



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102292093 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201080004917. 9

代理人 张钰斌

(22) 申请日 2010. 02. 01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 36/00 (2006. 01)

224/CHE/2009 2009. 02. 02 IN

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 101304756 A, 2008. 11. 12,

2011. 07. 20

CN 101304756 A, 2008. 11. 12,

(86) PCT国际申请的申请数据

陈蕙芳. 治疗癌症、调节免疫的草药混合物. 《国外医药(植物药分册)》. 2008, (第06期),

PCT/IN2010/000053 2010. 02. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

夏星. 莽吉柿药理活性的研究概况. 《广西中医学院学报》. 2009, (第03期),

W02010/100653 EN 2010. 09. 10

(73) 专利权人 莱拉营养食品有限公司

郝杰等. 水果、蔬菜、调料中脂肪酸合酶抑制剂的筛选. 《生命科学仪器》. 2008, (第11期),

地址 印度安得拉邦维查雅瓦达市莱比帕特  
宾达万聚居区 40-15-14

赵岩等. 莽吉柿果皮中脂肪酸及其它脂溶性成分的GC-MS分析. 《特产研究》. 2007, (第01期),

(72) 发明人 冈加·拉吉·古卡拉吉

拉玛·拉吉·古卡拉吉

文卡塔·肯纳卡·兰加·拉吉·古卡拉吉

拉吉

崔姆尔土卢·古兰扣堤

吉兰·布帕蒂拉吉

克里斯南·森古普塔

文卡塔·克里斯南·拉吉·阿汝李

赵岩等. 莽吉柿果皮提取物对实验性高脂血症大鼠血脂的影响. 《特产研究》. 2007, (第02期),

陈蕙芳. 治疗癌症、调节免疫的草药混合物. 《国外医药(植物药分册)》. 2008, (第06期),

审查员 凌宇静

(74) 专利代理机构 广州弘邦专利商标事务所有  
限公司 44236

权利要求书2页 说明书37页 附图9页

(54) 发明名称

用于代谢综合症控制的选自绒毛戴星草和莽吉柿的混合物

(57) 摘要

本发明涉及选自绒毛戴星草及其混合物的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物, 优选的与至少一个选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合的药品/膳食添加剂/食品组合物。该组合物与混合物可用于肥胖, 代谢综合征, 糖尿病和其他代谢疾病的控制, 预防和治疗, 也用于调节能量消耗, 预防冠状动脉和腹主动脉的动脉粥样硬化, 增加胰岛素敏感性, 改善糖耐量, 降低甘油三酯水平, 和平衡哺乳动物的血糖水平。

1. 一种药物 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其特征在于至少含有重量比为 3:1 的绒毛戴星草甲醇提取物和莽吉柿甲醇提取物, 或至少含有重量比为 1:3 的绒毛戴星草醋酸乙酯提取物和莽吉柿甲醇提取物。

2. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其特征在于还选择性的包括一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 维生素、矿物质、载体或其混合物。

3. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于其用来控制, 预防和治疗过度减肥症, 代谢综合征, 肥胖症。

4. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于其用来改善至少一种生物标志物蛋白的表达或者产量, 所述的生物标志物蛋白非限制性地选自脂肪分化相关蛋白 (ADRP), 巨噬细胞 CD36, 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1), 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL), 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2), 脂联素, 周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 IB (PTP IB)。

5. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于至少含有一种耳叶苔内酯或桉叶内酯倍半萜类化合物, 该耳叶苔内酯或桉叶内酯倍半萜化合物非限制性地选自耳叶苔内酯, 7-羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基-4, 5-环氧-6 $\beta$ , 7-桉烷内酯; 11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ -乙酰氧基- $\beta$ 3-羟基-6 $\beta$ , 7-桉叶醇-4-内酯; 3-酮- $\beta$ -桉叶醇; 11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基桉烷-4-烯-6 $\alpha$ , 12-内酯; 11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ , 13-二羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ , -羟基-13-甲氧基耳叶苔内酯; 2 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基-4-烯-11, 13-二羟基桉叶醇-6, 12-内酯; 2 $\alpha$ -羟基木香酸; 3-酮-7 $\alpha$ -羟基桉叶醇-4-烯-6, 12-内酯 (柳杉二醇); 4-表柳杉醇; 绒毛戴星草内酯苷; 2 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$ -乙酰氧基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$ -乙酰氧基-7 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$ -乙酰氧基-5 $\alpha$ -羟基异绒毛戴星草内酯或其混合物。

6. 如权利要求 5 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于在绒毛戴星草的提取物和馏分中, 活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯或其它耳叶苔内酯或桉叶内酯倍半萜 / 其它植物化学物的质量浓度为 0.001% -100%。

7. 如权利要求 6 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于在所述的混合物中, 活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯或其它耳叶苔内酯或桉叶内酯倍半萜 / 其它植物化学物的质量浓度为 0.001% -99%。

8. 如权利要求 7 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于在所述的混合物中, 活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯或其它耳叶苔内酯或桉叶内酯倍半萜 / 其它植物化学物的质量浓度为 0.01-95%。

9. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于莽吉柿中的活性化合物非限制性地包括  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素。

10. 如权利要求 9 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于在莽吉柿的提取物和馏分中, 活性成分  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的单独或组合质量浓度为 0.001% -99.9%。

11. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物, 其特征在于在所述的混

合物中,活性成分  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的单独或组合质量浓度为 0.001% -99%。

12. 如权利要求 11 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于在所述的混合物中,活性成分  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的单独或组合质量浓度为 0.01-95%。

13. 如权利要求 2 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述的生物活性化合物选自植物,动物和微生物的提取物或馏分或纯化合物或植物化学物或粉末,具有任意健康效果。

14. 如权利要求 13 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述任意健康效果包括抗糖尿病活性,降血糖活性,降血脂活动,抗肥胖活性,抗高血压活性,抗血小板聚集活动,抗感染活性,抗动脉粥样硬化的活性和消炎活性,抗氧化剂和生物增强活性。

15. 如权利要求 2 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述的提取物选自至少一个植物部分。

16. 如权利要求 15 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述植物部分包括但不限于叶、花头,茎,树皮,根,全株或其混合物。

17. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述的莽吉柿产生的提取物是选自整个水果或水果皮。

18. 如权利要求 2 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于,所述的载体包括固体载体和油性载体。

19. 如权利要求 18 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于,所述的固体载体非限制性地包括葡萄糖,果糖,蔗糖,麦芽糖,糊精黄,白糊精,喷雾,微晶纤维素,硬脂酸钙,硬脂酸镁,山梨糖醇,甜菊糖甙,玉米糖浆,乳糖,柠檬酸,酒石酸,苹果酸,琥珀酸,乳酸, L-抗坏血酸, DL- $\alpha$ -生育酚,甘油,丙二醇,甘油脂肪酸酯,聚甘油脂肪酸酯,蔗糖脂肪酸酯,失水山梨醇脂肪酸酯,丙二醇脂肪酸酯,洋槐,卡拉胶,酪蛋白,明胶,果胶,琼脂, B 族维生素,烟酰胺,泛酸钙,氨基酸,钙盐,色素,香精和防腐剂。

20. 如权利要求 18 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于,所述油性载体包括各种动植物油,白色软石蜡,石蜡及蜡。

21. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述的组合物或混合物是口服、局部或肠外给药,或对哺乳动物或温血动物根据需要采用吸入体内给药。

22. 如权利要求 1 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述的组合物或混合物是口服制剂;肠外制剂;经皮给药制剂。

23. 如权利要求 22 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述口服制剂包括片剂,软胶囊,硬胶囊,药丸,颗粒,粉末,乳液,悬浮液,糖浆,小团丸,食品,饮料。

24. 如权利要求 22 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述肠外制剂包括注射液、滴液。

25. 如权利要求 22 所述的药物 / 膳食补充剂 / 食品组合混合物,其特征在于所述经皮给药制剂包括贴片、局部乳膏和凝胶。

## 用于代谢综合症控制的选自绒毛戴星草和莽吉柿的混合物

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及新的药物或膳食添加剂，其中包括至少一个选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物和一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物，并选择性地包括一种或多种药用或膳用可接受的稀释剂、介质、载体、活性物或其混合物。

[0002] 本发明进一步涉及至少一种选自绒毛戴星草及其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物，优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合，用于代谢综合征或肥胖，和 / 或一种或多种与代谢综合症和代谢疾病有关系或有联系的疾病。

[0003] 本发明还涉及使用绒毛戴星草衍生化合物或其混合物来对一个或多个生物标志物蛋白或与代谢综合征、肥胖或其他有关系或有联系疾病的代谢过程的改善。

[0004] 发明背景：

[0005] 绒毛戴星草属菊科。它也被称为麻腊干。它是一种高度分枝，强烈气味，具有翼茎齿翅的一年生草本植物。叶呈倒卵状，基部渐狭，边缘有刺状和尖齿。花呈复头状，球形。在印度的环境中，开花时间跨度从十一月到一月。有用的药用部位是根，树皮，叶，花和种子。

[0006] 绒毛戴星草植物的花和果实中含有的一个主要化合物是 3a- 羟基 -5a,9- 二甲基 -3- 甲基 -3a,4,5,5a,6,7,8,9b- 八氢 -3H- 萘并 [1,2-b] 呋喃 -2- 酮 (7- $\alpha$ - 羟基 -4,11(13)- 双烯酮 -12,6- 内酯或 7- 羟基耳叶苔内酯)。它具有强烈的抑制促炎性细胞因子作用。

[0007] 选自绒毛戴星草的其他化合物包括如主要成份的甲基胡椒酚， $\alpha$ - 紫罗兰酮， $\delta$ - 杜松烯，p- 甲氧基肉桂醛和作为少量精油的次要成份  $\alpha$ - 松油烯，柠檬醛香叶醇，香叶基醋酸， $\beta$ - 紫罗兰酮，绒毛戴星草烯，印度烯和绒毛戴星草内酯（浓缩香水，埃森特油的记录，1959 年，50,765；。化合文摘索引号 1960,54,7980g）；7 $\alpha$ - 羟基桉叶醇 -4 烯 -6,12- 内酯，它的  $\beta$ - 异构体，一种新的倍半萜烯酸，2- 羟基木香酸， $\beta$ - 桉叶醇和香草酸 (Jayant S. Sohoni et al, J. Chem. Soc, Perkin Tram. 1,1988,157-160)；桉叶内酯如 11- $\alpha$ -13- 二氢 -3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ - 二羟基 -4,5- 环氧 -6 $\beta$ ,7- 桉烷醇甙,11 $\alpha$ ,13- 二氢 -7 $\alpha$ - 乙酰氧基 - $\beta$ 3- 羟基 -6 $\beta$ ,7- 桉叶醇和 3- 酮基 - $\beta$ - 桉叶油醇 (Pujar PP et al, Fitoterapia. 2000Jun; 71(3):264-8) 和一种倍半萜烯苷 (Shekhani MS et al,1990;Phytochemistry 29, 2573-2576)。

[0008] 一些关于绒毛戴星草的非专利文献引述如下：一份关于茜草，隆加姜黄，印度菝葜，印楝和绒毛戴星草对抗炎效果的研究报告中，发现绒毛戴星草在对丙酸杆菌的上清培养液的白细胞 (PMNL) 和单核细胞诱导致炎细胞因子白细胞介素 -8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 的抑制作用更加有效 [Jain A et. al. ;Phytomedicine. 2003Jan ;10(1):34-8]。

[0009] 在老鼠实验中，发现绒毛戴星草花头的石油醚提取物对增加细胞吞噬活性，血凝抗体滴度和迟发型超敏反应有效。石油醚提取物呈现出剂量 - 反应关系。结果发现，200mg/kg 的剂量是最佳剂量。绒毛戴星草相当于免疫调节剂，通过刺激体液和细胞免疫以及细胞

的吞噬功能。[Bafna AR et al ;J Herb Pharmacother. 2007 ;7(1) :25-37]。

[0010] 在一项研究中,发现绒毛戴星草的水提取物 (300mg/kg/ 天, i. p) 对用地塞米松 (110mg/kg/ 天, s. c) 诱导的大鼠血脂变化有效。绒毛戴星草显示出降低血清总胆固醇,甘油三酯,低密度脂蛋白,极低密度脂蛋白,而对高密度脂蛋白胆固醇水平没有明显的变化。使用绒毛戴星草治疗后动脉粥样硬化指数也明显地降低了,绒毛戴星草具有潜在的降脂效果 [Tenpe CR et al ;Biomed. Vol. 02(4), 2008 ;400-403]。

[0011] 最近,在另一项研究中,通过烟酰胺 [120 毫克 / 公斤, IP] 和链脲佐菌素 (STZ) [60 毫克 / 公斤, IP] 诱导糖尿病的老鼠研究中,绒毛戴星草具有抗高血糖效果。口服给药绒毛戴星草 15 天,结果血糖水平明显下降而肝糖原和血浆胰岛素水平明显提高。用绒毛戴星草酒精提取物处理空腹的正常大鼠,显示在口服糖耐量试验中表现出了明显提高。用格列本脲作为参考标准 [Prabhu KS et al ;J Pharm Pharmacol. 2008 ;60(7) :909-16]。

[0012] 上述文献都没有公开关于用绒毛戴星草改善代谢综合征相关的生物标志物或对代谢综合症或与代谢综合症有关疾病的治疗效果。

[0013] 丹贝 CR 等人的研究中使用了绒毛戴星草的水提取物,其不包括含量大的 7- 羟基耳叶苔内酯,而本发明的亲脂性化合物含有作为活性化合物的 7- 羟基耳叶苔内酯。因此,本发明的化合物不同于丹贝 CR 等人在研究中使用的化合物。同样,普达帕布 KS 等人的研究中使用了根和匍匐茎的酒精提取物。然而,本发明的化合物是选自花头,其含有大量的 7- 羟基耳叶苔内酯,因此,与普达帕布 KS 等人在研究中使用的化合物也不同。

[0014] 一些关于绒毛戴星草的专利文献引述如下 :

[0015] PCT 公布号 W007036900A2 涉及到了一种新的草药化合物,包括一种绒毛戴星草植物的花和果实头的提取物,其含有 3a- 羟基 -5a,9- 二甲基 -3- 甲基 -3a,4,5,5a,6,7,8,9b- 八氢 -3H- 萘并 [1,2-b] 呋喃 -2- 酮 (7-  $\alpha$  - 羟基 -4,11(13)- 双烯酮 -12,6- 内酯) 作为一种生物活性标志物。所述专利也涉及到了制备所述化合物的方法。

[0016] 日本专利公开号 JP07138180A2 涉及到抗体抑制剂,其含有一种包括至少一种印楝,香茅,咖喱树,绒毛戴星草,圣罗勒,青牛胆和叶下珠的提取物以及一种用作能防止衰老和防止细小皱纹和皮肤干燥的化妆品。

[0017] PCT 公布号 W006134609A2 中公开了中草药抗癌剂,其含有绒毛戴星草植物的提取物或选自绒毛戴星草植物的化合物。同时也公开了一种制药化合物,其含有所述的制剂,化合物的制备方法,各种动物包括人类癌症的治疗方法,植物提取物的制备方法和获得活性成份的方法。

[0018] PCT 公布号 W006016228A2 涉及到一种化合物或一组化合物,选自于存在于绒毛戴星草植物中的活性物质,可用作预防和 / 或治疗肿瘤疾病的药品制剂或食物添加剂的配制剂。所述专利进一步涉及一种用于从绒毛戴星草植物中分离对癌症预防和 / 或治疗有效的活性物制的方法。

[0019] 美国专利号 US7344738 提供了用于配药用或医药用的配制剂,由两种草药化合物的混合物组成,其中包括一种以下草药的化合物:辣木,黄细心,紫草,洋紫荆,绒毛戴星草,沙漠柚木,吊兰,聚果榕,和香头草或一种从那些草药中提取的活性成分或合成化学品的混合物。这些草药制剂广泛用于治疗由削弱或恶化的免疫系统造成人体的生理和病理疾病是有效的。

[0020] 莽吉柿是用于本发明中的新化合物,其属于藤黄科。藤黄属植物大约有 300 种雌雄异株乔木和灌木,分布在南美洲(它们也就是所知的瑞地亚木),非洲,马达加斯加和东南亚。本属中的大部分多样化物种集中在马来西亚,在那里发现有超过三分之二的品种 [<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/mangosteen/>]。

[0021] 倒捻子素是莽吉柿中的一个主要化合物。倒捻子素的结构已由彼得耶茨等人证实 [Peter Yates, George H. Stout ;J. Am. Chem. Soc ;1958 ;80 (7) ;1691-1700]。

[0022] 已有倒捻子素的一些药理学活性如抗炎剂 [Gopalakrishnan C et al., Indian J Exp Biol. 1980 Aug ;18(8) :843-6], 组胺和血清素受体阻断剂 [Chairungsrilerd N et al., Planta Med. 1996 Oct ;62(5) :471-2], 抗癌剂 [Ee GC et al., J Asian Nat Prod Res. 2008 May ;10(5) :481-5], 抗菌剂 [Sundaram B. M., et al. ;Planta Med. 1983 ;48 :59-60] 等的报道,和大量探索新活性的研究。

[0023] 藤黄非专利文献描述如下:在一个实验指导分馏研究中,采用从亲脂性到亲水性的化合物溶剂萃取,不同分馏法和离子交换树脂 XAD2 吸附色谱法进行了研究。莽吉柿果皮提取物对  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性进行了测试,得出的结论是氧杂蒽酮不具有任何的抑制活性,但报道亲水成份的原花青素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性大 56 倍 [Eng Kiat Loo A, Huang D. ; J Agric Food Chem. 2007 Nov28 ;55(24) :9805-10]。

[0024] 知道上述研究结果 [Eng Kiat Loo et al, 2007] 非常重要。 $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性是由于原花青素。进一步的研究表明,氧杂蒽酮成份对  $\alpha$ -淀粉酶抑制没有任何活性。因此,这些现有文献的提取物或馏分的活性物质与本发明的活性物质不同。

[0025] 在另一项研究中,研究者确定醛糖还原酶 (ALR2) 的抑制作用是由莽吉柿引起的。发现  $\alpha$ -倒捻子素对 ALR2 具有很大的作用力。得出的结论是  $\alpha$ -倒捻子素可以用于预防糖尿病并发症 [Sri Fatmawatia et al., Biology, Chemistry, Pharmacology and Clinical Studies of Asian Plants April 9-11, 2007, Surabaya, Indonesia]。

[0026] 简单的回顾一下现有文献,还没有有关使用含有绒毛戴星草和莽吉柿的化合物来治疗代谢综合征或改善代谢标志物蛋白质的报道。

[0027] 代谢综合症是一种疾病,又称综合征 X,胰岛素抵抗综合征和代谢不良综合症,其中的一类疾病症状是增加动脉粥样硬化,中风和糖尿病。

[0028] 代谢综合症是由 Reaven 于 1988 年首次描述 [Reaven, (1988) Diabetes 37 ; 1595-1607], 作为一类相互关联的临床常见疾病,包括肥胖,胰岛素抵抗,葡萄糖耐受不良,高血压和血脂异常。

[0029] 诊断代谢综合症的一个标准是由于 2001 年成立的美国胆固醇教育计划成人治疗小组-III (ATP III) [JAMA (2001), 285 ;2486-2497] 制定的。由小组确定的代谢综合症有五项标准,分别包括腹部肥胖,空腹血糖,高甘油三酯 (TG),低高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 浓度和血压上升。如一个一个人身上存在任何三个,则可诊断为代谢综合症。

[0030] 大量的研究正在进行,已超过十年来开发用于控制代谢综合症的制剂。用于控制代谢综合症的代谢标志物的应用也已有尝试。

[0031] 患有代谢综合症的人都对冠心病,其他与在动脉壁上集结斑块相关的疾病(例如,中风和周边血管疾病)和 2 型糖尿病具有高风险。

[0032] 一些生物疾病也被认为是代谢综合症,其中包括高尿酸血症 [Vuorinen-Markkola

H et al; J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78(1): 25-9.]; 高甘油三酯血症 [Grundy SM.; Am J Cardiol. 1998; 81(4A): 18B-25B]; 低脂联素血症 [Stern N et al.; J Cardiometab Syndr. 2007; 2(4): 288-94]; 微量白蛋白尿 [Brahimi M et al.; Arch Mal Coeur Vaiss. 2007; 100(8): 673-6.].

