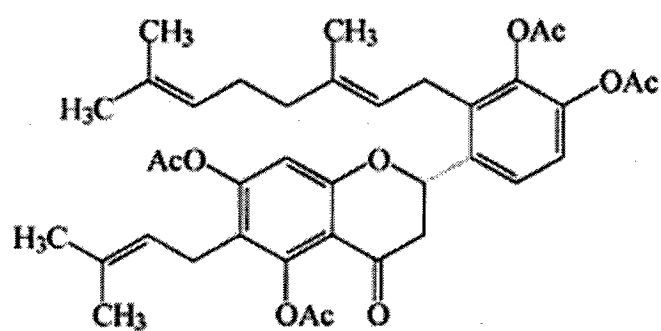
[0061] 优选地，式 (I) 化合物是如下化合物：其中， R_1 和 R_2 各自独立为 OH、 OC_{1-6} 烷基、 $OC(=O)C_{1-6}$ 烷基、O- 苯基或 O- 苄基或 R_1 与 R_2 一起形成二氧戊环； R_3 和 R_4 各自独立为 OH、 OC_{1-6} 烷基、 $OC(=O)C_{1-6}$ 烷基、O- 苯基或 O- 苄基； R_5 是



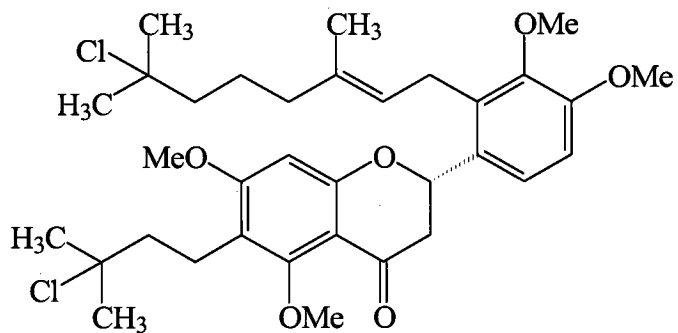
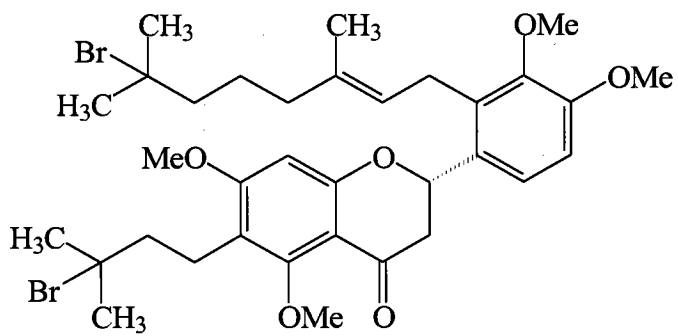
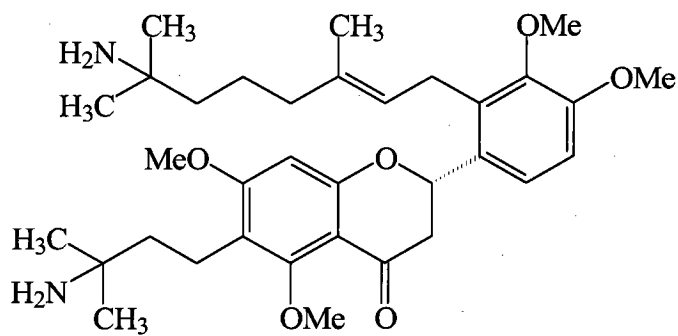
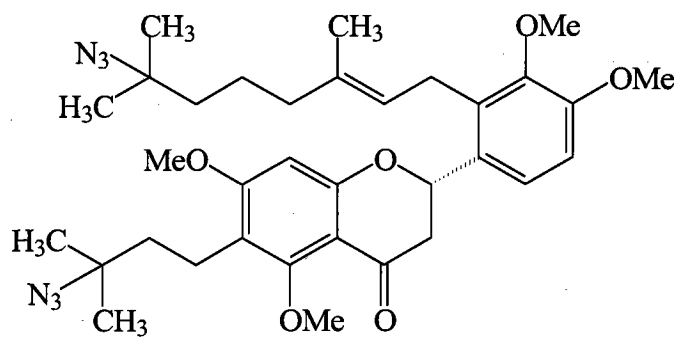


[0063] 优选地, 式 (I) 化合物选自下列群组:

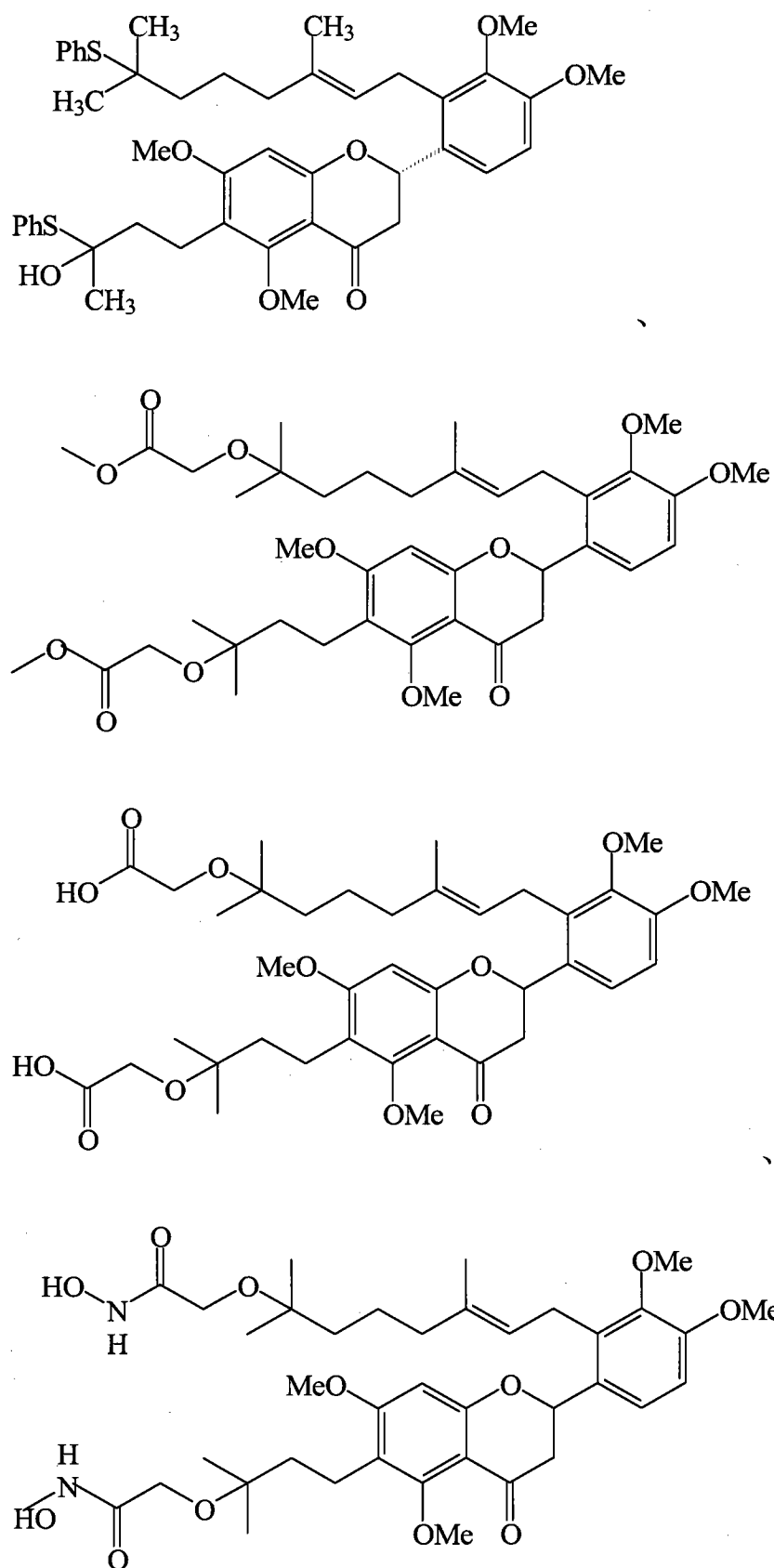
[0064]

**NBM-HD-1**

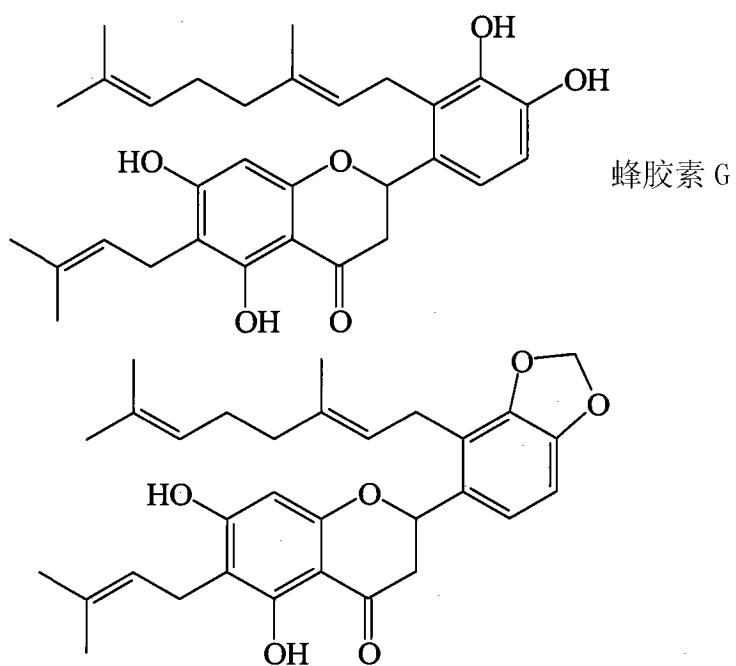
[0065]



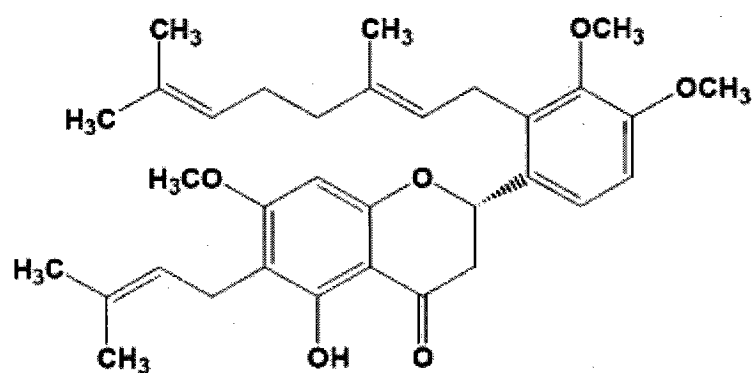
[0066]



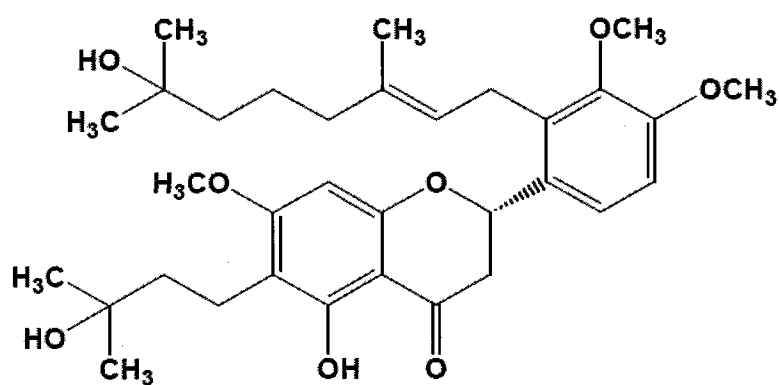
[0067]

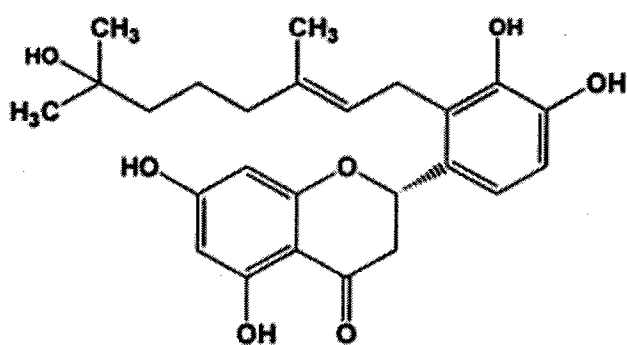
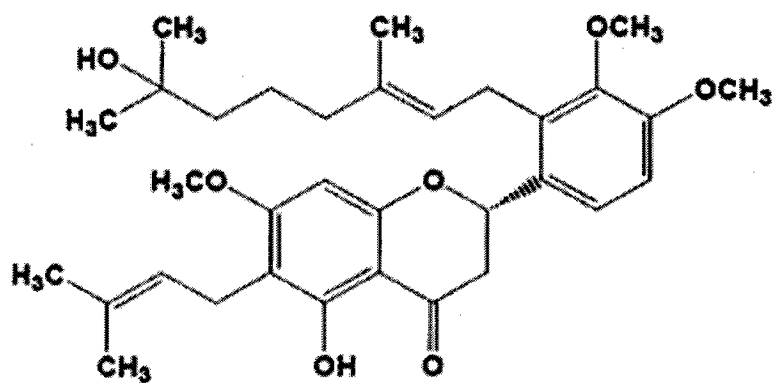


[0068]



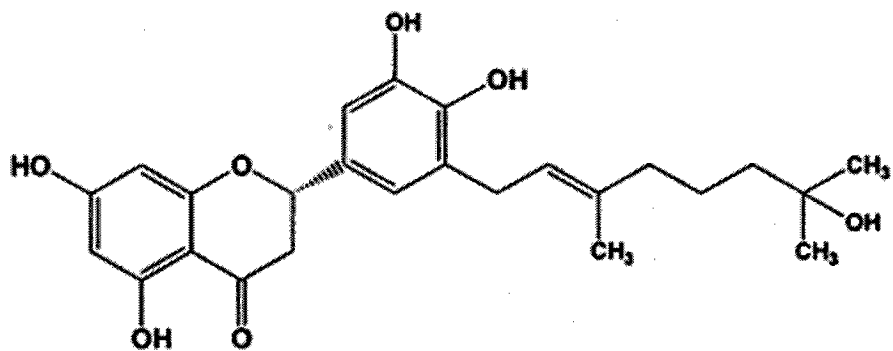
[0069]





[0070] 蜂胶素 A

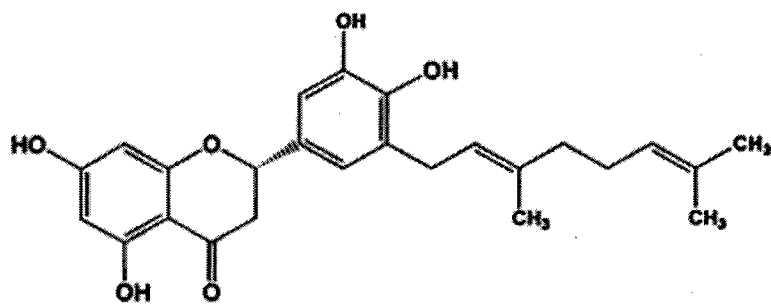
[0071]



