

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/35

A61K 31/70 A23L 1/22

A23L 2/56 A61P 1/16



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98810708.2

[45] 授权公告日 2003 年 10 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1124134C

[22] 申请日 1998.10.20 [21] 申请号 98810708.2

[30] 优先权

[32] 1997.10.28 [33] KR [31] 55579/1997

[32] 1998.3.28 [33] KR [31] 10889/1998

[32] 1998.4.1 [33] KR [31] 11450/1998

[32] 1998.4.8 [33] KR [31] 12411/1998

[32] 1998.4.14 [33] KR [31] 13283/1998

[86] 国际申请 PCT/KR98/00323 1998.10.20

[87] 国际公布 WO99/21548 英 1999.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2000.4.28

[71] 专利权人 韩国科学技术研究院

地址 韩国汉城

[72] 发明人 卜成海 郑泰淑 崔明淑 文锡植

权容国 李恩淑 玄柄和 崔良圭

李哲浩 裴基焕 朴镛福 李准圣

孙光熙 权炳穆 金永国 崔度一

金成郁 黄仁奎 安贞娥 朴永培

金孝洙 崔盛俊

[56] 参考文献

JP8280358A 1996.10.29 A23L1/0528

JP8283154A 1996.10.29 A61K31/35

US4297348 1981.10.27 A61K31/70

审查员 王晶晶

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

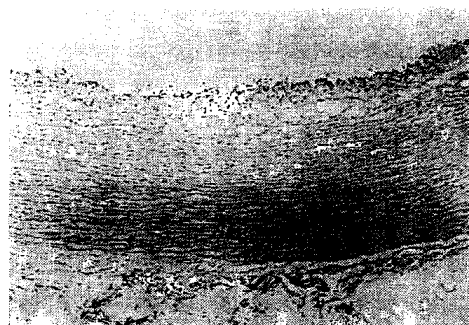
代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 6 页

[54] 发明名称 柚苷和柚苷配基作为肝病的预防或治疗剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及柚苷和柚苷配基在哺乳动物中抑制酰基 CoA - 胆固醇 - O - 酰基转移酶 (ACAT) 的活性、抑制巨噬细胞 - 脂质复合物在动脉壁上的累积、以及预防或治疗肝病的应用。



ISSN 1008-4274

1、柚苷或柚苷配基在制备用于预防或治疗哺乳动物之脂肪肝的组合物中的应用。

2、如权利要求 1 所述的应用，其中，所述哺乳动物是人。

3、如权利要求 1 所述应用，其中，所述组合物选自于以下组中：
药物组合物、食品组合物和饮料组合物。

4、如权利要求 3 所述的应用，其中，在食品组合物中包含的柚苷或柚苷配基的含量为 0.01—5 重量%。

5、如权利要求 3 所述的应用，其中，所述食品组合物是肉食、巧克力、小吃、糖果、意大利馅饼、由谷粉制成的食品、口香糖、乳制品、汤、肉汤、稀粥、番茄沙司、调味汁、维生素复合物、或保健食品。

6、如权利要求 5 所述的应用，其中，所述由谷粉制成的食品是面包、蛋糕、苏打饼干、曲奇饼干、饼干、或面条。

7、如权利要求 3 所述的应用，其中，所述饮料组合物是乳制品、

蔬菜汁、果汁、茶、酒精饮料或碳酸饮料

8、如权利要求 3 所述的应用，其中，在饮料组合物中的柚苷或柚苷配基含量为每 1000 ml 饮料 200—10000 mg。

柚苷和柚苷配基作为肝病的预防或治疗剂的应用

发明领域

本发明涉及柚苷和柚苷配基在哺乳动物中抑制酰基 CoA—胆固醇—O—酰基转移酶（ACAT）的活性、抑制巨噬细胞—脂质复合物在动脉壁上的累积、以及预防或治疗肝病的应用。

发明背景

近些年来，冠状心血管循环疾病，例如动脉粥样硬化和高胆固醇血症，已逐渐成为主要的致死原因。已有报道称，血浆胆固醇浓度增高导致脂肪、巨噬细胞和泡沫细胞沉积在血管壁上，此等沉积则导致斑块形成，并由此引发动脉粥样硬化（Ross, R., Nature, 362, 801-809 (1993)）。降低血浆胆固醇浓度的方法之一是饮食料法，以降低胆固醇和脂质的摄入。另一种方法是通过抑制其中所涉及的酶来抑制胆固醇的吸收。

酰基 CoA—胆固醇—O—酰基转移酶（ACAT）促进血液中胆固醇的酯化。泡沫细胞是在 ACAT 的作用下形成的，并包含大量的由低密度脂蛋白携带的胆固醇酯。泡沫细胞在动脉壁上的形成随 ACAT 的活

性而增加，因此 ACAT 的抑制剂也可以是防止动脉粥样硬化的药剂。

另外，已有人报道 LDL-胆固醇的血浓可通过抑制 ACAT 的活性来降低 (Witiak, D. T.和 D. R. Feller (eds.), *Anti-Lipidemic Drugs: Medicinal, Chemical and Biochemical Aspects*, Elsevier, pp 159-195 (1991))。

另一方面，由于过度摄入酒精或具有高脂质含量的食品、或者感染肝炎 B 或 C 病毒有可能发生肝功能的损坏，并有可能发展为肝炎、肝硬变或肝癌。具体而言，过量摄入含脂肪的食品和酒精导致脂肪肝，其中在肝组织中沉积了大量的脂质类物质，而且血清 GOT (谷氨酸-草酰乙酸转氨酶)、GPT (谷氨酸-丙酮酸转氨酶) 和 γ -GTP (γ -谷氨酰基转肽酶) 升高 (T. Banciu 等人, *Med. Interne.*, 20, 69-71 (1982); 以及 A. Par 等人, *Acta. Med. Acad. Sci. Hung.*, 33, 309-319 (1976))。