[0033] 下面引用一些涉及代谢综合症的诊治和治疗的专利。

[0034] PCT 公布号 W008086403A1 公开了对植物来源的色酮和新色酮化合物的识别与分离,其在提高脂肪细胞脂联素的产生和调节脂肪酸合成有关基因中有效。该发明也包括用于预防和治疗各种疾病和病症包括但不限于胰岛素抵抗,葡萄糖不耐症,高血糖,代谢综合征,血脂异常,高甘油三酯血症的方法。

[0035] PCT 公布号 W008074935A2 涉及到从植物中获得的如提取物,馏分和 / 或分子的化合物和产品,其可用于预防或治疗代谢疾病,肥胖和 / 或与其相关的疾病如 X 综合征 (代谢综合征), 2 型糖尿病,或用于人类或动物的生产食品添加剂。

[0036] PCT 公布号 W008093848A1 公开了一种制药产品,一种功能性食品和一种口服化合物,其含有选自大豆的卵磷脂,通过口服给药或用于口腔施药,可用于通过增加炎症标志物来预防或改善身体机能疾病,可降低代谢综合症的发生或疾病和代谢综合症的风险,并能保持或促进健康状态。

[0037] 基于上述和其他一些文件上的信息,本发明的发明人认为需要一个可以有效的用于代谢综合症和其他一些有关及联系疾病控制的天然化合物。

[0038] 据我们所知,还没有现有文献涉及到使用选自绒毛戴星草及其混合物的提取物、馏分或活性化合物,植物化学物或其混合物的化合物,与选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物组合,用于与肥胖,代谢综合症和其他与代谢疾病有关或联系疾病的改善,控制,预防或治疗。

[0039] 发明概述:

[0040] 本发明的一个主要方面提供了一种新的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物,其中包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,和一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,并选择性地包括一种或多种药用或膳用可接受的稀释剂、介质、载体、活性物或其混合物。

[0041] 本发明的另一主要方面提供了至少一种选自绒毛戴星草及其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物,优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合,用于代谢综合征或肥胖,和 / 或一种或多种与代谢综合症和代谢疾病有关系或有联系疾病的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物。

[0042] 本发明的另一方面提供了绒毛戴星草衍生化合物,选自其提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物或其组合,优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合,用于对一个或多个与代谢综合症,肥胖和其它与代谢综合症有关的包括但不限于基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1), 基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3), 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), 脂肪分化相关蛋白 (ADRP), 脂肪细胞 CD36, 巨噬细胞 CD36, 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1), 氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL), 脂

肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4/A-FABP),  $\beta$ -3 肾上腺素受体 ( $\beta$  3AR), 周脂素, 脂联素和蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (PTP-1B) 疾病有关系或联系的生物标志蛋白的表达与产生。

[0043] 本发明的另一方面提供了绒毛戴星草衍生化合物, 选自其提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物或其组合物, 优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合, 用于改善代谢过程如促进脂肪分解, 抑制脂肪形成,  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性。

[0044] 本发明的一个主要方面, 药品 / 膳食添加剂 / 食品组合物的提取物, 馏分、纯化化合物或植物化学物或其混合物是选自绒毛戴星草或所述组合物含有所述的混合物, 用于对代谢综合征或肥胖, 和 / 或一个或多个与代谢综合症有关或联系的疾病的控制, 预防和治疗。

[0045] 本发明的另一主要方面, 提取物或浓缩馏分或纯化化合物或其混合物选自绒毛戴星草, 可单独使用也可与一种或多种药用或膳用可接受的介质、载体或溶剂或其混合物一起使用, 用于对代谢综合征或肥胖, 和 / 或一个或多个与其有关或关联的疾病的控制, 预防和治疗。

[0046] 本发明的另一方面, 用于代谢综合症或肥胖和其他有关或相关疾病的预防、控制 and 治疗的活性绒毛戴星草的活性化合物包括但不限于 7-羟基耳叶苔内酯、11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基-4,5-环氧-6 $\beta$ , 7-桉烷内酯、11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ -乙酰氧基- $\beta$ 3-羟基-6 $\beta$ , 7-桉叶醇-4-内酯、3-酮- $\beta$ -桉叶醇、11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基桉烷-4-烯-6 $\alpha$ , 12-内酯、11 $\alpha$ , 13-二氢-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基耳叶苔内酯、11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ , 13-二羟基耳叶苔内酯、11 $\alpha$ , 13-二氢-7 $\alpha$ , -羟基-13-甲氧基耳叶苔内酯、2 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基-4-烯-11, 13-二羟基桉叶醇-6, 12-内酯、2 $\alpha$ -羟基木香酸、3-酮-7 $\alpha$ -羟基桉叶醇-4-烯-6, 12-内酯 (柳杉二醇)、4-表柳杉醇、绒毛戴星草内酯苷、2 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯、2 $\alpha$ -乙酰氧基绒毛戴星草内酯、2 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二羟基绒毛戴星草内酯、2 $\alpha$ -乙酰氧基-7 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯、2 $\alpha$ -乙酰氧基-5 $\alpha$ -羟基异绒毛戴星草内酯等, 优选 7-羟基耳叶苔内酯或有关的化合物或其类似物或其混合物。

[0047] 在另一方面, 本发明中使用的 7- $\alpha$ -羟基-4, 11(13) 双烯酮-12, 6-内酯 (7-羟基耳叶苔内酯) 来源可以是绒毛戴星草或任何植物或合成。

[0048] 本发明的另一方面, 绒毛戴星草衍生化合物和其混合物可有效用于一种或多种包括但不限于代谢综合症, 肥胖, 动脉硬化, 糖尿病, 胰岛素抵抗等疾病, 调节能源消耗, 预防冠状动脉和腹主动脉中动脉粥样硬化斑块, 增强胰岛素敏感性, 提高糖耐量, 降低动物体内的甘油三酯水平和平衡血糖水平。

[0049] 本发明的另一方面, 提供包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 和一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物的组合物, 来制备对预防或控制或治疗代谢综合症或与代谢综合症有关疾病有增效作用的产品, 和改善与代谢综合症或与代谢综合症有关疾病的不同生物标志物蛋白的产品。

[0050] 本发明的另一方面, 提供用于代谢综合症, 肥胖和其他与代谢综合症有关或相关的疾病, 尤其是在动物体内由胰岛素抵抗引起的疾病和病症的预防、治疗和控制的方法, 其中所述的方法包括给对象给予选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物并含有至少一种选自药用和膳用可接受的稀释剂、介质、载体、活性物

或其混合物的配药或膳食添加剂所需有效剂量。

[0051] 本发明的另一方面,提供用于代谢综合症,肥胖和其他与代谢综合症有关或相关的疾病,尤其是在动物体内由胰岛素抵抗引起的疾病和病症的预防、治疗和控制的方法,其中所述的方法包括给对象给予选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物一起组合,并含有至少一种选自药用和膳用可接受的稀释剂、介质、载体、活性物或其混合物的配药或膳食添加剂所需有效剂量。

#### 附图说明:

[0052] 图 1:所示的是绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 对 A2058 人类黑色素瘤细胞培养上清液中 MMP-I 降低百分率柱状图。在 LI/DD-II/054A/01 不同浓度下处理 24 小时后用 50nM 的 PMA 诱导 A2058 细胞。用 MMP-I 的 ELISA 检测试剂盒 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 对分泌在细胞培养上清液中的 MMP-I 浓度进行测定。培养上清液中的 MMP-I 浓度用已知浓度的 MMP-I 标准曲线上计算得到。在每种测试化合物浓度下的 MMP-I 抑制百分率通过该公式计算得到:  $\{(PMA \text{ 诱导孔中的 MMP-I 浓度} - \text{测试孔中的 MMP-I 浓度}) \times 100\} \div PMA \text{ 诱导孔中的 MMP-I 浓度}$ 。

[0053] 图 2:所示的是绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 对 A549 人肺癌细胞培养上清液中 MMP-3 浓度降低百分率柱状图。在 LI/DD-II/054A/01 不同浓度下处理 24 小时后用 10ng/ml 的人类 IL-1 $\beta$  诱导 A549 细胞。用 MMP-3 的 ELISA 检测试剂盒 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 对分泌在细胞培养上清液中的 MMP-3 浓度进行测定。培养上清液中的 MMP-3 浓度用已知浓度的 MMP-3 标准曲线上估算得到。在每种测试化合物的浓度下的 MMP-3 抑制百分率通过该公式计算得到:  $\{(IL-1 \beta \text{ 诱导孔中的 MMP-3 浓度} - \text{测试孔中的 MMP-3 浓度}) \times 100\} \div IL-1 \beta \text{ 诱导孔中的 MMP-3 浓度}$ 。

[0054] 图 3:所示的是绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对 3T3-L1 脂肪细胞在脂肪生成和脂肪分解过程中的标志蛋白的调控。典型免疫印迹显示各种标志物蛋白如 PPAR $\gamma$  (A), ADRP (B), CD36 (C), aP2 (D),  $\beta$  3AR (E) 和周脂素 (F) 具有反向调控作用。在 LI/DD-II/054A/01 或 LI054A01 不同浓度下处理分化 3T3-L1 老鼠前脂肪细胞。空白对照培养只有相同浓度的 DMSO。评估每个印迹的肌动蛋白表达作为内部控制。通过光密度来测量每种蛋白的表达并用肌动蛋白表达来格式化。比较水平描绘成柱状图 (侧面)。

[0055] 图 4:所示的是绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对在巨噬细胞中高葡萄糖诱导 CD36 表达的反向调控。在 LI/DD-II/054A/01 不同浓度或 1 $\mu$ g/ml 的 LI054A01 处理 J774 老鼠巨噬细胞暴露在高葡萄糖 (600mg/dL) 5 天。空白对照培养是低葡萄糖 (100mg/dL)。典型免疫印迹分析显示 CD36 蛋白反向调控。肌动蛋白表达作为内部控制。柱状图显示的是用肌动蛋白格式化的 CD36 表达 (低面)。

[0056] 图 5:典型免疫印迹显示用莽吉柿甲醇提取物 (AR933) 处理的 3T3-L1 脂肪细胞在的 PPAR $\gamma$  (A)、ADRP (B)、aP2 (C)、CD36 (D)、周脂素 (E) 和  $\beta$  3AR (F) 蛋白表达的调控。通过光密度来分析蛋白的表达并用肌动蛋白表达来格式化。每块柱子的柱状图显示的是任意单位

的格式化蛋白表达。在柱状图中,柱状表示的分别是空白对照 (a), 2.5  $\mu$ g/ml 的 AR 933 (b) 和 5.0  $\mu$ g/ml 的 AR933 (c) 处理细胞后的蛋白表达。

[0057] 图 6 :典型免疫印迹显示用绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 或莽吉柿甲醇提取物 (AR933) 或含有这两种提取物的混合物 1B 处理的 3T3-L1 脂肪细胞在的 PPAR  $\gamma$  (A)、ADRP (B)、aP2 (C)、CD36 (D)、周脂素 (E) 和  $\beta$  3AR (F) 蛋白表达的调控。通过光密度来分析蛋白的表达并用肌动蛋白表达来格式化。每块柱子的柱状图显示的是任意单位的格式化蛋白表达。在柱状图中,柱状表示的分别是空白对照 (a), LI/DD-II/054A/01 (b), AR 933 (c) 和混合物 1B (d) 处理细胞后的蛋白表达。

[0058] 图 7 :典型免疫印迹显示用绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 或莽吉柿甲醇提取物 (AR933) 或混合物 1B 处理巨噬细胞后高葡萄糖诱导动脉粥样硬化标志物的反向调控。

[0059] 免疫印迹显示 CD36 (X)、MCP-I (B) 和 Ox-LDL (C) 蛋白表达的反向调控。肌动蛋白作为附加控制。每块柱子的柱状图显示的是格式化蛋白表达。柱状表示的是 a、葡萄糖 100mg/dL ;b、葡萄糖 600mg/dL ;c、LI/DD-II/054A/01 (5  $\mu$ g/ml) ;d、AR 933 (5  $\mu$ g/ml) ;和 e、混合物 1B (5  $\mu$ g/ml) 的表达水平。

[0060] 图 8 :典型免疫印迹显示用 5  $\mu$ g/ml 的 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 处理 3T3-L1 脂肪细胞的脂联素蛋白的正向表达。通过光密度来分析蛋白的表达并用肌动蛋白表达来格式化。每块柱子的柱状图显示的是任意单位的格式化蛋白表达。在柱状图中,柱状表示的分别是空白对照 (a)、LI/DD-II/054A/01 (b)、AR 933 (c) 和混合物 1B (d) 处理细胞后的蛋白表达。

[0061] 图 9 :典型免疫印迹显示用 5  $\mu$ g/ml 的 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 处理 3T3-L1 脂肪细胞的 PTP-1B 蛋白的反向表达。通过光密度来分析蛋白的表达并用肌动蛋白表达来格式化。每块柱子的柱状图显示的是任意单位的格式化蛋白表达。在柱状图中,柱状表示的分别是空白对照 (a)、LI/DD-II/054A/01 (b)、AR 933 (c) 和混合物 1B (d) 处理细胞后的蛋白表达。

[0062] 图 10A :柱状图表示的是 HFD 诱导代谢综合征模型中 SD 大鼠在不添加 (1) 和添加 (2) LI/DD-II/054A/01 处理,从 1 周至 8 周后增加的平均体重 g。每个柱状表示  $\pm$ SD, \* $p$  < 0.05。

[0063] 图 10B :线形图表示的是日常饮食诱导代谢综合征模型中 SD 大鼠在添加 (2) 和不添加 (1) LI/DD-II/054A/01 的身体增加的重量。每条线表示在 8 周的处理期内的平均体重 g 变化。

[0064] 图 11 :柱状图表示的是在日常饮食诱导代谢综合征模型中 SD 大鼠血清脂联素浓度的增加。每个柱子表示空白 (1) 或 LI/DD-II/054A/01 (2) 处理 0 天到 56 天后血清脂联素浓度的平均  $\pm$ SD。N = 6, \* 表示统计意义 (t- 测试, 8 周与 0 周)。

[0065] 图 12 :柱状图表示的是用 LI/DD-II/054A/01 添加到代谢综合征模型的 SD 大鼠中的 HOMA 指数的降低。每个柱子表示空白 (1) 或 250mg/kg 的 LI/DD-II/054A/01 (2) 处理 0 天到 56 天后 HOMA 指数 (任意单位) 的平均  $\pm$ SD。N = 6, \* 表示统计意义 (t- 测试, 8 周时 LI/DD-II/054A/01 组与空白对照组)。

[0066] 图 13 :柱状图表示的是在日常饮食诱导肥胖模型的 SD 大鼠的体重减少%。柱

子 1-5 分别表示的是用 LI/DD-II/054A/03 (100mg/kg)、LI/DD-II/054A/03 (250mg/kg)、AR 933 (250mg/kg)、混合物 1D (250mg/kg) 和西布曲明 (7mg/kg) 添加到处理组中体重减少%。

[0067] 发明详细说明：

[0068] 肥胖是针对特定年龄，性别和高度的体重过重，是能量摄入和能量消耗之间的不平衡的一种结果。肥胖的主要原因是由于暴饮暴食，缺乏运动或饮食失调，某些遗传性疾病，潜在性疾病（如甲状腺功能减退），服用某些药物或久坐的生活方式。肥胖增加许多疾病和健康疾病如高血压，血脂异常（例如，高总胆固醇或高甘油三酯水平），2 型糖尿病，冠心病，中风，胆囊疾病，骨关节炎，睡眠障碍，呼吸困难，肿瘤（子宫内膜癌，乳腺癌和结肠癌），动脉硬化和心脏衰竭的风险。

[0069] 代谢综合征是一种包括机能失调的疾病，并提高了患患心脏病的风险。代谢综合征的主要特征是超重，心血管参数（血压高，血脂异常，甘油三酯水平高和血液中的高密度脂蛋白胆固醇水平低），动脉粥样硬化，糖尿病和胰岛素抵抗。这些特征的主要痛苦即代谢综合征是极容易患上心脏病，每个特征都是一个危险因素。

[0070] 脂肪细胞和巨噬细胞在代谢综合症的发病机制和与之相关的疾病发挥重要的作用。他们都有着一个共同的特点，包括吞噬和杀灭微生物和分泌细胞因子，如肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 1 (IL-1) 的能力。在参与细胞因子，炎性分子，和脂肪酸转运调节表达中的脂肪细胞是关键转录因子，并且巨噬细胞也具有相似的生物学作用。例如，PPAR 活性，配体活化核配体超家族的转录因子，与两种类型细胞的分化有关。PPAR 在脂肪细胞中调节脂肪细胞的生长和糖代谢。PPAR 在巨噬细胞中调节炎症基因的表达和参与动脉粥样硬化病变的发展。

