



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106958 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098129136

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 28 日

(51)Int. Cl. : *A61K36/076 (2006.01)*

A61K31/575 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

(71)申請人：杏輝藥品工業股份有限公司(中華民國) SINPHAR PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(TW)

宜蘭縣冬山鄉中山村 84 號

(72)發明人：林漢欽 LIN, HANG CHING (TW)；黃裕權 HUANG, YU CHUAN (TW)；張自忠
CHANG, TSU CHUNG (TW)；張溫良 CHANG, WEN LIANG (TW)

(74)代理人：陳展俊

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：9 共 40 頁

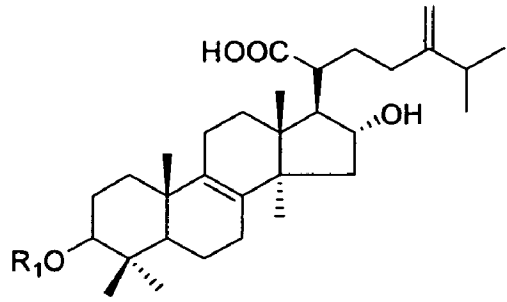
(54)名稱

以羊毛甾烷及茯苓萃取物治療糖尿病的用途

USE OF LANOSTANE AND PORIA EXTRACT IN TREATING DIABETIC

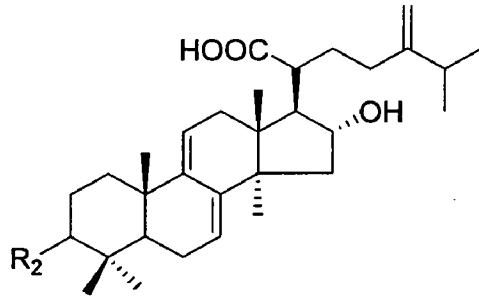
(57)摘要

本發明提供一種用於治療糖尿病的醫藥組合物，其包含羊毛甾烷化合物作為有效成分。此羊毛甾烷化合物的一合適來源為茯苓萃取物，其包含 1-60 重量%的羊毛甾烷類化合物且實質上不含開環羊毛甾烷類化合物。該萃取物係萃取自多孔菌科植物茯苓菌(Poria cocos(Schw)Wolf)之代謝產物、菌絲或醱酵產物。



R₁: COCH₃ (PA)

R₁: H (TA)



R₂:  OCOCH₃ (DHPA)

R₂:  OH (DHTA)

R₂:  O (PPA)

R₂:  OH (EDHTA)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種以茯苓萃取物治療糖尿病的用處，尤其有關以萃取自茯苓的化合物治療因血中胰島素不足所引起的糖尿病的用處發明。

【先前技術】

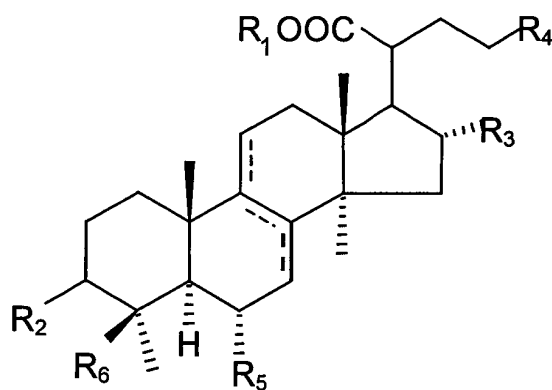
糖尿病為富裕國家之成人(尤指老年人)常見的慢性病。糖尿病人主要可分為兩種，第一型糖尿病或稱胰島素依賴型糖尿病，其病因是免疫反應造成胰臟之 β -細胞破壞而無法生產胰島素，血中無胰島素因此此種型病人必需藉助於注射胰島素補充才能治療糖尿病。第二型糖尿病或稱非胰島素依賴型糖尿病，其病因不明，但是遺傳基因問題為重要因素之一，另外生活方式影響(如肥胖)也是重要因素之一。

大約西元 500 年，唐朝之醫學書籍備急千金要方記載著用於治療的糖尿病的多種複方，其中某些複方含有茯苓。2002 年日本研究人員 M. Sato 發表茯苓皮部份的氫化去氫松苓酸(Dehydrotrametenolic acid)能夠應用在第二型糖尿病(Biol. Pharm. Bull. 2002, 25(1), 81-86)的治療，其作用原理是經由增加胰島素敏感度(即減少人體對胰島素抗藥性)而達到治療目的。但是從其體外脂肪細胞試驗知道氫化去氫松苓酸的有效濃度為 10^{-5} M，及從體內小老鼠動物實驗的結果得知氫化去氫松苓酸的有效劑量為 110

mg/kg，顯然應用在人體其有效劑量至少高達大於 700 mg 以上。700 mg 之有效劑量相當於目前臨床使用之用藥劑量的 10 倍以上，因此發展成臨床用藥會造成困難。

【發明內容】

本發明的一個目的在揭示一種使用具下列化學式(I)的羊毛甾烷或其醫藥上可接受的鹽作為有效成分在製備一種用於治療哺乳類動物因血中胰島素不足所引起的糖尿病藥物的用途，



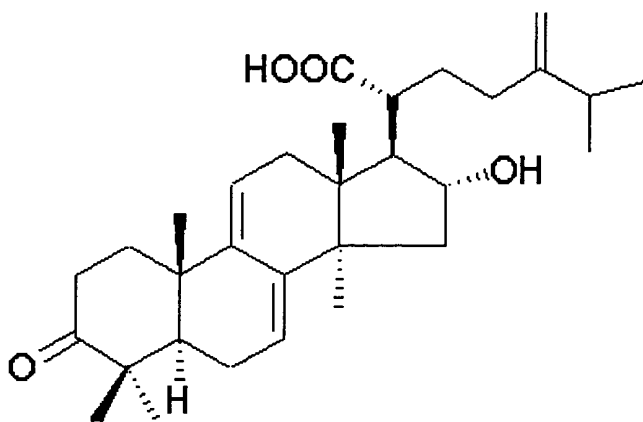
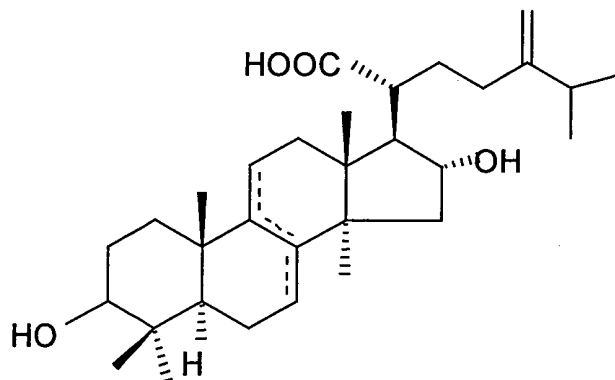
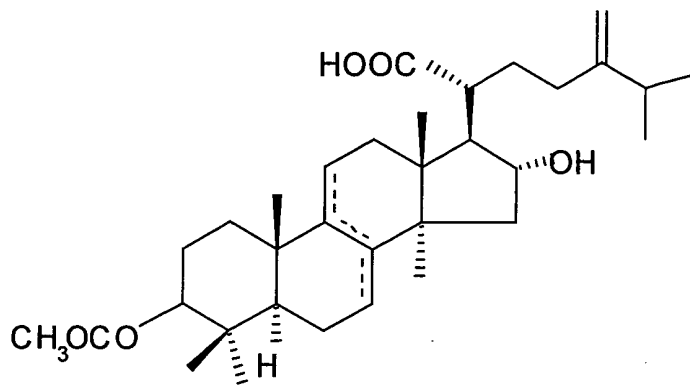
(I)

於式中 R_1 為 H 或 CH_3 ； R_2 為 $OCOCH_3$ ，=O 或 OH； R_3 為 H 或 OH； R_4 為 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2R_a$ ，其中 R_a 為 H 或 OH，或 $-CH=C(CH_3)-R_b$ ，其中 R_b 為 CH_3 或 CH_2OH ； R_5 為 H 或 OH；及 R_6 為 CH_3 或 CH_2OH 。

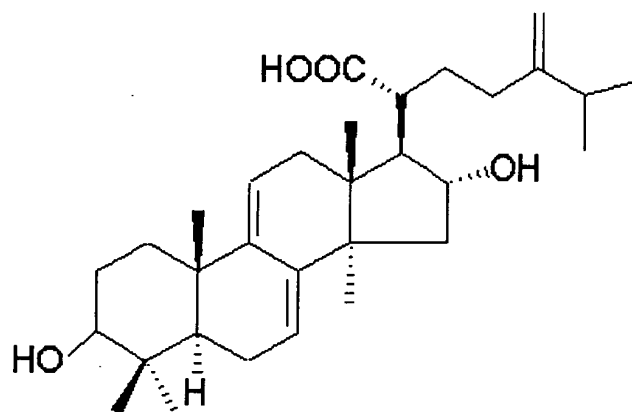
本發明亦揭示一種使用茯苓萃取物作為有效成分在製備一種用於治療哺乳類動物因血中胰島素不足所引起的糖尿病藥物的用途，其中該茯苓萃取物包含 1-60 重量%的具申

請專利範圍第1項所述的羊毛甾烷(I)且實質上不含開環羊毛甾烷。較佳的，該茯苓萃取物包含包含5-35重量%的羊毛甾烷(I)。

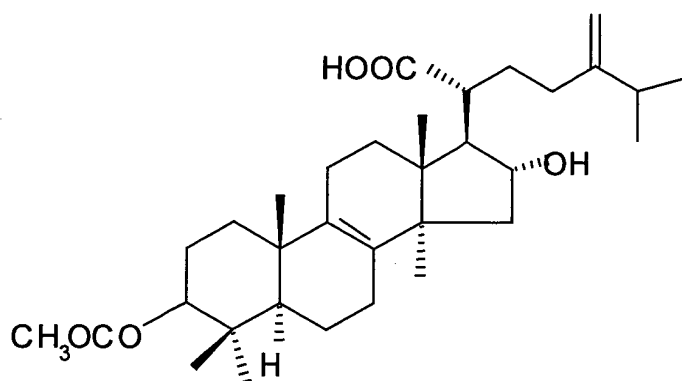
較佳的，該羊毛甾烷(I)具有下列化學式：



或



更佳的，該羊毛甾烷(I)具有下列化學式：



較佳的，該藥物為注射劑型。

較佳的，該藥物為口服劑型。

較佳的，該糖尿病為第一型糖尿病。

較佳的，該糖尿病為第二型糖尿病。

較佳的，該哺乳類動物為人類。

本發明證明，從茯苓分離出來的有效成分能夠發揮同胰島素一樣功能：(1)增加葡萄糖轉運蛋白(GLUT4)之基因表達(mRNA)，(2)葡萄糖轉運蛋白(GLUT4)製造，(3)能夠將轉運蛋白(GLUT4)從細胞內轉位(translocatin)到脂肪(或肌肉)細胞膜上，(4)葡萄糖轉運蛋白能夠將細胞外葡萄糖運送至細胞內，及(5)同胰島素功能一樣能夠製造三酸甘油脂儲