[0072] 蜂胶素 B

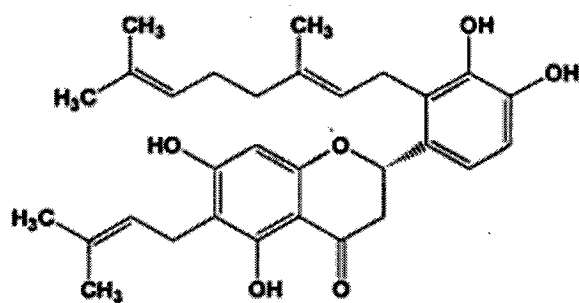
[0073]





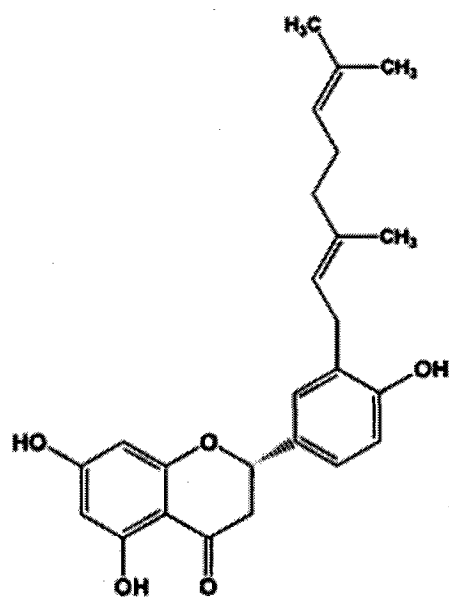
[0080] 蜂胶素 F

[0081]



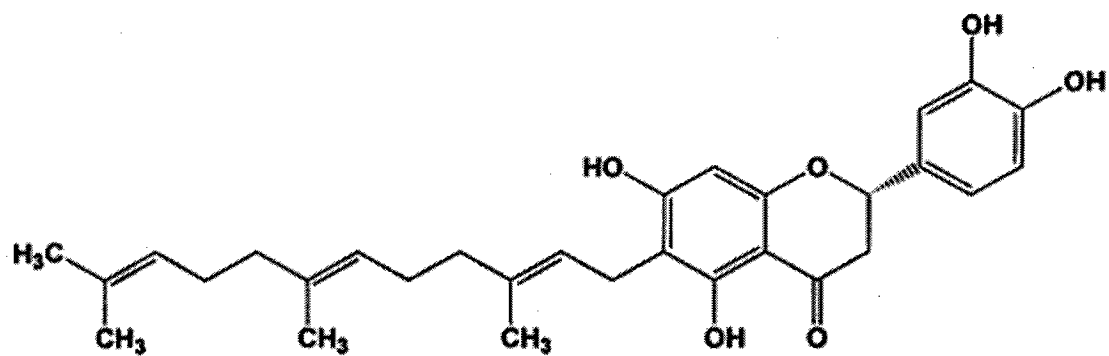
[0082] 蜂胶素 G

[0083]



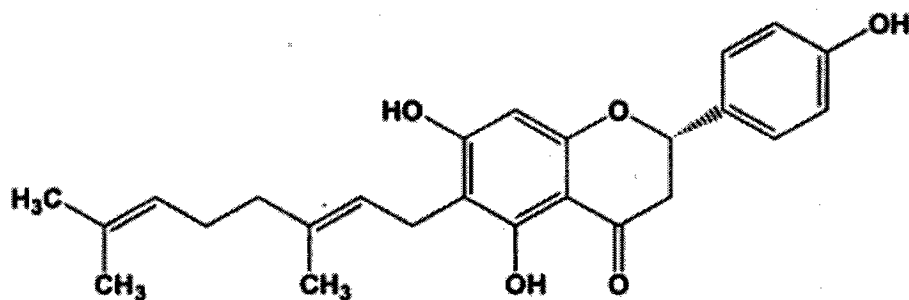
[0084] 蜂胶素 H

[0085]



[0086] 蜂胶素 I

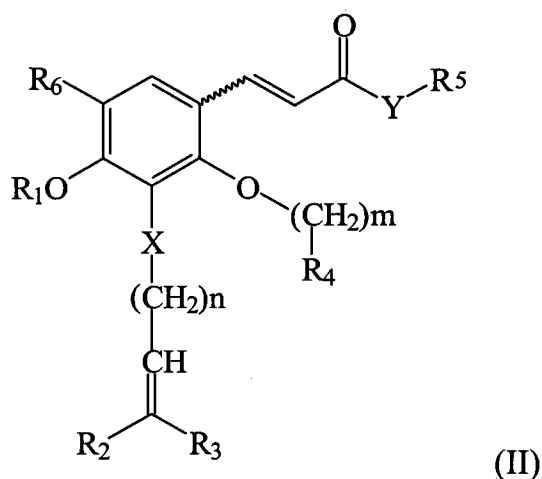
[0087]



[0088] 蜂胶素 J

[0089] 根据本发明的另一具体实施例,本发明所使用的 HDAC 抑制剂是下式 II 所代表的化合物:

[0090]



[0091] 其中

[0092] R_1 是氢、烷基、烯基、 C_{5-6} 环烷基、5 元或 6 元不饱和碳环或 5 元或 6 元杂环;

[0093] X 是 C、O、N 或 S;

[0094] Y 是 O、NH 或 $O-C_{1-4}$ 烷基;

[0095] n 是 0 至 10 的整数;

[0096] m 是 0 至 5 的整数;

[0097] R_2 和 R_3 各自为 C_{1-6} 烷基;

[0098] R_4 是 C_{5-6} 环烷基或 5 元或 6 元不饱和碳环或杂环,其可经卤素、 CF_3 、 OR_7 或 NR_7R_8 取代,其中 R_7 和 R_8 各自为氢或 C_{1-6} 烷基;

[0099] R_5 是 OH、 NH_2 或 C_{5-6} 环烷基、5 元或 6 元不饱和碳环或杂环,其中所述环烷基、碳环和杂环可任选地经卤素、 NH_2 、 NO_2 、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 OR_7 、 NR_7R_8 或 CF_3 取代;且

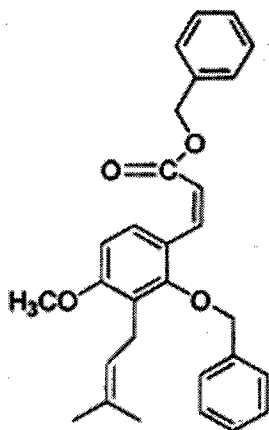
[0100] R_6 是 H、 C_{1-10} 烷基,其可经羟基或 C_{2-10} 烯基取代,或与 R_1 一起为 $-C_2H_2-$;

[0101] 和其医药上可接受的盐、立体异构体、对映异构体、前药和溶剂合物。

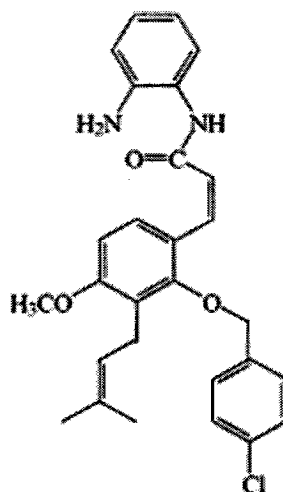
[0102] 优选地,式 (II) 化合物是 R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 C_{1-4} 烷基; R_4 是苯基或经卤素、 CF_3 或 OC_{1-4} 烷基取代的苯基; R_5 是 OH、苯基或经 NH_2 取代的苯基且 R_6 是氢的化合物。

[0103] 更优选地, 式 (II) 化合物选自下列群组:

[0104]

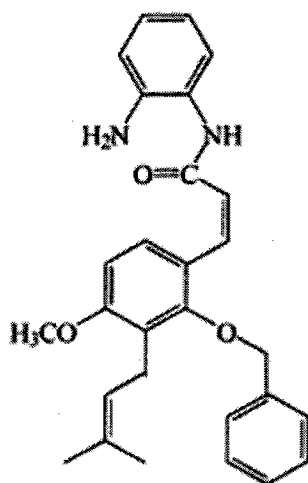


NBM-HB-OS01

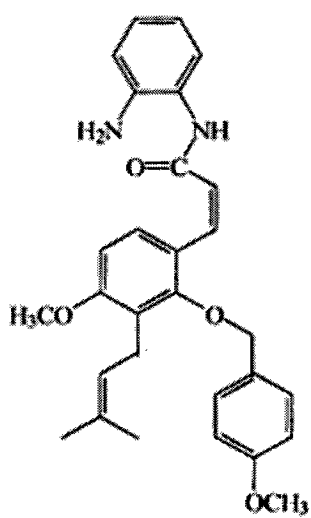


NBM-C-BCA-OS01

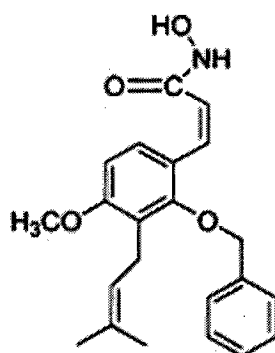
[0105]



NBM-C-BA-OS01

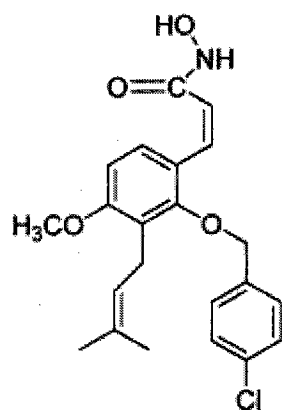


NBM-C-BMA-OS01

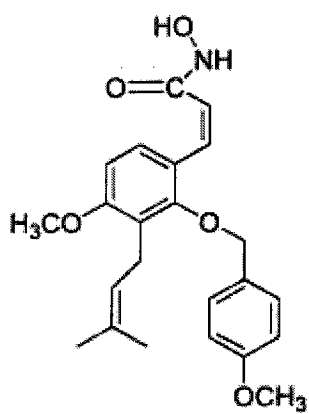


NBM-C-BX-OS01

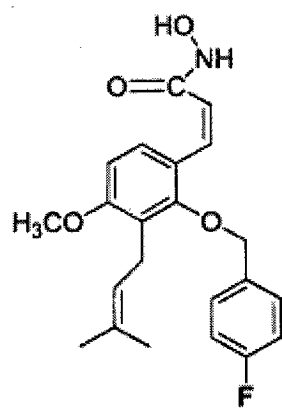
[0106]



NBM-C-BCX-OS01

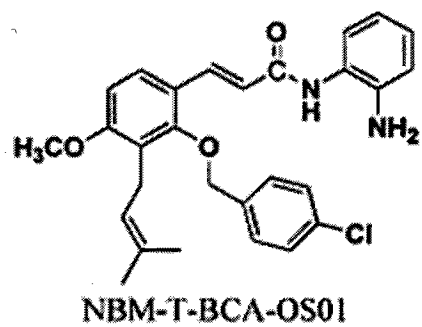
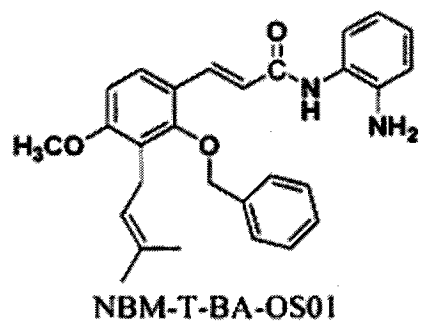
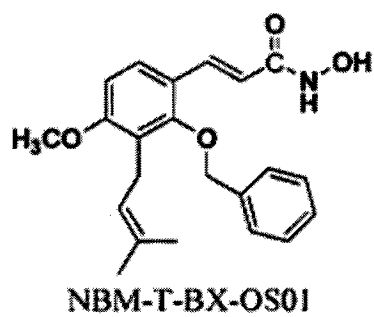
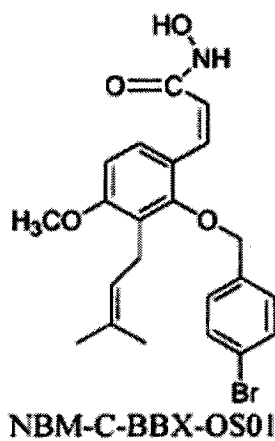


NBM-C-BMX-OS01

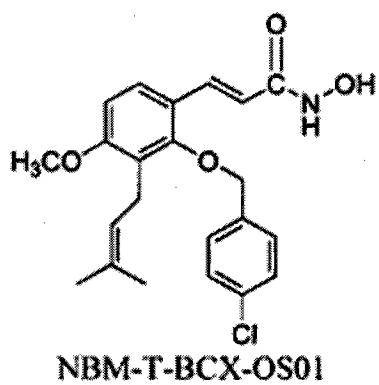
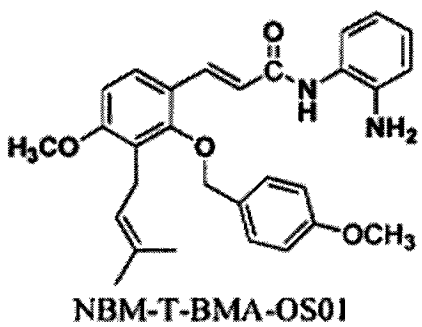
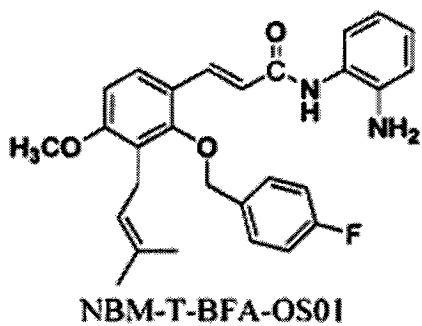
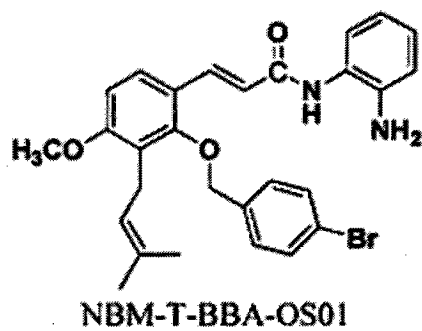


NBM-C-BFX-OS01

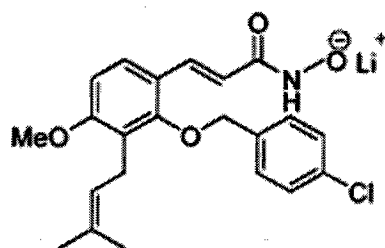
[0107]



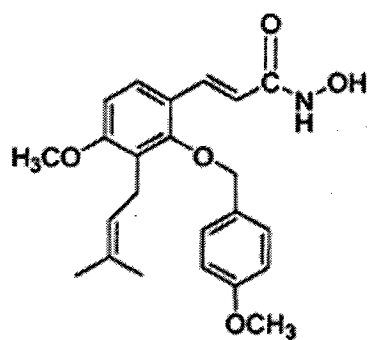
[0108]



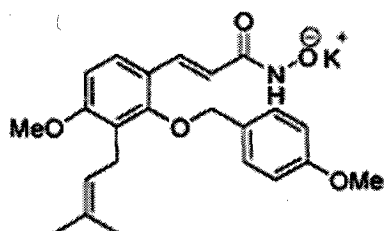
[0109]