[0071] 巨噬细胞在某些与代谢综合症有关的疾病状态下对基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1) 和基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3) 的正向表达。同样的，脂肪细胞除了在肥胖发展过程中积累油脂还能产生和分化多种对整个身体有强健作用的低分子量的生物活性蛋白分子，这些蛋白标志物与不同的代谢综合症的特征有关。这些代谢标志物的表达与产品，包括但不限于 PPAR- $\gamma$ ，脂肪分化相关蛋白 (ADRP)，CD36，脂肪细胞的脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4/A-FABP)， $\beta$ -3 肾上腺素受体 ( $\beta$  3-AR)，脂联素和周脂素，在肥胖和代谢综合征和其他与代谢综合症有关的疾病中变为异常。

[0072] 动脉粥样硬化，又称冠状动脉心脏病（冠心病），是一种大血管并发症和代谢综合症，对人体健康产生巨大的影响。这是一种慢性炎症反应来修改脂蛋白，主要是使低密度脂蛋白 (OX LDL) 被氧化。认为动脉粥样硬化是由血管壁巨噬细胞积累脂质导致泡沫细胞的发展和细胞活素和细胞增殖的累积从而导致平滑肌细胞增殖的发展而来的 (Berliner, J. A., Circulation, 91 :2488-2496, 1995, Boring, L., et. al., Nature, 394 :894-897, 1998)。已证实分化抗原簇 36 (CD36) 蛋白在动脉粥样硬化的过程中发挥了关键的作用。

[0073] 一些代谢生物标志物分子，消化酶和涉及到的代谢综合症和有关疾病的发病机制和控制的代谢过程简要说明概述如下：

[0074] 1、基质金属蛋白酶：

[0075] 基质金属蛋白酶 (MMPs) 是锌依赖内肽酶，是能够破坏各种细胞外基质的蛋白质，如胶原蛋白，通常在组织中的细胞之间的空间中发现。基质金属蛋白酶主要分为三个主要群体，由胶原酶形成的成纤维细胞胶原酶 -1 (MMP-1)，明胶酶包括白明胶酶 A (MMP-2) 和白

明胶酶 B (MMP-9), 和基质裂解素包括基质裂解素 1 (MMP-3) 和溶基质蛋白素 (MMP-7)。过量的金属蛋白酶导致生物分子的降解如胶原蛋白, 蛋白多糖和明胶, 它对表皮有致命的后果和还可以生成软骨, 炎症等疾病。

[0076] 认为 MMP 是冠状动脉疾病 (CAD) 的发病机制, 尤其是急性冠脉综合征 (ACS) 的发生。研究表明, MMP 及其组织抑制剂 (TIMPs) 的表达和调控在早期的 CAD 中进行评估。MMP-2, MMP-3 和 MMP-9, MMP-1 和 TIMP-2 的血浆浓度 / 活性在 80 例患者 (49 例 ACS 和 31 例稳定的 CAD) 和 40 例对照的临床研究中进行了评估, 其结论是 MMP 和 TIMP 在早期 CAD 的血浆水平与临床表现有关而炎症和代谢疾病的标志物不是遗传多态性。同样, 发现与巨噬细胞活性 (单核细胞化学诱导蛋白-1, 新蝶呤), 组织重塑 (矩阵金属蛋白酶-9) 和血栓 (组织因子) 有关的标志物在急性冠脉综合征 (ACS) 比稳定型冠心病冠状动脉疾病 (CAD) 始终更高。

[0077] 在肥胖和脂肪组织的发展中 MMP 的作用 [正反两方面的] 已经有一些调查研究。其中几个引述如下:

[0078] 在一项研究中, 研究者在两个肥胖的遗传模型 (OB/OB 和 db/db 小鼠) 和饮食诱导的肥胖模型 (AKR 小鼠) 中通过印迹法和实时 PCR 技术研究 MMPs 和 TIMPs 的差异表达。他们的结论是, 在 mRNA 水平, MMP-2, MMP-3, MMP-12, MMP-14, MMP-19 和 TIMP-1 对肥胖的脂肪组织比对瘦肉组织具有强烈诱导作用 [Chavey C et al., J Biol Chem. 2003 ;278(14) : 11888-96]。

[0079] 在一个类似的研究中, 在食物诱导肥胖小鼠上, 发现 MMP-3, -11, -12, -13, -14 和 TIMP-1 的 mRNA 的表达比标准饮食小鼠更高。还发现在体外研究中合成 MMP 抑制剂的存在可减少脂肪的生成 [MaquoiE et al., Diabetes. 2002 ;51(4) :1093-101]。

[0080] 2、过氧化物酶体增生物激活受体 (PPAR)- $\gamma$  :

[0081] 过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) 是一种核受体, 在肥胖和糖尿病中起着举足轻重的作用。脂肪组织增加是通过脂肪生成过程来产生新的脂肪细胞和在每个细胞中增加细胞质甘油三酯脂滴的数量的结果。在脂肪生成过程中, 先脂肪细胞或肥胖细胞的增殖是这些细胞分化到显型成熟脂肪细胞的过程。PPAR  $\gamma$  的表达主要在脂肪组织中, 已知其在脂肪细胞分化和脂肪沉积中发挥着关键作用。另一方面, PPAR  $\gamma$  的活性会导致胰岛素的作用有所改善。PPAR  $\gamma$  是噻唑烷二酮类 (TZD) 类降糖药如曲格列酮 (瑞如林), 罗格列酮 (文迪雅) 和吡格列酮 (爱妥糖) 的分子靶点。发现在小鼠指示的肥胖和糖尿病中, PPAR  $\gamma$  2 对脂肪组织的发育和胰岛素的敏感性具有非常大的破坏作用。PPAR  $\gamma$  是脂肪酸摄取和脂肪生成的关键调节因子, 还对脂肪细胞分化, 还对脂质储存和新陈代谢所需要酶的产生有影响 (Zhang, J., Proceedings of National Academy Sciences 2004 ;101 ;10703-10708, 2004)。

[0082] 3、重组人脂肪组织分化相关蛋白 (ADRP) :

[0083] ADRP 是一种 50kD 蛋白, 它的 mRNA (ADRP mRNA) 是 1.7kb 大小, 可在脂肪组织中高水平表达。在未分化的脂肪细胞中 ADRP 表达非常低, 但在几个小时后脂肪开始分化时 ADRP 的 mRNA 可达到 50 至 100 倍。还在很多不同类型的积累或合成脂质的细胞和组织中发现 ADRP。因此, 上述表明在脂肪细胞和其他细胞的质滴形成与稳定中 ADRP 可能发挥的作用。ADRP 能特别提高脂肪组织对长链脂肪酸的吸收。因此, ADRP 是一种识别通过控制 ADRP 表

达来控制肥胖和糖尿病的潜在化合物的重要靶子。

#### [0084] 4、脂肪细胞 CD36 :

[0085] CD36 是一种常见的由脂肪细胞和巨噬细胞表达的蛋白标志物。CD36 在脂肪细胞中作为脂肪酸转运 (FAT) 功能表达是已知的。对脂肪细胞的研究表明, CD36mRNA 是脂肪细胞分化的标志。在巨噬细胞中它是一个结合与内化的氧化 LDL(OX LDL) 的清道夫受体。CD36 也可以作为一种长链脂肪酸 (LCFA) 转运, 促进脂肪细胞对 LCFAs 的摄取。在这两类细胞的分化期间通过 PPAR 对 CD36 进行正向调控。同时也表明, 脂肪细胞可以吞噬和溶酶降解 Ox LDL, 主要是由 CD36 介导的。零 CD36 动物表明在结合和摄取氧化低密度脂蛋白方面明显降低, 以及在胆固醇、非酯化游离脂肪酸, 甘油三酯的空腹水平方面明显提高。

#### [0086] 5、巨噬细胞 CD36 :

[0087] CD36 是 B 类清道夫受体家族的原型成员。在细胞表面上的内源性 (如巨噬细胞, 脂肪细胞, 血小板, 微血管内皮细胞和专门的上皮细胞) 和变异性 (例如, 黑色素瘤细胞和成纤维细胞) 的多配体受体的表达赋予噬菌细胞对凋亡细胞的吞噬活性。CD36 广泛表达, 可能与多个外配体, 包括血小板反应蛋白 1(TSP-1), 长链游离脂肪酸 (FFA 的), 改良 (氧化) 低密度脂蛋白 (OX-LDL), 晚期糖化端 (年龄) 产品, 胶原蛋白 I 和 IV 型胶原有关 [PLoS Medicine, 2 :152-161, 2005]。CD36 在单核细胞和巨噬细胞表面表达并介导对氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 的摄取 [Nozaki, S., J. Clin. Invest. 96 :1859-1865, 1995], 以及在不同的细胞过程, 包括泡沫细胞的形成, 脂肪酸运输, 吞噬和清除衰老细胞, 抑制血管生成, 细胞-基质配合中发挥着作用。已知的 CD36 依赖摄取 Ox-LDL, 对胆固醇的积累和随后的泡沫细胞形成起着关键作用; 在动脉粥样硬化的小鼠模型中观察到 CD36 有可能参与活动 [Michael E et al, J. Exp. Med., 203 :2613-25, 2006]。CD36 可能启动动脉粥样硬化的伤害并是心血管疾病的一个重要危险因素。在缺乏 CD36 受体的老鼠中, 泡沫细胞形成和血管病变发展存在着中停现象 [Febbraio M, et. al., J Clin Invest 105 :1049-1056, 2000]。通过糖尿病人动脉粥样硬化病变中的巨噬细胞和泡沫细胞形成过程中, 在巨噬细胞中高血糖诱导 CD36 的合成与增加 Ox-LDL 的摄取有关 [PLoS Medicine, 2 :152-161, 2005]。增加的过氧化物酶体增殖子激活受体- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 可获得高血糖水平, 导致巨噬细胞 CD36 的表达增加, 并有助于加速动脉粥样硬化。因此, 上述数据表明, 增加 CD36 的表达与动脉粥样硬化性血管病变的高血糖之间有一定的关系, 从而用 CD36 作为一个潜在的动脉粥样硬化分子标志物提供潜在的机会和有利条件。

#### [0088] 6、瘦蛋白 :

[0089] 瘦蛋白在调节食物摄入量, 能量消耗过程中起着重要作用。瘦蛋白在脂肪组织, 进一步还包括低和中分子量的蛋白质如脂联素, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-6 (IL-6), 抵抗素, 纤溶酶原激性抑制剂-I (PAI-I) 和血管紧张素中是一个重要的脂肪细胞因子。

[0090] 这些细胞因子在脂肪组织的生理机制发挥着重要作用, 并认为是肥胖, 胰岛素抵抗和内皮功能障碍之间的联系。

[0091] 在皮下脂肪组织中的瘦蛋白、脂肪酸转运酶 ((FAT/CD36)、PPAR- $\gamma$  2, 解偶联蛋白 (UCP)-2, UCP-3 和 TNF- $\alpha$  的体内基因表达受独立于胰岛素的循环脂质的调控。因此, 长期高脂血症, 有助于提高脂肪代谢和储存, 其结果是增加这些蛋白质的表达 [Nisoli E et

al. ;Diabetes.2000 Mar ;49(3) :319-24]。

[0092] 7、氧化低密度脂蛋白：

[0093] 已知当被氧化时，LDL 胆固醇是坏胆固醇并变得更加危险。在向各个器官和组织供应血液的动脉中氧化 LDL 可产生炎症。这会导致动脉粥样硬化，增加心脏病发作或中风的风险。

[0094] Holvoet 等人首次发现代谢综合征与高数量的氧化 LDL 并因此具有高水平的循环氧化 LDL 有关。在这些研究中，氧化 LDL 用一种单克隆抗体酶联免疫吸附试验来测量。他们证实，代谢综合征以及腹部肥胖，高血糖，高甘油三酯血症的发病率升高与氧化 LDL 浓度的增加有关 [Holvoet P et al., JAMA. 2008 May 21 ;299(19) :2287-93.]。

[0095] 一项关于患有多囊卵巢综合征 (PCOS) 妇女的研究指出，氧化低密度脂蛋白和载脂蛋白 E (载脂蛋白) 和非酯化脂肪酸的增加与胰岛素抵抗的有直接关系，可能会增加这些妇女早期动脉粥样硬化的风险。

[0096] 8、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)：

[0097] 单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)，一个小诱导基因 (SIG) 的家族，在损伤与感染位置补充单核细胞中起一定的作用。MCP-1 也被称为小诱导细胞因子 A2 (SC YA2) 和单核细胞趋化和活化因子 (MCAF)。MCP-1 是在类风湿关节炎患者的关节中发现的，其主要起着在关节中补充巨噬细胞和持续发炎的作用。MCP-1 也发现在作为肾发炎警告标志物的狼疮患者的尿液中 [<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=33740>]。最近，报道称 MCP-1 作为一个新的脂肪细胞因子参与肥胖相关的胰岛素抵抗和动脉粥样硬化的发展 [Kawada T, et. al., Asia Pac J Clin Nutr. 2008 ;17(1) :126-30]。MCP-1 与其他脂肪因子，包括瘦素，脂联素，肿瘤坏死因子  $\alpha$  等一样与炎症及炎症反应有关。肥胖具有慢性轻微发炎症状的特点，具有突出的炎症标志物和表达的循环水平。这些高浓度的炎症相关的脂肪因子产物越来越多地被认为在肥胖，尤其是 II 型糖尿病和代谢综合征有关疾病的发展中起着重要作用 [Trayhurn P. and Wood I. S., Biochem Soc Trans. 2005 ;33(Pt5) :1078-81]。

[0098] 9、脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4)：

[0099] FABPs 是代谢和炎症路径的分子伴侣。FABP 基因家族不同成员呈现出非统一性的组织表达与分布，并且在组织中的代谢活性表达非常丰富。FABPs 具有许多功能。例如，做为脂质伴侣，FABPs 可积极促进脂质转运到细胞特定隔层，如脂滴存储；内质网发信号，转运和薄膜合成；线粒体或过氧化物酶氧化 [Masato, F et al, Nature Reviews/Drug Discovery, Vol. 7 :489-503, 2008]。A-FABP 是在成熟的脂肪细胞和巨噬细胞中重要表达的脂肪酸胶蛋白。即众所周知的 FABP-4 和 aP2。然而，当其脂肪细胞前体和单核细胞分别分化时，脂肪细胞的 A-FABP 表达水平比巨噬细胞高出（约 10000 倍）。

[0100] A-FABP 在人血清中大量存在，通过其在脂肪细胞和巨噬细胞中独特的活性，和其对代谢和炎症反应的整合，它可能在代谢综合征，如肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病的主要因素的发展中发挥了核心作用 [Masato, F et al, Nature Reviews/Drug Discovery, Vol. 7 :489-503, 2008]。AP2 是对脂肪细胞调节系统葡萄糖和脂质代谢的表达。阻止 AP2 功能是一种新用来

[0101] 治疗肥胖症，跟踪心脏病，代谢综合征和其他代谢综合征因素的治疗策略。



或化合物对肥胖,糖尿病,心血管系统和代谢综合征和其他与代谢综合症有关的疾病因素有用。

[0112] 13、蛋白酪氨酸磷酸酶 IB(PTP-IB) :

[0113] 胰岛素抵抗是 2 型糖尿病和肥胖的重要标志。蛋白酪氨酸磷酸酶 IB(PTP-IB) 被认为是一个对胰岛素敏感细胞如脂肪细胞,肌肉细胞和肝细胞中胰岛素信号转换的反向调控。在胰岛素抵抗的糖尿病和肥胖中,PTB-IB 是正表达,并且其酶活性就增加。过量的 PTP1B 表达可降低胰岛素受体和 IRS-I 磷酸化,从而产生胰岛素抵抗(Theodore O. J., et al., Nature Reviews Drug Discovery, 1 ;696-709, 2002 ;Carol L. V., et. al., J. Biol. Chem. 275 :18318-18326, 2000.)。因此,对处于危险的肥胖和 2 型糖尿病患者,PTP-IB 抑制剂可作为一种新的治疗途径。

[0114] 14、脂肪生成 :

[0115] 脂肪生成是指脂肪前体分化和增殖成为主要脂肪或脂肪细胞,并且是细胞分化的最深入研究的模型之一。在脂肪生成过程中,脂肪前体增殖或脂肪细胞前体通过这些细胞的分化,变成成熟的显型脂肪细胞。核受体 PPAR  $\gamma$  的表达主要在脂肪组织中,已知其在脂肪细胞分化和脂肪沉积中发挥关键作用。然而,市场上许多用于治疗 II 型糖尿病,都围绕 PPAR  $\gamma$  的表达和促进脂肪生成上。脂肪细胞分泌的蛋白质有些有益(瘦素,脂联素)有些有害作用(血管紧张素)。这些分泌因子之间的平衡疾病,对巨噬细胞(细胞活素)分泌的产物有影响,从而导致代谢综合征的发展。

[0116] 15、脂肪分解 :

[0117] 脂肪分解是指脂肪细胞中存贮的脂质破裂。 $\beta$  3-肾上腺素受体激活剂可刺激白色脂肪组织和产热的棕色脂肪组织的脂肪分解。具有脂肪分解活性的植物化学剂可以用于肥胖,代谢综合征和其他代谢疾病的治疗。脂肪组织的脂肪分解代谢过程,导致存贮在脂肪细胞中的甘油三酯破裂并释放出脂肪酸和甘油。在脂肪分解过程中所涉及的蛋白质可成为用于肥胖和代谢综合征治疗的药物靶点。

[0118] 16、 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶) :

[0119]  $\alpha$ -淀粉酶是一种水解复合碳水化合物如将淀粉转化为糖的酶。淀粉不能被吸收,除非它们首选被消化酶淀粉酶和其他辅助酶分解。当碳水化合物被消耗,在消化道中的酶将这些大的分子分解成较小的糖分子,并通过肠道吸收。最近,淀粉阻滞剂已被证明对治疗控制肥胖有效。因此,淀粉酶抑制剂对胃肠道和代谢的影响,有助于糖尿病和肥胖的治疗。

[0120] 植物也可用  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂作为防御策略。这些抑制剂在昆虫肠道中阻碍  $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶的消化作用,因此,可作用为昆虫拒食。从植物中分离出  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂可用作淀粉阻滞剂,来大大的降低选自日常饮食中的淀粉的葡萄糖的数量,并在重复给药后降低食欲。

[0121] 17、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -葡萄糖苷酶) :

[0122]  $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种催化复合碳水化合物降解成葡萄糖的酶。其活性与  $\alpha$ -淀粉酶相似。通过抑制这种酶,在肠道中,碳水化合物有效的分解和葡萄糖的吸收被延迟,其结果是在全天内血糖上升较慢和较低,尤其是饭后。目前市场上的一些  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,如阿卡波糖,米格列醇和伏格列波糖可作为口服抗糖尿病药物,用于 2 型糖尿病的治疗与控制。因此,具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制的植物提取物,馏分或纯化合物可用于 2 型糖尿