存在細胞內。故茯苓有效成分成功地扮演了胰島素之角色，可將血糖運送至細胞內而降低血糖，可運用在第一型糖尿病及因血中胰島素不足所引起的第二型糖尿病之治療。另外最重要的是從脂肪體外試驗說明在 $0.01 \mu\text{M}$ 濃度下就能產生葡萄糖吸收作用，相較於上述日學者 Sato 研究需要 10^{-5} M 才能產生作用，二者之間劑量差 1000 倍。

【實施方式】

本發明所揭示之從茯苓製備具有治療因血中胰島素不足所引起的糖尿病的有效成分的一合適方法例如為 EP 1535619 A1 所揭示的方法，包括利用傳統萃取法萃取茯苓得到一粗萃取物，再經由層析法，分成極性小之羊毛甾烷 (lanostane) 類部位 (以二氯甲烷：甲醇 (96:4) 為沖提液) 和極性大之開環羊毛甾烷 (secolanostane) 類部位 (以二氯甲烷：甲醇 (90:10 或 0:100) 為沖提液)，其中，利用矽膠薄層層析法，顯示出羊毛甾烷 (lanostane) 類部位之所在位置，即展開溶媒為二氯甲烷—甲醇 (96:4) 時，層析值 (Rf) 為 ≥ 0.1 ；至於開環羊毛甾烷 (secolanostane) 類成分，則層析值小於 0.1。用矽膠管柱層析法可進一步分離該羊毛甾烷類部位，其中沖提液使用二氯甲烷：甲醇 (97:3 至 95:5)，分離出數種羊毛甾烷 (lanostane) 類化合物。

下面結合實施例對本發明做進一步詳細的描述，但不以此限制本發明。

實施例一

雲南產茯苓 26 公斤，以 260 升含 75%酒精，加熱萃取三次，合併酒精萃取液，經減壓濃縮後可得 225.2 克萃取物。萃取物經定量分析知道每一克萃取物可得 76.27 毫克之羊毛甾烷，其中 K1 (茯苓酸(Pachymic acid)) 33.4 毫克，K1-1 (去氫茯苓酸(dehydropachymic acid)) 9.59 毫克，K2-1 (塊苓酸(tumulolic acid)) 19.01 毫克，K2-2 (去氫塊苓酸(dehydrotumulolic acid)) 6.75 毫克，K3 (多孔甾酸 C (poylporenic acid C)) 5.06 mg，K4 (3-表氫塊苓酸(3-epidehydrotumulolic acid)) 2.46 毫克。

實施例二

實施例一酒精萃取物 125 克以 1.3 升二氯甲烷萃取 6 次，合併二氯甲烷萃取液，經濃縮後可得 22.26 克之萃取物。以 95%熱酒精溶解二氯甲烷萃取物，放冷後過濾不溶物，濾液以水少量加入直到酒精含量為 45%為止，此時會有沉澱產生，用離心方式取沉澱物，可得 17.4 克沉澱物。經定量分析可得知每克沉澱物含有 264.78 毫克羊毛甾烷，其中 K1-1 159.7 毫克，K1-2 56.96 毫克，K2-1 24.43 毫克，K2-2 8.8 毫克，K3 9.84 毫克，K4 5.05 毫克。該沉澱物經矽膠薄層層析法檢測證明其不含有開環羊毛甾烷。

實施例三

茯苓藥材 100 公斤以 800 公斤水煮沸 3 小時後，靜置

冷卻至 50°C，以 5N NaOH 調節溶液至 pH 11，再攪拌溶液 3 小時。接著以離心機分離液體和固體，固體再以 800 公斤水加入，同上述方法，以 NaOH 調至 pH 11、攪拌和離心機分離，去掉固體。合併兩次液體，在 50°C 將液體真空濃縮至 100 公斤溶液，再加入 3N HCl 至 pH 6.5，產生沈澱物。分離出該沈澱物，再以 40 L H₂O 清洗，接著以離心機分離出沈澱物，加入 8 L 水噴霧乾燥(spray dry)，得到約 380 g 粉末。再以 4 L 之酒精萃取該粉末三次，合併萃取液並濃縮可得 238.9 克酒精萃取物。該萃取物經矽膠薄層層析法(TLC)檢測證明其不含有開環羊毛甾烷。該萃取物再經過 HPLC 分離，每克該萃取物可得主成分為 K2 214 mg，K3 23 mg，K4 24 mg 及少量成分 K1 4.52 mg，即萃取物每克約含 265 mg 羊毛甾烷。

或以 4 L 之 50%酒精水溶液萃取該粉末，去除 50%酒精水溶液部份收取不溶之粉末，重覆三次可得 245.7 克之 50%酒精水溶液不溶物，經 TLC 法檢測顯示該不溶物不含開環羊毛甾烷，再經過 HPLC 純化分離該不溶物，每克可得主成分為 K2 214 mg，K3 23 mg，K4 24 mg 及少量成分 K1 4.52 mg，即萃取物每克約含 261 mg 羊毛甾烷。

實施例四

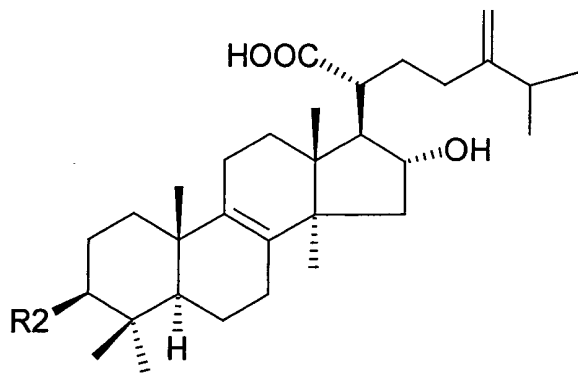
以雲南產茯苓 30 公斤，磨成粉後，利用 120 L 酒精(濃度 95%)萃取 24 小時，及過濾分離。再重復前述萃取及固液分離三次。合併濾液，並將之濃縮後得乾燥萃取物 265.2

克。再利用一兩相萃取劑(己烷：95%甲醇=1：1)對該乾燥萃取物進行分配萃取。取出甲醇層並加予濃縮後得到乾燥固體 246.9 克。利用矽膠管柱層析對該乾燥固體進行分離，該矽膠管柱填充有該乾燥固體重量 10-40 倍的矽膠，係購自 Merck 公司，Silica gel 60, 70-230 mesh。以二氯甲烷/甲醇混合液作為沖提劑(eluent)，依序以 96:4、90:10、0:100 比例的混合液進行沖提，溶離液(eluate)以矽膠薄層層析法(Thin Layer Chromatography) (紫外光燈及碘作檢測，展開液為二氯甲烷：甲醇=96:4)檢測成分，將相同成分合併。

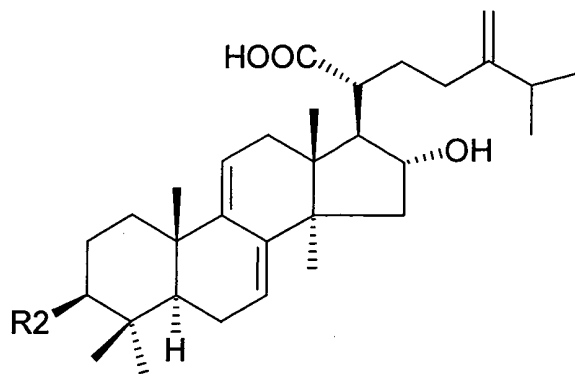
以二氯甲烷—甲醇(96:4)混合液進行矽膠管柱層析，可得到屬本發明的茯苓萃取物之 PCM 部份 78 克。PCM 部份依上述矽膠薄層層析法可明顯看到 6 個跡點。以二氯甲烷：甲醇(90:10)及(0:100)沖提液層析合併可得到 PCW 部份 168 克。

PCM 部份進一步以二氯甲烷：甲醇(96.5:3.5)作為沖提劑進行矽膠管柱層析(同上述矽膠管柱)，進一步分離可得純化之羊毛甾烷(lanostane)類成分 K1 (K1-1 及 K1-2), K2 (K2-1 及 K2-2), K3, K4, K4a, K4b, K5, K6a 及 K6b。詳細分離步驟及鑑定分析數據請參見 EP 1535619 A1。

上述之 K1 至 K6b 化合物，其結構如下：



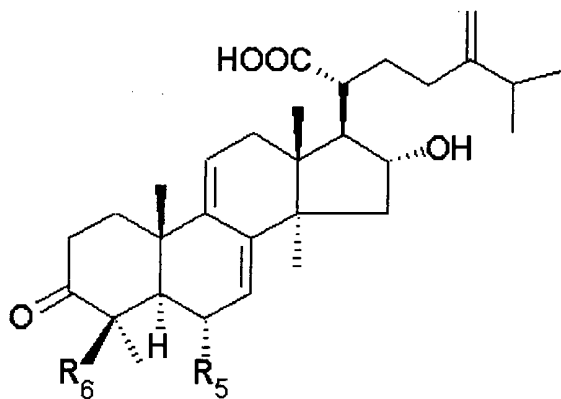
K1-1: $R_2 = \text{OCOCH}_3$ (茯苓酸 (pachymic acid, PA))



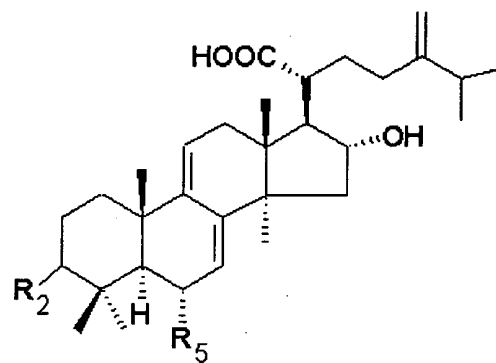
K1-2: $R_2 = \text{OCOCH}_3$ (微量) (去氫茯苓酸 (dehydropachymic acid, DHPA))