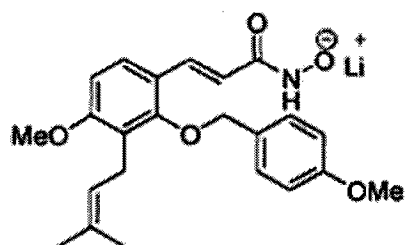
NBM-T-L-BCX-OS01



NBM-T-BMX-OS01

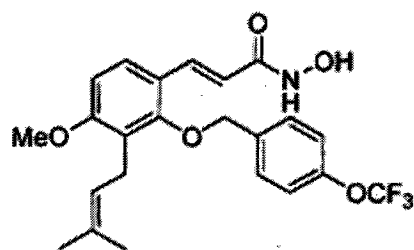


NBM-T-K-BMX-OS01

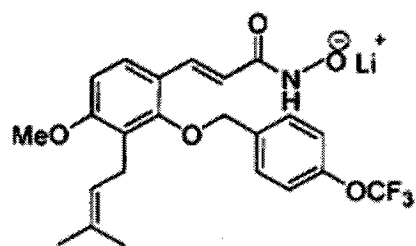


NBM-T-L-BMX-OS01

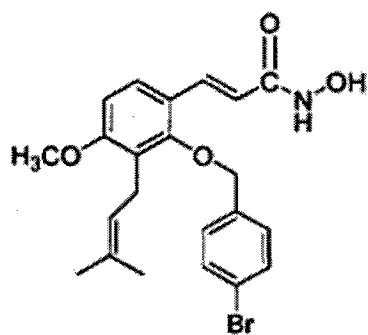
[0110]



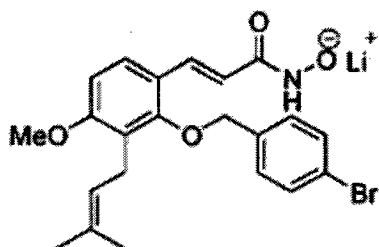
NBM-T-BTX-OS01



NBM-T-L-BTX-OS01

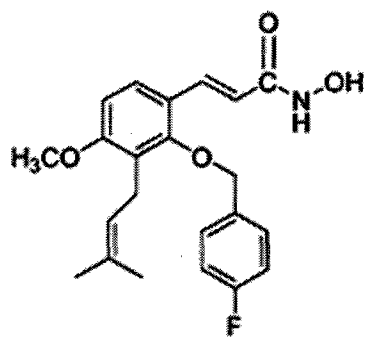


NBM-T-BBX-OS01

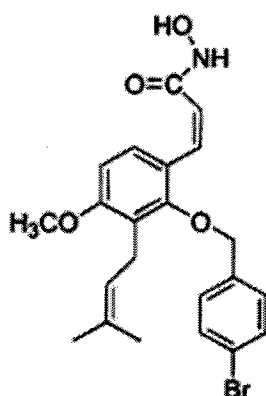


NBM-T-L-BBX-OS01

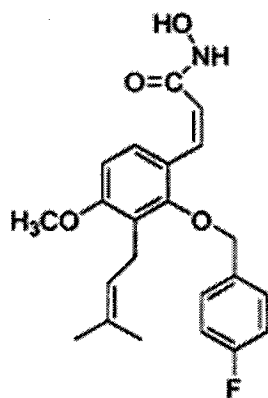
[0111]



NBM-T-BFX-OS01

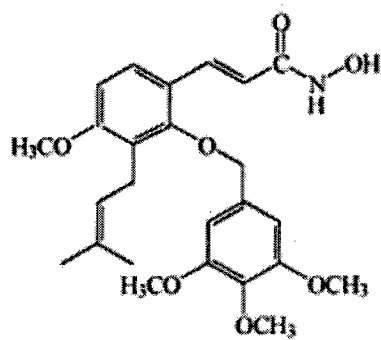


NBM-C-BBX-OS01

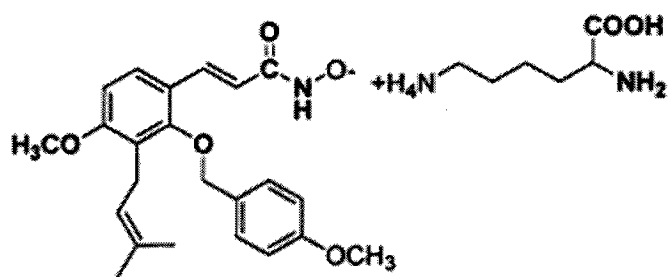


NBM-C-BFX-OS01

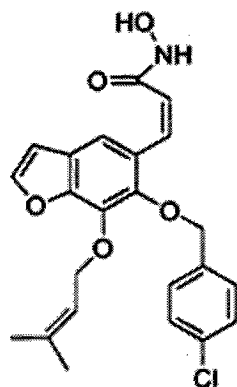
[0112]



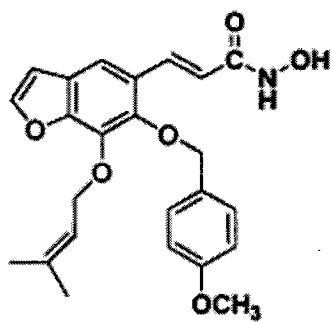
NBM-T-TMX-OS01



NBM-T-BMX-L-OS01

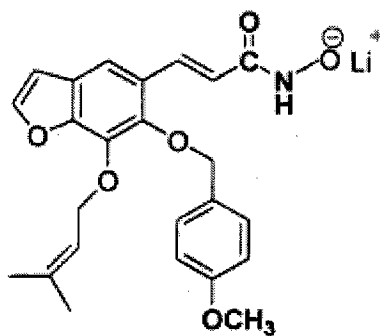


NBM-I-BCX-OS01

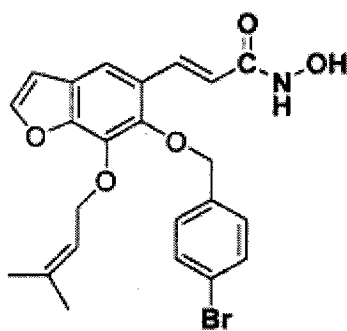


[0113]

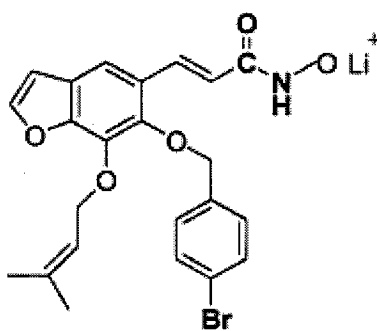
NBM-T-I-BMX-OS01



NBM-T-L-I-BMX-OS01

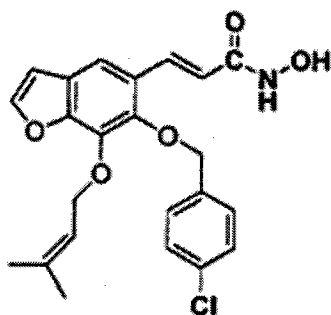
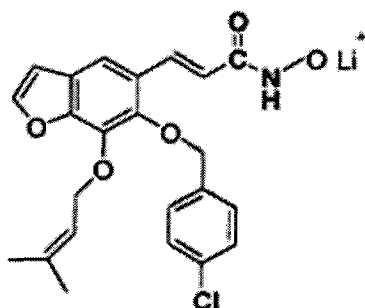
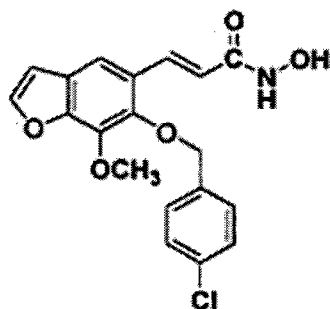


NBM-T-I-BBX-OS01



NBM-T-L-I-BBX-OS01

[0114]

**NBM-T-I-BCX-OS01****NBM-T-L-I-BCX-OS01****NBM-T-I-MCX-OS01**

[0115] 根据本发明的另一具体实施例,用于本发明的 HDAC 抑制剂是 SAHA、蜂胶或蜂胶素 (例如蜂胶素 A 至 J)。优选地,HDAC 抑制剂是台湾绿蜂胶、蜂胶素 A、蜂胶素 B、蜂胶素 C、蜂胶素 D、蜂胶素 E、蜂胶素 F、蜂胶素 G、蜂胶素 H、蜂胶素 I、蜂胶素 J、SAHA 或 NBM-HD-1。

[0116] 本发明出乎意料地发现 HDAC 抑制剂可改变喂食 HDAC 抑制剂的工蜂所分泌的蜂王浆的 MRJP3 的 68kDa 蛋白质对 64kDa 蛋白质的比例。本发明建议所述改变是由表观遗传修饰 (epigenetic modification) 诱导,其可由珍南格雷厄姆 (Janet S. Graham) 等人 (珍南格雷厄姆等人,2009)、沃顿 (T. J. Walton) 等人 (沃顿等人,2008)、朱莉基弗 (Julie C. Kiefer) (朱莉基弗,2007) 和阿曼德梅瑞马迪 (Ahmad Miremedi) 等人 (阿曼德梅瑞马迪等人,2007) 支持。喂食上述蜂王浆的蜂王子相比于一般蜂王子,具有较重的重量和较大的大小,使得他们的发育期较短。自所述蜂王子发育的蛹和蜂王也具有较重的重量和较大的大小。这些蜂王具有较高的卵产量,使得蜂群的数目和蜂蜜的产量增加。

[0117] 实例

[0118] 实例 1:台湾绿蜂胶萃取物和蜂胶素 C 和 G(propolins C and G) 的制备

[0119] 台湾绿蜂胶萃取物

[0120] 使用 95% 乙醇 (250mLx3) 萃取 50g 台湾绿蜂胶 (TP), 用超声波振荡处理 3 小时后, 在 25℃ 下静置 21 小时。经过滤后在减压下干燥处理乙醇萃取物, 以生成黄褐色胶状物 (34.5g)。将前述胶状物保存于 -20℃ 下直至需使用时。

[0121] 蜂胶素 C(Propolin C)

[0122] 使用葡聚糖凝胶 (Sephadex) LH-20 柱 (安玛西亚生物技术 AB(Amersham Pharmacia Biotech AB), 乌普萨拉 (Uppsala), 瑞典 (Sweden)) 对 5g TP 萃取物进行色谱处理, 使用甲醇作为溶剂进行洗脱 (elution), 得到六份流份 (fraction)。在硅胶柱中对所有洗脱物 (包括得自后续色谱法的流份) 进行色谱处理, 并使用正己烷和 EtOAc 的梯度溶剂系统进行洗脱。通过反相 (reversed-phase) 制备型高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) /UV 对活性最高的流份 4 进行纯化 (正己烷: EtOAc = 70 : 30), 随后收集保留时间 (retention time) 为 45 分钟的蜂胶素 C 流份。所采用的试验条件如下: 柱: 卢纳菲罗门 (Luna Phenomenex) (C18, 250mmx10mm); 溶剂系统: 甲醇: 水 (7 : 3); 流速: 2.5mL/ 分钟; 和检测: UV 280nm。所得化合物经确认为蜂胶素 C, 利用 HPLC/UV 基于峰区域进行估计, 所得蜂胶素 C 的纯度不低于 95%。

[0123] 蜂胶素 G(Propolin G)

[0124] 使用葡聚糖凝胶 (Sephadex) LH-20 柱 (安玛西亚生物技术 AB(Amersham Pharmacia Biotech AB), 乌普萨拉 (Uppsala), 瑞典 (Sweden)) 对 5g TP 萃取物进行色谱处理, 使用甲醇作为溶剂进行洗脱, 得到六份流份。在硅胶柱中对所有洗脱物 (包括得自后续色谱法的流份) 进行色谱处理, 并使用正己烷和 EtOAc 的梯度溶剂系统进行洗脱。通过反相制备型高效液相色谱 /UV 对活性最高的流份 3 进行纯化 (正己烷: EtOAc = 70 : 30), 随后收集保留时间为 25 分钟的蜂胶素 G 流份。所采用的试验条件如下: 柱: 卢纳菲罗门 (Luna Phenomenex) (C18, 250mmx10mm); 溶剂系统: 甲醇: 水 (8.5 : 1.5); 流速: 3.5mL/ 分钟; 和检测: UV 280nm。所得化合物经确认为蜂胶素 G, 利用 HPLC/UV 基于峰区域进行估计, 所得蜂胶素 G 的纯度不低于 95%。

[0125] 实例 2: 收集并分析蜂王浆和蜂王子

[0126] 筛选 MRJP3 蛋白质表达量相近的蜂箱进行试验, 而每一对照组和实验组各包含两个待测蜂箱。在第一天, 先以摇动方式移除蜂箱内原本含有的蜜, 并在接下来的两天内各以糖水喂食蜜蜂 (*Apis mellifera*) 两次 (对照组: 普通糖水; 实验组: 特殊糖水)。前述特殊糖水是将配方糖粉用水稀释 10 倍而得到。在第三天, 将 1.5 日龄的蜂王子 (来自相同的蜂王的后代) 移入蜂箱, 并喂食 1 次 (对照组: 普通糖水; 实验组: 特殊糖水)。24 小时、48 小时和 72 小时后, 收集 20 只蜂王子和所述 20 只蜂王子巢内的蜂王浆, 以进行定量、定性和蛋白质组学分析。

[0127] 在定性分析方面, 以蜂王浆与灭菌水重量比 1 : 10 萃取蜂王浆, 取水层部分的蛋白质, 通过布拉福染色 - 结合方法 (Bradford dye-binding method) (伯乐蛋白质分析 (Bio-Rad protein assay), 伯乐实验室 (Bio-Rad laboratories) 公司) 测定蛋白质的含量。利用艾丽萨读数器 (Elisa Reader) (Bio-TEK) 在吸光值 595nm 进行蛋白质样本定量, 并取 10 μg 的蛋白量, 利用 12.5% SDS-PAGE 凝胶 (60 伏特、30 分钟和 120 伏特、2 小

时)分离不同分子量的蛋白质。接着进行考马斯蓝(Coomassie blue)染色(考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue R),西格玛(Sigma),B0630),15分钟后再利用去染缓冲剂(甲醇:乙酸:ddH₂O=20:7:73)进行退染,直至凝胶背景透明。

[0128] 用1x PBS清洗幼虫,将体表上残留的蜂王浆去除,再进行虫体研磨。研磨后,加入适量灭菌水,以进行蛋白质萃取。如前述方法取水层部分的蛋白质进行蛋白质定量,并取10 μg的蛋白量,利用12.5% SDS-PAGE凝胶(60伏特、30分钟和120伏特、2小时)分离不同分子量的蛋白质。以考马斯蓝染色15分钟后,利用去染缓冲剂(甲醇:乙酸:ddH₂O=20:7:73)进行退染,直至凝胶背景透明。

[0129] 在定量分析方面,在不同时间点(24小时、48小时或72小时)收集对照组和实验组各蜂箱中的蜂王浆和蜂王子。将蜂王浆或蜂王子称重,并将蜂王子拍照记录,以进行分析和比较。