病更大的高血糖,尤其是餐后高血糖的血糖控制。

[0123] 代谢综合症是公认的一种重要疾病,其可以是单独或一系列疾病症状,如肥胖,糖尿病和动脉粥样硬化,以及如果没有及时治疗将导致多种并发症。即使在市场上有多个药物可用于代谢综合症不同成分的治疗,但它们很多具有一些相关的副作用,很少药物可有效的用来治疗代谢综合症和还没有可以用于相关的全部疾病的治疗。因此,发开用于代谢综合症,肥胖,糖尿病和动脉粥样硬化的预防与治疗,特别是使用安全和有效的天然化合物具有很大的药用需求。

[0124] 在过去的几十年中肥胖研究的关键发展之一就是已普遍认识到,肥胖是一种慢性低水平炎症。肥胖和炎症之间的关系已从肥胖个体的一些炎症标志物物包括细胞因子(TNF- $\alpha$ , IL-6)和急性时相蛋白如C-反应蛋白(CRP)的血浆水平增加得到公认(Stienstra R., et. al., 2007, article ID 95974)。因此,肥胖,糖尿病和动脉粥样硬化以及其他成分的代谢综合症选择性与炎症有关系。近年来,也有人推测,慢性、低级组织的炎症是导致胰岛素抵抗,2型糖尿病的主要病因(Science News, Science Daily, U.S., November 7, 2007)。

[0125] 代谢疾病方面的研究活动已成为世界各地的许多科学家的一个高度优先的对像,相比之下的合成来源的商业药物,来寻找替代解决方案,尤其是那些基于作为植物衍生产物被认为是天然和自然的植物源性产品。记住这些并迫切需要用于代谢综合症,肥胖,糖尿病,动脉粥样硬化和內皮功能障碍和其他代谢疾病的预防,控制和治疗的产品,本发明人进行了广泛的研究调查,涉及几种植物提取物,馏分和纯化合物的几个体外和体内实验,并意外地发现,在一项基于细胞治疗效果的研究中,选自药草绒毛戴星草的提取物,馏分和纯化合物能有效改善代谢过程,包括抑制脂肪生成,和促进脂肪水解(脂肪分解)。本发明者还意外的发现,在一项基于细胞治疗效果的研究中,使用一种或多种选自药草绒毛戴星草的提取物,馏分,活性化合物的混合物能有效改善某些标志物分子或生物蛋白水平,改变包括代谢综合症,肥胖,糖尿病,动脉粥样硬化,內皮功能障碍和其他与代谢综合症有关的疾病病症。

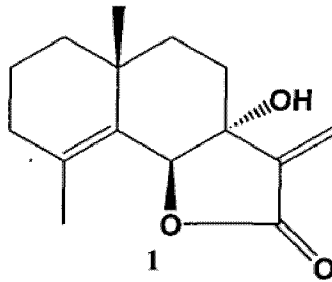
[0126] 对分化的脂肪细胞中脂质积累的抑制是通过在3T3-L1小鼠前体脂肪细胞中用绒毛戴星草的花头的醋酸乙酯提取物(LI/DD-II/054A/01)评估来表示。用处理细胞的脂肪积累抑制与模拟处理分化脂肪细胞相比较,并计算抑制百分率。意外的是,10  $\mu$ g/ml的绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(LI/DD-II/054A/01)对脂肪生成显示出明显的抑制作用,脂质积累的抑制率为65.9%,概括如表1所示。

[0127] 同样的,用3T3-L1前体脂肪细胞在分化/成熟脂肪细胞中对绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(LI/DD-II/054A/01)对促脂解活性进行了评估。通过用脂肪分解检测试剂盒(Chemicon International, USA)的每个步骤来测量分泌到培养基中的游离甘油,对成熟的脂肪细胞分解脂肪的活性进行了评估。相比于对照含有已知浓度甘油,样品溶液中的甘油浓度的增长百分率,相当于绒毛戴星草提取物(LI/DD-II/054A/01)对脂肪分解的加速百分率。意外的是,25  $\mu$ g/ml的LI/DD-II/054A/01在脂肪分解中显示出对脂肪水解/脂肪分解适度提高,为26.7%增长,概括如表2所示。

[0128] 通过生物鉴定指导纯化LI/DD-II/054A/01来识别活性化合物,并意外的发现7- $\alpha$ -羟基-4,11(13)-双烯酮-12,6-内酯,也就是所知的7-羟基耳叶苔内酯(LI054A01; 1),发现其起着活性作用。该活性化合物7- $\alpha$ -羟基-4,11(13)-双烯酮-12,6-内酯也就

是所知的 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 显示出较高的活性并显示在 0.5  $\mu$ g/ml 浓度时对脂质积累 (脂肪生成) 的抑制率为 68.7%和在 5  $\mu$ g/ml 浓度时提高 47.8%的脂肪分解, 概括如表 2 所示。

[0129]



### 7-羟基耳叶苔内酯

[0130] 同时还意外的发现, 绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 在 PMA 诱导的 A2058 人类黑色素瘤细胞中的基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1) 具有强列的抑制活性 (图 1)。佛波酯 (PMA) 是一种已知的强有力的细胞内氧化应激诱导剂。在心血管疾病, 如动脉粥样硬化中, 过氧化应激标志物的生产是一个关键因素。此外, LI/DD-H/054A/01 在白细胞介素 -1 $\beta$  诱导 A549 人肺肿瘤细胞中的基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3) 具有强列的抑制活性 (图 2)。在动脉粥样硬化中, 在促炎性细胞因子如 IL-1 $\beta$  的诱导下促炎蛋白酶, 如 MMP-3, MMP-9, MMP-13 的生产是动脉粥样硬化病变和动脉瘤形成的发展和进展的关键。

[0131] 然后, 本发明者对那些主要负责脂肪生成过程中的代谢标志物的控制进行了评估, 通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 在 3T3-L1 脂肪细胞的脂肪生成过程中对 2 型糖尿病胰岛素抵抗, 肥胖, 代谢综合征和其他代谢病症如过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), CD36, 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4 or aP2), 周脂素, 和  $\beta$ -3 肾上腺素受体 ( $\beta$ 3AR) 进行免疫印迹分析。保养在杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中的老鼠前体脂肪细胞 3T3-L1 细胞预先用不同浓度的 LI/DD-II/054A/01 处理 2 小时, 然后加入含有 500nM 胰岛素、1.0  $\mu$ M 地塞米松、0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基培养 48 小时。之后, 细胞在存在或缺少 LI/DD-II/054A/01 或 LI054A01 继续用分化培养基 (DMEM 培养液含 100nM 胰岛素) 培养 8 天。最后, 处理细胞并用细胞溶解液溶解。通过免疫印迹检测法评估蛋白质提取液, 并用西微型化学发光底物来发展免疫反应带, 以及用柯达影像站来捕获的印迹图像, 用肌动蛋白表达来格式化。

[0132] 令人惊讶的发现, 醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对改善一些脂肪细胞分化标志物水平如过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), CD36, 脂肪酸结合蛋白 4 (aP2/FABP4) 和细胞内脂滴表面相关蛋白 (周脂素) 具有强烈的剂量依赖性 (图 3)。在 LI/DD-II/054A/01 处理脂肪细胞后一些标志物蛋白反向调控, 表明绒毛戴星草醋酸乙酯提取物在脂肪细胞分化过程中发挥多重有效作用: (1) 通过反向调控 PPAR  $\gamma$  来抑制细胞分化, PPAR  $\gamma$  是一种核受体蛋白, 作为一种转录因子调节细胞分化, 发育和代谢功能。(2) 通过抑制 CD36 来限制胆固醇酯的吸收, CD36 是一种 B 类清道夫受体参与脂质的摄取。(3) 通过降低 FABP4/aP2 水平来降低细胞内的肥胖和细

胞内的脂质转运, FABP4/aP2 作为长链脂肪酸的一种转运蛋白。此外, LI/DD-II/054A/01 处理脂肪细胞后周脂素的反向调控, 表明在细胞质中脂肪存贮明显减少。周脂素是一种在脂肪细胞中涂盖在脂滴上的蛋白质。它主动保护激素敏感脂肪酶的活性, 激素敏感脂肪酶用在代谢和脂解过程中可分解甘油三酸脂成甘油和游离脂肪酸。因此, 表明毛戴星草醋酸乙酯提取物可提供一种情形, 即通过涂盖在脂质填充介质周围的周脂素越来越薄, 存储脂质越来越容易受到酶的分解变成甘油和自由脂肪酸。

[0133] 此外, 通过 LI/DD-II/054A/01 使  $\beta$ -3 肾上腺素受体 ( $\beta$ 3AR) 在 3T3-L1 脂肪细胞中的表达 / 产量显着增强, 并呈剂量依赖性, 如在图 3 所示。过度减肥表明, 通过提高细胞内 cAMP 和激活在脂肪组织中的线粒体解偶联蛋白 1 来增加能源消耗。

[0134] 在巨噬细胞, CD36 是一个调停摄取氧化低密度脂蛋白 (OxLDL) 和随后泡沫细胞发展的清道夫受体。因此, 增加巨噬细胞 CD36 水平一直以来被认为是动脉粥样硬化发展的一个预测指标。LI/DD-II/054A/01 和 LI054A01 的存在或缺乏对高糖诱导 J774 巨噬细胞的 CD36 蛋白表达的抑制可用免疫印迹法检测进行评估。简言之, 在相同量的经 LI/DD-II/054A/01 或 LI054A01 处理细胞后的细胞的细胞溶解液蛋白中加入 7.5% SDS-PAGE; 此后, 蛋白转移到硝酸纤维素膜上。阻断非特异性位置后, 在膜上形成 CD36 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。最后, 用西微型化学发光底物来发展特异性的免疫反应带, 以及用柯达影像站 (Kodak, USA) 来捕获的印迹图像, 带的强度用光密度来计算并用各个样品中的肌动蛋白表达来格式化。其结果如图 4 所示。典型免疫印迹图像表明, 在高糖诱导 J774 巨噬细胞中的 CD36 蛋白表达的抑制依赖于 LI/DD-II/054A/01 剂量。然而, 相比于 LI/DD-II/054A/01, 活性化合物 LI054A01 对 CD36 的抑制大于 10 倍。这个意外的结果, 为绒毛戴星草提取物和化合物的性能用于抗动脉粥样硬化提供了有利的支持。

[0135] 同样值得注意的是, 醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 对高糖诱导 J774 巨噬细胞中的单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 和氧化 LDL 具有强烈的抑制作用。这些标志物对泡沫细胞的分化发展动脉粥样硬化斑块有重要的意义, 因此被认为是用于动脉粥样硬化发展与进程的潜在生物标志物。

[0136] 同样, 通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 在 3T3-L1 脂肪细胞中对脂联素蛋白调控的评估采用西方免疫印迹检测技术。细胞培养基, 处理方法和免疫印迹检测方法按标准技术进行, 并简要介绍上述代谢标志物。LI/DD-II/054A/01 提取物在 3T3-L1 成熟脂肪细胞中对脂联素蛋白表达显示出适度的正向调控, 概括如图 8 所示。脂联素是脂肪细胞分泌的一种激素。它可以降低细胞内甘油三酯含量并通过有效的胰岛素信号对葡萄糖摄取进行正向调控。因此, 它可以对脂肪形成和胰岛素抵抗或 2 型糖尿病进行预防。因此, 我们的发现表明, 毛戴星草提取物可以用于抗肥胖、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病的发展, 也有助于减弱内皮功能疾病。因此, 提取物可有效用于对上述代谢综合症的预防、治疗和控制。通过在 LI/DD-II/054A/01 处理 3T3-L1 前脂肪细胞中的蛋白酪氨酸磷酸酶 -1B (PTP-1B) 的活性调控来对绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 对胰岛素的敏感性的影响进行评估研究。3T3-L1 前脂肪细胞培养在按标准技术制备的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 上并用 LI/DD-II/054A/01 处理 48 小时。用细胞溶解液溶解细胞, 并将细胞裂解产物在 4°C 时 14000g 转速下离心 5 分钟进行澄清。使用含有 10mM 的 4-硝基苯磷酸盐的底物试剂 (pNPP, Sigma Chemical Co., MO, USA) 按照标准技术来进行 PTP-1B

活性评估,并在微孔板 ELISA 仪 (BioRad, USA) 上显示反应颜色为红色。结果意外的表明, LI/DD-II/054A/01 对 3T3-L1 前脂肪细胞中的 PTP-IB 具有强烈的抑制作用 (图 9)。

[0137] 通过对胰岛素受体和胰岛素受体底物复合物 1 (IRS-1) 的磷酸酪氨酸残基的去磷酸化,蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP)-IB 可作为一个胰岛素信号的生理反向调节器。在先前的一个动物研究中,抗发育中的 2 型糖尿病中意外的发现了沉默 PTP-IB 基因。因此,最近发现抑制 PTP-IB 是治疗 2 型糖尿病的一个潜在的靶向。有趣的是,本发明的 LI/DD-H/054A/01 在脂肪细胞中显示出对 PTP-IB 活性强烈的抑制作用 (图 9)。因此,这些数据显示,绒毛戴星草提取物也可用作治疗 2 型糖尿病的一个潜在干预治疗方案。

[0138] 相当意外和惊讶地发现,选自绒毛戴星草的单个成分可以调节多个与代谢综合症和其他代谢疾病有关的疾病标志物蛋白的调节。这个意外的结果表明,绒毛戴星草衍生的提取物、馏分和化合物可用于对动物和人类的代谢综合症、肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化、内皮功能障碍、慢性肾脏疾病 (CKD) 和其他代谢疾病疾病的预防、治疗和控制的一个潜在的治疗剂。

[0139] 在体外模型中所示的 LI/DD-II/054A/01 抗代谢综合症强烈效果进一步在代谢综合症的体内模型中得到评估。代谢综合症疾病通过用高脂肪,高胆固醇,高盐,高糖饮食来喂养雄性大鼠 8 周来实验性诱导生成。8 周的前期诱导后,大鼠随机的每 6 个一组分为两组,并对处理组的老鼠口服添加在 10mL 的 0.5% CMC 水溶液中加入 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 再喂养 8 周。对照组的老鼠在这段时间内仅喂食空白溶液 (0.5% CMC 水溶液的 10mL/kg 体重)。整个研究期间每周记录一次每个大鼠的体重。计算处理组和对照组的平均体重。计算与初始体重相比,开始治疗后 1 周,4 周和 8 周末体重增加量。与对照组相比,250mg/kg 体重剂量的 LI/DD-II/054A/01 在减少体重增长 (66.04%) 上显示出强烈的效果和统计意义 ( $p < 0.01$ )。处理组和对照组体重增长的结果如图 10A 和 10B 所示。

[0140] 血清脂联素的评估:脂联素是一种由脂肪组织分泌,可调节一些代谢过程,包括糖代谢和脂质代谢的特异蛋白质激素。循环脂联素浓度与体内脂肪呈负相关性。肥胖,心血管疾病,胰岛素抵抗与脂联素水平低相关。因此,这种蛋白质激素已被认为是一种代谢综合症和与代谢综合症有关的疾病病症的有力标志物。用基于夹心大鼠脂联素的双抗体 ELISA 试剂盒来对处理组和对照组老鼠的血清脂联素进行评估。数据显示,当与基线相比较时,每日添加 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 在 8 周后的结果是对血清脂联素浓度有统计意义上 ( $p = 0.00618$ ) 的改善,概括如图 11 所示。然而,对照组显示没有对血清脂联素浓度有改善。因此,LI/DD-II/054A/01 在减轻症状如肥胖,心血管疾病,胰岛素抵抗,2 型糖尿病,代谢综合症和其他与代谢综合症有关疾病上具有潜在作用。

[0141] 添加 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01,其结果是在肥胖中,对血清胆固醇,低密度脂蛋白和甘油三酯的减少百分率分别是 15.3,12.7 和 22.9。这些观察结果也证实其能有效提高脂联素水平。

[0142] 稳态模型评估法 (HOMA) :

[0143] HOMA 指数是基于血清胰岛素和血糖水平计算得到,使用公式:空腹胰岛素浓度 ( $\mu\text{U/mL}$ ) x 空腹血糖浓度 ( $\text{mmol/L}$ ) / 22.5。图 12 所示的数据显示,相比较于对照组,每日添加剂量 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 喂养 8 周后的结果是,HOMA 指数明显降低。稳态模型评估法 (HOMA) 在临床研究被广泛作为胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞功能的程度。该数据表

明, LI/DD-II/054A/01 可作为一种用来提高改善胰岛素敏感性和  $\beta$  细胞功能的治疗剂。

[0144] 根据目前的动物实验研究, 很明显 LI/DD-II/054A/01 不仅可减少肥胖, 还可改善代谢综合症所括体重增加, 内脏和器官的脂肪沉积等多种症状, 以及改善脂质, 血糖的动态平衡,  $\beta$ -细胞功能等。通过 LI/DD-II/054A/01 治疗得到体重增长降低具有统计意义。此外, 在 LI/DD-II/054A/01 处理组中对脂肪组织也有明显的降低。综上所述, LI/DD-II/054A/01 是用于治疗肥胖, 代谢综合症和其化有关代谢疾病的有效制剂。

[0145] 另外, 随机筛选研究意外的发现, 莽吉柿外皮的甲醇提取物 (AR 933) 在酶研究中对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有强烈的抑制活性作用, 以及在体外 3T3-L1 细胞中显示出抗脂肪生成的强烈作用。在生物鉴定指导分离甲醇提取物中发现最活跃的化合物是  $\alpha$ -倒捻子素 (2) 和  $\gamma$ -倒捻子素 (3)。该甲醇提取物含有  $\alpha$ -倒捻子素和 / 或  $\gamma$ -倒捻子素, 所以表现出强烈的促进脂解和抗脂肪生成的活性。该甲醇提取物也能显著的改善多种关键生物标志物分子和生物蛋白质水平, 这些蛋白质主要在脂肪生成和脂质分解过程, 2 型糖尿病的胰岛素抵抗, 代谢疾病和与代谢综合症有关的疾病病症中起着主要作用。它们包括 PPAR  $\gamma$ , ADRP, 脂肪细胞 CD36, aP2/FABP4/A-FABP,  $\beta$  3AR, 脂联素, 周脂素和 PTP-IB (图 5、8、9)。值得注意的是 AR933 也对抑制高糖诱导巨噬细胞中的巨噬细胞 CD36, MCP-1, 和氧化 LDL 有强烈的作用 (图 7)。总而言之, 这些结果表明, AR933 也可以用于治疗肥胖, 心血管疾病如动脉粥样硬化, 代谢综合征和其他代谢疾病的一个潜在应用。