K2-1: $R_2 = \text{OH}$ (块苓酸 (tumulosic acid, TA))

K2-2: $R_2 = \text{OH}$ (微量) (去氫块苓酸 (dehydrotumulosic acid, DHTA))



K3: $R_6 = \text{CH}_3$ $R_5 = \text{H}$ (多孔蕈酸 C (polyporenic acid C, PPA))

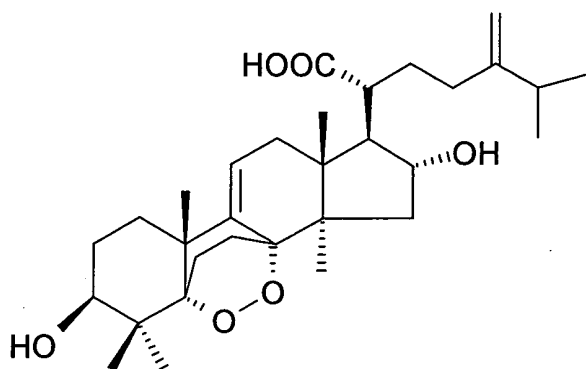


K4: $R_2 = \alpha\text{-OH}$ $R_5 = \text{H}$ (3-表脱氫块苓酸 (3-epidehydrotumulosic acid, EDHTA))

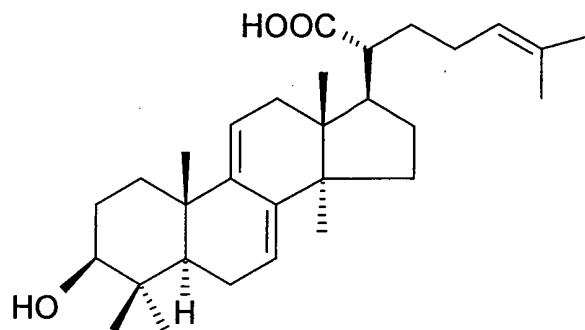
K4a: $R_6 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_5 = \text{H}$

K6a: $R_6 = \text{CH}_3$ $R_5 = \text{OH}$

K4b: $R_2 = \beta\text{-OCOCH}_3$ $R_5 = \text{OH}$



K6b



K5

從 PCM 部份分離出來羊毛甾烷化合物 K1 至 K6b 的產量如下表所示。PCM 部份含有約 15 重量%的羊毛甾烷化合物 K1 至 K6b。

K1	K2	K3	K4	K4a	K4b	K5	K6a	K6b
3.0 g	6.2 g	1.93 g	0.55 g	66 mg	86.8 mg	47.6 mg	21.4 mg	90.7 mg

實施例五：膠囊製備

依下列組成製備含有實施例四所製得的茯苓萃取物 PCM 成份的膠囊：

成份	每膠囊	每 30,000 膠囊
以實施例四方法製備的茯苓萃取物 PCM (含約 15 wt% 的 K1-K6 化合物)	11.2 mg	336.0 g
矽鋁酸鈉(Sodium silicoaluminate)	5.0 mg	150.0 g
馬鈴薯澱粉 (Starch Potato)	378.8 mg	11,364.0 g
硬脂酸鎂(Mangensium Sterate)	5.0 mg	150.0 g
小計	400 mg	12,000.0 g

將茯苓萃取物 PCM 與矽鋁酸鈉分別以 # 80 目(mesh) 篩網過篩，馬鈴薯澱粉以 # 60 目篩網過篩，硬脂酸鎂以 # 40 目篩網過篩後，置入混合機攪拌均勻，接著填充入壹號空膠囊，每顆膠囊含有約 1.68 mg (0.42 wt%) 的有效成份 K1-K6。

實施例六

茯苓三萜類化合物預防及治療第一型糖尿病試驗

進行下列細胞實驗之茯苓萃取物為由實施例二所製得者或示於圖 1 的純化合物。它們被溶在酒精:DMSO (9:1) 溶媒，所得溶液加入在培養盤上，其中每一個孔(well)僅加入最後體積之千分之一。

一、脂肪細胞培養

3T3-L1 為一種老鼠前脂肪細胞，型態為紡錘狀，當加入誘導劑培養 2-3 天後，可以觀察到細胞型態轉為圓型，而且細胞內有油滴累積，隨著分化天數增加，會分化的越完全。分化前的細胞，主要的葡萄糖轉運蛋白為 GLUT1，而分化後的細胞，則主要作用的葡萄糖轉運蛋白為 GLUT4，如細胞膜上的 GLUT4 蛋白數目愈多，血液中葡萄糖穿越細胞膜被細胞吸收的速度與量也愈大，血糖下降速度越快。此 3T3-L1 脂肪細胞內具有完整的胰島素活化葡萄糖吸收的系統，可以進行糖類代謝與胰島素信息路徑的研究，另外也可以觀察完整的脂質新生調節過程，因此分化的 3T3-L1 脂肪細胞為一具代表性且應用廣泛的模式細胞株，由於人體組織內真正的脂肪細胞難以繼代培養，故學術界一般使用此模式進行各項試驗及評估。

(a) 脂肪細胞培養：

3T3-L1 細胞於 DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) 及 37°C 培養箱 (5% 二氧化碳，95% 空氣) 中進行培養，該 DMEM 被添加 10% 成牛血清的 (calf serum)、100

IU/mL 青黴素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鏈黴素及 1% 非必需性胺基酸。待細胞完全長滿後，加入含脂肪細胞分化促進劑[含 0.5 mM 3-異丁基-1-甲基黃嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthane, IBMX)，1 μM 皮質類固醇激素(dexamethasone)，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰島素]之 10% FBS/DMEM 培養液培養二天，更換成含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰島素之 10%FBS/DMEM 培養液中二天後，再以每二天更換無胰島素培養液乙次進行培養 4-6 天。此時 3T3-L1 細胞將近 90% 形成脂肪細胞(adipocyte phenotype) 之型態後即可進行試驗。試驗進行前先以 PBS 溶液清洗 3T3-L1 細胞，再以無血清及無胰島素之 0.2% BSA/DMEM 培養液培養過夜，以去除血清及胰島素之干擾。

(b) 抑制葡萄糖轉運體 4 基因表達(mRNA)實驗之脂肪細胞培養：

利用攜帶抑制葡萄糖轉運體 4 核糖核酸之病毒載體 (TRCN0000043630 shRNA, 中央研究院基因體研究中心, 台灣) 感染 3T3-L1 前脂肪細胞(shG4-30)，以建立長期性抑制葡萄糖轉運體 4 基因表達，並以此株細胞分化後之脂肪細胞進行試驗。

(c) 檢測葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白質轉位實驗之脂肪細胞培養：

將帶有流行感冒病毒蛋白 HA 標幟之葡萄糖轉運體 4 (HA-GLUT4-GFP, Timothy E. McGraw 贈送, 美國紐約 Well Gornell 醫學院) 載體以 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) 轉染到 3T3-L1 前脂肪細胞，並利用

G418 篩檢出持續表達帶有流行感冒病毒蛋白 HA 標幟之葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白之脂肪細胞株，分化成脂肪細胞後進行葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位試驗評估。

二、2-去氧葡萄糖吸收評估

茯苓三萜類化合物促進 3T3-L1 脂肪細胞對於葡萄糖吸收的測試中，3T3-L1 前脂肪細胞被培養於 6-孔培養盤上，待細胞長滿以脂肪細胞分化促進劑進行分化刺激，待 7-12 天 3T3-L1 細胞成熟分化成脂肪細胞後，可用以進行葡萄糖吸收的測試。將前述脂肪細胞先置於無血清培養液(含 0.2% BSA/DMEM)過夜後，以含不同濃度的茯苓三萜類化合物的無血清細胞培養液，培養 2-6 小時後，用 PBS 溶液洗滌一次，改換以 KRP 緩衝液(20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, and 2 mM 丙酮酸鹽(pyruvate), pH 7.4 及 0.2% BSA)於 37°C 培養 3 小時後，再使用加入 0.2 μCi/mL 之 [¹⁴C] 2-去氧葡萄糖 [2-deoxy-D-[¹⁴C]-glucose (2-DG, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, U.K.)]和無放射性 0.1mM 2DG 之 0.2 ml 葡萄糖緩衝液來取代 KRP 緩衝液以開始葡萄糖的吸收實驗。5 分鐘後移出細胞並以 PBS 清洗來終止葡萄糖攝取。以 0.2 mL 之 0.2 %SDS 中溶解細胞並將 10 μL 之細胞溶離液轉置至含有過濾底盤之 UniFilter 盤中(Perkim-Elmer, Wellesley, MA, USA)於 37°C 真空烘箱中乾燥，並將在每孔中加入 30 μL 之計數溶液，利用微盤液體閃爍計數器 (TopCount, Packard NXT, Packard BioScience Company,

Meriden, CT, USA)分析。計算出累積在細胞內之葡萄糖含量，並除以蛋白質濃度，所得攝取速率係以每分鐘每毫克細胞蛋白質之奈莫耳葡萄糖(nmol/min/mg)來表示。蛋白質濃度可利用標準二辛可寧酸(Bicinchoninic acid; BCA)試劑(Pierce, Rockford, IL, USA)分析來測定。加入 0.2 μ Ci 之 L-[14 C]-葡萄糖以測量非特定葡萄糖的攝取，並與每個測定值中相減，而得到特定葡萄糖攝取量。觀察 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度的茯苓三萜類化合物的作用下對葡萄糖的吸收是否有所影響。