[0130] 在蛋白质组学分析与蛋白质鉴定方面,使用旋转减压浓缩机(真空离心(Speed Vac))真空干燥蜂王浆或蜂王子的上清悬浮液,并使用再水合缓冲液(rehydration buffer)回溶。利用布拉福染色-结合方法测定蛋白质的含量,随后取10 μg的蜂王浆和100 μg的蜂王子进行二维电泳(two-dimensional electrophoresis,2-DE)分析;其中所使用步骤如下:先以pH 3至10的条带通过等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)分离样品,平衡后,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)(积层凝胶(stack gel):30%丙烯酰胺(伯乐(Bio-Rad))、Tris pH 6.8、10% APS、ddH₂O、1% SDS;TEMED;分离凝胶(separating gel):30%丙烯酰胺(伯乐(Bio-Rad))、Tris pH 8.8、10% APS、ddH₂O、1% SDS;TEMED)进行样品分离。对凝胶进行影像摄取,并利用二维图像大师白金6.0(Image Master 2DPlatinum 6.0)软件进行分析。选取待测色点,进行凝胶内胰蛋白酶水解(In-gel trypsin digestion),并由LC-ESI-Q-TOF MS/MS实施质谱分析,并利用马斯科特(Mascot)软件进行所得结果与资料库的比对、和蛋白质身份鉴定。

[0131] 实例3:台湾绿蜂胶萃取物对诱发蜂王子生长的效果

[0132] 台湾绿蜂胶乙醇萃取物中含有10种蜂胶素,分别命名为蜂胶素A-J,其中蜂胶素C、D、F和G为主要种类。用每千克糖含1.25、2.5或5.0克台湾绿蜂胶萃取物的糖水喂饲蜂群三次,并分别在移入1.5日龄蜂王子后的24小时、48小时和72小时,收集蜂王子与由工蜂所生产的蜂王浆进行分析。如表1和图1所示,1.25至5.0克/千克的台湾绿蜂胶萃取物显著促进蜂王子的生长。在24小时至48小时期间,对照组的蜂王子由4.73mg增加到12.26mg,即重量增加约1.59倍。而在以高剂量(5g/kg)台湾绿蜂胶萃取物处理的组别中,蜂王子由6.78mg增加到26.72mg,即重量增加约2.94倍。在48小时至72小时期间,对照组的蜂王子由12.26mg增加到31.70mg,重量增加约1.58倍。而在以高剂量(5g/kg)台湾绿蜂胶萃取物处理的组别中,蜂王子从26.72mg增加到107.55mg,重量增加约3.03倍。

[0133] 表1:由喂饲以台湾绿蜂胶萃取物的年轻工蜂所分泌的特殊蜂王浆,可促进蜂王子的快速生长

[0134]

平均每只蜂王子的重量(mg)	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U-1 和 2)	4.73±0.54	12.26±0.74	31.70±11.08
台湾绿蜂胶萃取物-低剂量组 (A-1 和 2) (1.25 g/kg)	5.05±2.19	12.43±3.52	60.71±6.56
台湾绿蜂胶萃取物-中剂量组 (B-1 和 2) (2.5 g/kg)	6.86±1.14	11.77±0.97	51.16±11.61
台湾绿蜂胶萃取物-高剂量组 (C-1 和 2) (5.0 g/kg)	6.78±1.37	26.72±4.29	107.55±3.47

[0135] 以上数据显示,用含台湾绿蜂胶萃取物的糖喂饲蜂群,可使工蜂生产特殊的蜂王浆,而食用所述特殊蜂王浆可促进蜂王子快速生长。

[0136] 对前述特殊蜂王浆进行进一步分析,以测定其量与质是否不同于正常蜂王浆。结果显示,特殊蜂王浆(得自经处理组)的产量与正常蜂王浆(得自对照组)的产量并无明显差异(见表2)。此意味着年轻工蜂确实能提供充足的蜂王浆供蜂王子食用,且根据蜂王子大小与食用量调配供应量。

[0137] 表2:台湾绿蜂胶萃取物未显著影响年轻工蜂所生产的蜂王浆量

[0138]

(g/20 个孔)	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U-1 和 2)	3.375±0.7	9.19±1.1	11.96±0.83
台湾绿蜂胶萃取物-低剂量组 (A-1 和 2) (1.25 g/kg)	3.03±0.58	8.30±0.81	12.1±1.0

[0139]

台湾绿蜂胶萃取物-中剂量组 (B-1 和 2) (2.5 g/kg)	2.04±0.50	6.50±0.69	10.21±1.08
台湾绿蜂胶萃取物-高剂量组 (C-1 和 2) (5.0 g/kg)	3.09±0.59	8.76±1.21	13.12±2.38

[0140] 比较正常蜂王浆和特殊蜂王浆的水溶性蛋白质含量后发现无明显差异(见表3)。结果说明,台湾绿蜂胶萃取物只影响MRJP3蛋白质中各异型物表达量间的比例,却不会诱

发新蛋白质的生成;换句话说,总蛋白质量未改变。

[0141] 表 3:台湾绿蜂胶萃取物未显著影响年轻工蜂所生产的蜂王浆中水溶性蛋白质的含量

[0142]

mg 水溶性蛋白质/g 蜂王浆	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U-1 和 2)	48.94±0.29	38.37±0.29	41.02±9.20
台湾绿蜂胶萃取物-低剂量组 (A-1 和 2) (1.25 g/kg)	44.47±4.89	29.43±6.04	32.68±1.44
台湾绿蜂胶萃取物-中剂量组 (B-1 和 2) (2.5 g/kg)	46.91±3.16	38.78±5.46	34.51±2.30
台湾绿蜂胶萃取物-高剂量组 (C-1 和 2) (5.0 g/kg)	37.76±16.10	33.70±0.57	36.34±2.59

[0143] 实验结果还发现,食用特殊蜂王浆不但可诱发蜂王子的快速生长,还可增进这些蜂王子体内的蛋白质含量(见表 4);其中蛋白质含量似以与蜂王子重量近似的倍数增加。

[0144] 表 4:台湾绿蜂胶萃取物可增加蜂王子体内的蛋白质含量

[0145]

μg 总蛋白质/蜂王子	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U-1 和 2)	60.9±24.89	383.35±39.24	1595.05±349.24
台湾绿蜂胶萃取物-低剂量组 (A-1 和 2) (1.25 g/kg)	80.4±14.85	557.7±268.42	1397.55±122.26

[0146]

台湾绿蜂胶萃取物-中剂量组 (B-1 和 2) (2.5 g/kg)	165.25±9.12	639.5±61.09	2922.2±776.97
台湾绿蜂胶萃取物-高剂量组 (C-1 和 2) (5.0 g/kg)	193.95±48.01	1393.2±30.55	4679.05±436.50

[0147] 实例 4:蜂胶素 C 对诱发蜂王子生长的效果

[0148] 蜂胶素 C 是台湾绿蜂胶的主要成份,是所有蜂胶素中含量最高者。通过进行上述

的实验方法,用 50-100mg/kg 剂量的蜂胶素 C 处理,可以显著改变年轻工蜂所分泌蜂王浆的蛋白组成,使得蜂王子快速生长(见表 5 和图 2)。由这个结果得知,蜂胶素 C 可能需要将剂量调高到 300mg/kg 剂量,才有驱动倍数增加蜂王子生长能力。根据结果显示,在 48 小时至 72 小时期间,对照组由每只蜂王子 13.45mg 增加到 61.60mg,约增加 3.58 倍。而高剂量蜂胶素 C(100mg/kg) 组,从 13.48mg 增加到 98.48mg,约增加 6.30 倍。

[0149] 表 5:蜂胶素 C 影响年轻工蜂分泌特殊蜂王浆造成蜂子生长快速

[0150]

平均每只蜂王子的重量(mg)	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U2)	3.52	13.45	61.60
蜂胶素 C (C2-1) (50 mg/kg)	2.40	15.2	70.17
蜂胶素 C (C2-2) (100 mg/kg)	2.38	13.48	98.48

[0151] 实例 5:蜂胶素 D、F 和 G 对 MRJP3 蛋白表达和蜂王子生长的效果

[0152] 蜂胶素 D、F 和 G 也是台湾绿蜂胶活性的主要成份。在本研究中,用每千克糖含 150 毫克、300 毫克或 600 毫克蜂胶素 G 的糖水喂饲蜂群三次,并分别在移入 1.5 日龄蜂王子后的 24 小时、48 小时和 72 小时,收集蜂王子与由工蜂所生产的蜂王浆以进行分析。如图 3 所示,蜂王浆的水溶性蛋白 MRJP3(实验组)的组成与一般蜂王浆(对照组)有显著的改变。在 72 小时,对照组中分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 2 : 8;然而,在中剂量(300mg/kg)蜂胶素 G 组中,分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 6.5 : 3.5。显然,MRJP3 的 68kDa 的表达显著增加,且 64kDa 的表达则显著降低。

[0153] 而这类特殊组成的蜂王浆明显提供优选营养组成,造成蜂王子快速生长,在 24 小时至 48 小时期间,对照组由每只蜂王子 5.23mg 增加到 13.57mg,约增加 1.60 倍。高剂量(5g/kg)台湾绿蜂胶萃取物组是阳性对照组,从 5.53mg 增加到 30.27mg,约增加 4.47 倍;而蜂胶素 G(300mg/kg) 组,从 3.93mg 增加到 23.80mg,约增加 5.05 倍。而在 48 小时至 72 小时期间,对照组由每只蜂王子 13.57mg 增加到 30.07mg,约增加 1.22 倍。而高剂量(5g/kg)台湾绿蜂胶萃取物组,从 30.27mg 增加到 103.30mg,约增加 2.41 倍,而蜂胶素 G(300mg/kg) 组,从 23.80mg 增加到 161.73mg,约增加 5.79 倍(表 6)。而蜂胶素 D 和 F 也会达成类似效果,只是活性较蜂胶素 G 弱。

[0154] 表 6:蜂胶素 G 影响年轻工蜂分泌特殊蜂王浆造成蜂子生长快速

[0155]

平均每只蜂王子的重量(mg)	收集时间		
	24 小时	48 小时	72 小时
组别 对照组 (U1)	5.23	13.57	30.07
台湾绿蜂胶抽出物高剂量组 (T1) (5 g/kg)	5.53	30.27	103.30
蜂胶素 G (G1-1) (150 mg/kg)	5.73	54.2	156.63
蜂胶素 G (G2-1) (300 mg/kg)	3.93	23.80	161.73
蜂胶素 G (G3-1) (600 mg/kg)	2.70	13.67	85.67

[0156] 上述数据表明特殊蜂王浆具有优选的营养组成,且因此可诱导蜂王子的快速生长。

[0157] 蜂胶素 D 和 F 也会造成类似效果,只是活性较蜂胶素 G 弱。

[0158] 实例 6 :HDAC 抑制剂 NBM-HD-1G 对 MRJP3 蛋白表达和蜂王子生长的效果

[0159] NBM-HD-1 是由台湾绿蜂胶的主要成份之一 :蜂胶素 G 合成衍生得到,且已知 NBM-HD-1 是一种新型的 HDAC(组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase))抑制剂。通过进行如上所述的实验方法,发现经 50mg/kg 至 200mg/kg 剂量的 NBM-HD-1 进行处理显著促进年轻工蜂所分泌蜂王浆的蛋白组成比例的改变,其中以 72 小时为例,对照组中分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 4 : 6。然而,在阳性对照组高剂量(5g/kg)台湾绿蜂胶抽出物组中,分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 7 : 3,而 NBM-HD-1(200mg/kg)组中分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 9 : 1。如表 7 所示,NBM-HD-1 处理诱导蜂王子的快速生长。

[0160] 表 7 :NBM-HD-1 影响年轻工蜂分泌特殊蜂王浆造成蜂王子生长快速

[0161]

平均每只蜂王子的重量 (mg)	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U1)	2.2	7.8	19.3
台湾绿蜂胶抽出物高剂 量组 (T1) (5 g/kg)	2.8	12.7	51.9
NBM-HD-1 (H1-1) (50 mg/kg)	4.57	18.0	37.4
NBM-HD-1 (H2-1) (100 mg/kg)	3.5	14.3	79.9
NBM-HD-1 (H3-1) (200 mg/kg)	2.1	17.8	82.6

[0162] 上述数据表明不同 MRJP3 蛋白间的蛋白比例改变,会造成蜂王子体重明显增加,生长快速。

[0163] 将表达于对照组和实验组的蜂王子的水溶性蛋白进行分析,由二维电泳与高分辨率质谱分析显示, NBM-HD-1 处理所培育的蜂王子,会增加 MRJP 1、2 和 3 的蛋白量,其中以 MRJP3 最为明显(参见图 5)。

[0164] 实例 7 :HDAC 抑制剂 SAHA 对 MRJP3 蛋白表达和蜂王子生长的效果

[0165] SAHA 是一种有效的 HDAC 抑制剂,当以 5-15mg/kg 剂量进行处理时,可以显著促进年轻工蜂所分泌蜂王浆的蛋白组成比例的改变。以 72 小时为例,对照组中分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 2 : 8 ;然而,在高剂量 (5g/kg) 台湾绿蜂胶萃取物组与蜂胶素 G (150mg/kg) 阳性对照组中,分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例分别为 5.5 : 4.5 和 8 : 2。然而,15mg/kg SAHA 处理组中分子量 68kDa 与 64kDa 的 MRJP3 比例为 4 : 6 (参见图 6)。而这种特殊蜂王浆提供优选营养成分,让蜂王子体重明显增加生长快速,如表 8 所示。

[0166] 表 8 :SAHA 影响年轻工蜂分泌特殊蜂王浆造成蜂子生长快速

[0167]

平均每只蜂王子的重量(mg)	收集时间
----------------	------

[0168]

组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U1)	1.9	13.3	38.4
台湾绿蜂胶抽出物高剂量组 (T1) (5 g/kg)	2.9	24.1	194.7
蜂胶素 G (G-1) (150 mg/kg)	3.6	41.2	178.6
SAHA (S1-1) (5 mg/kg)	4.0	28.2	149.3
SAHA (S2-1) (15 mg/kg)	7.3	41.0	149.2

[0169] 实例 8 :特殊蜂王的培育

[0170] 进行实验研究以喂食台湾绿蜂胶萃取物的年轻工蜂所分泌特殊蜂王浆喂食蜂王子的发育和变态。如上文所述,经台湾绿蜂胶萃取物处理组显著促进蜂王子的生长。发现食用台湾蜂胶萃取物组(以 5.0g/kg 台湾绿蜂胶萃取物处理),明显在幼虫期促进蜂王子的生长;并且持续观察进入蛹期,在第 4 天至第 8 天蜂蛹明显比对照组大(参见图 9(a))。测量蜂王子和蛹的体重,发现在幼虫期第 3 天,实验组台湾蜂胶萃取物组体重较对照组重 100%(参见图 9(b))。而进入蛹期后,对照组从第 4 天的 196.0mg 降至第 8 天的 136.10mg(每只蜂蛹的重量),约下降 30%。台湾蜂胶萃取物组,从第 4 天的 271.30mg 降至第 8 天的 244.53mg(每只蜂蛹的重量),约下降 9.8%(参见图 9(c))。显然,喂饲台湾蜂胶萃取物组的蜂蛹在进行变态过程中消耗较少的能量。而我们以蛹期第 8 天来进行比较,也发现喂饲台湾蜂胶萃取物组的蜂蛹约比对照组增加约 80%的重量。大约与幼虫期相差 100%的重量差。