[0146] 然后, 本发明者随机的制备和测试多种含有绒毛戴星草提取物与多种植物提取物的混合物来寻找一种混合物显示出对代谢过程和与代谢疾病有关的生物标志物分子产物的改善更有效, 和确定一种对肥胖, 代谢综合症和与代谢综合症和代谢疾病有关的疾病病症的控制、治疗和预防更有效的制剂。意外发现, 含有至少一种选自绒毛戴星草的提取物或馏分或浓缩馏分或化合物的植物化学化合物的组合的混合物, 对某些代谢过程的改善和调节一些参与代谢过程的重要代谢标志物非常有效。

[0147] 由上述混合物控制的代谢过程包括抗脂肪生成和亲脂肪分解, 和  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制。由上述混合物改善的标志物包括但不限于 MMP-1, MMP-3, PPAR  $\gamma$ , ADRP, 脂肪细胞 CD36, 巨噬细胞 CD36, MCP-I, Ox-LDL, aP2/FABP4/A-FABP,  $\beta$  3AR, 脂联素, 周脂素和 PTP-IB。

[0148] 更重要的是, 进一步意外的发现, 这两种草药的提取物在混合使用时比分别单独使用时对改善某些代谢过程和调节一些参与代谢过程的重要代谢标志物具有协同增效作用。例如, 混合物 1D 是由醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和莽吉柿甲醇提取物 (AR 933) 以 1 : 3 单位剂量比混合而成, 显示出其对生物标志物如脂肪细胞 3T3-L1 细胞中的 ADRP, aP2, 周脂素和 PTP-IB 以及小鼠巨噬细胞中的 CD36, MCP-I 和 Ox-LDL 具有抑制协同增效作用, 如图 6、7、9 所示。此外, 混合物 1D 也显示出对脂肪细胞中的脂联素产量有协同增效作用 (图 8)。混合物的效果比分别单独化合物的显示效果要更好。

[0149] 绒毛戴星草提取物和莽吉柿甲醇提取物和它们的混合物在体外模型中所显示的强烈抗肥胖和协同增效作用进一步在一个体内肥胖模型中得到评估。肥胖通过用添加高脂肪饮食来喂养雄性大鼠 8 周来实验性诱导生成。8 周的前期诱导后, 大鼠随机的每 7 个一组分为多组, 并对属于处理组的老鼠每日口服 10mL 的 0.5% CMC 水溶液中加入 100 或 250mg/

kg 体重的绒毛戴星草提取物 (LI/DD-II/054A/01) 或 250mg/kg 体重的 AR933 或 250mg/kg 体重的以 1 : 3 比例混合的 LI/DD-II/054A/03 和 AR 933 的混合物 1D, 再喂养 8 周。对照组的老鼠在这段时间内仅喂食空白溶液 (10mL 的 0.5% CMC 水溶液)。每周记录一次每个大鼠的体重。计算与初始体重相比, 开始治疗后 1 周, 4 周和 8 周末体重增加量。处理组老鼠体重增加的抑制依赖 LI/DD-II/054A/03 剂量。与对照组老鼠相比, 添加 100mg/kg 体得的 LI/DD-II/054A/03 的老鼠体重增加降低率为 46.3%。同样的, 每日剂量为 250mg/kg 的 AR 933 和 LI/DD-II/054A/03 的老鼠体重增加降低率分别为 41.3% 和 80.1%。值得注意的是, 与对照组老鼠相比, 相同剂量水平 (250mg/kg) 的混合物 1D 对体重增加降低显示出强烈和协同增效作用 (89%)。处理组和对照组的体重增加结果如图 13 所示。

[0150] 从上述情况可以很明显的看出, 含有以 1 : 3 比例混合的绒毛戴星草甲醇提取物 (LI/DD-II/054A/03) 和莽吉柿甲醇提取物 (AR 933) 的混合物 1D 显示的体重增加降低效果比单独化合物 LI/DD-II/054A/03 和 AR 933 显示的效果更好, 表明这两种化合物之间的效果有协同增效作用。

[0151] 虽然这些研究中只使用一些提取物, 但本发明包括绒毛戴星草的所有提取物, 活性馏分和活性化合物, 其包括范围 0.1% 至 99.9% 的 7-羟基耳叶苔内酯活性成分或其他活性成分。优选的使用绒毛戴星草有机提取物或从这些具有或不具有标准 7-羟基耳叶苔内酯的提取物中分离出来的一种馏分或纯化合物。用于获得活性提取物的介质可以是有机溶剂或水或有面溶剂与水的混合液, 优选是一种有机溶剂。有机溶剂的列表包括但不限于正己烷, 二氯甲烷, 氯仿, 乙酸乙酯, 丙酮, 甲醇, 乙醇, 正丁醇, 异丙醇, 甲基异丁基酮等或其混合物。这些粗提取物可以作为一种药剂或用来制备化合物。这些提取物可以浓缩到指定 7-羟基耳叶苔内酯浓度, 也可以使用溶剂分离或洗涤, 或硅胶或反相硅胶色谱柱, 或使用有机溶剂或水溶剂或其混合液的树脂柱, 或结晶, 或直接使用前期的混合物, 来达到本发明所需要的健康应用或制备化合物需求。

[0152] 同样, 本发明已证实使用了莽吉柿甲醇提取物。不过, 也可以使用任何有机溶剂提取物或混合有机溶剂提取物或水或采用一种含有水和水溶性有机溶剂的混合溶剂提取的一种提取物。

[0153] 本发明的这种新的和具有价值的化合物包括以下所述不同的方面:

[0154] 本发明说明书和权利要求中广泛使用的词汇“混合物”是指草药粉末, 提取物, 馏分, 活性化合物或植物化学物质和植物化学活性物质。词汇“混合物”从现在开始用来描述替代这些术语。

[0155] 选自绒毛戴星草提取物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物质可用作药品 / 膳食添加剂 / 食品原料, 用来对肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化、代谢综合征和其他代谢疾病的防预、治疗和控制。

[0156] 本发明所述的药品 / 膳食添加剂 / 食品原料是选自绒毛戴星草提取物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物质或其混合物。

[0157] 本发明的一个重要方面, 提供了药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并选择性的包括一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 药用或膳用可接受

的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物。

[0158] 本发明的另一重要方面,提供了药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,用于控制、预防和治疗一种或多种疾病,这些疾病包括但不限于肥胖,过度减肥,糖尿病,动脉粥样硬化,动脉硬化,心血管疾病,神经系统疾病,阿尔茨海默氏症,认知障碍,氧化应激,皮肤疾病,皮肤老化,紫外线照射损害,高血压,高胆固醇血症(低密度脂蛋白,高密度脂蛋白,极低密度脂蛋白),高血脂(甘油三酯),免疫缺陷,癌症,代谢综合征和其他代谢疾病。

[0159] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,与一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物组合,用于控制、预防和治疗一种或多种疾病,这些疾病包括但不限于肥胖,过度减肥,糖尿病,动脉粥样硬化,动脉硬化,心血管疾病,神经系统疾病,阿尔茨海默氏症,认知障碍,氧化应激,皮肤疾病,皮肤老化,紫外线照射的损害,高血压,高胆固醇血症(低密度脂蛋白,高密度脂蛋白,极低密度脂蛋白),高血脂(甘油三酯),免疫缺陷,癌症,代谢综合征和其他代谢疾病。

[0160] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,并选择性的包括一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物,用于控制、预防和治疗一种或多种疾病,这些疾病包括但不限于肥胖,过度减肥,糖尿病,动脉粥样硬化,动脉硬化,心血管疾病,神经系统疾病,阿尔茨海默氏症,认知障碍,氧化应激,皮肤疾病,皮肤老化,紫外线照射的损害,高血压,高胆固醇血症(低密度脂蛋白,高密度脂蛋白,极低密度脂蛋白),高血脂(甘油三酯),免疫缺陷,癌症,代谢综合征和其他代谢疾病。

[0161] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,并选择性的含有一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物,用于改善至少一种生物标志物蛋白的表达与产量,这些生物标志物蛋白包括但不限于基质金属蛋白酶-1(MMP-1),基质金属蛋白酶-3(MMP-3),C反应蛋白(CRP),PPAR- $\gamma$ ,脂肪分化相关蛋白(ADRP),脂肪细胞CD36,巨噬细胞CD36,单核细胞趋化蛋白(MCP-1),氧化低密度脂蛋白,脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(aP2/FABP4/A-FABP), $\beta$ 3-肾上腺素受体( $\beta$ 3-AR),脂联素,周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶IB(PTP IB)。

[0162] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,并且该混合物包括至少一种所述的选自绒毛戴星草的化合物,与一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物组合,用于改善至少一种与代谢综合症、肥胖和其它代谢疾病有关或

关联的生物标志物蛋白的表达与产量,这些生物标志物蛋白包括但不限于基质金属蛋白酶-1 (MMP-1), 基质金属蛋白酶-3 (MMP-3), C 反应蛋白 (CRP), PPAR- $\gamma$ , 脂肪分化相关蛋白 (ADRP), 脂肪细胞 CD36, 巨噬细胞 CD36, 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1), 氧化低密度脂蛋白, 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4/A-FABP),  $\beta$  3- 肾上腺素受体 ( $\beta$  3-AR), 脂联素, 周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP 1B)。

[0163] 本发明的另一个方面, 提供药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并且这些化合物与一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物组合, 用于控制一种或多种包括加速脂肪分解、抑制脂肪生成、抑制  $\alpha$ - 淀粉酶和抑制  $\alpha$ - 葡萄糖苷酶等代谢过程。

[0164] 本发明的另一个方面, 提供药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物组合。

[0165] 本发明的另一个方面, 提供药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并选择性的含有一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物, 其特征在于绒毛戴星草衍生化合物在该混合物中的含量百分率范围从 0.01% 至 99.9%, 而莽吉柿衍生化合物在该混合物中的含量百分率范围从 99.9% 至 0.01%。

[0166] 本发明的另一个方面, 提供药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并与一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物组合, 其特征在于绒毛戴星草衍生化合物在该混合物中的含量百分率范围从 0.01% 至 99.9%。

[0167] 本发明的另一个方面, 提供药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物, 其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物, 并选择性的含有一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物, 药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物, 包括至少一种绒毛戴星草衍生耳叶苔内酯 / 桉叶内酯倍半萜类化合物, 包括但不限于耳叶苔内酯, 7- 羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -3 $\alpha$ , 7 $\alpha$  - 二羟基 -4, 5- 环氧 -6 $\beta$ , 7- 桉烷内酯; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -7 $\alpha$  - 乙酰氧基 - $\beta$  3- 羟基 -6 $\beta$ , 7- 桉叶醇 -4- 内酯; 3- 酮 - $\beta$  - 桉叶醇; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -3 $\alpha$ , 7 $\alpha$  - 二羟基桉烷 -4- 烯 -6 $\alpha$ , 12- 内酯; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -3 $\alpha$ , 7 $\alpha$  - 二羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -7 $\alpha$ , 13- 二羟基耳叶苔内酯; 11 $\alpha$ , 13- 二氢 -7 $\alpha$ , - 羟基 -13- 甲氧基耳叶苔内酯; 2 $\alpha$ , 7 $\alpha$  - 二羟基 -4- 烯 -11, 13- 二羟基桉叶醇 -6, 12- 内酯; 2 $\alpha$  - 羟基木香酸; 3- 酮 -7 $\alpha$  - 羟基桉叶醇 -4- 烯 -6, 12- 内酯 (柳杉二醇); 4- 表柳杉醇; 绒毛戴星草内酯苷; 2 $\alpha$  - 羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$  - 乙酰氧基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$ , 7 $\alpha$  - 二羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$  - 乙酰氧基 -7 $\alpha$  - 羟基绒毛戴星草内酯; 2 $\alpha$  - 乙酰氧基 -5 $\alpha$  - 羟基异绒毛戴星草内酯或其混合

物,优选 7- $\alpha$ -羟基-4,11(13)双烯酮-12,6-内酯也就是所知道的 7-羟基耳叶苔内酯或有关的化合物或选自绒毛戴星草的类似物。

[0168] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,该混合物包括至少一种所述的选自绒毛戴星草的植物化学化合物,并与一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物组合,包括至少一种绒毛戴星草衍生耳叶苔内酯/桉叶内酯倍半萜类化合物,包括但不限于耳叶苔内酯,7-羟基耳叶苔内酯;11 $\alpha$ ,13-二氢-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-4,5-环氧-6 $\beta$ ,7-桉烷内酯;11 $\alpha$ ,13-二氢-7 $\alpha$ -乙酰氧基- $\beta$ 3-羟基-6 $\beta$ ,7-桉叶醇-4-内酯;3-酮- $\beta$ -桉叶醇;11 $\alpha$ ,13-二氢-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基桉烷-4-烯-6 $\alpha$ ,12-内酯;11 $\alpha$ ,13-二氢-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基耳叶苔内酯;11 $\alpha$ ,13-二氢-7 $\alpha$ ,13-二羟基耳叶苔内酯;11 $\alpha$ ,13-二氢-7 $\alpha$ ,-羟基-13-甲氧基耳叶苔内酯;2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-4-烯-11,13-二羟基桉叶醇-6,12-内酯;2 $\alpha$ -羟基木香酸;3-酮-7 $\alpha$ -羟基桉叶醇-4-烯-6,12-内酯(柳杉二醇);4-表柳杉醇;绒毛戴星草内酯苷;2 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯;2 $\alpha$ -乙酰氧基绒毛戴星草内酯;2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基绒毛戴星草内酯;2 $\alpha$ -乙酰氧基-7 $\alpha$ -羟基绒毛戴星草内酯;2 $\alpha$ -乙酰氧基-5 $\alpha$ -羟基异绒毛戴星草内酯或其混合物,优选 7- $\alpha$ -羟基-4,11(13)双烯酮-12,6-内酯也就是所知道的 7-羟基耳叶苔内酯或有关的化合物或选自绒毛戴星草的类似物。

[0169] 本发明的另一个方面,提供选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,并且这些化合物如上所述,其特征在于绒毛戴星草衍生化合物中用于预防、治疗和控制肥胖、代谢综合征和其他代谢疾病的活性化合物包括但不限于耳叶苔内酯/桉叶内酯倍半萜类化合物,优选 7- $\alpha$ -羟基-4,11(13)双烯酮-12,6-内酯也就是所知道的 7-羟基耳叶苔内酯。

[0170] 用于预防、治疗和控制肥胖、代谢综合征和其他代谢疾病的 7-羟基耳叶苔内酯或有关的化合物和用来制备本发明的化合物可以是天然衍生或可以通过合成或半合成生产。

[0171] 本发明的另一方面,提供的绒毛戴星草衍生化合物可以是提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物,可用于预防、治疗和控制肥胖、代谢综合征和其他代谢疾病或用于制备上述的化合物,其特征在于选自绒毛戴星草的提取物和馏分中的活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯/其他耳叶苔内酯/桉叶内酯倍半萜类化合物/植物化学物的含量范围从 0.001%至 100%不等,优选从 0.01%至 99%。

[0172] 本发明的另一方面,在前面实施例中所所述的含有绒毛戴星草衍生化合物的混合物中的活性化合物 7-羟基耳叶苔内酯/其他耳叶苔内酯/桉叶内酯倍半萜类化合物/植物化学物的浓度的质量浓度范围从 0.001%至 99%不等,优选从 0.01%至 95%不等。

[0173] 本发明的另一方面,提供的混合物,含有选自藤黄属植物优选莽吉柿的化合物,用于控制、预防和治疗肥胖、代谢综合征和其他代谢疾病,其特征在于活性物质包括但不限于氧杂葱酮,优选  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素。

[0174] 本发明的另一方面,提供的混合物,含有至少一种选自前面实施例中所所述的自莽吉柿的提取物、馏分、浓缩馏分、化合物,其特征在于在莽吉柿衍生提取物或馏分中活性化合物  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的单独或共同浓度范围从 0.001%至 99.9%不等。

[0175] 本发明的另一方面,提供的混合物,含有至少一种选自前面实施例中所述的自莽吉柿的提取物、馏分、浓缩馏分、化合物,其特征在于在混合物中活性化合物  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的单独或共同浓度范围从 0.001%至 99%不等,优选 0.01 至 95%。

[0176] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,用于改善至少一种代谢生物标志物分子的表达与产量,生物标志物分子包括但不限于基质金属蛋白酶-1(MMP-1),基质金属蛋白酶-3(MMP-3),C反应蛋白(CRP),PPAR- $\gamma$ ,脂肪分化相关蛋白(ADRP),脂肪细胞 CD36,巨噬细胞 CD36,单核细胞趋化蛋白(MCP-1),氧化低密度脂蛋白,脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(aP2/FABP4/A-FABP), $\beta$ 3-肾上腺素受体( $\beta$ 3-AR),脂联素,周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 IB(PTP IB)。

[0177] 本发明的另一个方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其包括选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物或它们的混合物,其特征在于为获得所要求的健康好处所需要改善的代谢过程,包括但不限于脂肪分解和脂肪生成,脂肪降解,脂肪细胞再生或其他与代谢有关的机制。

[0178] 在另一实施例中,本发明提供的耳叶苔内酯/桉叶内酯和相关的化合物,优选 7-羟基耳叶苔内酯或其类似物或含有所述混合物与至少一种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物的混合物,用于控制、预防和治疗一种或多种疾病,这些疾病包括但不限于肥胖,减肥,糖尿病,动脉硬化,代谢综合征和其他代谢疾病。

[0179] 在另一实施例中,本发明提供的耳叶苔内酯/桉叶内酯和相关的化合物,优选 7-羟基耳叶苔内酯或其类似物或含有上述混合物的混合物,用于改善至少一种代谢生物标志物分子的表达或产量,这些生物标志物分子包括但不限于基质金属蛋白酶-1(MMP-1),基质金属蛋白酶-3(MMP-3),C反应蛋白(CRP),PPAR- $\gamma$ ,脂肪分化相关蛋白(ADRP),脂肪细胞 CD36,巨噬细胞 CD36,单核细胞趋化蛋白(MCP-1),氧化低密度脂蛋白,脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(aP2/FABP4/A-FABP), $\beta$ 3-肾上腺素受体( $\beta$ 3-AR),脂联素,周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 IB(PTP IB)。

[0180] 本发明的另一方面,提供的混合物,包括莽吉柿衍生的化合物,其特征在于所述的选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物具有抗碳水化合物吸收、抑制酶作用包括但不限于  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、和抑制脂肪生成的抑制作用。