已进行了许多努力来研制可以抑制 ACAT 活性的药物；其结果是已有几种从各种微生物的培养物中分离出的化合物。此等化合物的例子包括从 *Aspergillus fumigatus* 的培养物中分离出的 pyripyropenes (S. Omura 等人, *J. Antibiotics*, 46, 1168-1169 (1993)); 以及从 *Pseudomonas* sp. 中分离出的 Acaterin (S. Nagamura 等人, *J. Antibiotics*, 45, 1216-1221 (1992))。

另外，作为高胆固醇血症的治疗剂，Merck Co., USA 已研制并销售称为 Lovastatin®的 HMG-CoA 还原酶抑制剂。但是，已知该药物会诱发肝脏中肌酸激酶增加的副作用。

因此，仍有必要继续研制无毒性的 ACAT 和巨噬细胞-脂质复合物在动脉上皮上累积的抑制剂、以及肝病预防或治疗剂。

本发明的发明者努力由天然物质研制新型且强效的 ACAT 抑制剂、巨噬细胞—脂质复合物累积抑制剂以及肝病治疗剂，其结果是发现柚苷或柚苷配基具有强效 ACAT 抑制活性、巨噬细胞—脂质复合物累积抑制活性、以及对肝病的预防或治疗活性。

柚苷 ($C_{27}H_{32}O_{14}$, M.W.: 580.53) 和柚苷的配基——柚苷配基 ($C_{15}H_{12}O_5$, M.W.: 272.25) 是存在于柠檬、葡萄柚、柑桔、枸橼和橙中的生物类黄酮 (Horowitz, Gentili, Tetrahedron, 19, 773 (1963))。

已有报道称，柚苷或柚苷配基具有抗癌、抗病毒和降低胆固醇的活性 (Monforte, M. T.等人, Farmaco., 50 (9), 595-599 (1995, Sep.); JP 95-86929; JP 95-86930; Felicia, V.等人, J. Med. Virol., 15, 71-79 (1985); EP 0352147 A2 (1990. 1. 24); 以及 Martin, M. J.等人, Pharmacol., 49, 144-150 (1994))。

另外，柚苷已被用作苦味剂、甜味剂或口香糖基质。

但是，目前尚没有人报道柚苷或柚苷配基的 ACAT 抑制活性、巨噬细胞—脂质复合物累积抑制活性、以及对肝病的预防或治疗活性。

发明简述

因此，本发明的目的是提供柚苷或柚苷配基抑制哺乳动物中 ACAT 活性的新用途。

本发明的另一个目的是提供柚苷或柚苷配基抑制哺乳动物中巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮壁上累积的新用途。

本发明的再一个目的是提供柚苷或柚苷配基预防或治疗哺乳动物中

肝病的新用途。

附图简述

参考以下附图及描述，本发明的上述和其他目的及优点将更为显而易见，在附图中：

图 1A、1B 和 1C 显示了分别给药 1%胆固醇、1%胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin[®]、以及 1%胆固醇及 0.1%柚苷的兔动脉；以及

图 2A、2B 和 2C 代表分别给药 1%胆固醇、1%胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin[®]、以及 1%胆固醇及 0.1%柚苷的兔肝脏的显微特征。

发明详述

根据本发明的一个方面，其提供柚苷或柚苷配基抑制哺乳动物中酰基 CoA—胆固醇—O—酰基转移酶（ACAT）活性的新用途。

根据本发明的另一个方面，其提供柚苷或柚苷配基抑制哺乳动物中巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮壁上累积的新用途。

根据本发明的再一个方面，其提供柚苷或柚苷配基预防或治疗哺乳动物中肝病的新用途。

柚苷和柚苷配基可从桔属植物的皮中提取，或者根据 Zemplen, Bogнар (Ber., 75, 1043 (1943)) 和 Seka, Prosche (Monatsh., 69, 284 (1936)) 描述的方法来合成。另外，柚苷配基可通过水解柚苷来制得。

柚苷或柚苷配基在 0.1 mg/kg/天或更高的剂量时对 ACAT 活性和巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮壁上的累积具有抑制作用，而且对肝

病具有预防和治疗作用，所述抑制作用随剂量而增加。

而且，尽管有强的效力，但柚苷或柚苷配基在鼠实验中几乎没有表现出毒性或促有丝分裂性。更具体而言，当以 1000 mg/kg 的剂量给鼠口服给药时，柚苷或柚苷配基没有产生毒性，对于 50 kg 重的人来说，上述剂量相当于口服给药 50—100 g 柚苷或柚苷配基/kg 体重。另外，柚苷和柚苷配基对肝功能没有副作用。

本发明还提供用于抑制 ACAT 活性和巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮壁上累积、以及预防或治疗肝病的药物组合物，该组合物包括柚苷或柚苷配基作为活性成分以及药物学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

可根据任何常规方法来制备药物制剂。在制备制剂时，活性成分优选与载体混合或用载体稀释，或者包封在胶囊、小药囊或其他容器之形式的载体中。如果载体为稀释剂，其可为固体、半固体或液体物质，作为活性成分的载体、赋形剂或介质。因此，制剂可为片剂、丸剂、粉末、小药囊剂、甘香酒剂、混悬剂、乳剂、溶液、糖浆、气雾剂、软和硬明胶胶囊、无菌注射液、无菌包装的粉末等剂型。

合适的载体、赋形剂和稀释剂的例子是乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、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、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油。药物制剂可另外包括填料、抗附聚剂、润滑剂、润湿剂、调味剂、乳化剂、防腐剂等。本发明的组合物可用任何本领域已知的方法配制成在给药于哺