[0171] 实例 9 :本发明特殊蜂王浆的生物功能

[0172] 针对喂食台湾绿蜂胶萃取物的年轻工蜂所分泌蜂王浆的抗癌功能和脑神经干细胞的分化。

[0173] 在抗癌研究中,Hs683 细胞(人类胶质瘤细胞)购自食品工业发展研究所(台湾,新竹)并在 RPMI 1640(格兰特岛生物公司(Gibco))中进行培养,所述培养基含有 2mM 谷氨酸和 0.1mM NEAA、100mg/L 丙酮酸钠、10% FBS 和 1%稀释的盘尼西林和链霉素,并维持在 37℃、95%湿度的大气和 5% CO₂ 下。在 6 孔培养皿中培养细胞(每盘 3×10⁵ 个),保持过夜。接着将细胞转移至不含血清的培养基中并用不同浓度(15 μg/mL 和 45 μg/mL)的水溶性蜂王浆蛋白处理。发现在 B1 和 C1 组中用 45 μg/mL 的蜂王浆蛋白处理 48 小时显著抑制 Hs683 细胞的生长(参见图 7)。

[0174] 在分化研究中,在含有 B27(格兰特岛生物公司(Gibco))的神经基础培养基(格

兰特岛生物公司 (Gibco)) 中培养脑神经干细胞。用 $10 \mu\text{g/mL}$ 的水溶性蜂王浆蛋白质处理神经球 (neurosphere)。使用 EGF (5ng/mL) 作为阳性对照组。如图 8 中所示, 在 B1 和 C1 组中用 $10 \mu\text{g/mL}$ 的蜂王浆蛋白处理 72 小时明显诱导神经干细胞分化成神经元细胞、神经胶质细胞和寡突细胞。

[0175] 上述数据表明 HDAC 抑制剂可影响年轻工蜂的咽头腺与大顎腺的染色质重组, 由此改变 68kDa 与 64kDa MRJP3 蛋白的表达, 但不改变其它 MRJP 蛋白质的表达。可在每一增大的蜂王子中鉴定出 68kDa 与 64kDa MRJP 蛋白间比例的改变, 且转变趋向于 68kDa 或 64kDa MRJP 同种型 (isoform)。HDAC 抑制剂可影响多态性 MRJP3 的选择性剪切, 其导致 68kDa 和 64kDa 同种型表达的改变。两种同种型蛋白表达的调控决定了蜂王子的生长。

[0176] 实例 10 :DNA 甲基转移酶抑制剂 (EGCG) 对诱发蜂王子生长的效果

[0177] 没食子酸表儿茶素酯 (Epigallocatechin Gallate, EGCG) 为一种 DNA 甲基转移酶抑制剂。以每日 50mg、100mg 及 150mg 剂量的 EGCG 糖水及一般糖水, 分别喂饲实验组及对照组蜂群两日, 并分别于移入 1 日龄蜂王子 (皆由相同蜂王所产) 后的 24、48 及 72 小时, 收集蜂王子以进行分析。如表 9 及图 10 所示, EGCG 显著促进蜂王子的生长。举例而言, 在 24 至 48 小时期间, 对照组的蜂王子由 5.9mg 增加到 19.6mg, 即重量增加约 3.32 倍。而于以 50mg/天 EGCG 处理的组别当中, 蜂王子由 4.8mg 增加到 23.77mg, 即重量增加约 4.95 倍。在 48 至 72 小时期间, 对照组的蜂王子由 19.6mg 增加到 88.57mg, 重量增加约 4.52 倍。而以 50mg/天 EGCG 处理的组别当中, 蜂王子从 23.77mg 增加到 152.42mg, 重量增加约 6.41 倍。

[0178] 表 9 :EGCG 影响工蜂分泌蜂王乳造成蜂王子生长快速

[0179]

每只蜂王子的重量(mg)	收集时间		
组别	24 小时	48 小时	72 小时
对照组 (U-1)	5.9	19.6±12.03	88.57±52.49
EGCG (E1-1) (50 mg/天)	4.8	23.77±8.87	152.42±38.55
EGCG (E2-1) (100 mg/天)	4	28.36±8.88	126.95±27.75
EGCG	4	23.0±5.8	117.44±40.41

[0180]

(E3-1) (150 mg/天)			
----------------------	--	--	--

[0181] 实验结果显示, 近似于前述 HDAC 抑制剂的作用, EGCG 亦具有促进蜂王子生长的功效。

[0182] 参考资料

[0183] 1. 赫尔纳 (Hellner M), 温特 (Winter D), 冯格奥尔基 (von Georgi R), 穆斯泰德 (Münstedt K). 蜂疗: 德国养蜂人的使用与经验 (Apitherapy: usage and experience in german beekeepers). 基于证据的补充和替代医学 (Evid Based Complement Alternat Med). 2008 ;5(4) :475-9。

[0184] 2. 温斯顿 (Winston M L). 蜜蜂的生物学 (The Biology of the Honeybee). 哈佛大学出版社 (Harvard University Press) : 剑桥 (Cambridge), MA, 1987。

[0185] 3. 罗宾逊 (Robinson G E). 蜜蜂的神经生物学和行为 (In Neurobiology and Behavior of Honeybee) ; 门泽尔 (Menzel R), 默瑟 (Mercer R) 编辑 ; 施普林格出版公司 (Springer-Verlag) : 纽约 (New York), 1987 ; 第 266-279 页。

[0186] 4. 派仁 (Peiren N), 万若贝伊 (Vanrobaeys F), 迪格夫 (de Graaf DC), 德佛里兹 (Devreese B), 冯布门 (Van Beeumen J), 雅各布斯 (Jacobs FJ). 通过蛋白质组学方法重新审视蜜蜂蜂毒的蛋白质组成 (The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach). 生物化学与生物物理学学报 (Biochim Biophys Acta). 2005 ;1752(1) :1-5。

[0187] 5. 高木 - 土井 (Takaki-Doi S.), 桥本 (Hashimoto K), 山村 (Yamamura M), 鬼井 (Kamei C). 蜂王浆蛋白质水解产物和其部分在自发高血压大鼠中的抗高血压活性 (Antihypertensive activities of royal jelly protein hydrolysate and its fractions in spontaneously hypertensive rats). 冈山大学医学学报 (Acta Med Okayama). 2009 ;63(1) :57-64。

[0188] 6. 曼奴 (Mannoor MK), 岛袋 (Shimabukuro I), 冢本 (Tsukamoto M), 渡边 (Watanabe H), 山口 (Yamaguchi K), 佐藤 (Sato Y). 蜜蜂蜂王浆在易发系统性红斑狼疮的 NZB x NZW F1 小鼠中抑制自身免疫 (Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice). 狼疮 (Lupus). 2009 ;18(1) :44-52。

[0189] 7. 咖思科 (Gasic S), 维科威克 (Vucevic D), 瓦西利伊奇 (Vasilijic S), 安图诺维奇 (Antunovic M), 迟诺 (Chinou I), 考利克 (Colic M). 在活体外评价蜂王浆组份的免疫调节活性 (Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro). 免疫药理学和免疫毒理学 (Immunopharmacol Immunotoxicol). 2007 ;29(3-4) :521-36。

[0190] 8. 维科威克 (Vucevic D), 米利欧 (Melliou E), 瓦西利伊奇 (Vasilijic S), 咖思科 (Gasic S), 伊凡诺夫斯基 (Ivanovski P), 迟诺 (Chinou I), 考利克 (Colic M). 自蜂王浆分离的脂肪酸在活体外调节树突细胞调介的免疫反应 (Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro). 国际免疫药理学 (Int Immunopharmacol). 2007 ;7(9) :1211-20。

[0191] 9. 布卡 (Boukraa L). 蜂王浆与蜂蜜对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的加性活性 (Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*). 替代医学评论 (Altern Med Rev). 2008 ;13(4) :330-3。

[0192] 10. 桥本 (Hashimoto M), 艾田 (Kanda M), 池野 (Ikeno K), 林 (Hayashi Y), 中村 (Nakamura T), 小川 (Ogawa Y), 福光 (Fukumitsu H), 野本 (Nomoto H), 古川 (Furukawa S). 经口投予蜂王浆有助于衍生自神经胶质细胞系的神经营养因子和神经丝 H 在成年小鼠

脑的海马中进行 mRNA 表达 (Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain). 生物科学生物技术与生物化学 (Biosci Biotechnol Biochem). 2005 ;69(4) :800-5。

[0193] 11. 郭 (Guo H), 伊库萨 (Ekusa A), 岩井 (Iwai K), 米仓 (Yonekura M), 高畠 (Takahata Y), 森松 (Morimatsu F). 蜂王浆肽在活体外和活体内抑制脂质过氧化 (Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo). 营养学与维生素学期刊 (J Nutr Sci Vitaminol) (东京 (Tokyo)). 2008 ;54(3) :191-5。

[0194] 12. 斯卡塞利 (Scarselli R), 多纳迪奥 (Donadio E), 吉欧佛瑞达 (Giuffrida MG), 福尔图纳托 (Fortunato D), 康蒂 (Conti A), 巴莱斯特雷 (Balestreri E), 费利乔利 (Felicioli R), 平扎帝 (Pinzauti M), 萨巴蒂尼 (Sabatini AG), 费利乔利 (Felicioli A). 关于蜂王浆蛋白质组 (Towards royal jelly proteome). 蛋白质组学 (Proteomics). 2005 ;5(3) :769-76。

[0195] 13. 斯米唑娃 (Schmitzová J), 克拉蒂尼 (Klaudiny J), 艾尔伯特 (Albert S), 施罗德 (**Schröder** W), 斯瑞克高斯特 (Schreckengost W), 黑恩斯 (Hanes J), 尤多娃 (Júdová J), 西姆斯 (Simúth J). 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L) 的主要蜂王浆蛋白质家族 (A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L). 细胞和分子生命科学 (Cell Mol Life Sci). 1998 ;54(9) :1020-30。

[0196] 14. 河野 (Kohno K), 冈本 (Okamoto I), 山诺 (Sano O), 新井 (Arai N), 磐城 (Iwaki K), 池田 (Ikeda M), 栗本 (Kurimoto M). 蜂王浆通过活化的巨噬细胞抑制促炎细胞因子的生成 (Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages). 生物科学生物技术与生物化学 (Biosci Biotechnol Biochem). 2004 ;68(1) :138-45。

[0197] 15. 马列科娃 (Malecová B), 拉姆泽 (Ramser J), 奥布莱恩 (O'Brien JK), 扎尼提兹 (Janitz M), 尤多娃 (Júdová J), 勒哈士 (Lehrach H), 西姆斯 (Simúth J). 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L) mrjp 基因家族 :mrjp1 的推定启动子和基因组结构的计算分析, 所述 mrjp1 基因编码幼虫食物的最丰富的蛋白质 (Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family :computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food). 基因 (Gene). 2003 ;303 :165-75。

[0198] 16. 古泽 (Furusawa T), 拉科娃 (Rakwal R), 河 (Nam HW), 柴户 (Shibato J), 阿格拉沃尔 (Agrawal GK), 金姆 (Kim YS), 小川 (Ogawa Y), 吉田 (Yoshida Y), 寇祖玛 (Kouzuma Y), 池田 (Masuo Y), 米仓 (Yonekura M). 使用一维和二维蛋白质组学平台的综合蜂王浆 (RJ) 蛋白质组学分析揭示新颖的 RJ 蛋白质和潜在的磷蛋白 / 糖蛋白 (Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins). 蛋白质组研究期刊 (J Proteome Res). 2008 ;7(8) :3194-229。

[0199] 17. 尤佩达尔 (Djupedal I), 伊可娃 (Ekwall K). 表观遗传学 : 异染色质符合 RNAi (Epigenetics : heterochromatin meets RNAi). 细胞研究 (Cell Res). 2009 ;19(3) :

282-95。

[0200] 18. 塞尔维 (Selvi RB), 昆杜 (Kundu TK). 染色质的可逆乙酰化: 与基因表达的调控、疾病和治疗学有关 (Reversible acetylation of chromatin: implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics). 生物技术期刊 (Biotechnol J). 2009 ;4(3) :375-90。

[0201] 19. 菲斯库思 (Fiskus W), 巴克利 (Buckley K), 拉奥 (Rao R), 曼达沃特 (Mandawat A), 杨 (Yang Y), 乔什 (Joshi R), 王 (Wang Y), 巴卢苏 (Balusu R), 陈 (Chen J), 库奥 (Koul S), 乔什 (Joshi A), 乌帕达亚 (Upadhyay S), 阿塔珈 (Atadja P), 芭拉 (Bhalla KN). 帕比司他 (Panobinostat) 治疗降低 EZH2 和 DNMT1 水平并增强地西他滨 (decitabine) 调节的 JunB 去压制作用和人类急性白血病细胞的存活损失 (Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells). 癌症生物学与疗法 (Cancer Biol Ther). 2009 ;8(10)。

[0202] 20. 傅勒 (Fournel M), 班费斯 (Bonfils C), 侯 (Hou Y), 严 (Yan PT), 塔弛-布尔歇 (Trachy-Bourget MC), 卡利塔 (Kalita A), 刘 (Liu J), 鲁 (Lu AH), 周 (Zhou NZ), 罗伯特 (Robert MF), 吉莱斯皮 (Gillespie J), 王 (Wang JJ), 圣克鲁瓦 (Ste-Croix H), 拉希 (Rahil J), 勒费布尔 (Lefebvre S), 莫拉代伊 (Moradei O), 德洛姆 (Delorme D), 马克劳 (Macleod AR), 贝斯特曼 (Besterman JM), 李 (Li Z). MGCD0103, 一种新颖的同种型选择性组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 其在活体外和活体内具有广谱抗肿瘤活性 (MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo). 分子癌症治疗学 (Mol Cancer Ther). 2008 ;7(4) : 759-68。

[0203] 21. 夏里埃 (Charrier C), 罗氏 (Roche J), 谢松 (Gesson JP), 伯特兰 (Bertrand P). 茚满酮与 HDAC 抑制剂 SAHA 和 MS-275 类似物的杂合文库的抗增殖活性 (Antiproliferative activities of a library of hybrids between indanones and HDAC inhibitor SAHA and MS-275 analogues). 生物有机与医药化学快报 (Bioorg Med Chem Lett). 2007 ;17(22) :6142-6。

[0204] 22. 斯珀林 (Spurling CC), 戈德曼 (Godman CA), 努南 (Noonan EJ), 拉斯穆森 (Rasmussen TP), 罗森伯格 (Rosenberg DW), 贾尔迪纳 (Giardina C). HDAC3 过表达与结肠癌细胞增殖和分化 (HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation). 分子致癌作用 (Mol Carcinog). 2008 ;47(2) :137-47。

[0205] 23. 山卡 (Shankar S), 斯里瓦斯塔瓦 (Srivastava RK). 组蛋白去乙酰化酶抑制剂: 在癌症中的机制和临床意义: HDAC 抑制剂诱导细胞凋亡 (Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis). 实验医学与生物学进展 (Adv Exp Med Biol). 2008 ;615 : 261-98。

[0206] 24. 吴 (Wu LP), 王 (Wang X), 李 (Li L), 赵 (Zhao Y), 鲁 (Lu S), 于 (Yu Y), 周 (Zhou W), 刘 (Liu X), 杨 (Yang J), 郑 (Zheng Z), 张 (Zhang H), 冯 (Feng J), 杨 (Yang Y), 王 (Wang H), 朱 (Zhu WG). 组蛋白去乙酰化酶抑制剂缩酚酸肽通过降低启动子上 CpG

和 H3K9 的甲基化来激活沉默的基因 (Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter). 分子细胞生物学 (Mol Cell Biol). 2008 ;28(10) :3219-35。