三、對葡萄糖轉運體 1 及 4 (GLUT 1 & 4)轉運蛋白之評估

茯苓三萜類化合物促進 3T3-L1 脂肪細胞之葡萄糖轉運體表達之測試中，同上述說明分化成熟之 3T3-L1 脂肪細胞以無血清細胞培養液培養過夜後，以含不同濃度之茯苓三萜類化合物之無血清細胞培養液培養 24 小時，再以 PBS 溶液清洗，接著以 0.2 ml 溶解細胞液[1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 0.5% 去氧膽酸鹽 (deoxycholate), 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10 mM β -磷酸甘油酯 (glycerophosphate), 10 μ g/mL 蛋白酵素抑制劑和磷酸酯酶 (phosphatase)抑制劑]作用 30 分(4 $^{\circ}$ C溫度下)。每一樣品經 SDS-10% 聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)電泳分離，轉漬至 PVDF 膜(Millipore, Bedford, MA, USA)。利用西方點墨法以專一性抗體，葡萄糖轉運體 1 抗體 (GLUT1, Abcam, Cambridge, MA)，葡萄糖轉運體 4 抗體 (GLUT4, R&D

systems, Minneapolis, MN), 及 β -肌動蛋白抗體 (β -Actin, Chemicon, Temecula, CA, USA), 來觀察 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度的茯苓三萜類化合物的作用下對葡萄糖轉運體蛋白質表達是否有影響。每一個樣品(蛋白)以化學冷光處理, 再暴露在 X 光片, 再以軟體分析含量。

四、葡萄糖轉運體 1 及 4 (GLUT1 & 4) 轉運蛋白之基因表達評估

利用即時定量聚合酵素鏈鎖反應 (Q-PCR) 對 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度的茯苓三萜類化合物的作用下對葡萄糖轉運體訊息核糖核酸 (mRNA) 之表達進行評估。將分化完全之 3T3-L1 脂肪細胞, 給予不同濃度的茯苓三萜類化合物 24 小時後, 去除細胞培養液後, 用 Trizol 試劑 (Invitrogen, Irvine, CA, USA) 提取總 RNA, 並取 1 μ g RNA 利用反轉錄試劑 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) 將 mRNA 反轉錄成 cDNA。分別針對葡萄糖轉運體 1、葡萄糖轉運體 4 及 β -肌動蛋白, 設計出專一引子 (primer), 及利用 SYBR Green Q-PCR 分析 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 擴增待測基因 (GLUT1 及 GLUT4) 及內參基因 (β -actin), 並以 StepOne v2.0 software (Applied Biosystems) 軟體以 $\Delta\Delta C_T$ 方法計算相對因表達值。

五、對葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位之評估

(1) 對葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位分析(一)

因胰島素促進脂肪細胞或肌肉細胞之葡萄糖吸收之機轉中, 葡萄糖轉運體 4 (GLUT4) 轉運蛋白從細胞內胞器轉

位 (translocation) 到質膜 (plasma membrane (PM)) 扮演重要角色，故進行以茯苓三萜類化合物促進 3T3-L1 脂肪細胞之葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位到質膜之測試。分化成熟之 3T3-L1 脂肪細胞以無血清細胞培養液培養過夜後，再以含不同濃度之茯苓三萜類化合物之無血清細胞培養液培養 2 小時，接著以不同轉速高速離心 (16,000 g ~ 200,000 g)，將細胞之質膜部份 (plasma membrane (PM) fraction) 及低密度微粒體 (low density microsome (LDM)) 分離出 (Liu, L. Z. 等; *Mol Biol. Cell* 17, (5), 2322-2330, 2006)。利用西方點墨法以葡萄糖轉運體 4 的專一性抗體來觀察 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度的茯苓三萜類化合物的作用下對葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白從細胞之 LDM 轉位到質膜 (PM) 是否有影響。

(2) 對葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位分析(二)

將穩定表達 HA-GLUT4-GFP 蛋白之 3T3-L1 前脂肪細胞種於 96 孔培養盤，待長滿後以分化促進劑進行分化 (Govers, R. 等; *Mol Cell Biol.* 24 (14), 6456-6466, 2004)。將分化完全之 3T3-L1 脂肪細胞，給予不同濃度的茯苓三萜類化合物 2 小時，去除細胞培養液，用冰 PBS 清洗細胞。再以 4% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) 於室溫下固定細胞 15 分鐘，接著以冰 PBS 清洗 2-3 次，再加入針對 HA 之一級抗體 (12CA5) 培育 2 小時。以冰 PBS 清洗 2-3 次，加入共軛架接螢光染料鹽基桃紅精之二級抗體 (rhodamine-conjugated secondary antibody) (Leinco, Ballwin, MO) 培育細胞 1 小時。以冰 PBS 清洗 2-3 次，再以螢光免

疫分析儀 (POLARstar Galaxy; BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) 分別偵測鹽基桃紅精 (rhodamine) 及綠色螢光蛋白 (GFP) 之激發波長強度 (Em. 480/Ex. 425 nm 及 Em. 576 nm/Ex. 550 nm)，並以鹽基桃紅精對綠色螢光蛋白之比值評估 HA-GLUT4-GFP 轉位之質膜之相對量。因為僅有在 HA-tagged GLUT4 移位到質膜上時，才會被鹽基桃紅精標識，故此比值可用來評估葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白轉位到質膜之情形。

六、三酸甘油酯堆積及甘油釋放之影響

在茯苓三萜類化合物對 3T3-L1 脂肪細胞內的三酸甘油酯堆積和甘油之釋出的測試中，已分化成熟之 3T3-L1 脂肪細胞以無血清細胞培養液培養過夜，再以含不同濃度之茯苓三萜類化合物之無血清細胞培養液培養 24 小時。收集培養液以甘油檢測試劑 (glycerol assay kit (Randox Laboratories, Antrim, UK)) 進行甘油釋出檢測，觀察 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度的茯苓三萜類化合物的作用下對脂肪分解的甘油釋出是否有所影響。脂肪細胞內三酸甘油酯檢測利用油紅染色法 (Oil-Red O staining) 進行 (Ramirez-Zacarias, J. L. 等; *Histochemistry* 97, (6), 493-497, 1992)。將細胞內脂質堆積形成的脂肪油滴染色，經 60% 異丙醇洗滌二次，再以 100% 異丙醇萃取後，檢測 490 nm 吸光值。以未給予茯苓三萜類化合物之脂肪細胞之吸光值進行比較，來評估不同濃度的茯苓三萜類化合物作用下對脂肪細胞的三酸甘油酯堆積之影響。

實驗結果說明茯苓三萜類化合物如同胰島素一樣具備下列四種性質，因此具有治療第一型糖尿病患的能力：

(一) 茯苓成分或萃取物於脂肪細胞模式下具促進葡萄糖從細胞外吸收進入細胞內之能力：

茯苓萃取物(實施例二)在成熟脂肪細胞之評估，如圖 2A 結果顯示茯苓萃取物具有顯著增加葡萄糖吸收之作用，其促進吸收效果隨給與劑量增加而增加。如給予 100 nM 胰島素則一樣看到葡萄糖吸收。進一步以實施例二之純化合物作試驗。如圖 2B 所示，純化合物給予脂肪細胞二小時後，其中三個化合物茯苓酸(PA)、塊苓酸(TA)及多孔甾酸 C (PPA)於 0.01 μ M 顯著增加糖吸收分別增加至 165.89 %，142.5 %及 147.9 %。其中以 PA 增加程度最為顯著，故後續試驗之評估均以 PA 進行試驗。

圖 3A 顯示，PA 隨投予時間之增加而促使糖吸收隨之增加，而以投予 2 小時之增加最為顯著(增加 165.89%)另外，PA 隨投予濃度之增加，糖吸收之促進程度亦隨之增加，1 μ M PA 時，增加至 209.84%，如圖 3B 所示。

如圖 4 結果所示，PA 促進糖吸收效果僅對已分化之脂肪細胞，對於前脂肪細胞 PA 無促進葡萄糖吸收之效果。如對前脂肪細胞及成熟脂肪細胞二者給予葡萄糖轉運體轉運蛋白抑制劑(PT, phloretin)後觀察到二種細胞之促進吸收能力大幅被抑制。跟據文獻前脂肪細胞僅有葡萄糖轉運體-1 (GLUT1)轉運蛋白，而成熟脂肪細胞則為葡萄糖轉運體-4

(GLUT4)轉運蛋白，故 PA 之作用應為增加 GLUT4 而增加糖吸收。

(二) 茯苓三萜類化合物 PA 對成熟脂肪細胞有顯著誘導葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白質 (GLUT4) 及信息核糖核酸 (mRNA) 之表達

圖 5 結果顯示，對成熟脂肪細胞給予不同劑量之 PA，作用 24 小時後，以西方點墨法分析葡萄糖轉運體 1 及 4 轉運蛋白 (GLUT1, 4)，進行評估 PA 對 GLUT1 及 GLUT4 轉運蛋白表達的影響，結果 PA 具促進 GLUT4 轉運蛋白表達之效果 (圖 5A)，而其不具有促進 GLUT1 轉運蛋白之表達效果 (圖 5B)。

以定量聚合酵素鏈鎖反應 (Q-PCR) 及以專一之探針來觀察 PA 對成熟之 3T3-L1 脂肪細胞在不同濃度作用下對葡萄糖轉運體訊息核糖核酸 (mRNA) 之表達進行評估，圖 6 結果顯示，1 μ M PA 促進 GLUT4 基因表達至 228%。顯示 PA 具調節增加 GLUT4 基因及蛋白質表達之能力。另外利用干擾訊息核糖核酸技術建立持續性降低 GLUT4 轉運蛋白之 3T3-L1 脂肪細胞 (圖 7A)，並以此脂肪細胞進行糖吸收評估，如圖 7B 所示，所有 PA 之不同劑量均無法促進該脂肪細胞之糖吸收，進一步證實 PA 之促進糖吸收與 GLUT4 轉運蛋白有直接關係。

(三) PA 對成熟脂肪細胞具有促進 GLUT4 轉運蛋白從細胞內轉位移至質膜之功效

胰島素促進糖吸收之機轉之一為促使大量 GLUT4 由

細胞內胞器轉位到質膜(PM)上進行糖吸收。故利用具備完整的胰島素活化葡萄糖吸收的系統的 3T3-L1 成熟脂肪細胞進行 GLUT4 轉運蛋白轉位效能評估。由圖 8A 結果觀察利用超高速離心方法所分離之質膜(PM)之西方點墨法觀察到 0.01 μM PA 顯著增加 GLUT4 於質膜量達到 141%，隨劑量增加到 1 μM 則增加至 328%。而利用持續表達 HA-GLUT4-GFP 蛋白之 3T3-L1 脂肪細胞方式及螢光檢測，再次確認 PA 促進糖吸收為增加 GLUT4 轉運蛋白轉位到質膜所導致。圖 8B 結果觀察到於 PA 劑量 1.0 μM 時 GLUT4 轉運蛋白轉位到質膜顯著增加達 2.71 倍。上述結果證實 PA 確實具有促進 GLUT4 轉運蛋白轉位到質膜之能力。