乳动物后快速、持续或延迟释放活性成分的制剂。

本发明的药物制剂可通过各种途径给药，包括口服、透皮、皮下、静脉和肌肉给药。对于人，柚苷或柚苷配基的典型日剂量是约 0.1—100 mg/kg 体重，优选为 3—10 mg/kg，而且该剂量可以单剂量或多份剂量给药。

但应理解的是，实际给药的活性成分的量应根据各种相关因素来确定，所述因素包括待治疗的疾病、所选择的给药途径、每个患者的年龄、性别和体重、以及患者症状的严重程度；因此，上述剂量绝不是用于限制本发明的范围。

另外，柚苷或柚苷配基可掺入在食品或饮料中，作为添加剂或食物增补剂，用于抑制 ACAT 活性、抑制巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮上的累积和/或预防或治疗肝病。食品或饮料可包括肉食；汁液如蔬菜汁（例如胡萝卜汁和番茄汁）和果汁（例如橙汁、葡萄汁、菠萝汁、苹果汁和香蕉汁）；巧克力；小吃；糖果；意大利馅饼；由谷粉制成的食品，如面包、蛋糕、苏打饼干、曲奇饼干、饼干、面条等；口香糖；乳制品，如牛奶、乳酪、酸奶和冰淇淋；汤；肉汤；稀粥、番茄沙司和调味汁；茶；酒精饮料；碳酸饮料如开口可乐® 和百事可乐®；维生素复合物；以及各种保健食品。

在此情况下，食品或饮料中的柚苷或柚苷配基含量可在 0.01—5% 重量之间。具体而言，每 1000 ml 根据本发明的饮料可包含 200—10000 mg 的柚苷或柚苷配基。

如上所述，柚苷或柚苷配基可用作有效抑制 ACAT 活性、抑制巨噬

细胞-脂质复合物在动脉内皮上累积、和/或预防或治疗肝病的非毒性药物。

以下实施例用于进一步阐明本发明，而不是限制其范围。

另外，以下固体混合物中之固体、液体中之液体、以及液体中之固体的百分比分别是以 wt/wt、vol/vol 和 wt/vol 计算，而且所有的反应都是在室温下进行，除非另有说明。

实施例 1：从桔皮中提取柚苷

在室温下干燥柑桔 (Cheju Island, Korea)、枸橼 (Jeollanamdo, Korea) 以及橙、葡萄柚和柠檬 (California, CA, USA) 的皮，然后粉碎成粒径为 100–200 μm 的粉末。在 500 mg 的上述各桔皮粉末中分别加入 50 ml 的甲醇，然后在水浴中于 50°C 下提取 6 小时。冷却所得到的提取物，然后过滤，在滤液中添加甲醇至 50 ml 的体积。

为证实如上制得的提取物中柚苷的含量，对 0.5 μl 所述提取物进行高效液相色谱 (HPLC) 分析，其中使用 Lichrosorb RP-8 柱 (5 μm , 4 \times 250 mm)，所述色谱柱用 37% 甲醇预平衡并保持在 30°C 下。提取物用 37% 甲醇以 1.0 ml/min 的流速洗脱。将柚苷 (Sigma Chemical Co., USA) 溶解在甲醇中，使得最终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、和 0.5 mg/ml，由此制备标准溶液，然后在相同的条件下进行 HPLC 分析。在 280 nm 下用 UV-VIS 分光光度计检测洗脱液，并通过比较桔皮提取物和标准溶液的 HPLC 曲线面积来计算柚苷的含量。各种桔皮提取物中的柚苷含量 (%) 见表 I 所示。

表 I

	柚苷 (%)
橙	痕量
柠檬	痕量
柑桔	痕量
葡萄柚	4.70
枸橼	0.80

实施例 2：口服给药柚苷或柚苷配基的毒性

在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 的温度、 $55 \pm 5\%$ 的湿度和光照周期 12L/12D 的条件下，饲养 7—8 周龄、无特定病原的 ICR 雌鼠（6 只）和雄鼠（6 只），雌鼠重量在 25—29 g，雄鼠重量在 34—38 g。将饲料（Cheiljedang Co.，鼠饲料）和水消毒，然后喂给小鼠。

将柚苷或柚苷配基溶解在 0.5% Tween 80 中，至浓度为 100 mg/ml，然后将该溶液口服给药至小鼠，用量为 0.2 ml/20 g 小鼠体重。给药所述溶液后，按以下程序观察小鼠 10 天并记录副作用或死亡现象：给药后 1、4、8 和 12 小时，以后则每隔 12 小时观察。每天记录小鼠体重变化，以检查柚苷或柚苷配基的作用。另外，在第 10 天时，将小鼠处死，并肉眼检查内部器官。

在第 10 天时所有小鼠都存活，而且 1000 mg/kg 剂量的柚苷或柚苷配基没有毒性。尸检结果是，小鼠没有形成任何病理非正常性，而且在 10 天的检查期间没有观察到体重减轻。因此，可得出以下结论：桔

柚苷或柚苷配基在口服给药于动物时没有毒性。

实施例 3：向动物给药柚苷或柚苷配基

随机将体重为 90—110 g 的 30 只 4 周龄 Sprague-Dawley 大鼠(Taihan laboratory animal center, Korea) 平均分成 3 个饮食组。三个组的大鼠分别用三种不同的高胆固醇食物喂养，即包含 1%胆固醇的 AIN-76 实验室动物饲料 (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA) (对照组)，以及 1%胆固醇加 0.1%柚苷或柚苷配基。三个组所用饲料的成分见下表 II。