[0207] 25. 古尔维奇 (Gurvich N), 特西甘诺娃 (Tsygankova OM), 梅考斯 (Meinkoth JL), 克莱因 (Klein PS). 组蛋白去乙酰化酶是丙戊酸调节的细胞分化的靶标 (Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation). 癌症研究 (Cancer Res). 2004 ;64(3) :1079-86。

[0208] 26. 陶斯特 (Tost J). DNA 甲基化:生物学介绍和有希望的生物标记的与疾病有关的改变 (DNA methylation:an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker). 分子生物学方法 (Methods Mol Biol). 2009 ;507 :3-20。

[0209] 27. 戈沙尔 (Ghoshal K), 拜 (Bai S). DNA 甲基转移酶作为癌症疗法的靶标 (DNA methyltransferases as targets for cancer therapy). 今日药物 (Drugs Today) (Barc). 2007 ;43(6) :395-422。

[0210] 28. 珍南格雷厄姆 (Janet S. Graham), 斯坦利卡耶 (Stanley B. Kaye), 罗伯特·布朗 (Robert Brown). 实体肿瘤的表现遗传疗法的前景与缺陷 (The promises and pitfalls of epigenetic therapies in solid tumours). 欧洲癌症期刊 (European Journal of Cancers) 45(2009) 1129-1136。

[0211] 29. 沃尔顿 (T. J. Walton), 李 (G. Li), 塞思 (R. Seth), 麦卡德尔 (S. E. McArdle), 毕晓普 (M. C. Bishop) 和里斯 (R. C. Rees). DNA 去甲基化与组蛋白去乙酰化抑制合作以再表达雌激素 β 受体并诱导前列腺癌细胞系细胞凋亡 (DNA Demethylation and Histone Deacetylation Inhibition Co-Operate to Re-Express Estrogen Receptor Beta and Induce Apoptosis in Prostate Cancer Cell-Lines). 前列腺 (The Prostate) 68 : 210-222 (2008)。

[0212] 30. 朱莉基弗 (Julie C. Kiefer). 发育中的表现遗传学 (Epigenetics in Development). 发育动力学 (Developmental Dynamics) 236 :1144-1156, 2007。

[0213] 31. 阿曼德梅瑞马迪 (Ahmad Miremedi), 米克尔厄斯特高 (Mikkel Z. Oestergaard), 鲍尔法老 (Paul D. P. Pharoah) 和卡尔达斯 (Carlos Caldas). 表现遗传基因的癌症遗传学 (Cancer genetics of epigenetic genes). 人类分子遗传学 (Human Molecular Genetics), 2007, 第 16 卷, 综述版 1, R28-R49。