(四) PA 具促進脂肪細胞三酸甘油酯累積及減少脂肪細胞釋放甘油至細胞培養液之能力

除了觀察 PA 促進糖吸收，也觀察脂肪細胞之影響，我們評估脂肪細胞三酸甘油酯合成(儲存)及脂肪分解(甘油釋出)情形。圖 9 結果所示，給予不同劑量之 PA 24 小時，以油紅染色方法評估三酸甘油酯累積情形，觀察到三酸甘油酯累積超過 137%，PA 給予也觀察到甘油釋出降至原本 70% 以下。顯示 PA 具有促進脂肪新生及抑制脂肪分解之能力。

【圖式簡單說明】

圖 1 示出由茯苓分離純化所得之羊毛甾烷型三萜類化合物的結構。

圖 2A 顯示茯苓萃提取物促進 3T3-L1 脂肪細胞糖吸收。圖 2B 顯示胰島素(0.1 μM)作用 30 分鐘及純化之三萜類化合物於 0.01 μM 劑量二小時反加糖測試下促進糖吸收。數據以平均值 \pm 標準誤差(n=6)表示。* p <0.05, ** p <0.01 與對照組(不給藥)比較。

圖 3A 顯示茯苓酸(PA)於 0.01 μM 劑量下給予二小時吸收速率最高。圖 3B 顯示給予不同劑量之 pachymic acid (PA) 隨劑量增加，糖吸收有增加趨勢。PA 作用 2 小時後，再加入糖測驗，數據以平均值 \pm 標準誤差(n=6) 表達，* p <0.05, ** p <0.01 與對照組(不給藥)比較

圖 4 顯示 PA 促進糖吸收僅作用於分化成熟之脂肪細胞。如將未成熟與成熟脂肪細胞除加入 PA 處理 2 小時外，另外加入或不加入葡萄糖轉運蛋白抑制劑(PT)則顯著抑制二種細胞之糖吸收作用也抑制 PA 之糖吸收促進作用。數據以平均值 \pm 標準誤差(n=6)表示。* p <0.05, ** p <0.01 與對照組比較。

圖 5A 顯示 PA 不具有促進葡萄糖轉運體 1 (GLUT1)轉運蛋白表達之能力。而圖 5B 顯示 PA 具有促進葡萄糖轉運體 4 (GLUT4)轉運蛋白表達之能力。分化成熟細胞以不同濃度 PA 處理 24 小時，然後分析 GLUT1 及 GLUT4 轉運蛋白，數據以平均值 \pm 標準誤差(n=3)表示。* p <0.05, ** p <0.01 與對照組(不給藥)作比較。

圖 6 顯示 PA 具有促進 GLUT4 mRNA 表達的能力，其中分化成熟細胞分別以胰島素(0.1 μM)及 0.01 μM PA 處理

24 小時，然後分析 GLUT1 及 GLUT4 mRNA 之表達，數據以平均值±標準誤差 (n=3) 表示。*p<0.05，**p<0.01 與對照組作比較。

圖 7 顯示對抑制 GLUT4 mRNA 的表達的脂肪細胞 PA 不具促進糖吸收之能力。成熟脂肪細胞與抑制 GLUT4 mRNA 表達的脂肪細胞 (shG4-30) 二者以不同濃度 PA 及胰島素處理，然後分析 GLUT4 轉運蛋白 (圖 7A) 及其糖吸收能力 (圖 7B)，數據以平均值±標準誤差 (n=6) 表示。*p<0.05，**p<0.01 與對照組作比較。

圖 8A、通過分析由離心方法分離的不同細胞膜層之 GLUT4 轉運蛋白，顯示 PA 具有促進葡萄糖轉運體 4 轉運蛋白從細胞內胞器轉運到細胞膜之能力。圖 8B、以螢光分析完整細胞之細胞膜層之 GLUT4 轉運蛋白，顯示 PA 具有促進 GLUT4 從細胞內胞器轉運到細胞膜之能力。數據以平均值±標準誤差 (n=3) (圖 8A)，(n=6) (圖 8B) 表示。*p<0.05，**p<0.01 與對照組 (不給藥) 作比較。

圖 9 顯示 PA 具有促進脂肪細胞三酸甘油酯合成及抑制脂肪分解 (產物甘油) 產生之能力。成熟之脂肪細胞以胰島素 (0.1 μ M) 及不同濃度 PA 處理 24 小時，數據以平均值±標準誤差 (n=6) 表示。*p<0.05，**p<0.01 與對照組作比較。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98129136

A61K 36/076 (2005.01)

※申請日： 98. 8. 28

※IPC 分類：

A61K 31/575 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 3/10 (2006.01)

以羊毛甾烷及茯苓萃取物治療糖尿病的用途

USE OF LANOSTANE AND PORIA EXTRACT IN TREATING
DIABETIC

二、中文發明摘要：

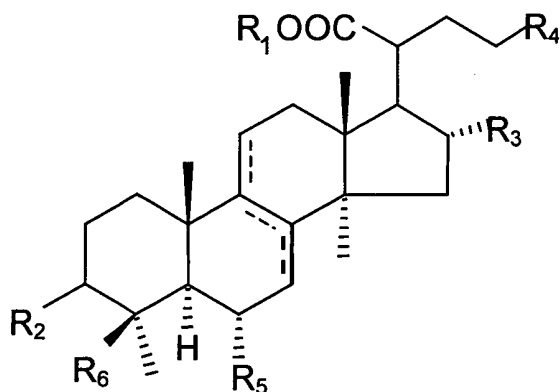
本發明提供一種用於治療糖尿病的醫藥組合物，其包含羊毛甾烷化合物作為有效成分。此羊毛甾烷化合物的一合適來源為茯苓萃取物，其包含 1-60 重量%的羊毛甾烷類化合物且實質上不含開環羊毛甾烷類化合物。該萃取物係萃取自多孔菌科植物茯苓菌 (*Poria cocos* (Schw) Wolf) 之代謝產物、菌絲或醱酵產物。

三、英文發明摘要：

A pharmaceutical composition for treating diabetic is provided in this invention. The composition contains a lanostane compound as a potent component. A suitable source of the lanostane compound is a *Poria* extract from metabolite, sclerotium, or fermentation product of *Poria cocos* (Schw) Wolf. The *Poria* extract contains 1-60% of the lanostane compounds by weight of the extract, and is devoid of secolanostane.

七、申請專利範圍：

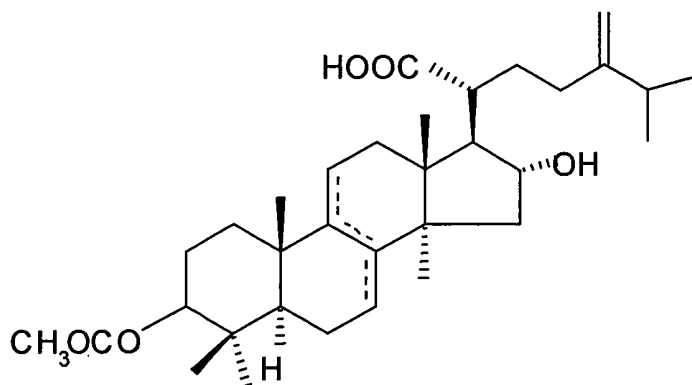
1. 一種使用具下列化學式(I)的羊毛甾烷或其醫藥上可接受的鹽作為有效成分在製備一種用於治療哺乳類動物因血中胰島素不足所引起的糖尿病藥物的用途，

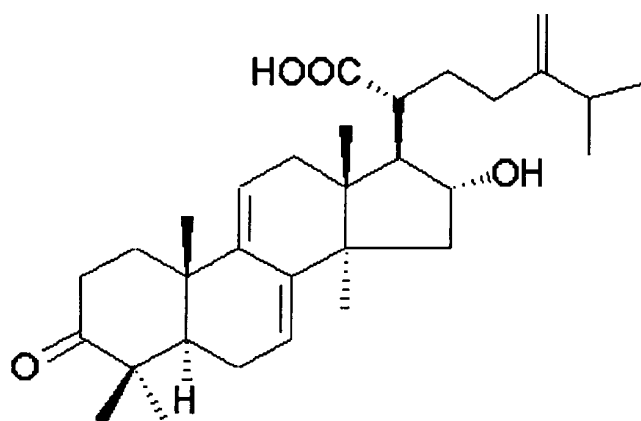
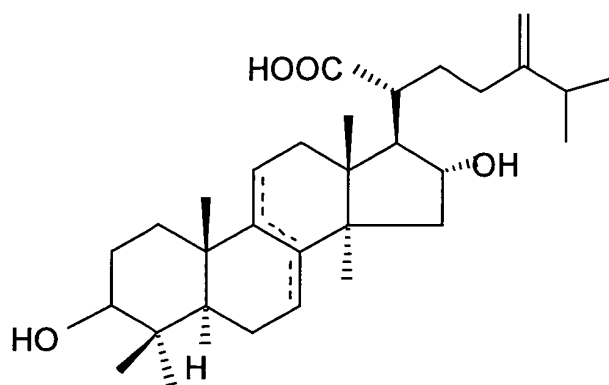


(I)

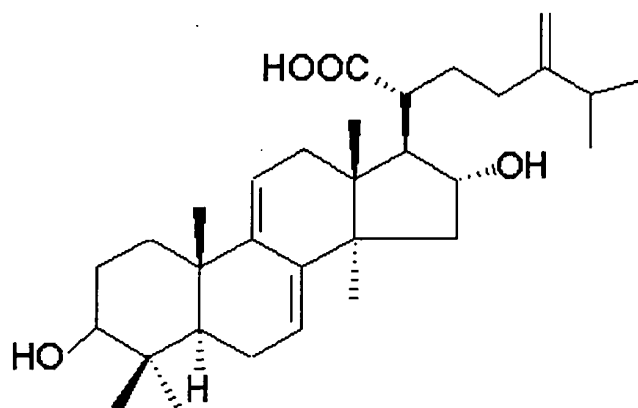
於式中 R_1 為 H 或 CH_3 ； R_2 為 $OCOCH_3$ ， $=O$ 或 OH ； R_3 為 H 或 OH ； R_4 為 $-C(=CH_2)-C(CH_3)_2R_a$ ，其中 R_a 為 H 或 OH ，或 $-CH=C(CH_3)-R_b$ ，其中 R_b 為 CH_3 或 CH_2OH ； R_5 為 H 或 OH ；及 R_6 為 CH_3 或 CH_2OH 。

2. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該羊毛甾烷(I)具有下列化學式：

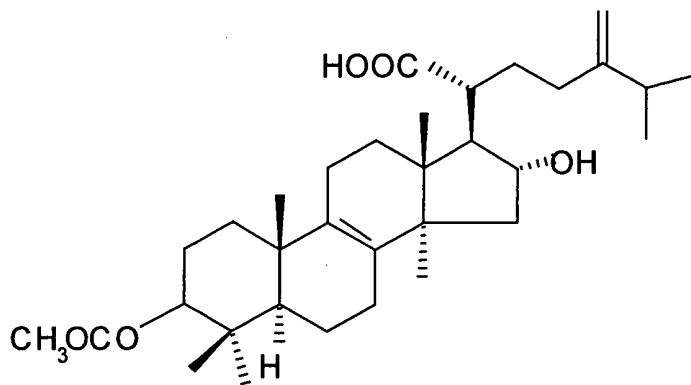




或



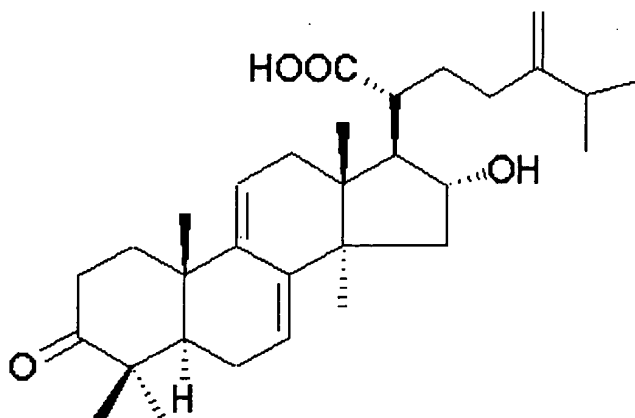
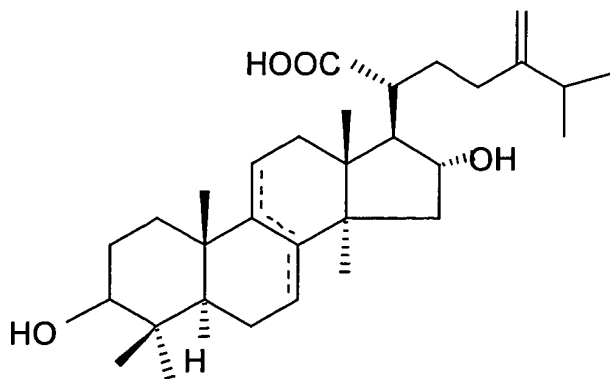
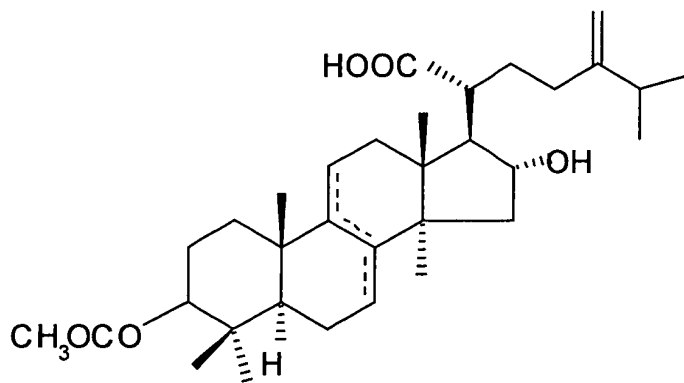
3. 如申請專利範圍第2項的用途，其中該羊毛甾烷(I)具有下列化學式：



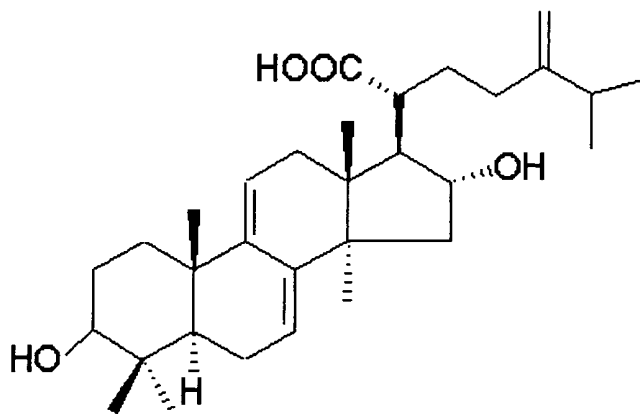
4. 如申請專利範圍第1項的用途，其中該藥物為注射劑型。
5. 如申請專利範圍第1項的用途，其中該藥物為口服劑型。
6. 如申請專利範圍第1項的用途，其中該糖尿病為第一型糖尿病。
7. 如申請專利範圍第1項的用途，其中該糖尿病為第二型糖尿病。
8. 如申請專利範圍第1項的用途，其中該哺乳類動物為人類。
9. 一種使用茯苓萃取物作為有效成分在製備一種用於治療哺乳類動物因血中胰島素不足所引起的糖尿病藥物的用途，其中該茯苓萃取物包含1-60重量%的具申請專利範圍第1項所述的羊毛甾烷(I)且實質上不含開環羊毛甾烷。

10. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該茯苓萃取物包含包含5-35重量%的羊毛甾烷(I)。

11. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該羊毛甾烷(I)具有下列化學式：



或



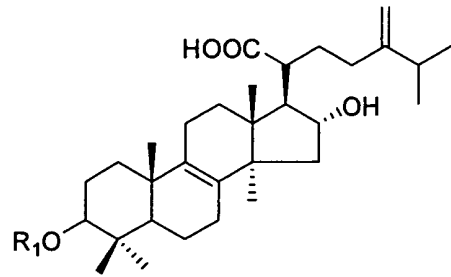
12. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該藥物為口服劑型。

13. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該糖尿病為第一型糖尿病。

14. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該糖尿病為第二型糖尿病。

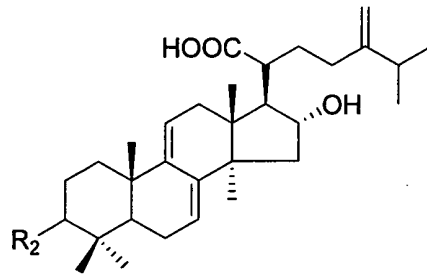
15. 如申請專利範圍第9項的用途，其中該哺乳類動物為人類。

圖 1



$R_1: \text{COCH}_3$ (PA)

$R_1: \text{H}$ (TA)



$R_2: \blacktriangleleft \text{OCOCH}_3$ (DHPA)

$R_2: \blacktriangleleft \text{OH}$ (DHTA)

$R_2: =\text{O}$ (PPA)

$R_2: \cdots\text{OH}$ (EDHTA)