表 II

饲料成分	对照组	柚苷组	柚苷配基组
酪蛋白	20	20	20
D, L-蛋氨酸	0.3	0.3	0.3
玉米淀粉	15	15	15
蔗糖	49	48.9	48.9
纤维素粉末*1	5	5	5
矿物质混合物*1	3.5	3.5	3.5
维生素混合物*1	1	1	1
重酒石酸胆碱	0.2	0.2	0.2
玉米油	5	5	5
胆固醇	1	1	1
柚苷*2		0.1	
柚苷配基*2	—	—	0.1
总计	100	100	100

*1: 从 TEKLAD Premier Co. (Madison, WI, U.S.A.) 购得

*2: 从 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) 购得

无限制地用具体饲料和水喂养大鼠共 6 周, 每日记录摄取量, 然后每 7 天称重, 并分析记录数据。所有大鼠都显示正常的生长速度, 而且三个组之间在食物摄取量和体重增加方面没有显著差异。

实施例 4: 血浆中总胆固醇、HDL-胆固醇和中性脂质含量的测定

以下测定向大鼠给药柚苷或柚苷配基对血浆胆固醇和中性脂质含量的影响。

从上三个组的大鼠中采取血样, 并用包含葡萄糖硫酸酯的 HDL-胆固醇试剂 (Sigma Chemical Co., Cat. No. 352-3) 从中分离血浆 HDL 成分。用 Sigma Diagnostic Kit Cat. No. 352-100 (Sigma Chemical Co., USA) 测定总胆固醇和 HDL-胆固醇浓度 (Allain et al., Clin. Chem., 20, 470-475 (1974))。用 Sigma Diagnostic Kit Cat. No. 339-50 (Sigma Chemical Co., USA) 测定中性脂质浓度 (Bucolo, G. 和 David, H., Clin. Chem., 19, 476-482 (1973))。结果见表 III, 其中, 与对照组大鼠相比, 柚苷和柚苷配基饲养组中大鼠的总血浆胆固醇浓度分别下降 32% 和 18%。

表 III

组	对照组	柚苷组	柚苷配基组
脂质浓度			
总胆固醇 (mg/dl)	147.8 ± 34.8	100.8 ± 16.1	120.9 ± 25.9
HDL-胆固醇 (mg/dl)	22.2	24.0	23.4
HDL-胆固醇/总胆固醇 (%)	15.7 ± 5.3	23.9 ± 7.6	20.8 ± 9.1
TG (mg/dl)	99.2 ± 18.9	86.7 ± 14.6	103.4 ± 18.2

TG: 甘油三酯

实施例 5: 柚苷和柚苷配基在 ACAT 抑制中的活性

(步骤 1) 制备微粒体

为确定用柚苷或柚苷配基饲养大鼠对 ACAT 活性的作用, 从肝组织中制备微粒体作为酶源。

首先, 将实施例 3 中的三组大鼠断头处死, 并取出肝脏。分别将 1 g 肝脏在 5 ml 匀浆介质 (50 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1 MEDTA, 2 mM β -巯基乙醇) 中均化。在 4°C、3000×g 下离心所述匀浆 10 分钟, 然后在 40°C、15000×g 下离心所得到的上清液 15 分钟, 由此得到上清液。将上清液放入超离心管 (Beckman) 中, 并在 100000×g、4°C 下离心 1 小时, 以得到微粒体沉淀物, 然后将该沉淀物悬浮在 3 ml 的匀浆介质中, 并在 4°C、100000×g 下离心 1 小时。将由此得到的沉淀物悬浮在 1 ml 匀浆介质中。用 Lowry 法测定所得悬浮液中蛋白质的含量, 然后调节至 4–8 mg/ml。将所得悬浮液储存在深冷冻机 (Biofreezer, Forma Scientific Inc.) 中。

(步骤2) ACAT 实验

在丙酮中将 6.67 μ l 的 1 mg/ml 胆固醇丙酮溶液与 6 μ l 的 10% Triton WR-1339 (Sigma Co.) 混合, 然后通过使用氮气进行蒸发来除去丙酮。在所得的混合物中添加蒸馏水, 其量是将胆固醇的浓度调节为 30 mg/ml。

在 10 μ l 得到的胆固醇水溶液中添加 10 μ l 的 1 M 磷酸二氢钾 (pH 7.4)、5 μ l 的 0.6 mM 牛血清白蛋白 (BSA)、10 μ l 的步骤 1 中制得的微粒体溶液和 55 μ l 的蒸馏水 (总共 90 μ l)。在水浴中于 37°C 下预温育该混合物 30 分钟。

将 10 μ l (1-¹⁴C) 油酰-CoA 溶液 (0.05 μ Ci, 最终浓度 10 μ M) 添加至经预温育的混合物中, 在水浴中于 37°C 下温育所得的混合物 30 分钟。在该混合物中添加 500 μ l 的异丙醇: 庚烷混合物 (4: 1 v/v)、300 μ l 的庚烷和 200 μ l 的 0.1 M 磷酸二氢钾 (pH 7.4), 然后使用 vortex 剧烈搅拌混合物, 并在室温下静置 2 分钟。

将 200 μ l 所得的上清液放入闪烁瓶中, 并在其中添加 4 ml 的闪烁液 (Lumac)。用 1450 Microbeta 液体闪烁计数器 (Wallacoy, Finland) 对混合物进行放射活性分析。以每 mg 蛋白每分钟合成的胆固醇油酸酯的 pmol 数 (pmoles/min/mg 蛋白) 计算 ACAT 活性。结果见表 IV。

表 IV

组	ACAT 活性 (pmol/min/mg 蛋白)	对 ACAT 活性的抑制百分数
对照组	806.2 ± 105.2	0
0.1% 柚苷组	643.5 ± 80.7	20.2
0.1% 柚苷配基组	666.3 ± 65.3	17.4