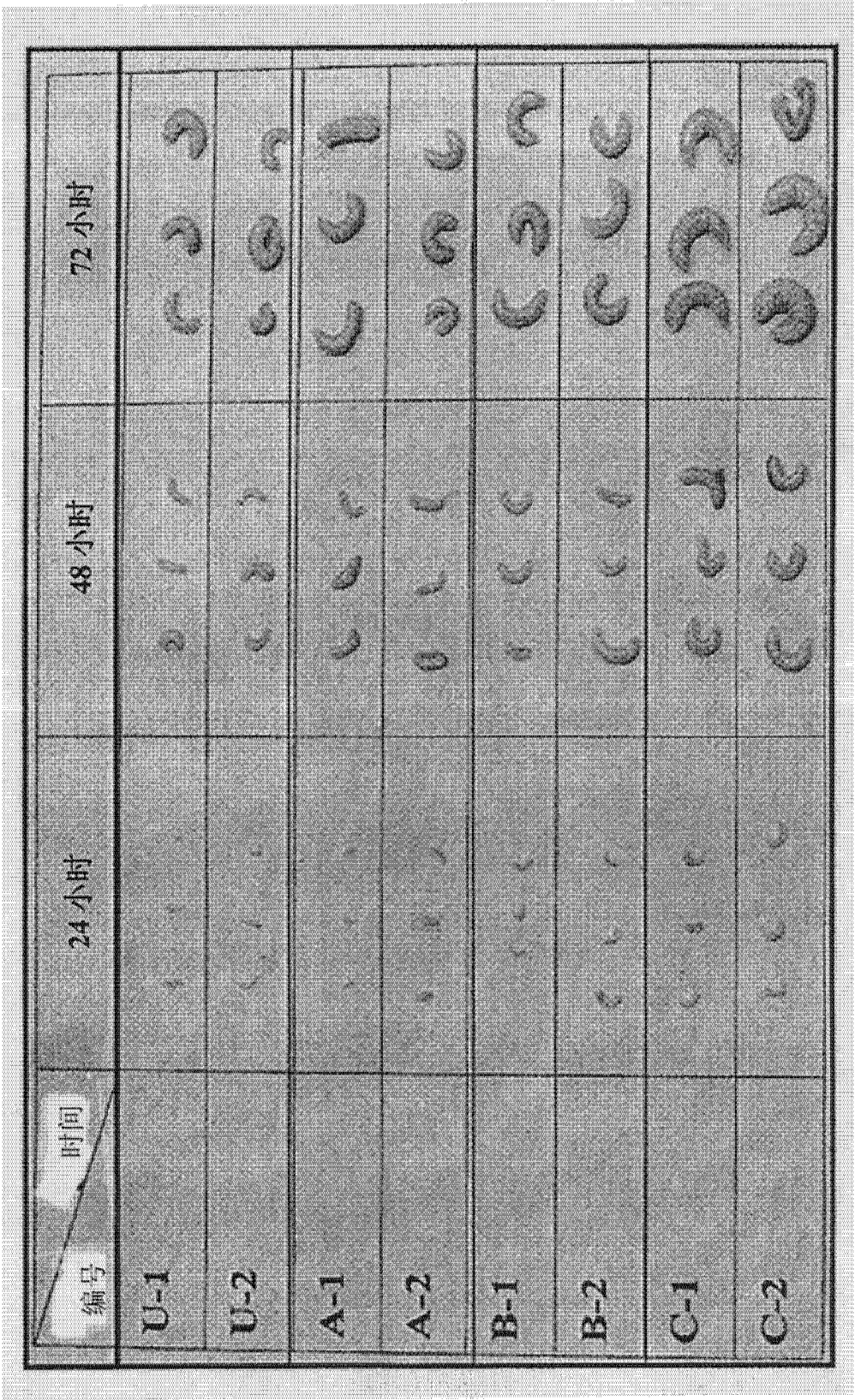


图 1

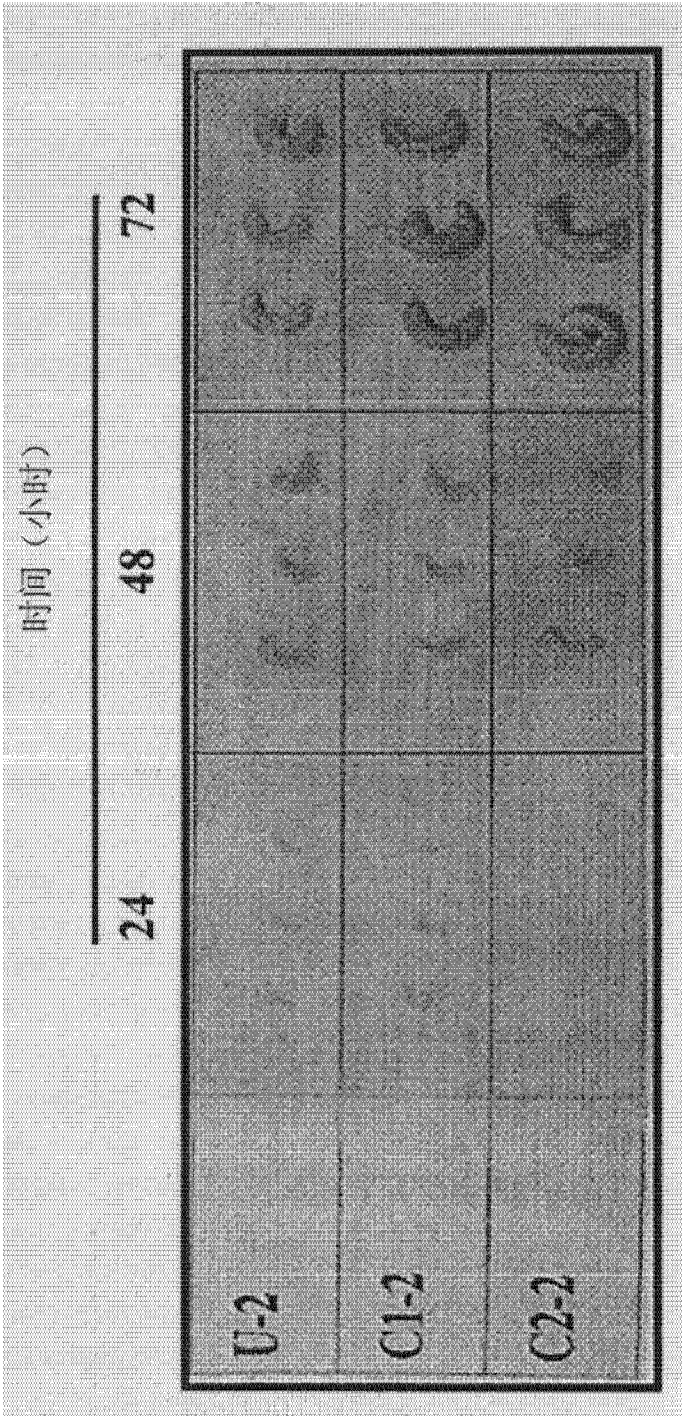


图 2

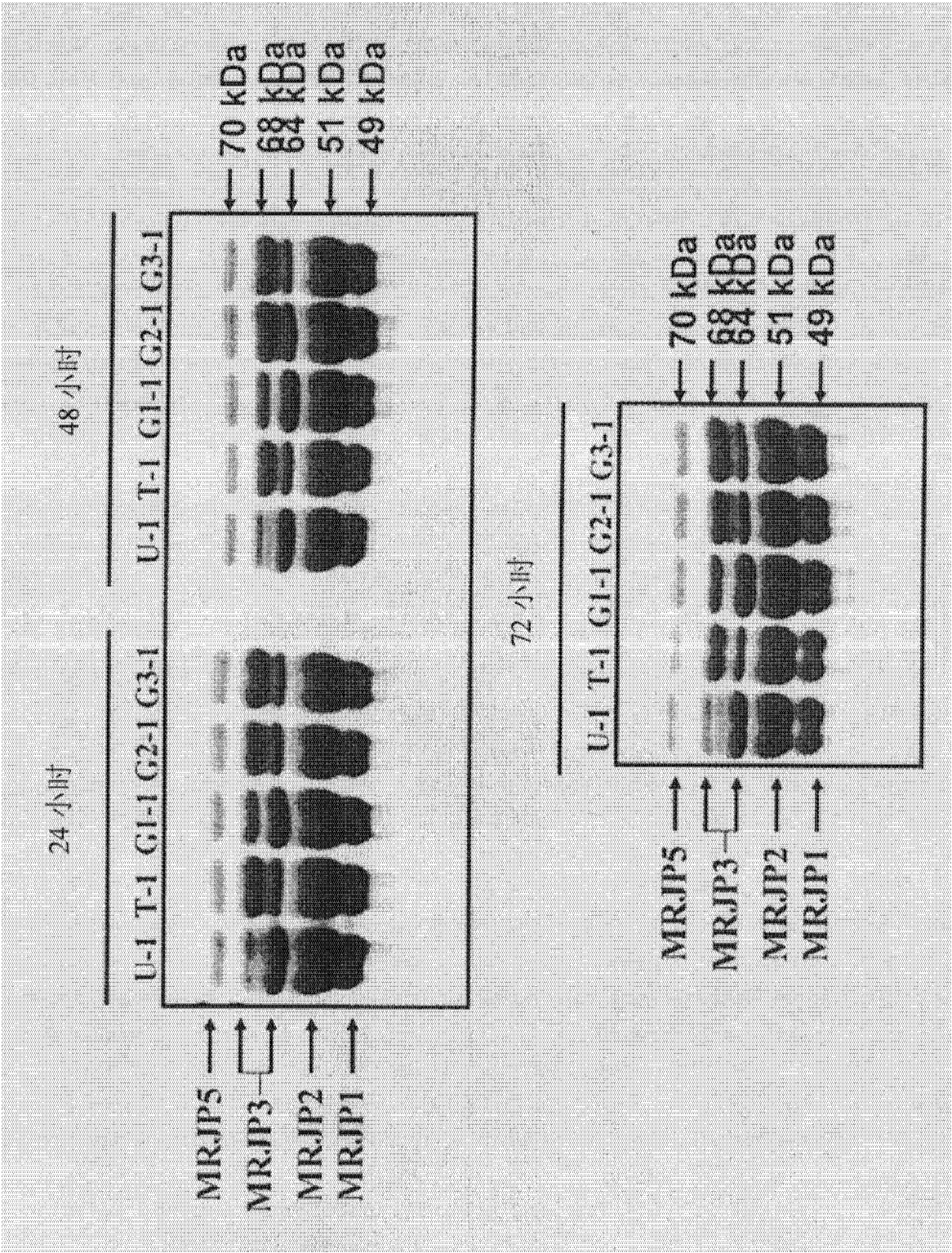


图 3

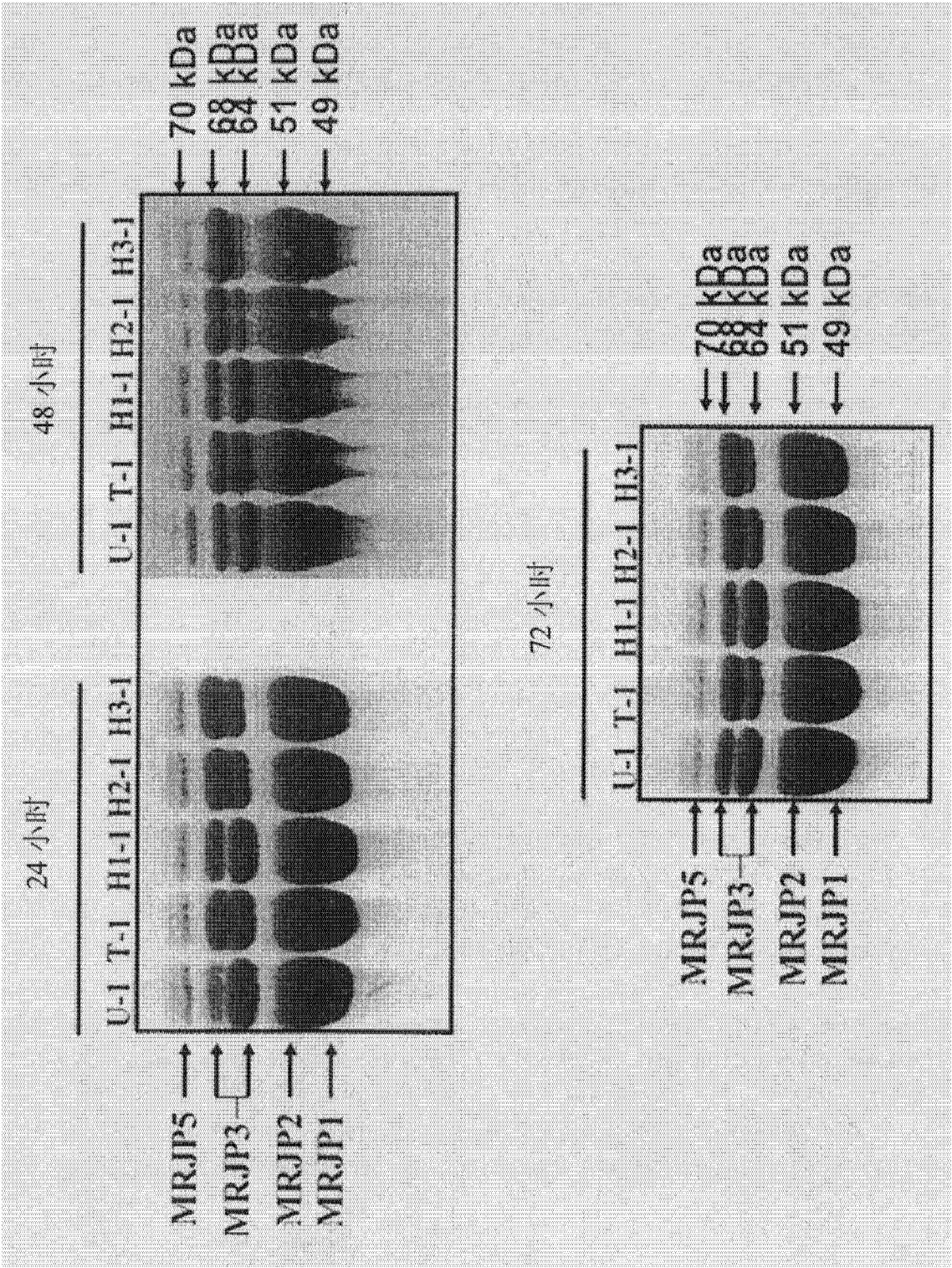


图 4

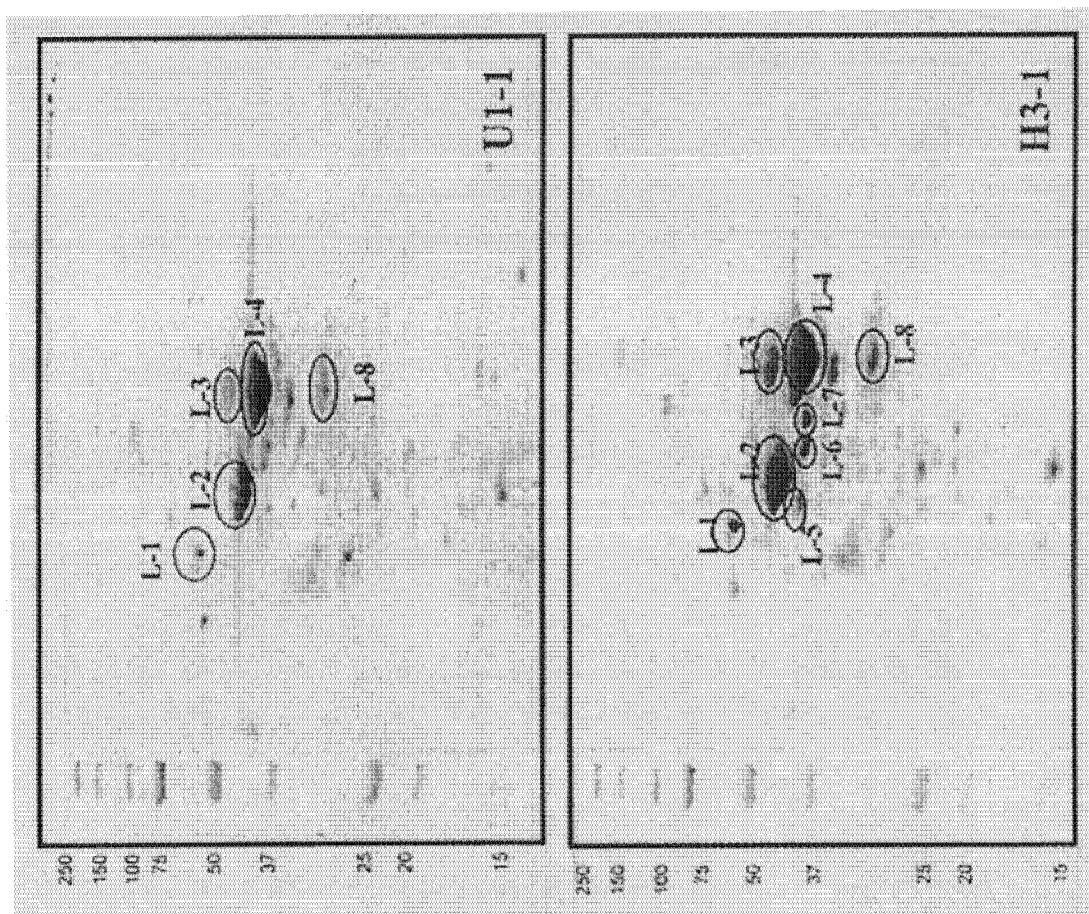


图 5

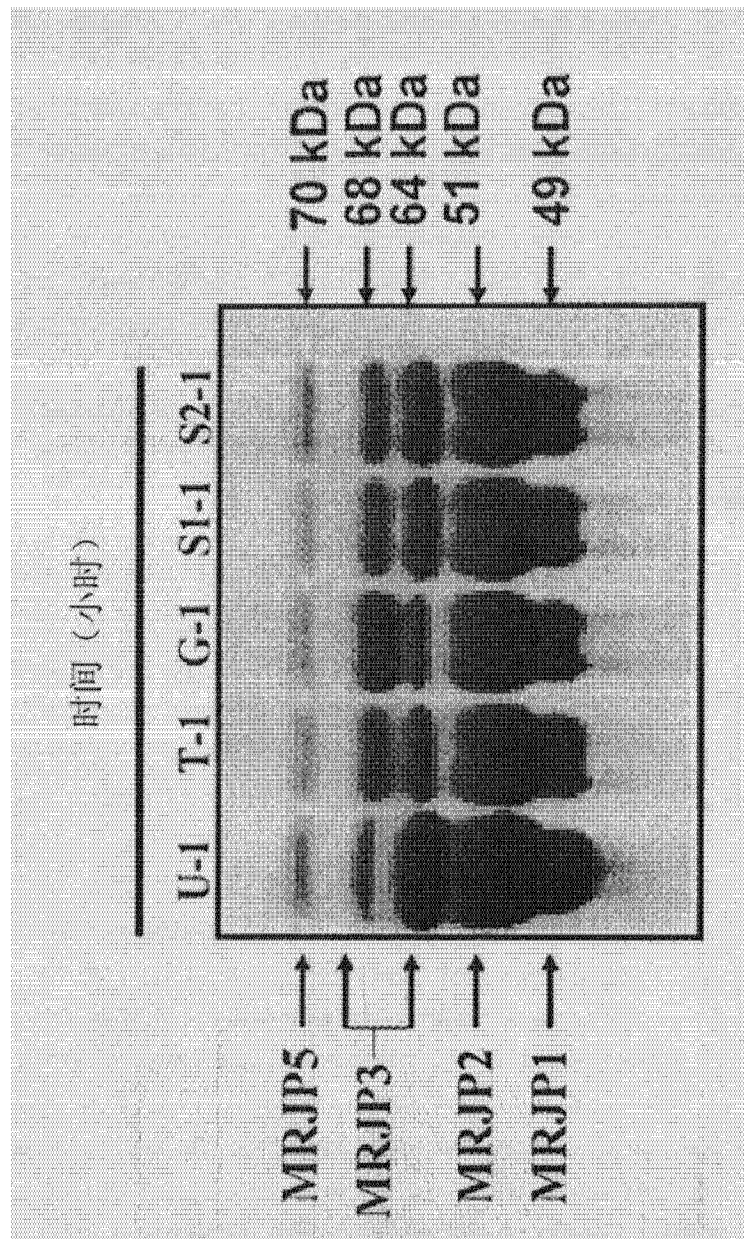


图 6