圖 2A

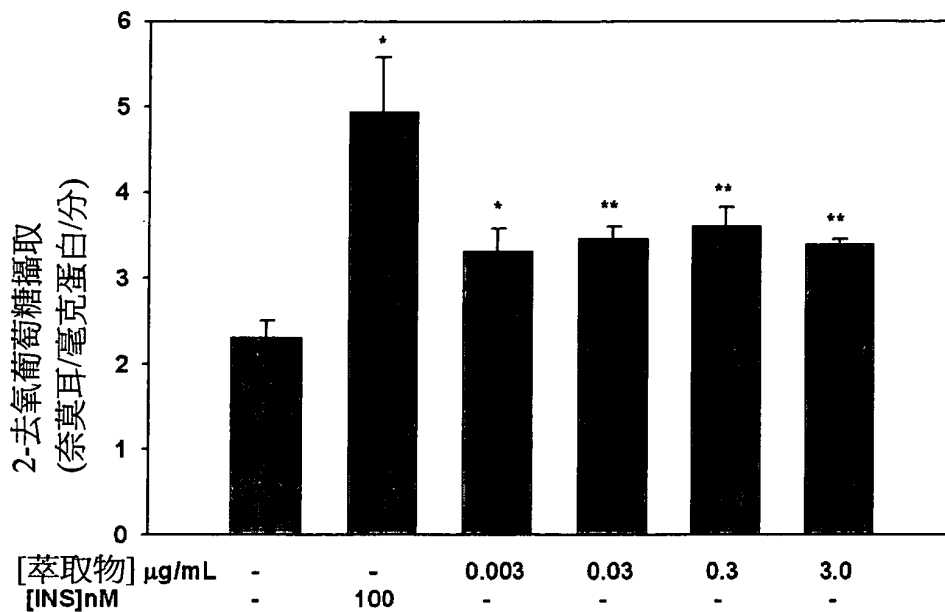


圖 2B

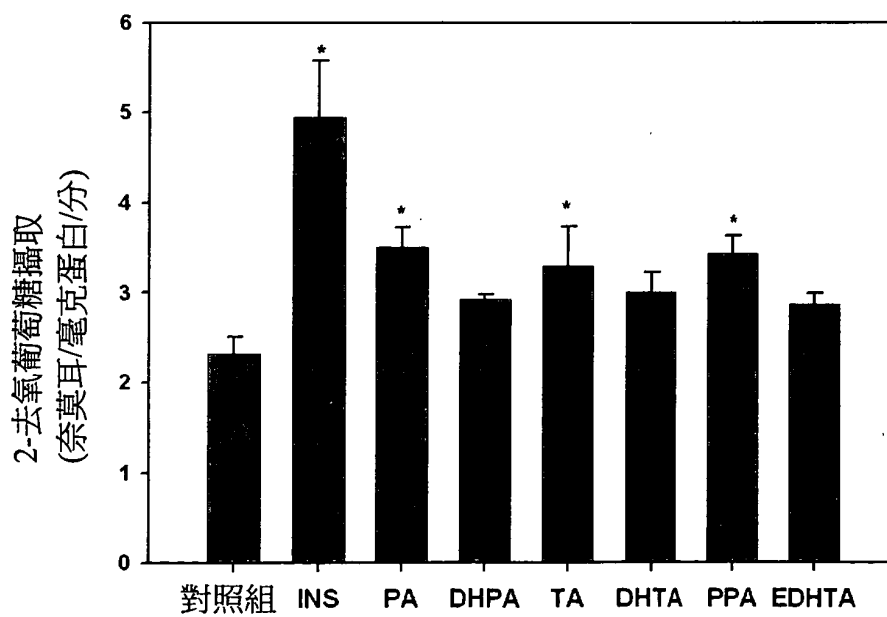


圖 3A

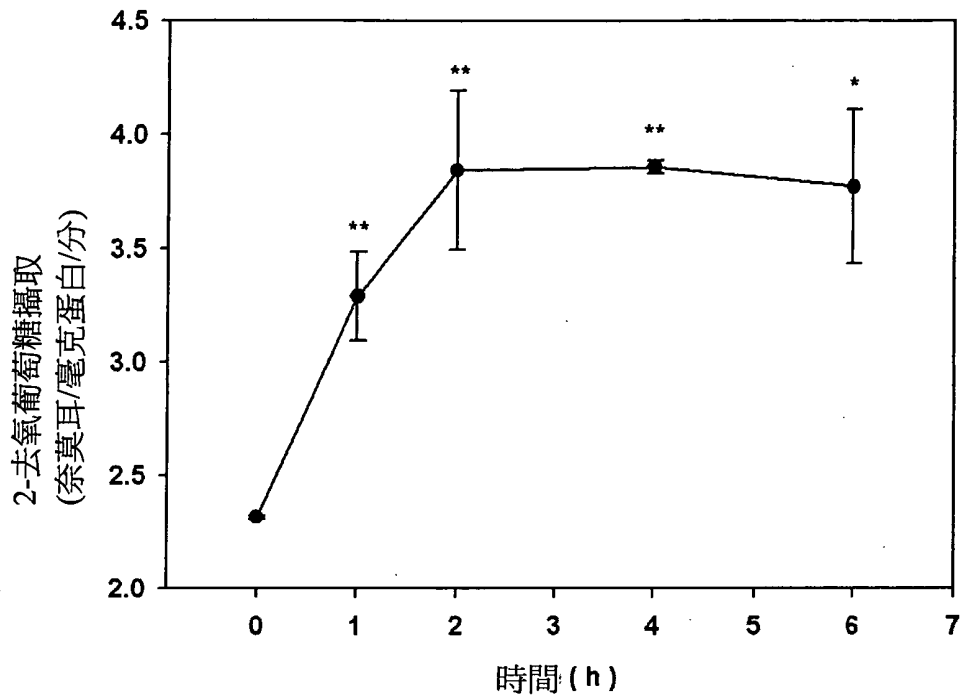


圖 3B

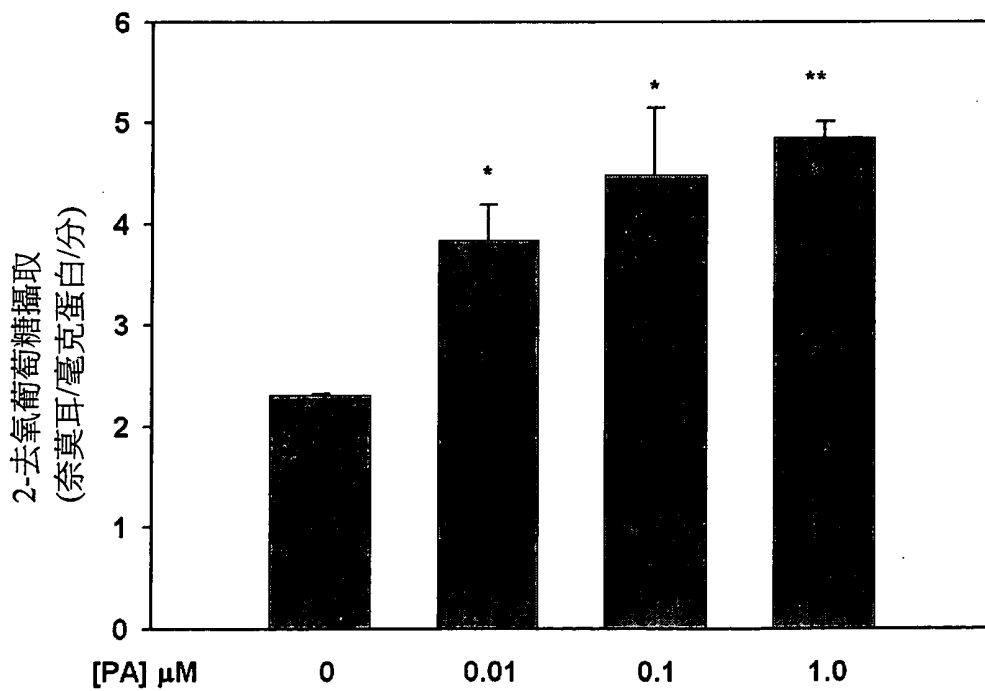


圖 4

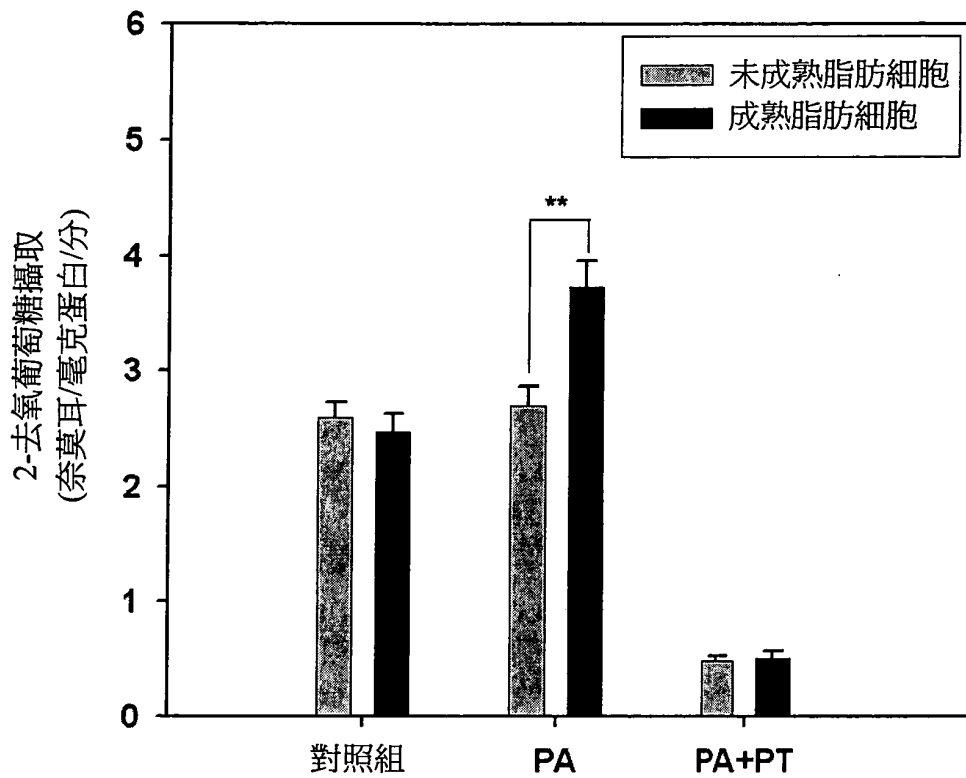


圖 5A

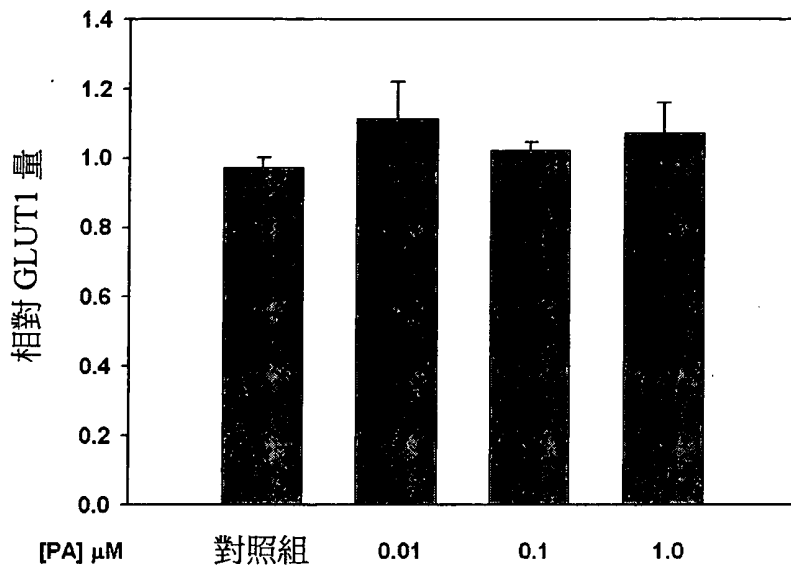


圖 5B

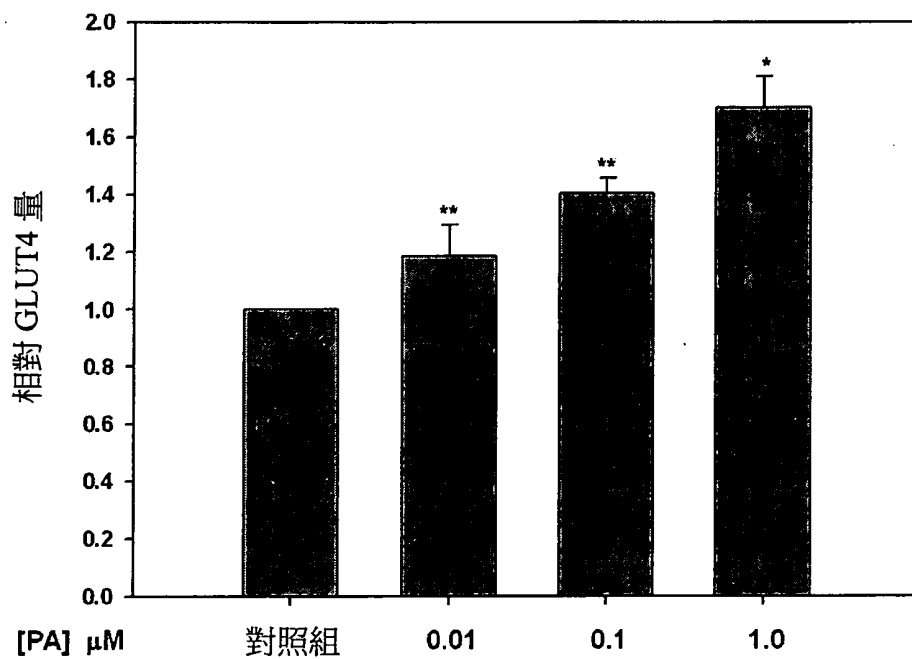


圖 6

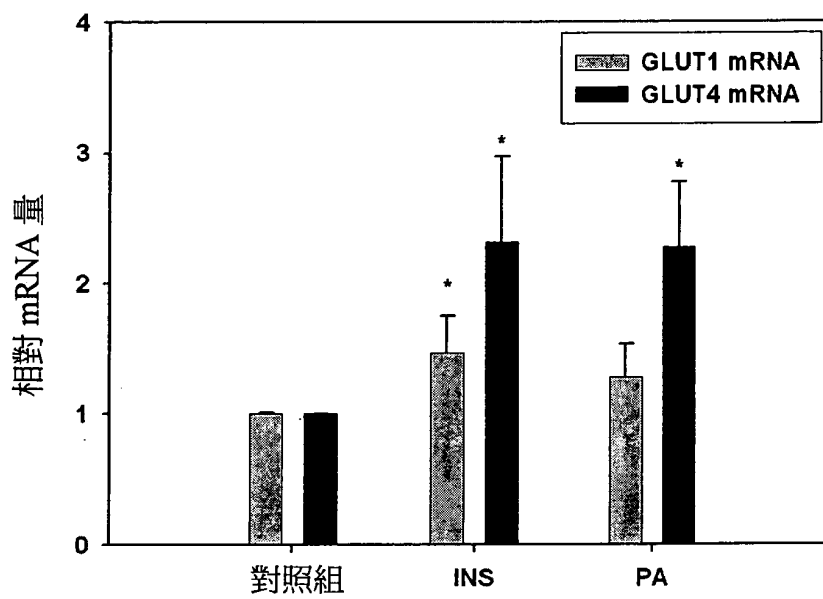


圖 7A

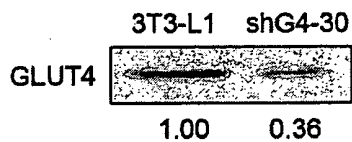