从表 IV 的结果可以看出，柚苷和柚苷配基组大鼠中 ACAT 活性分别低于对照组 20.2% 和 17.4%。

实施例 6：在柚苷和柚苷配基饲养动物中对由巨噬细胞—脂质复合物导致的斑块形成的抑制作用

(步骤 1) 向动物给药柚苷和柚苷配基

在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度、 $55 \pm 5\%$ 的相对湿度和光照周期 12L/12D 的条件下，饲养 24 只重量分别为 2.5—2.6 kg 的 3 月龄新西兰白兔 (Yeonam Horticulture and Animal Husbandry College, Korea)。将上述兔子分为 4 个组，然后向 4 个组的兔子饲养 4 种不同的饲料，即分别是：包含 1% 胆固醇的 RC4 饲料 (Oriental Yeast Co., Japan) (对照组)；1% 胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin® (Merck, USA) (对比组)；1% 胆固醇及 0.1% 柚苷；以及 1% 胆固醇及 0.1% 柚苷配基。RC4 饲料包含 7.6% 水分、22.8% 粗蛋白、2.8% 粗脂肪、8.8% 粗灰、14.4% 粗纤维素和 43.6% 可溶性无氮物质。兔子饲养 6 周，并可自由摄取饲料和水。

（步骤 2）分析动物动脉中的脂肪条纹

将步骤 1 中饲养的兔子杀死，然后切开胸部。由主动脉瓣上 1 cm 的部位开始向下切除长度约为 5 cm 的主动脉，然后除去主动脉周围的脂肪。沿纵轴中间切开主动脉，并钉在板上。对湿的动脉进行照相，然后如下根据 Esper, E.等人的方法（*J. Lab. Clin. Med.*, 121, 103-110 (1993)）对脂肪条纹进行染色。

用无水丙二醇在 2 分钟内洗涤一部分经切可的主动脉 3 次，然后用 Oil Red O (ORO, Sigman Co.) 的丙二醇饱和溶液染色 30 分钟。之后，用 85% 丙二醇溶液在 3 分钟内洗涤主动脉 2 次，以除去残留的染色溶液，再用生理盐水洗涤。对主动脉进行照相，并跟踪照相。用图象分析仪 (LEICA, Q-600, Germany) 测定染色区域 (脂肪条纹区域) 的面积，并计算与总主动脉面积的比例 (%)。

另一方面，根据苏木精-曙红 (H&E) 和 Masson's 三色染色法对主动脉的其他部分进行染色，然后在显微镜下观察，以证实巨噬细胞-脂质复合物是否累积在内膜、管腔中部、弹性层和中层。

另外，从兔子中采取血样，并根据与实施例 4 相同的方法测定总胆固醇和甘油三酯。

结果见表 V 所示。

表 V

饲料组	总胆固醇 (mg/dl)	甘油三酯 (mg/dl)	M-L*复合物面积 (%)
对照	1143	56	35
1 mg/kg Lovastatin®组	1210	66	5
0.1%柚苷组	1367	72	12
0.1%柚苷配基组	1350	70	13

*M-L 复合物：巨噬细胞—脂质复合物

由表 V 可以看出，与对照组相比，1 mg/ml Lovastatin®、0.1%柚苷和 0.1%柚苷配基组中累积在动脉内皮上的巨噬细胞—脂质复合物面积显著降低。因此，证实柚苷和柚苷配基可抑制巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮上的累积。具体而言，明显可以看出，在高于 1100 mg/dl 的胆固醇血液浓度时柚苷和柚苷配基对巨噬细胞—脂质复合物的累积具有抑制活性，所述胆固醇浓度大大高于正常兔子的浓度，即、约 50 mg/dl。该结果提示有新的机制防止动脉粥样硬化的开始，这与 HMG—CoA 还原酶抑制剂阻断胆固醇合成、ACAT 抑制剂阻断胆固醇吸收、或者 CETP 抑制剂阻断胆固醇转移不同。

图 1A、1B 和 1C 显示了分别给药 1%胆固醇（对照组）；1%胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin®（对比组）；和 1%胆固醇及 0.1%柚苷的兔子的动脉。如图 1A、1B 和 1C 所示，在给药 1%胆固醇的兔子的动脉内皮上观察到厚层的巨噬细胞—脂质复合物，而在给药 1%胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin®、和 1%胆固醇及 0.1%柚苷的兔子的动脉内皮上几乎

没有或者仅观察到较薄层的巨噬细胞—脂质复合物。

因此，可以得出以下结论：柚苷和柚苷配基可强烈地抑制巨噬细胞—脂质复合物在动脉内皮上的累积。

实施例 7：柚苷对肝病的预防

（步骤 1）向鼠给药柚苷

随机将 20 只重量为约 90—110 g 的 Sprague-Dawley 大鼠（Taihan Laboratory Animal Center, Korea）平均分为二个饲料组。这 2 个组的大鼠分别喂以 2 种不同的高胆固醇饲料，即、包含 1%胆固醇的 AIN-76 实验室动物饲料（ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA）（对照组）；以及 1%胆固醇及 0.02%柚苷。2 个组的饲料的组成见表 VI 所示。

表 VI

成分	饲料组	对照组	0.02%柚苷组
酪蛋白		20	20
D, L-蛋氨酸		0.3	0.3
玉米淀粉		15	15
蔗糖		39	38.98
纤维素粉末*1		5	5
矿物质混合物*1		3.5	3.5
维生素混合物*1		1	1
重酒石酸胆碱		0.2	0.2
脂肪		15	15
胆固醇		1	1
柚苷*2		-	0.02
总计		100	100

*1: 购自于 TEKLAD Premier Co. (Madison, WI, USA)

*2: 购自于 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

无限制地用具体饲料和水喂养大鼠共 6 周，每日记录摄取量，然后每 7 天称重，并分析记录数据。所有大鼠都显示正常的生长速度，而且二个组之间在食物摄取量和体重增加方面没有显著差异。