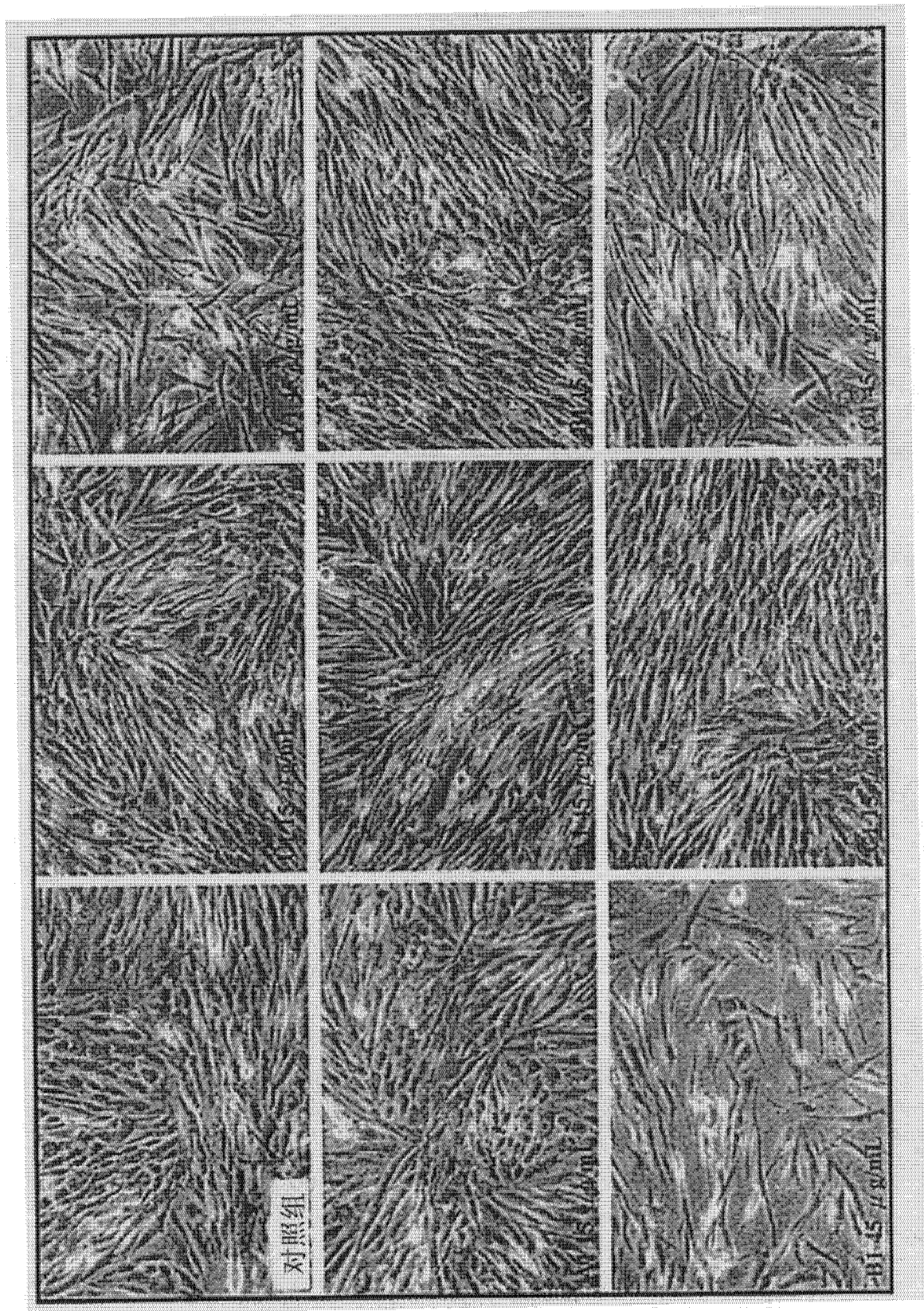


图 7

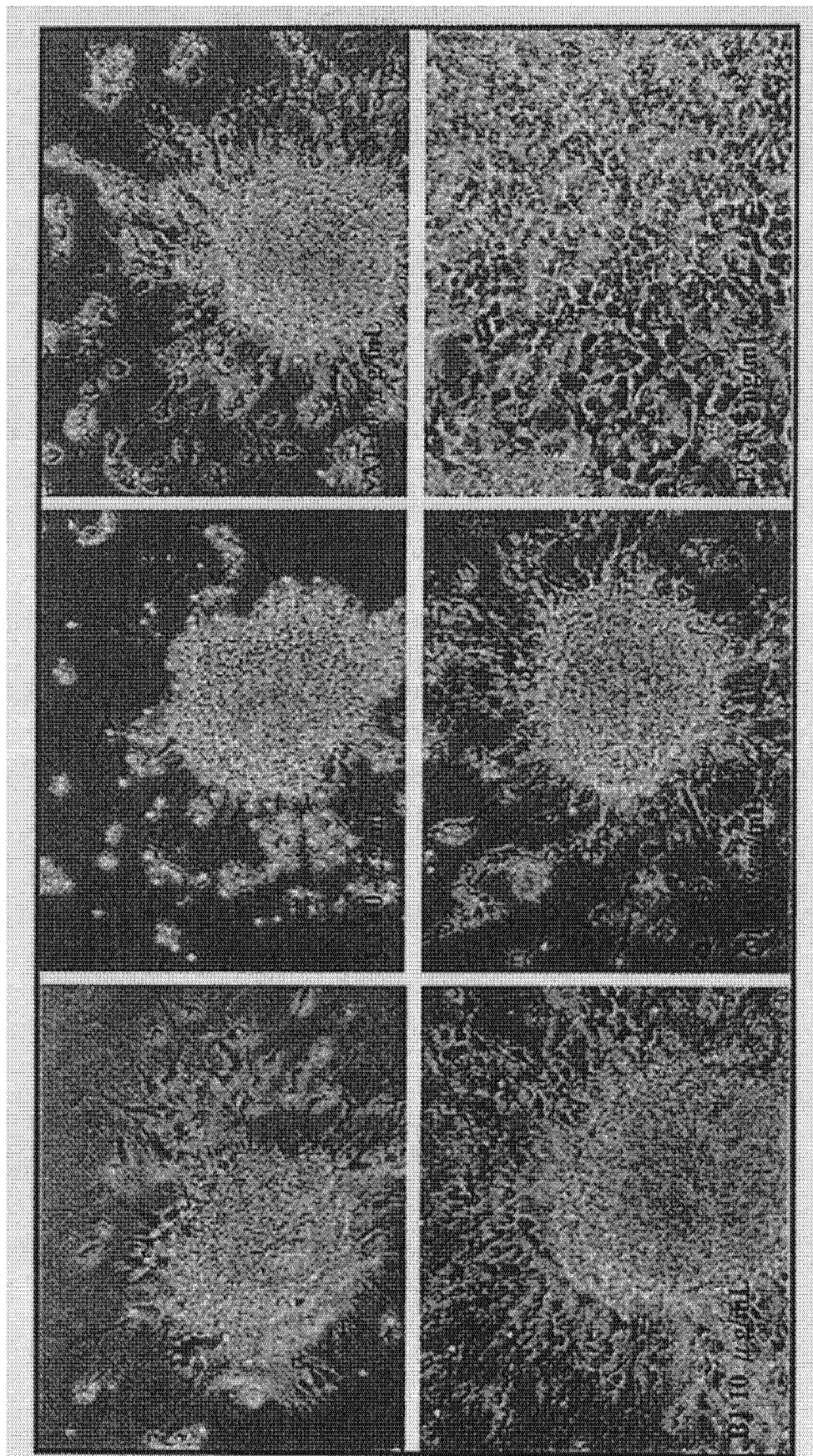


图 8

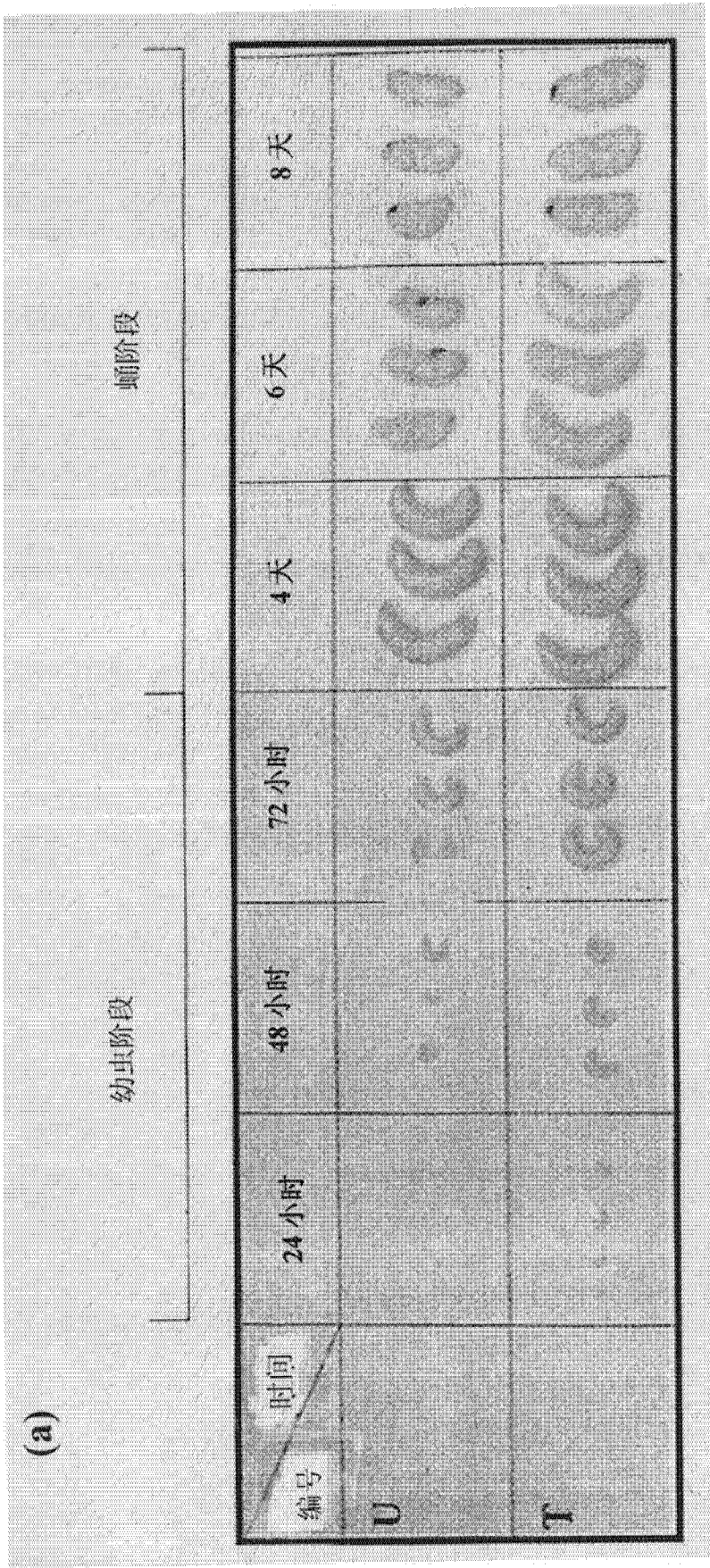


图 9

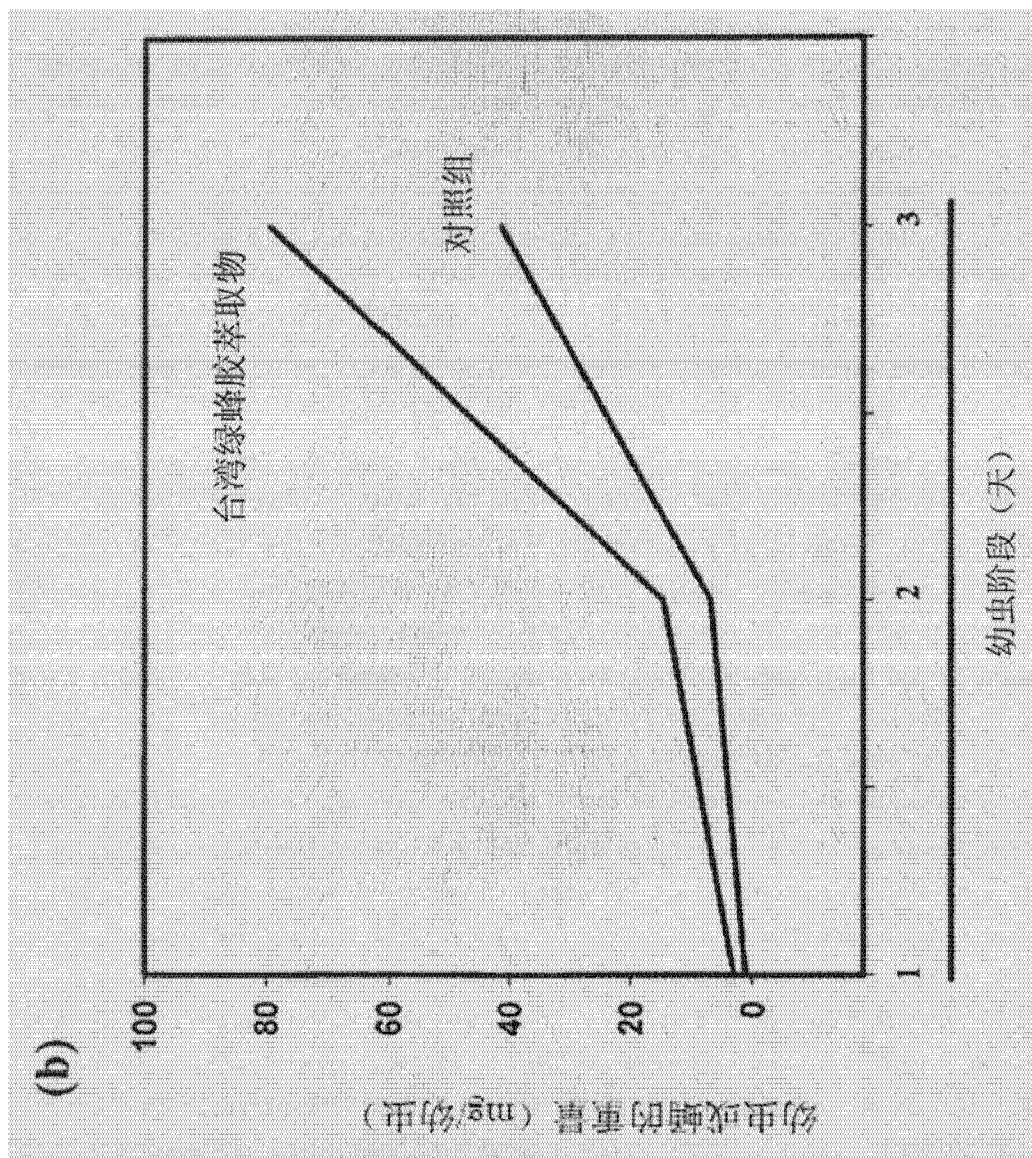


图 9

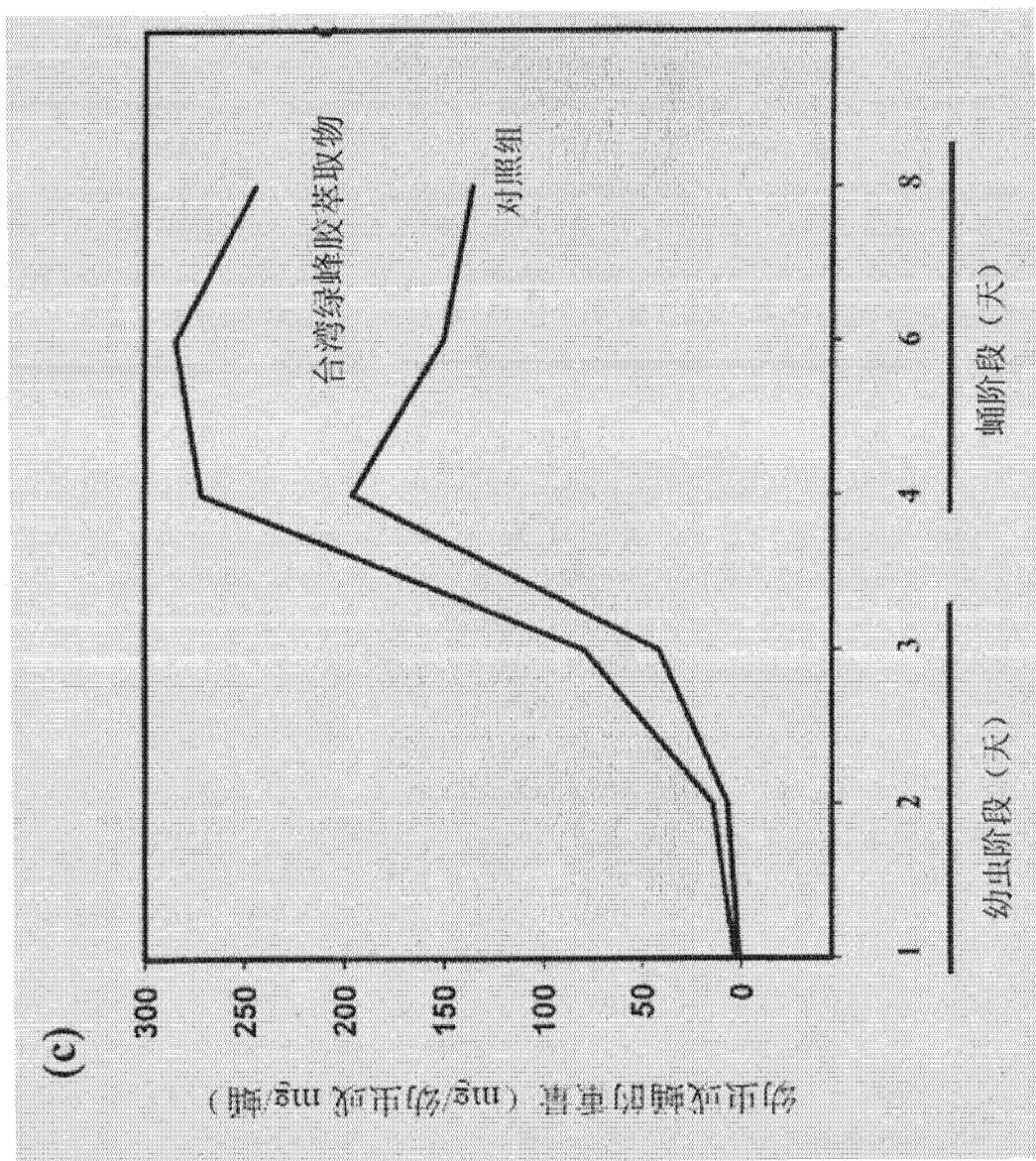


图 9

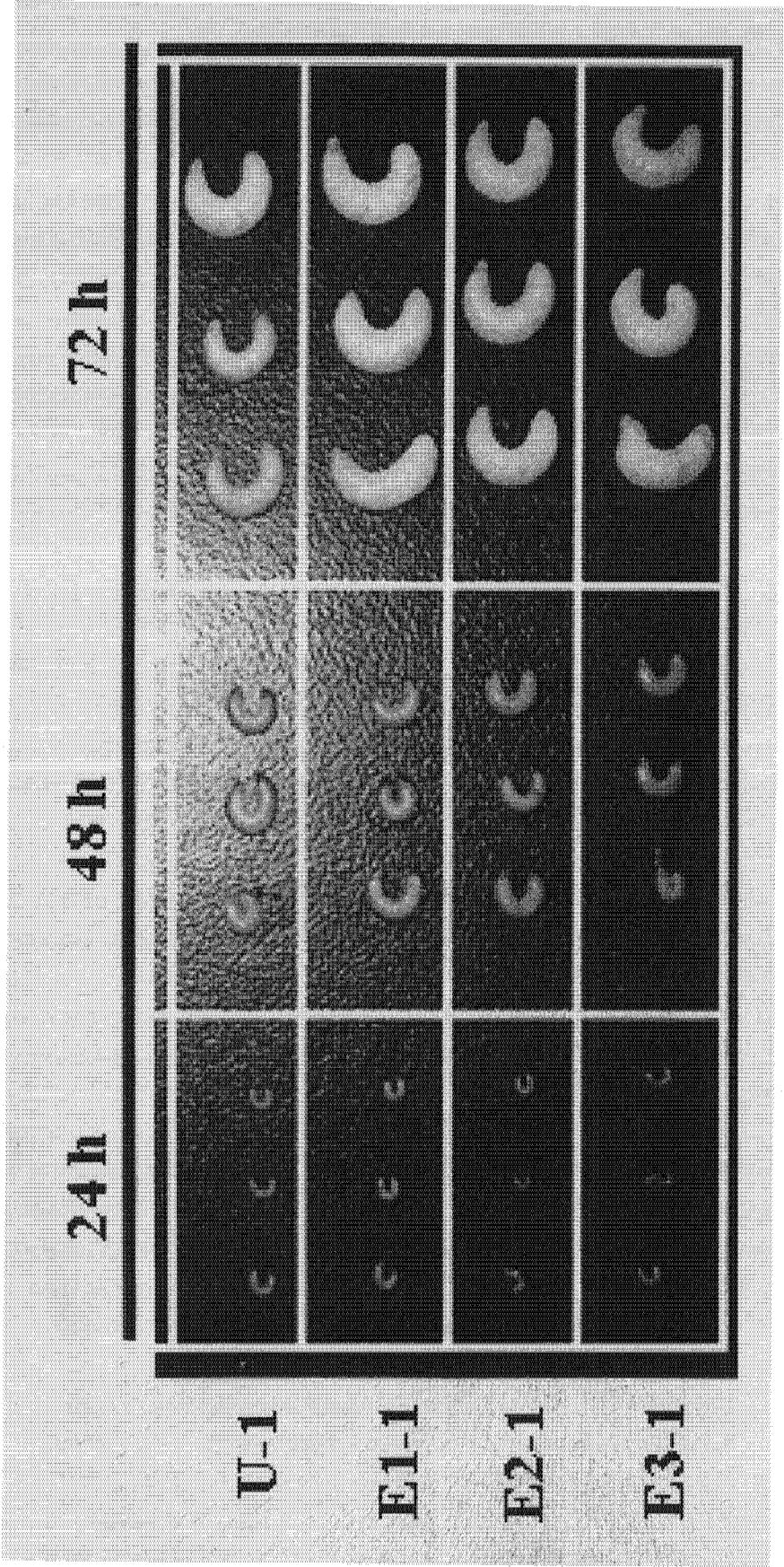


图 10