圖 7B

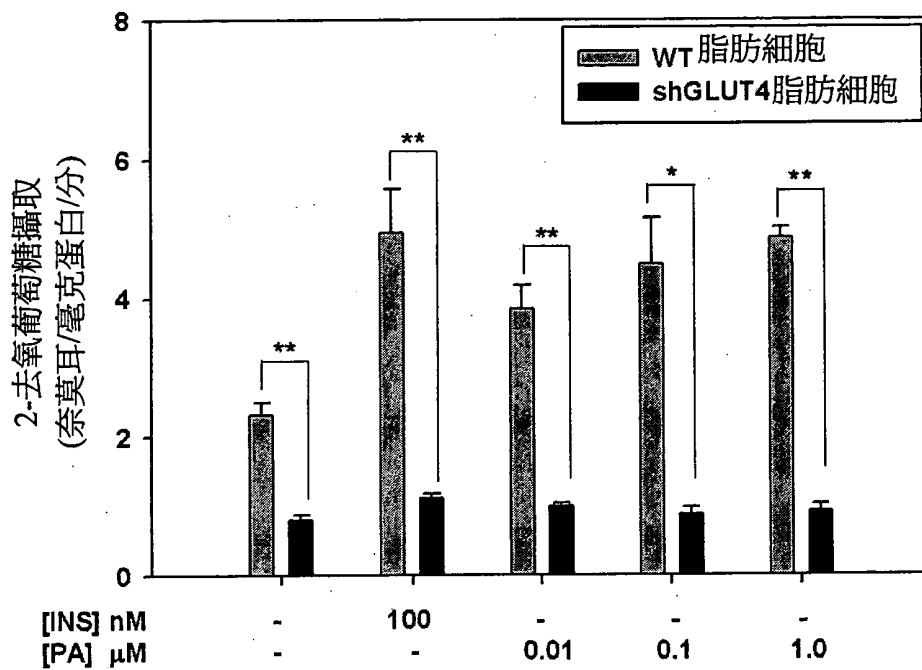


圖 8A

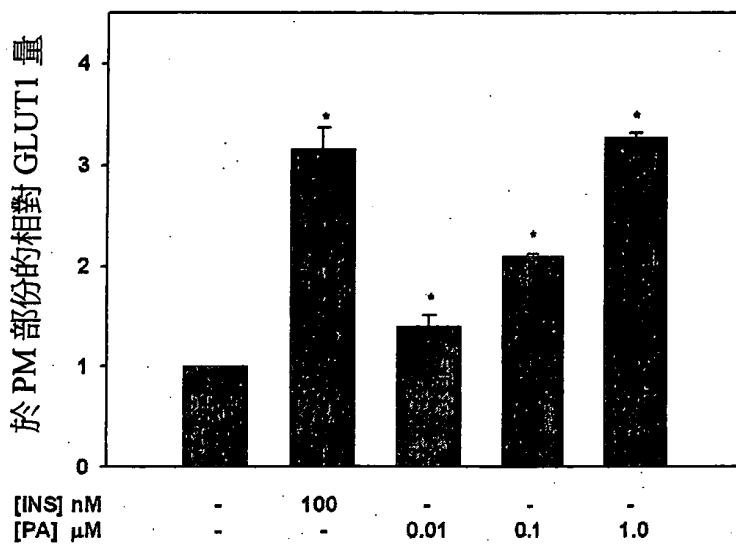
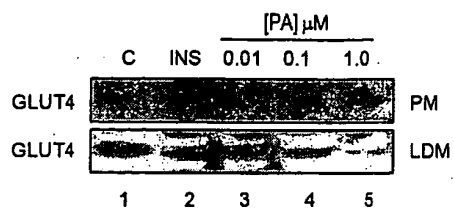


圖 8B

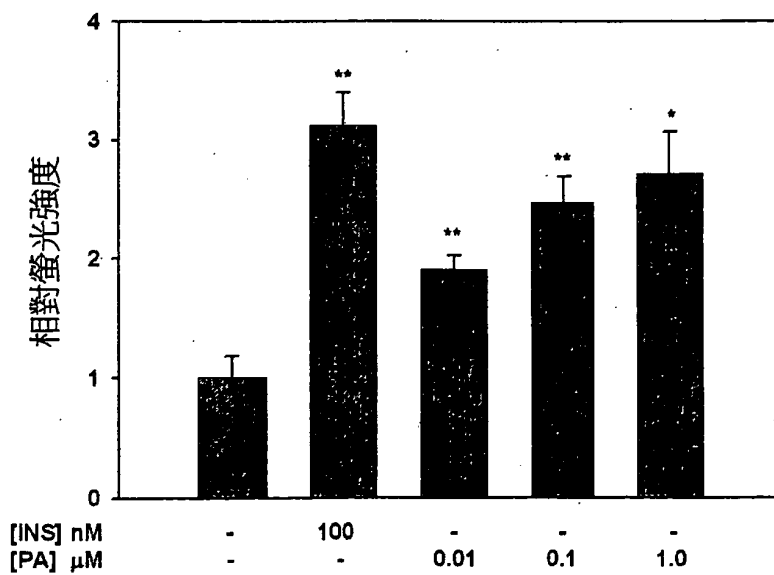


圖 9A

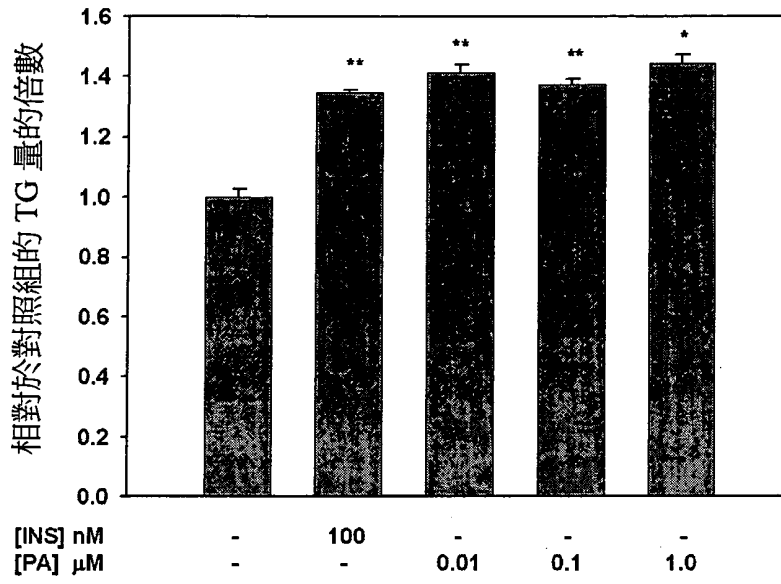
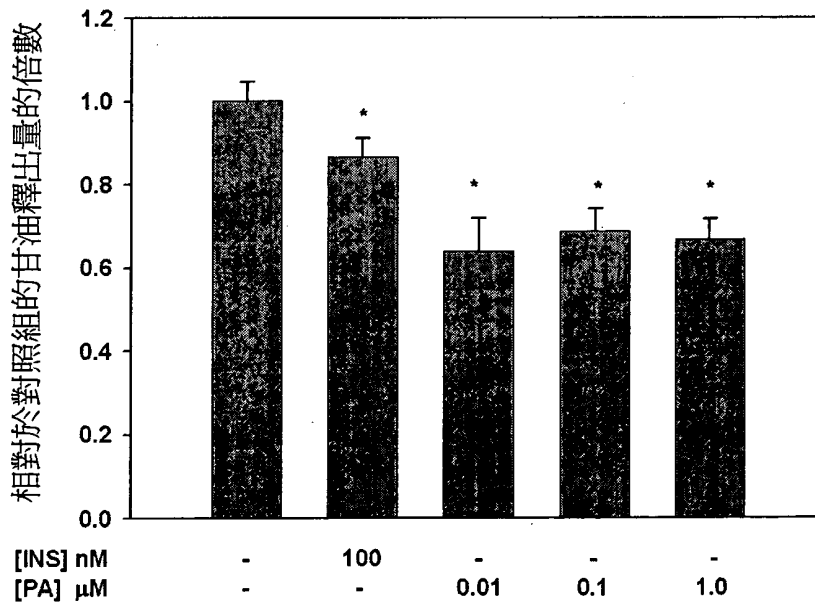


圖 9B



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

【無】

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