[0181] 本发明的另一方面,用于制备前面实施例所述混合物的生物活性化合物选自植物,动物和微生物的提取物或馏分或纯化合物或植物化学物或粉末,具有一些健康的益处包括但不限于抗糖尿病活性,降血糖活性,降血脂活性,抗肥胖活性,抗高血压活性,抗血小板聚集活性,抗感染活性,抗动脉粥样硬化活性和抗炎活性,抗氧化剂和生物增强活性。

[0182] 本发明的另一方面,提供药品/膳食添加剂/食品组合混合物,其选自前面实施例所述的绒毛戴星草,其特征在于所述的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物选自至少一个植物部分,包括但不限于叶、花头,茎,树皮,根,全株或其混合物,优选花头。

[0183] 本发明的另一方面,在前面实施例所述的药品/膳食添加剂/食品组合混合物和

它们的混合物,其特征在于所述的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物选自绒毛戴星草和莽吉柿,并使用一种或多种有机溶剂、醇、水醇、水或其混合物萃取获得。

[0184] 本发明的另一方面,选自莽吉柿的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物是选自整个水果或水果皮或藤黄植物,并优选莽吉柿。

[0185] 另一个实施例中,提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物选自于任何戴星草属的植物,包括但不限于绒毛戴星草、轴藜戴星草、非洲戴星草、伏尔加戴星草、缢筒戴星草、南木樨,可用于本发明所需的健康应用或用于制备所要求的化合物或混合物。

[0186] 另一个实施例中,用来制备化合物的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物选自于任何藤黄属的植物,包括但不限于藤黄果、汉伯里藤黄、苏姆藤黄、甜藤黄、高棉藤黄、大叶藤黄、小叶藤黄、大苞藤黄、巨藻藤黄和显脉藤黄。

[0187] 本发明实施例中的生物或药学上可接受的载体包括但不限于表面活性剂,赋形剂,黏合剂,稀释剂,粉碎剂,润滑剂,防腐剂,稳定剂,缓冲液,悬浮液和药物输送系统。

[0188] 本发明的另一方面,提供如前面实施例中所述的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物,包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,与至少一种选自赋形剂、载体和稀释剂的组分,其特征在于优选实施例中的固体载体或稀释剂或赋形剂包括但不限于葡萄糖,果糖,蔗糖,麦芽糖,糊精黄,白糊精,喷雾,微晶纤维素,硬脂酸钙,硬脂酸镁,山梨糖醇,甜菊糖甙,玉米糖浆,乳糖,柠檬酸,酒石酸,苹果酸,琥珀酸,乳酸, L- 抗坏血酸, DL- $\alpha$ -生育酚,甘油,丙二醇,甘油脂肪酸酯,聚甘油脂肪酸酯,蔗糖脂肪酸酯,失水山梨醇脂肪酸酯,丙二醇脂肪酸酯,洋槐,卡拉胶,酪蛋白,明胶,果胶,琼脂, B 族维生素,烟酰胺,泛酸钙,氨基酸,钙盐,色素,香精和防腐剂,以及优选实施例中的液体载体或稀释剂或赋形剂包括但不限于蒸馏水,生理盐水,葡萄糖水溶液,酒精(如乙醇),丙二醇和聚乙二醇;和油性载体,如各种动物和植物油,白软石蜡,石蜡和蜡。

[0189] 本发明的另一方面,提供的如前面实施例所要求的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合物或混合物,其特征在于所述的组合物或混合物是口服、局部或肠外给药,或对哺乳动物或热血动物根据需要采用吸入体内给药。

[0190] 本发明的另一方面,提供的如前面实施例所要求的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合物或混合物,其特征在于所述的组合物或混合物是口服制剂,如片剂,软胶囊,硬胶囊,药丸,颗粒,粉末,乳液,悬浮液,糖浆,小团丸,食品,饮料等等;肠外制剂如注射液、滴液、栓剂等等;经皮给药制剂如贴片、局部乳膏和凝胶、和食品原料或饮料。

[0191] 本发明的另一方面,提供一种用于控制 / 预防 / 治疗一种包括但不限于肥胖,代谢综合征和其他代谢疾病的疾病方法,包括向对象给药所需要的治疗有效剂量的至少一种如前面实施例所述的选自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合物。

[0192] 本发明的另一方面,提供一种促进脂肪分解和 / 或抑制脂肪生成的方法,包括向对象或哺乳动物或温血动物给药所需要的治疗有效剂量的至少一种如前面实施例所述的选自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合物。

[0193] 一种抑制脂肪生成或抑制消化酶包括但不限于  $\alpha$ -淀粉酶和 / 或  $\alpha$ -葡萄糖苷的方法,包括向对象或哺乳动物或温血动物给药所需要的治疗有效剂量的至少一种选自莽吉

柿或其含有所述莽吉柿衍生化合物的混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物。

[0194] 本发明的另一方面,提供一种治疗肥胖,糖尿病,代谢综合征或其他代谢疾病的方法,包括向对象或哺乳动物给药所需要的治疗有效剂量的至少一种选自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物,优选的与至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物组合,选择性的含有一种或多种选自植物、动物和微生物的生物活性化合物,药用或膳用可接受的活性原料、维生素、矿物质、介质、载体和稀释剂或其混合物。

[0195] 本发明的另一方面,提供一种选自绒毛戴星草和其混合物的提取物或馏分或活性化合物或植物化学物或其混合物的化合物用于改善生物标志物的表达或产量,这些生物标志物包括但不限于基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1), 基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3), C 反应蛋白 (CRP), PPAR- $\gamma$ , 脂肪分化相关蛋白 (ADRP), 脂肪细胞 CD36, 巨噬细胞 CD36, 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1), 氧化低密度脂蛋白, 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4/A-FABP),  $\beta$  3- 肾上腺素受体 ( $\beta$  3-AR), 脂联素, 周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 IB (PTP IB)。

[0196] 本发明的另一方面,提供一种改善生物标志物表达的方法,这些生物标志物包括但不限于基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1), 基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3), C 反应蛋白 (CRP), PPAR- $\gamma$ , 脂肪分化相关蛋白 (ADRP), 脂肪细胞 CD36, 巨噬细胞 CD36, 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1), 氧化低密度脂蛋白, 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2/FABP4/A-FABP),  $\beta$  3- 肾上腺素受体 ( $\beta$  3-AR), 脂联素, 周脂素和蛋白酪氨酸磷酸酶 IB (PTP IB), 包括向对象或哺乳动物给药所需要的治疗有效剂量的至少一种如前面实施例所述的选自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物的化合物。

[0197] 本发明的另一方面,提供的植物化学化合物如选自绒毛戴星草或含有所述绒毛戴星草衍生化合物的混合物的提取物、馏分、活性化合物、植物化学物或其混合物,用于改善一种或多种代谢过程包括促进脂肪分解,抑制脂肪生成活性、脂肪降解,脂肪细胞的再生,或其他与代谢有关的机制。

[0198] 本发明的另一方面,提供的混合物如选自莽吉柿和其混合物的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物,用于抑制碳水化合物水解酶如  $\alpha$  - 淀粉酶和 / 或  $\alpha$  - 葡萄糖苷酶。

[0199] 本发明的另一方面,提供的混合物如选自莽吉柿的提取物、活性馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物,用于通过抑制脂肪生成活性来治疗肥胖和代谢综合症。

[0200] 本发明的另一方面,提供的混合物,包括至少一种选自绒毛戴星草的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物和至少一种选自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,用于消化酶抑制 / 碳水化合物吸收抑制如  $\alpha$  - 淀粉酶抑制,  $\alpha$  - 葡萄糖苷酶抑制,来预防和治疗肥胖,糖尿病,代谢综合征或与代谢综合征相关的疾病。

[0201] 本发明的另一方面,提供的药品 / 膳食添加剂 / 食品组合混合物,包括选自绒毛戴星草和其混合物的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物与至少一种如前面实施例所述的自莽吉柿的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物组合,用于抑制脂肪生成活性,促进脂肪分解,脂肪降解,脂肪细胞再生或其他与代

谢有关的机制。

[0202] 本发明的另一个实施例,混合物选自如上所述的自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,可选择性与包括但不限于选自胡椒提取物和葎苳、胡椒碱的提取物、馏分、纯化合物的生物活性促进剂组合。

[0203] 本发明的另一方面,混合物选自如前面实施例所要求的自绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,可以是控释片的形式,通过包括现有技术已知纳米技术,微胶囊,胶体载体系统和其他药物输送系统等技术,采用控制释放的聚合物为基础的涂层。所述的制剂可设计成每日一次给药或每日多次给药。

[0204] 本发明的另一方面,混合物选自如前面实施例所要求的绒毛戴星草或其混合物的提取物、馏分、活性化合物和植物化学物或其混合物的化合物,也可以是掺入或加入到现有或新的食品和饮料和动物饮料中的形式,如用于控制、预防和治疗多种疾病包括但不限于肥胖,消瘦,糖尿病,动脉粥样硬化,动脉硬化,心血管疾病,神经系统疾病,阿尔茨海默氏症,认知障碍,氧化应激,皮肤疾病,皮肤老化,紫外线照射损害,高血压,高胆固醇血症(低密度脂蛋白,高密度脂蛋白,极低密度脂蛋白),高脂血症(甘油三酯),免疫缺乏,癌症,代谢综合征和其他代谢疾病的健康食品或饮料或饲料。

[0205] 选自绒毛戴星草和其混合物的提取物、馏分和活性化合物或植物化学物或其混合物的化合物与选自莽吉柿的提取物、馏分和活性化合物或植物化学物或其混合物的组合物对涉及一种或多种肥胖,代谢综合征和其他代谢疾病的酶、代谢生物标志物和代谢过程具有意外和优良的改善作用,非限制性说明例子如下:

[0206] 实施例 1

[0207] 绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(LI/DD-H/054A/01):绒毛戴星草花头(2.2kg)作为实验提取物,并用醋酸乙酯(22L)在回流温度下浸提2小时。将提取液过滤,并在相同的条件下用醋酸乙酯(2x13L)对用过的原料重复提取两次。合并提取液,精细过滤,并在一个升膜蒸发器中浓缩并获得残渣(174g)。用高效液相色谱分析方法显示该醋酸乙酯提取物含有11%的7-羟基-4,11(13)双烯酮-12,6-内酯(7-羟基耳叶苔内酯)。

[0208] 实施例 2

[0209] 绒毛戴星草正己烷提取物(LI/DD-H/054A/02):将绒毛戴星草花头(1.0kg)放入一个索氏仪器中,并用正己烷(6L)在回流温度浸提4小时,提取液精细过滤,再用正己烷(2x4L)对用过的原料重复提取两次。合并提取液,并在真空条件下浓缩获得残渣(43g)。用高效液相色谱分析方法显示该正己烷提取物含有21%的7-羟基耳叶苔内酯。

[0210] 实施例 3

[0211] 绒毛戴星草甲醇提取物(LI/DD-H/054A/03):将绒毛戴星草花头(1.0kg)放入一个RB烧瓶中,并用甲醇(8L)在80°C的温度下浸提2小时,提取液过滤,在相同的条件下用甲醇(2x6L)对用过的原料重复提取两次。合并提取液并精细过滤,并在一个升膜蒸发器中浓缩并获得残渣(110g)。用高效液相色谱分析方法显示该甲醇提取物含有8.3%的7-羟基耳叶苔内酯。

[0212] 实施例 4

[0213] 7-羟基耳叶苔内酯(LI054A01)的纯化:绒毛戴星草花头醋酸乙酯提取物(90g)经过使用正己烷到丙酮极性逐渐增强的洗涤液的硅胶色谱柱。用20%丙酮/正己烷将洗

脱部分合并,并在真空条件下浓缩获得残渣(16g),其含有63%的7-羟基耳叶苔内酯。将所获得的残渣再次经过使用正己烷到乙酸乙酯极性逐渐增强的洗涤液的硅胶色谱柱。用20-25%乙酸乙酯/正己烷将洗脱部分合并并浓缩,残渣加乙腈沉淀获得半纯7-羟基耳叶苔内酯(91%)。残渣最后的纯化经过使用氯仿/正己烷混合液的硅胶色谱柱。用25-35%氯仿/正己烷将洗脱部分合并并浓缩,得到纯7-羟基耳叶苔内酯(7.3g,99%)。

[0214] 实施例5

[0215] 莽吉柿甲醇提取物(AR 933):将晒干的莽吉柿果皮(1Kg)粉碎成粗粉末,用甲醇(5L)在60-65℃的温度下浸提2小时。通过过滤将溶剂与原料分离。用甲醇(2x3L&1x2L)重复提取过程3次。合并提取液并精细过滤,在抽真空条件下浓缩,并在室温下沉淀。过滤分离固体,得到干燥粉末(165g,  $\alpha$ -倒捻子素:32%和  $\gamma$ -倒捻子素:3%)。

[0216] 实施例6

[0217]  $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素的纯化:含有32%  $\alpha$ -倒捻子素的莽吉柿甲醇提取物(90g)经过使用氯仿到甲醇极性逐渐增强的洗涤液的硅胶色谱柱。用10-15%甲醇/氯仿监控并将含有 $\alpha$ -倒捻子素部分合并,并在真空条件下浓缩,残渣从甲醇/氯仿混合液中析出获得含有99%的 $\alpha$ -倒捻子素残渣(20g)。提取液部分用25%甲醇/氯仿监控并将含有 $\gamma$ -倒捻子素部分合并,并在真空条件下浓缩,残渣从甲醇/氯仿混合液中析出获得含有99%的 $\gamma$ -倒捻子素残渣(2.1g)。

[0218] 实施例7

[0219] 混合物1A、混合物1B、混合物1C、混合物1D的制备过程:

[0220] 通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物1A:三份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(LI/DD-H/054A/01,3g)和一份莽吉柿甲醇提取物(AR 933,1g)。

[0221] 通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物1B:一份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(1g)和三份莽吉柿甲醇提取物(3g)。

[0222] 通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物1C:一份绒毛戴星草甲醇提取物(1g)和三份莽吉柿甲醇提取物(1g)。

[0223] 通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物1D:三份绒毛戴星草甲醇提取物(3g)和一份莽吉柿甲醇提取物(1g)。

[0224] 实施例8

[0225] 混合物2A、混合物2B、混合物2C的制备过程:

[0226] 混合物2A:通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物2A:

[0227] 两份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(2g)和

[0228] 一份莽吉柿甲醇提取物(1g)。

[0229] 混合物2B:通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物2B:

[0230] 一份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(1g)和

[0231] 两份莽吉柿甲醇提取物(2g)。

[0232] 混合物2C:通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物2C:

[0233] 一份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物(1g)和

[0234] 一份莽吉柿甲醇提取物(1g)。

[0235] 实施例9

[0236] 混合物 2D 和混合物 2E 的制备过程：

[0237] 混合物 2D :通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物 2D :

[0238] 四份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (4g) 和

[0239] 一份莽吉柿甲醇提取物 (1g)。

[0240] 混合物 2E :通过混合单位剂量的下列化合物来制备混合物 2E :

[0241] 一份绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (1g) 和

[0242] 四份莽吉柿甲醇提取物 (4g)。

[0243] 实施例 10

[0244] 通过戴星草提取物来抑制基质金属蛋白酶 -1 (MMP-1) 的产量 :评估在 PMA 诱导的 A2058 人黑色素瘤细胞中的 MMP-1。简言之,细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺,100U/mL 青霉素,100mg/mL 链霉素和 10%胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中。在实验的前一天以每孔五千细胞接种到 96 孔细胞的培养平板 (美国康宁公司) 上。培养基用含有 10%胎牛血清的新鲜 DMEM 替换。绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 用培养基连续稀释到 0.1 至 10  $\mu$ g/ml 范围,并在 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 下预处理细胞 2 小时,然后用 50mM 的 PMA 诱导 24 小时。收集培养液上清物质并用 MMP-I ELISA 检测试剂盒 ((R&D System, Minneapolis, MN, USA) 来测定 MMP-1 的产量。通过在已知 MMP-1 浓度的光密度标准曲线上插值来定量计算培养液上清物质中 MMP-1 的浓度。

[0245] 不同浓度的绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 的抑制效果如图 1 所示。50%的 MMP-1 抑制 (IC<sub>50</sub>) 的抑制浓度可通过在抑制百分率与浓度坐标图中绘制得到。显示绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 的 IC<sub>50</sub> 值为 10.14  $\mu$ g/mL。使用类似的方法,发现纯化合物 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 的 IC<sub>50</sub> 值为 1.2  $\mu$ g/mL。

[0246] 实施例 11

[0247] 通过戴星草提取物来抑制基质金属蛋白酶 -3 (MMP-3) 的产量 :评估在白细胞介素 -1  $\beta$  诱导的 A549 人肺肿瘤细胞中的 MMP-3。简言之,细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺,100U/mL 青霉素,100mg/mL 链霉素和 10%胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中。在实验的前一天以每孔五千细胞接种到 96 孔细胞的培养平板 (美国康宁公司) 上。培养基用含有 10%胎牛血清的新鲜 DMEM 替换。绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 用培养基连续稀释到 0.1 至 10  $\mu$ g/ml 范围,并在 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 下预处理细胞 2 小时,然后用 10ng/mL 的人类白细胞介素 -1  $\beta$  (R&D System, Minneapolis, MN) 诱导 24 小时。收集培养液上清物质并用 ELISA 检测试剂盒 ((R&D System, Minneapolis, MN, USA) 来测定 MMP-3 的产量。通过在已知 MMP-3 浓度的光密度标准曲线上插值来定量计算培养液上清物质中 MMP-3 的浓度。50%的 MMP-3 抑制 (IC<sub>50</sub>) 的抑制浓度可通过在抑制百分率与浓度坐标图中绘制得到。显示绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 抑制 MMP-3 的 IC<sub>50</sub> 值为 0.36  $\mu$ g/mL。数据如图 2 所示。使用类似的过程,发现纯化合物 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 的 IC<sub>50</sub> 值为 0.075  $\mu$ g/mL。

[0248] 实施例 12

[0249] 通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对分化脂肪细胞的抑制脂质积累的评估 :将培养在含有 10%胎牛血清 (FBS) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中的 3T3-L1 人类前体脂肪细胞以每孔十万接种到 24