(步骤 2) 测定血清 GOT 和 GPT 浓度

如下测定给药柚苷对鼠肝功能的作用。

从 2 个组的鼠中采取血液，然后根据 Reitman 和 Frankel 的方法

(Reitman, S.和 J. S. Frankel, Am. J. Clin. Pathol., 28, 56 (1956)) 测定血清 GOT (谷氨酸-草酰乙酸转氨酶) 和 GPT (谷氨酸-丙酮酸转氨酶)。GOT 和 GPT 是在肝脏和心脏中合成的, 并在这些器官被损坏时释放在血液中。因此, GOT 和 GPT 是肝功能的代表性指标, 而高血清 GOT 和 GPT 浓度代表肝脏受到严重损伤。

结果显示, 柚苷组的 GOT 和 GPT 浓度较对照组的分别低约 30% 和 10%。

(步骤 3) 使用兔子的实验

重复步骤 1 中的相同步骤, 但使用 30 只重量分别为约 2.5—2.6 kg 的 3 月龄新西兰白兔 (Yeonam Horticulture and Animal Husbandry College, Korea) 代替鼠, 然后用 3 种不同的饲料分别喂养所述兔子, 即、包含 1% 胆固醇的 RC4 饲料 (对照组); 1% 胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin® (对比组); 以及 1% 胆固醇及 0.1% 柚苷。

之后, 从兔子中分离肝脏, 并如下所述进行组织病理学观察。

肌肉注射氯胺酮 (75 mg/kg) 麻醉兔子, 然后切开腹部。肉眼观察肝脏硬化的颜色和程度, 并将从兔中分离的肝脏用 10% 中性缓冲福尔马林固定 24 小时以上。用水充分洗涤经固定的肝脏, 分步用 70%、80%、90% 和 100% 乙醇脱水, 然后嵌在石蜡中。用切片机将嵌入的肝脏切成 4 μ m 的厚度, 并用苏木精和曙红染色。用二甲苯使经染色的肝脏样品呈透明状, 用 permount 固定, 然后用显微镜观察, 以证实损伤的存在。

图 2A、2B 和 2C 分别代表了给药 1%胆固醇（对照组）、1%胆固醇及 1 mg/kg Lovastatin®（对比组）、和 1%胆固醇及 0.1%柚苷的兔子肝脏的显微特征。如图 2A 和 2B 所示，对照组和对比组的肝细胞为不规则地排列并增大，而且其中沉积大量的脂肪。相反地，如图 2C 所示，柚苷组的肝细胞为正常，而且没有观察到脂肪的沉积。该结果表明，柚苷强烈地抑制脂肪肝的发生，而且对肝细胞没有毒副作用。

（步骤 4）使用人的实验

以 10 mg/kg 的剂量向一位 55 岁的男人给药柚苷共 68 天，并分别在开始给药之前（第 0 天）以及给药后的 45 和 68 天（第 45 和 68 天）时测定 GOT、GPT 和 γ GTP。其结果是，与第 0 天时的相比，第 45 和 68 天时的血清 GOT 浓度分别降低 17%。与第 0 天时的相比，第 45 和 68 天时的血清 GPT 浓度分别降低 15%和 19%。而且，与第 0 天时的相比，第 45 和 68 天时的血清 γ GTP 浓度分别降低 25%和 51%。令人惊奇的是，与第 0 天时的相比，血清 γ GTP 浓度在第 68 天时降低 50%以上。该结果表明，柚苷或柚苷配基对肝病如肝炎、脂肪肝和酒精性脂肪肝具有强效的肝保护活性。

另一方面，以 6 mg/kg 的每日剂量向一位 56 岁的男性口服给药柚苷共 30 天，该男性每天习惯性地饮用 100 cc 的酒精饮料，然后在给药之前（第 0 天）和给药之后 30 天（第 30 天）测定血清 γ GTP 浓度。其结果是，第 0 天时的初始血清 γ GTP 浓度为 129 IU/l，而第 30 天时的浓度降低至 69 IU/l，达到了正常范围。该结果证实柚苷或柚苷配基