孔的平板中,并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 48 小时。将分化前体脂肪细胞接入含有 10 μg/ml 胰岛素、1.0 μM 地塞米松和 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基中 48 小时。之后用含有 10ug/ml 胰岛素的 DMEM 替换这些培养基,并诱导 3 天。然后用 10 μg/ml 的绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 0.5 μg/ml 的 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 处理这些分化细胞并继续培养 3-5 天。用 0.1% 的 DMSO 诱导细胞作为空白对照。在前面的处理之后,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞并用 10% 的福尔马林缓冲液在室温下固化 1 小时。在血球计数室中一些小的细胞悬浮与细胞分离。固化后的细胞用油红 O 溶液染色来测定细胞的中性脂质的积累。简言之,用 PBS 洗涤细胞,用 10% 的福尔马林缓冲液固化,并用油红 O 溶液 (在 100ml 异丙醇含有 0.5g) 染色 10 分钟。之后取出染色溶液,已染色的固化细胞经洗涤进入异丙醇中,并在 550nm 下测量吸光度 OD。将处理细胞与模拟处理分化细胞相比来计算脂肪积累的抑制效果。在显微镜的观测下和合适的图像采集系统的数字记录下同时分析和比较处理和空白细胞来评估脂肪积累的抑制作用。通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 LI054A01 所显示的抑制脂肪生成活性如下表所示。

[0250] 表 1 绒毛戴星草的抑制脂肪生成活性

[0251]

序号	产品名称	脂肪积累抑制效果%
1	LI/DD-II/054A/01	10 μg/ml 时 65.9%
2	LI054A01	0.5 μg/ml 时 68.7%

[0252] 实施例 13

[0253] 在分化脂肪细胞中绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 促进脂肪分解的评估:在成熟的脂肪细胞中按照美国国标化学程序通过测量分泌到培养基的游离甘油来对脂解活性的评估。将培养在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中的 3T3-L1 人类前体脂肪细胞以每孔十万接种到 24 孔的平板中,并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 48 小时。将分化前体脂肪细胞接入含有 10 μg/ml 胰岛素、1.0 μM 地塞米松和 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基中。细胞分化培养 5 天,然后将培养基取走。用洗涤溶液 (汉克平衡盐溶液) 洗涤表层 2 次,然后将 250 μL 诱导液 (加有 2% 牛血清白蛋白的汉克平衡盐溶液) 加入到存有或没有绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 的平板孔中,细胞进一步诱导 15 分钟,然后在 540nm 下读取吸光率。通过创建的甘油标准曲线来计算培养基上清物质中游离甘油的浓度。与已知甘油浓度的对照相比,样品中甘油浓度的增加率就相当于 LI/DD-II/054A/01 或 LI054A01 的脂解加速率。LI/DD-II/054A/01 或 LI054A01 的脂解加速率如表 2 所示。

[0254] 表 2 绒毛戴星草的促进脂肪分解活性

[0255]

序号	产品名称	脂肪分解加速率%
1	LI/DD-II/054A/01	25 μg/ml 时 26.7%

2	LI054A01	5 $\mu$ g/ml 时 47.8%
---	----------	----------------------

[0256] 实施例 14

[0257] 通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对 3T3-L1 脂肪细胞中的氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、脂肪分化相关蛋白 (ADRP)、CD36、脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (AP2)、 $\beta$  3-肾上腺素受体 ( $\beta$  3AR) 和周脂素的抑制作用：

[0258] 实验方案：小鼠前体脂肪细胞 3T3-L1 细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、4.5g/L 葡萄糖和 10% 胎牛血清的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中，每孔相同数量的细胞接种到 24 孔培养平板中。细胞分别用 2.5、5 和 10  $\mu$ g/mL 的 LI/DD-II/054A/01 或 1  $\mu$ g/mL 的 7-羟基耳叶苔内酯预先处理 2 小时，然后加入到含有 500nM 胰岛素、1.0  $\mu$ M 地塞米松和 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基中处理 48 小时。之后，细胞进一步用存有或没有绒毛戴星草提取物 LI/DD-II/054A/01 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 的收集分化培养基 (含有 100nM 胰岛素的 DMEM) 中诱导。最后收集细胞，用冷冻的磷酸盐缓冲液洗涤并用细胞溶解液溶解。在 14,000g 转速下 20 分钟来澄清蛋白质提取物。蛋白质含量采用库马西蓝染色剂的布拉德福德法测定，并将细胞溶解液存储在 -80 $^{\circ}$ C 下以供进一步使用。脂肪细胞分化的标志物如氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、CD36、脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (AP2) 和细胞内脂滴表面相关蛋白和周脂素的表达的控制通过免疫印迹检测来评估。

[0259] 存有或没有绒毛戴星草提取物 LI/DD-II/054A/01 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 的脂肪细胞的生物标志物分子表达蛋白的抑制作用通过免疫印迹检测来评估。简言之，同量的细胞溶解蛋白解析在 7.5% 的 SDS-PAGE 中；之后，蛋白转移到硝酸纤维素膜。阻断非特异性的位置后，膜用抗-PPAR $\gamma$  或抗-CD36 或抗-aP2 或抗- $\beta$  3AR 或抗-ADRP 或抗周脂素抗体诱导。最后用西微型化学发光底物 (Pierce Biotechnology, IL, USA) 来发展特定的免疫反应带，并用柯达影像站 (美国柯达公司) 记录免疫印迹图像。通过光密度计算反应带强度并用肌动蛋白的表达来格式化各个样品。数据如图 3 所示。

[0260] 实施例 15

[0261] 通过绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 和 7-羟基耳叶苔内酯 (LI054A01) 对巨噬细胞中的 CD36 产量的抑制作用：

[0262] 实验方案：在葡萄糖诱导小鼠巨噬细胞中进行评估的。简言之，细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100mg/mL 链霉素和 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT) 的 DMEM 中。在实验的前一天，将相同数量的细胞接种到 35 毫米的培养皿 (美国康宁公司) 中。培养基用添加有 10% 的胎牛血清的新鲜、葡萄糖 DMEM 替换。绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 用培养基连续稀释到 1 至 10  $\mu$ g/ml 范围和 LI054A01 稀释到 1  $\mu$ g，并在 5% CO<sub>2</sub> 和 37 $^{\circ}$ C 下与预处理细胞 2 小时，然后用 600mg/dL 的葡萄糖诱导 5 天。对照培养添加 100mg/dL 的葡萄糖。收集细胞并用细胞溶解缓冲液溶解。细胞溶解液在 14000g 转速下澄清。蛋白质浓度通过布拉德福德法测定。

[0263] 存有或没有 LI/DD-II/054A/01 和 LI054A01 的高糖诱导 J774 巨噬细胞的 CD36 蛋白质表达的抑制作用通过免疫印迹检测来评估。简言之，同量的细胞溶解蛋白解析在 7.5% 的 SDS-PAGE 中；之后，蛋白转移到硝酸纤维素膜。阻断非特异性的位置后，膜用

CD36 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 诱导。最后用西微型化学发光底物 (Pierce Biotechnology, IL, USA) 来发展特定的免疫反应带,并用柯达影像站 (美国柯达公司) 记录免疫印迹图像。通过光密度计算反应带强度并用肌动蛋白的表达来格式化各个样品。结果如图 4 所示。

[0264] 实施例 16

[0265] 通过莽吉柿甲醇提取物 (AR 933)、 $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素对分化脂肪细胞中抑制脂质积累的评估:莽吉柿提取物 (AR 933)、 $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素抗脂肪生成活性通过如实施例 12 所述的方法进行评估。提取物 AR 933、 $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素所显示的抗脂肪生成活性如下表所示:

[0266] 表 3 莽吉柿抗脂肪生成活性

[0267]

序号	产品名称	10 $\mu$ g/ml 时脂质积累抑制%
1	$\alpha$ -倒捻子素	16.06
2	$\gamma$ -倒捻子素	61.57
3	莽吉柿 (AR 933)	48.5

[0268] 实验例 17

[0269] 在分化脂肪细胞中  $\alpha$ -倒捻子素、 $\gamma$ -倒捻子素和莽吉柿甲醇提取物 (AR 933) 的促脂解评估:

[0270] 对成熟脂肪细胞的脂解活性采用如实施例 13 所述方法进行评估。与已知葡萄糖浓度的空白对照相比,样品溶液中的葡萄糖浓度的增长率就相当于测试化合物的脂解加速率。通过  $\alpha$ -倒捻子素、 $\gamma$ -倒捻子素和莽吉柿甲醇提取物 (AR933) 对脂解加速的加速率如下表所示。

[0271] 表 4 莽吉柿的促脂解活性

[0272]

序号	产品名称	25 $\mu$ g/ml 时脂解加速%
1	$\alpha$ -倒捻子素	156.56
2	$\gamma$ -倒捻子素	4.52
3	莽吉柿 (AR 933)	55.8

[0273] 实施例 18

[0274] 通过莽吉柿甲醇提取物 (AR 933)、 $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性:采用二硝基水杨酸 (DNS) 方法来对  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的测定,该方法由贝恩菲尔德发展而来 (Methods in Enzymology, 1955, Vol. 1, pp149-158),由贾米森等人提高 (Journal of Dental Research 1969 ;48(3) :483),并由 M. C. M 席尔瓦等人用 1% 的可溶性淀粉为底物来对潜在测试物质的抑制作用进行测试 (2004, Pesq. Agropec. bras. ,

Brasilia, 2004 ;39 (3) ;pp 201-208)。

[0275] 在室温条件下用 100  $\mu$  L (10-25U/mL) 的  $\alpha$ -淀粉酶预先诱导测试物质 ( $\alpha$ -倒捻子素、 $\gamma$ -倒捻子素和 AR 933) 20 分钟之前, 添加在 37 $^{\circ}$ C 条件下诱导 10 分钟的 100  $\mu$  L THP 底物溶液。通过加入 200  $\mu$  L 和 DNS 试剂来停止反应, 之后将试剂放入沸水中 5 分钟来发展颜色。然后加入 3.6mL 蒸馏水, 在 470nm 下读取吸光率。用已知的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂作为正向对照和用空白作为反向对照。至少进行两次平行分析。比较平均测试 OD 与平均对照 OD 来计算抑制百分率。{抑制百分率% = [(COD-TOD)/COD]  $\times$  100}。IC50 值可通过剂量反应曲线的线性回归分析计算得到。结果如下表所示。

[0276] 表 5

[0277]

化合物	$\alpha$ -淀粉酶的 IC50 ( $\mu$ g/ml)
阿卡波糖	12.7
$\alpha$ -倒捻子素	3.99
$\gamma$ -倒捻子素	3.88
AR 933	5.32

[0278] 实施例 19

[0279] 通过莽吉柿甲醇提取物 (AR 933)、 $\alpha$ -倒捻子素和  $\gamma$ -倒捻子素对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性: 采用由 D 普拉森等研制的体外方法 (Fitoterapia 2001, 72, 686-688) 来对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定。在微生物培养皿中加入 50  $\mu$  L 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (0.4U/mL), 并用 90  $\mu$  L 的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7) 和 10  $\mu$  L 测试物质 ( $\alpha$ -倒捻子素、 $\gamma$ -倒捻子素和 AR 933) 或空白对照处理。将含量混合均匀并在室温条件下诱导混合物反应 5 分钟, 然后加来 50  $\mu$  L 的 7-硝基苯基  $\alpha$ -D-葡萄糖 (20mM) 为底物。将含量混合均匀并再次在室温条件下诱导 15 分钟。通过加入 30  $\mu$  L 的碳酸钠溶液 (135mM) 来停止反应。用微酶标仪在 405nm 测定吸光率。对照和测试空白的 OD 通过用缓冲液代替酶来获得。比较平均测试 OD 与平均对照 OD 来计算抑制率。{抑制百分率% = [(COD-TOD)/COD]  $\times$  100}。IC50 值可通过剂量反应曲线的线性回归分析计算得到。结果如下表所示。

[0280] 表 6

[0281]

化合物	$\alpha$ -葡萄糖苷酶的 IC50 ( $\mu$ g/ml)
$\gamma$ -倒捻子素	0.16
$\alpha$ -倒捻子素	0.30
AR 933	0.29
绿茶	1.10

## [0282] 实施例 20

[0283] 莽吉柿提取物 (AR 933) 对 3T3-L1 脂肪细胞的 PPAR  $\gamma$ 、ADRP、CD36、aP2、B3AR 和周脂素的抑制作用：

[0284] 实验方案：小鼠前体脂肪细胞 3T3-L1 细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、4.5g/L 葡萄糖和 10% 胎牛血清的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中，每孔相同数量的细胞接种到 24 孔培养平板中。细胞分别用 2.5 和 5  $\mu$ g/mL 的莽吉柿甲醇提取物 (AR 933) 预先处理 2 小时，然后加入到含有 500nM 胰岛素、1.0  $\mu$ M 地塞米松和 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基中处理 48 小时。之后，细胞进一步用存有或没有莽吉柿甲醇提取物 (AR 933) 的收集分化培养基 (含有 100nM 胰岛素的 DMEM) 中诱导。最后收集细胞，用冷冻的磷酸盐缓冲液洗涤并用细胞溶解液溶解。在 14,000g 转速下 20 分钟来澄清蛋白质提取物。蛋白质含量采用库马西蓝染色剂的布拉德福德法测定，并将细胞溶解液存储在 -80°C 下以供进一步使用。脂肪细胞分化的标志物如 PPAR  $\gamma$ 、CD36、aP2 和细胞内脂滴表面相关蛋白、周脂素的表达的控制通过免疫印迹检测来评估。

[0285] 存有或没有莽吉柿提取物的脂肪细胞的生物标志物分子表达蛋白的抑制作用通过免疫印迹检测来评估。简言之，同量的细胞溶解蛋白解析在 7.5% 的 SDS-PAGE 中；之后，蛋白转移到硝酸纤维素膜。阻断非特异性的位置后，膜用抗 -PPAR  $\gamma$  或抗 -CD36 或抗 -aP2 或抗 - $\beta$  3AR 或抗 -ADRP 或抗周脂素抗体诱导。最后用西微型化学发光底物 (Pierce Biotechnology, IL, USA) 来发展特定的免疫反应带，并用柯达影像站 (美国柯达公司) 记录免疫印迹图像。通过光密度计算反应带强度并用肌动蛋白的表达来格式化各个样品。数据如图 5 所示。

## [0286] 实施例 21

[0287] 通过含有 LI/DD-II/054A/01 和 AR 933 的混合物 1B、2C 和 2E 对对分化脂肪细胞中抑制脂质积累的评估：混合物 1B、2C 和 2E 抗脂肪生成活性通过如实施例 12 所述的方法进行评估。混合物 1B、2C 和 2E 所显示的抗脂肪生成活性如表 7 所示：

[0288] 表 7 混合物 1B、2C&2E 的抗脂肪生成活性

[0289]

序号	产品名称	10 $\mu$ g/ml 时脂质积累抑制%
1	混合物 1B(1 : 3)	23.6
2	混合物 2C(1 : 1)	21.5
3	混合物 2E(1 : 4)	38.6

## [0290] 实施例 22

[0291] 在分化脂肪细胞中含有 LI/DD-II/054A/01 和 AR 933 的混合物 1B、2C 和 2E 的促脂解评估：

[0292] 混合物 1B、2C 和 2E 对成熟脂肪细胞的脂解活性采用如实施例 13 所述方法进行评估。与已知葡萄糖浓度的空白对照相比，样品溶液中的葡萄糖浓度的增长率就相当于混合物 1B、2C 和 2E 的脂解加速率。通过混合物 1B、2C 和 2E 对脂解加速的加速率如下表所示。

[0293] 表 8 混合物 1B、2C 和 2E 的促脂解活性

[0294]

序号	产品名称	25 $\mu$ g/ml 时脂解加速%	50 $\mu$ g/ml 时脂解加速%
1	混合物 1B(1 : 3)	31.7	59.8
2	混合物 2C(1 : 1)	21.9	46.9
3	混合物 2E(1 : 4)	37.95	71.4

[0295] 实施例 23

[0296] 混合物 1B 对 3T3-L1 脂肪细胞的 PPAR  $\gamma$ 、ADRP、CD36、aP2、B3AR 和周脂素的抑制作用：

[0297] 实验方案：小鼠前体脂肪细胞 3T3-L1 细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、4.5g/L 葡萄糖和 10% 胎牛血清的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中。每孔相同数量的细胞接种到 24 孔培养平板中。细胞分别用 5  $\mu$ g/mL 的 LI/DD-II/054A/01 或 AR933 或混合物 1B 预先处理 2 小时，然后加入到含有 500nM 胰岛素、1.0  $\mu$ M 地塞米松和 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 的分化培养基中处理 48 小时。之后，细胞进一步用存有或没有混合物 1B 的收集分化培养基 (含有 100nM 胰岛素的 DMEM) 中诱导。最后收集细胞，用冷冻的磷酸盐缓冲液洗涤并用细胞溶解液溶解。在 14,000g 转速下 20 分钟来澄清蛋白质提取物。蛋白质含量采用库马西蓝染色剂的布拉德福德法测定，并将细胞溶解液存储在 -80°C 下以供进一步使用。脂肪细胞分化的标志物如过氧化物酶体增殖激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ )、CD36、脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 (aP2) 和细胞内脂滴表面相关蛋白、周脂素的表达的控制通过免疫印迹检测来评估。

[0298] 存有或没有混合物 1B 的脂肪细胞的生物标志物分子表达蛋白的抑制作用通过免疫印迹检测来评估。简言之，同量的细胞溶解蛋白解析在 7.5% 的 SDS-PAGE 中；之后，蛋白转移到硝酸纤维素膜。阻断非特异性的位置后，膜用抗 -PPAR  $\gamma$  或抗 -CD36 或抗 -aP2 或抗 - $\beta$  3AR 或抗 -ADRP 或抗周脂素抗体诱导。最后用西微型化学发光底物 (Pierce Biotechnology, IL, USA) 来发展特定的免疫反应带，并用柯达影像站 (美国柯达公司) 记录免疫印迹图像。通过光密度计算反应带强度并用肌动蛋白的表达来格式化各个样品。数据如图 6 所示。

[0299] 实施例 24

[0300] 混合物 1B 对动脉粥样硬化的标志蛋白产量的反向调控：

[0301] 实验方案：通过混合物 1B 在高葡萄糖诱导 J774 小鼠巨噬细胞中的动脉粥样硬化的标志蛋白如 CD36、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 的产量的抑制作用来评估。简言之，细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100mg/mL 链霉素和 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT) 的 DMEM 中。在实验的前一天，将相同数量的细胞接种到 35 毫米的培养皿 (美国康宁公司) 中。培养基用添加有 10% 的胎牛血清的新鲜、葡萄糖 DMEM 替换。用 5 $\mu$ g/ml 的 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 在 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 下与预处理细胞 2 小时，然后用 600mg/dL 的葡萄糖诱导 5 天。对照培养添加 100mg/dL 的葡萄糖。收集细胞并用细胞溶解缓冲液溶解。细胞溶解液在 14000g 转速下澄清。蛋白质