对预防酒精性脂肪肝和肝硬变具有高活性。

实施例 9：包含柚苷或柚苷配基的食品

如下制造包含柚苷或柚苷配基的食品。

(1) 制造番茄沙司和调味汁

将柚苷或柚苷配基添加至番茄沙司或调味汁中，其量为 0.01—5 wt %，以得到更有益于健康的番茄沙司或调味汁。

(2) 制造小麦粉食品

将柚苷或柚苷配基添加至小麦粉食品中，其量为 0.01—5 wt %，并使用该混合物制造面包、蛋糕、曲奇饼干、苏打饼干、和面条，以得到更有益于健康的食品。

(3) 制造汤和肉汁

将柚苷或柚苷配基添加至汤和肉汁中，其量为 0.01—5 wt %，以得到更有益于健康的汤和肉汁。

(4) 制造牛肉末

将柚苷或柚苷配基添加至牛肉末中，其量为 0.01—5 wt %，以得到更有益于健康的牛肉末。

(5) 制造乳制品

将柚苷或柚苷配基添加至牛奶中，其量为 0.01—5 wt%，然后使用该牛奶制造各种乳制品如黄油和冰淇淋。

但是，在制造乳酪时，将柚苷或柚苷配基添加至凝聚乳蛋白中；而在制造酸奶时，则将柚苷或柚苷配基添加至发酵后得到的凝聚乳蛋白中。

实施例 10：包含柚苷或柚苷配基的饮料

(1) 制造蔬菜汁

将 200—10000 mg 柚苷或柚苷配基添加至 1000 ml 番茄或胡萝卜汁中，以制得更有益于健康的蔬菜汁。

(2) 制造果汁

将 200—10000 mg 柚苷或柚苷配基添加至 1000 ml 苹果或葡萄汁中，以制得更有益于健康的果汁。

(3) 制造碳酸饮料

将 200—10000 mg 柚苷或柚苷配基添加至 1000 ml 可口可乐®或百事可乐®中，以制得更有益于健康的碳酸饮料。

虽然已参考上述具体实施方案对本发明进行了描述，但应认识到，本领域技术人员在本发明的范围内还可进行各种改进和变化，而本发明的范围为以下权利要求书所限定。

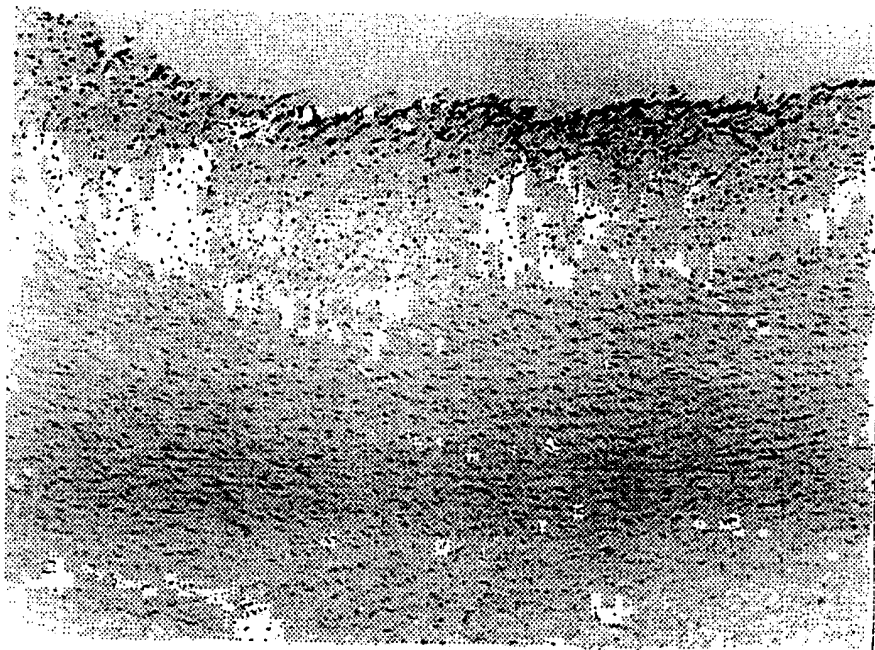


图1A

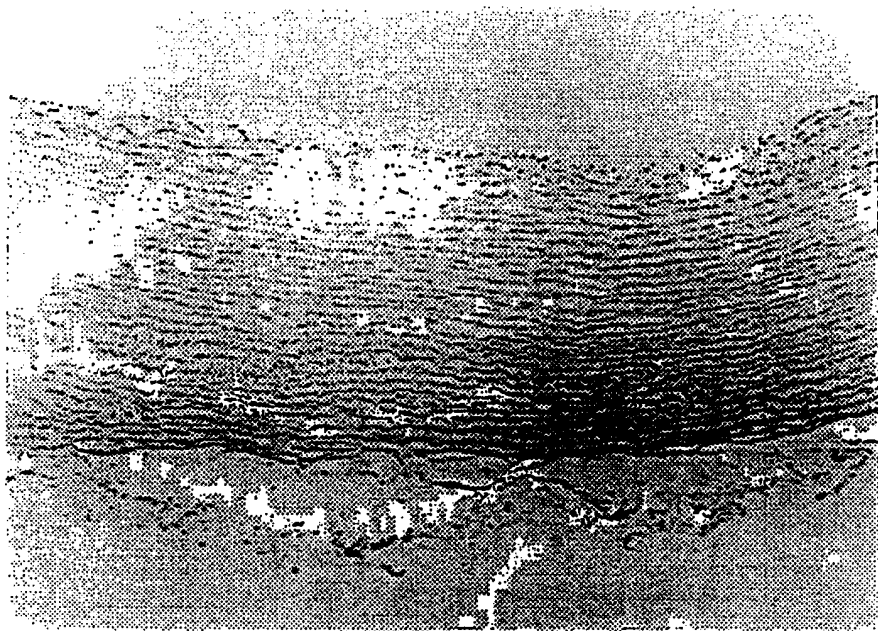


图1B

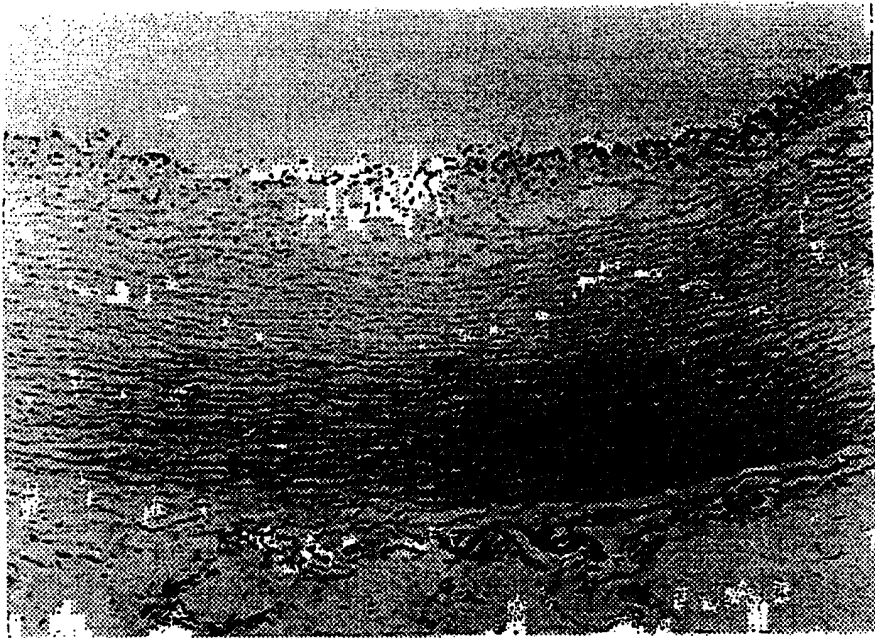


图10

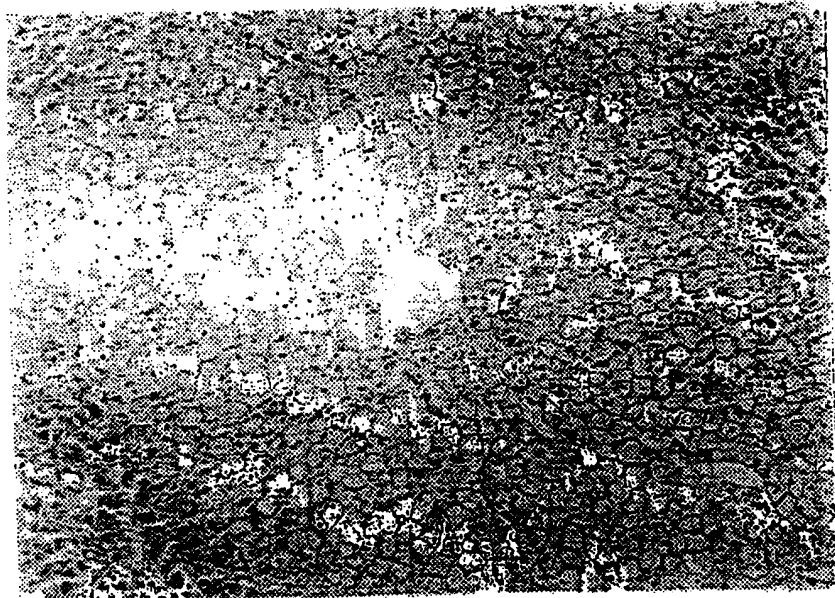


图2A

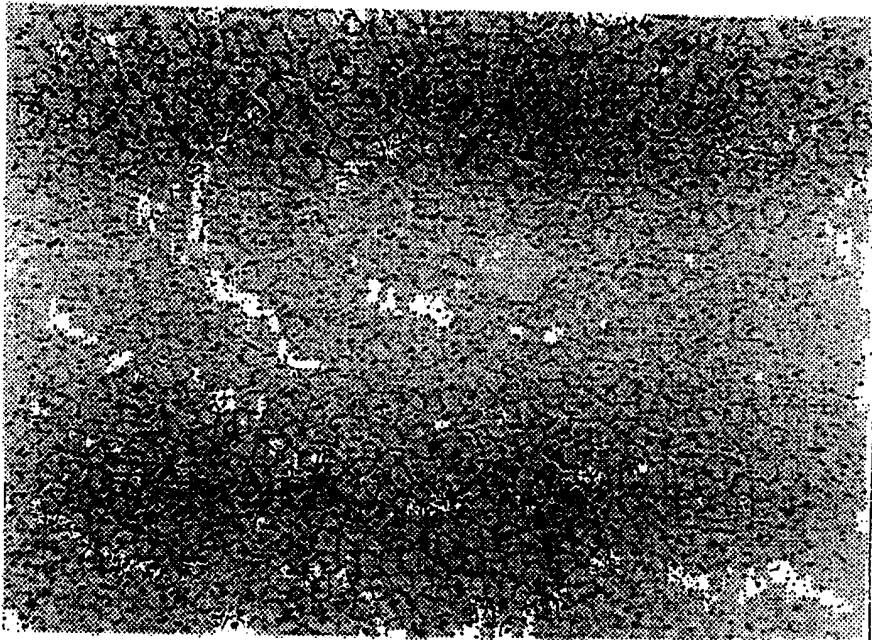


图2B

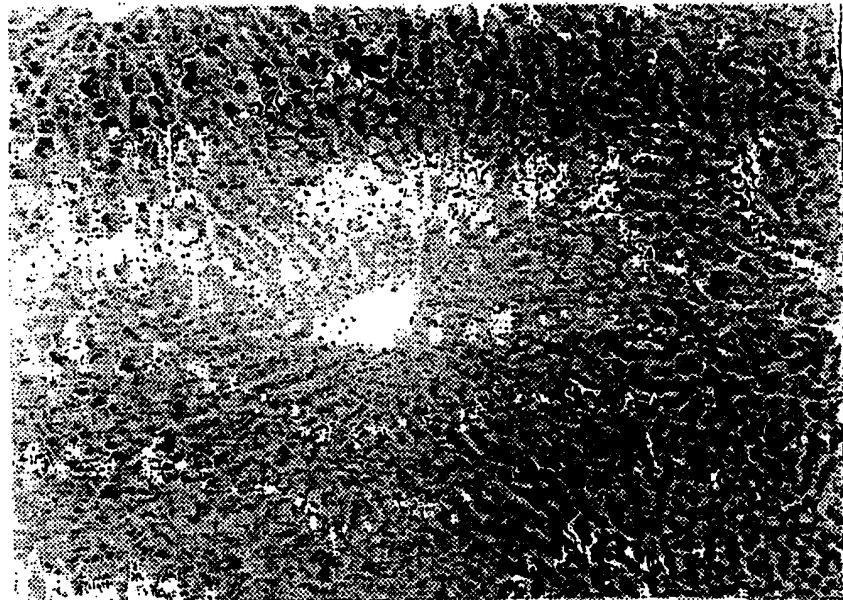


图20