浓度通过布拉德福德法测定。

[0302] 存有或没有混合物 1B 的高糖诱导 J774 巨噬细胞的标志物蛋白质表达的抑制作用通过免疫印迹检测来评估。简言之,同量的细胞溶解蛋白解析在 7.5% 的 SDS-PAGE 中;之后,蛋白转移到硝酸纤维素膜。阻断非特异性的位置后,膜用 CD36、或 MCP-I 或 Ox-LDL 特异性抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 诱导。最后用西微型化学发光底物 (Pierce Biotechnology, IL, USA) 来发展特定的免疫反应带,并用柯达影像站 (美国柯达公司) 记录免疫印迹图像。通过光密度计算反应带强度并用肌动蛋白的表达来格式化各个样品。结果如图 7 所示。

[0303] 实施例 25

[0304] 通过 LI/DD-H/054A/01、AR 933 和混合物 1B 对脂联素的调控:LI/DD-H/054A/01、AR 933 和混合物 1B 对 3T3-L1 脂肪细胞中的脂联素蛋白的调控作用采用西方免疫印迹检测法评估。细胞培养基,处理方法和免疫印迹检测方法与实施例 23 所述的相同。图 8 所示的是本实施例中通过混合物 1B 或其各自的单独化合物如 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 对 3T3-L1 成熟脂肪细胞的脂联素蛋白的增加效果。

[0305] 实施例 26

[0306] 通过 LI/DD-H/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 对 3T3-L1 前脂肪细胞的蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (PTP-1B) 的反向调控:3T3-L1 前体脂肪细胞培养在含有 2mM 谷氨酰胺、4.5g/L 葡萄糖和 10% 胎牛血清的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 中。每孔相同数量的细胞接种到 35cm<sup>2</sup> 细胞培养皿中过夜。平板用无血清无酚红 DMEM 培养液洗涤,然后培养基用 5  $\mu$ g/ml 的 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 在无 FBS 和无酚红、含有 0.2% BSA 和 1g/L 葡萄糖的 DMEM 中预处理。萃取细胞溶解缓冲液中的细胞溶解液,并通过布拉德福德试剂来测定蛋白浓度。通过如实施例 23 中所述的方法用抗 PTP-1B 抗体的免疫印迹分析检测法来对细胞溶解物中 PTP-1B 表达调控的分析。图 9 所示的是 LI/DD-II/054A/01 或 AR 933 或混合物 1B 处理 3T3-L1 前体脂肪细胞中 PTP-1B 蛋白表达的反向调控。

[0307] 实施例 27

[0308] 绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 在体内抗代谢疾病的效果。

[0309] 在高脂肪,高胆固醇,高盐和高糖饮食诱导的代谢综合症模型中测试绒毛戴星草醋酸乙酯提取物 (LI/DD-II/054A/01) 效果。

[0310] 诱导:一批 12 个 SD 大鼠随机分为 2 组,每组包括 6 个动物。研究开始的前 7 天来使动物适应环境。通过用每 100g 含有 32g 烤孟加拉克、27g 蔗糖、17g 奶粉、5g 矿物盐混合物、1g 酵母、2g 黄油、11g 花生油和 5g 胆固醇的代谢综合症食物来喂养大鼠 8 天来诱导代谢综合症。

[0311] 处理:8 周的诱导期后,这些动物每日口服 (采用从口灌胃进食) 所分配的测试物或空白处理 8 周。处理组的动物口服添加在 10mL 0.5% CMC 水溶液中加入 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 再喂养 8 周。对照组的老鼠在这段时间内仅喂食空白溶液 (0.5% CMC 水溶液的 10mL/kg 体重)。在整个处理阶段,所有的动物均提供标准的啮齿类动物饮食,直到研究结束。

[0312] 体重:整个研究期间每周记录一次每个大鼠的体重。计算处理组和对照组的平均体重。计算与初始体重相比,开始治疗后 1 周,4 周和 8 周末体重增加量。与对照组相比,

250mg/kg 体重剂量的 LI/DD-II/054A/01 在减少体重增长 (66.04%) 上显示出强烈的效果和统计意义 ( $p < 0.01$ )。处理组和对照组体重增长的结果如图 10A 和 10B 所示。

[0313] 脂肪组织重量:在研究结束时分离并称量腹部和附睾脂肪,结果如表 9 所示。当与那些空白组相比较时,处理组的腹部和附睾脂肪重量较低。添加有 LI/DD-II/054A/01 的处理组的总脂肪明显降低 ( $p < 0.05$ )。

[0314] 表 9 大鼠腹部和附睾区域的脂肪组织的重量

[0315]

处理	腹部脂肪 (g)	附睾脂肪 (g)	总脂肪 (g)
对照组 (10 mL/kg)	4.52±1.16	4.18±1.56	8.70±2.52
LI/DD-II/054A/01 (250 mg/kg)	2.28±0.78	3.07±0.74	5.36±0.89

[0316] 值表示为平均值重量 ± 标准差

[0317] 血清生化:在诱导前,开始处理前和处理结束后在轻度麻醉下从眶窦丛上采集血样。用自来休曼,德国,一种自动化临床化学分析仪豪迈之星 300(制造:休曼,德国)的生物化学试剂来对各种生物化学参数包括血脂进行评估。计算诱导前,诱导后/处理前和处理后的生物化学参数尤其是血清胆固醇水平和甘油三酯水平的平均值。添加 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 的结果是改善脂肪,对血清胆固醇,低密度脂蛋白和甘油三酯的减少百分率分别为 15.3,12.7 和 22.9。

[0318] 生物标志物脂联素评估:用基于夹心大鼠脂联素的双抗体 ELISA 试剂盒来对处理组和对照组老鼠的血清脂联素进行评估。按照制造商(Linco Research, USA)提供的说明书进行分析。分析的灵敏度为 0.155ng/ml。数据显示,当与基线相比较时,每日添加 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 在 8 周后的结果是对血清脂联素浓度有统计意义上 ( $p = 0.00618$ ) 的改善。然而,对照组的血清脂联素浓度没有显示出改善。结果如图 11 所示。

[0319] 稳态模型评估法(HOMA):基于血清胰岛素和血糖水平的 HOMA 指数通过使用以下公式计算得到:空腹胰岛素浓度( $\mu$ U/mL) x 空腹血糖浓度(mmol/L)/22.5。

[0320] 相比较于对照组,每日添加剂量 250mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/01 喂养 8 周后的结果是,HOMA 指数明显降低。数据如图 12 所示。

[0321] 实施例 28

[0322] 含有绒毛戴星草提取物(LI/DD-II/054A/03)和莽吉柿甲醇提取物(AR 933)以 3:1 比例混合的混合物 1D 的抗肥胖协同增效作用:在高脂肪饮食诱导 SD 大鼠肥胖模型中测试 LI/DD-II/054A/03、AR 933 和混合物 1D 的抵抗作用。

[0323] 诱导:选择健康的 SD 大鼠并随机的分为对照组或多个处理组 ( $n = 7$ )。在肥胖研究中所有的动物通过饮食干预来产生实验性肥胖,在整个 8 周诱导期间,每天使用每 100g 含有 32g 烤孟加拉克、15g 麦皮、1g 酵母、2g 黄油、8g 花生油、5g 酪蛋白、20g 氢化植物油、0.5g 复合维生素、12g 奶粉和 4.5g 矿物盐混合物的高脂肪食物来喂养诱导肥胖。

[0324] 处理:8 周的诱导期后,这些动物每日口服(采用从口灌胃进食)所分配的测试物或空白处理 8 周。处理组的动物口服添加在 10mL 0.5% CMC 水溶液中加入 100mg 或 250mg/

kg 体重的 LI/DD-II/054A/03 或 250mg/kg 体重的 AR 933 或 250mg/kg 体重的混合物 1D 再喂养 8 周。对照组的老鼠在这段时间内仅喂食空白溶液 (0.5% CMC 水溶液的 10mL/kg 体重)。在整个处理阶段,所有的动物均提供标准的啮齿类动物饮食,直到研究结束。

[0325] 体重:整个研究期间每周记录一次每个大鼠的体重。计算处理组和对照组的平均体重。计算与初始体重相比,开始治疗后 1 周,4 周和 8 周末体重增加量。在高脂肪饮食诱导大鼠肥胖中 LI/DD-II/054A/03 剂量抑制依赖体重的增加。显示出添加 100mg/kg 体重的 LI/DD-II/054A/03 的处理组中体重增加降低 46.3%。剂量在 250mg/kg 的 AR 933 和 LI/DD-II/054A/03 的体重增加分别降低 40%和 80.1%。然而,与对照组老鼠相比,相同剂量水平即 250mg/kg 的混合物 1D 对体重增加降低显示出强烈和协同增效作用 (89%)。处理组和对照组的体重增加结果如图 13 所示。

[0326] 每天记录食物和水的消耗量,并在研究的开始前、4 周后和 8 周后 (结束) 采集空腹血。

[0327] 本文件中的这些普通技术可理解并变化应用于上面所述的这些实施例,并没有超出本发明的范围。因此,应理解为,本发明并不限制所公开的这些特定实施例或例子,并且想要的替代修改包含在本发明说明书定义的目的和范围内。

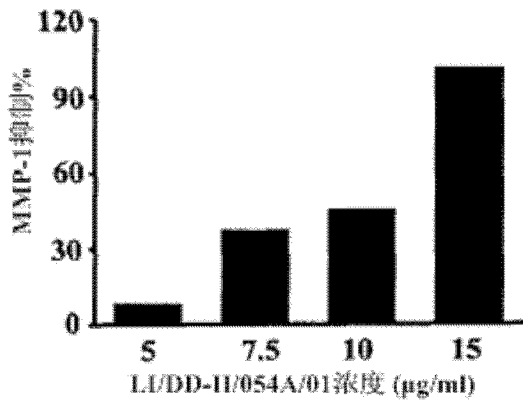


图 1

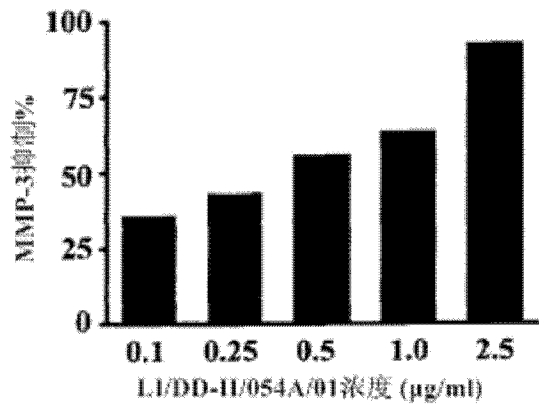


图 2

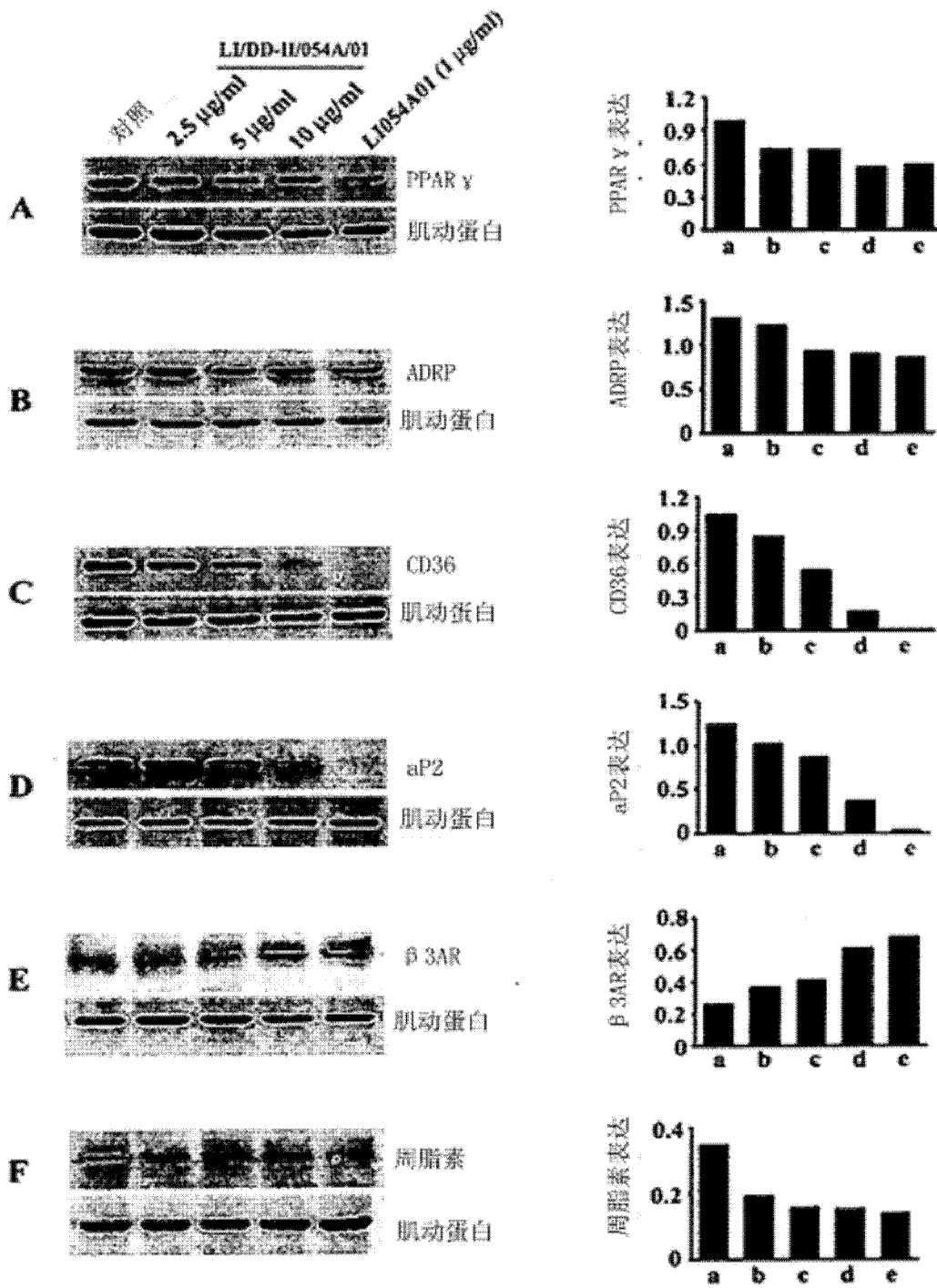


图 3

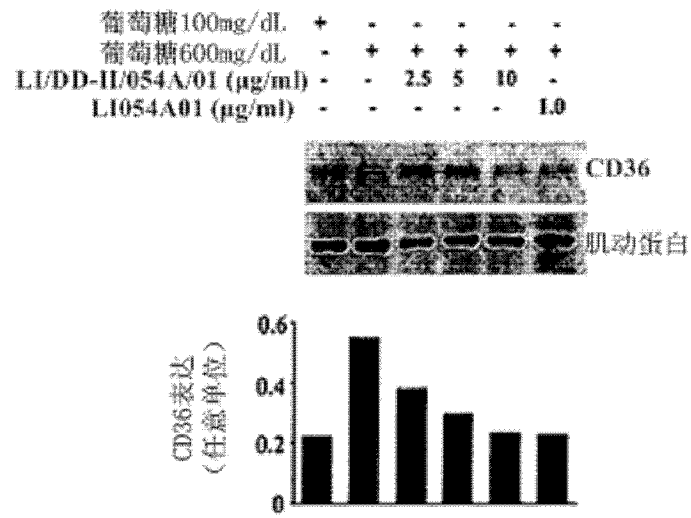


图 4

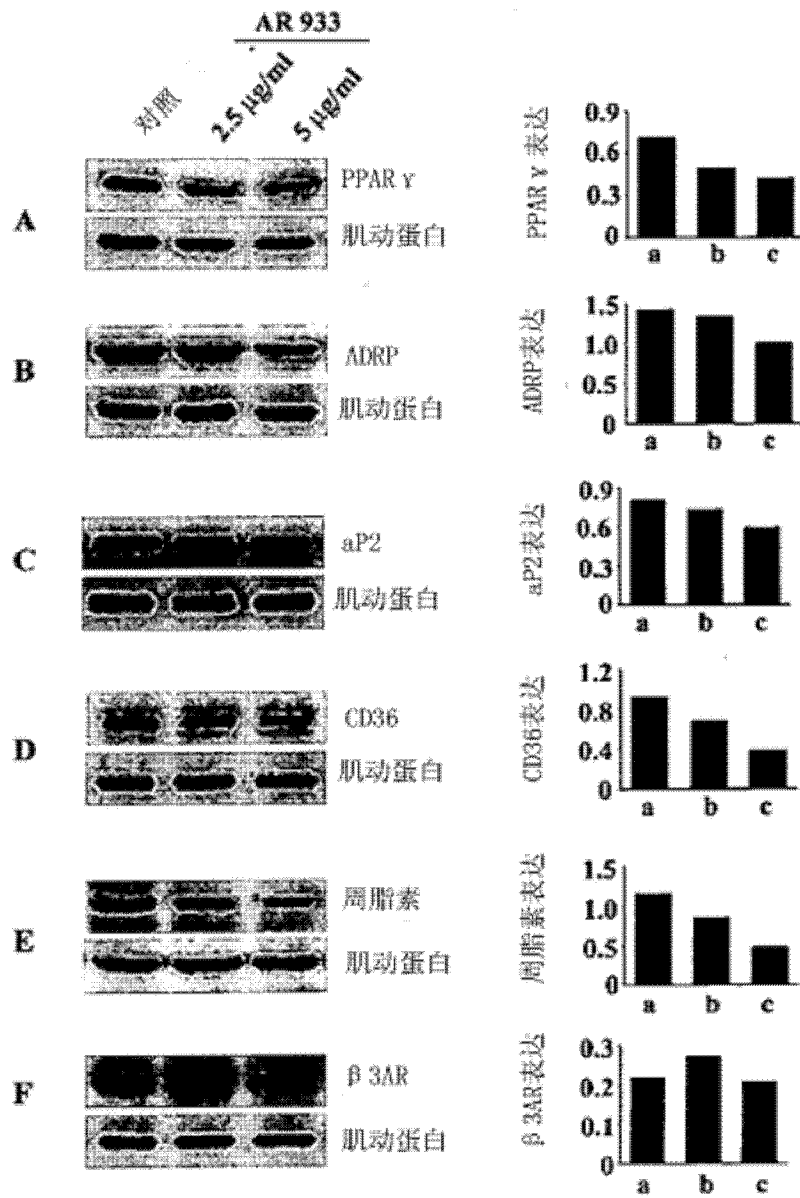


图 5

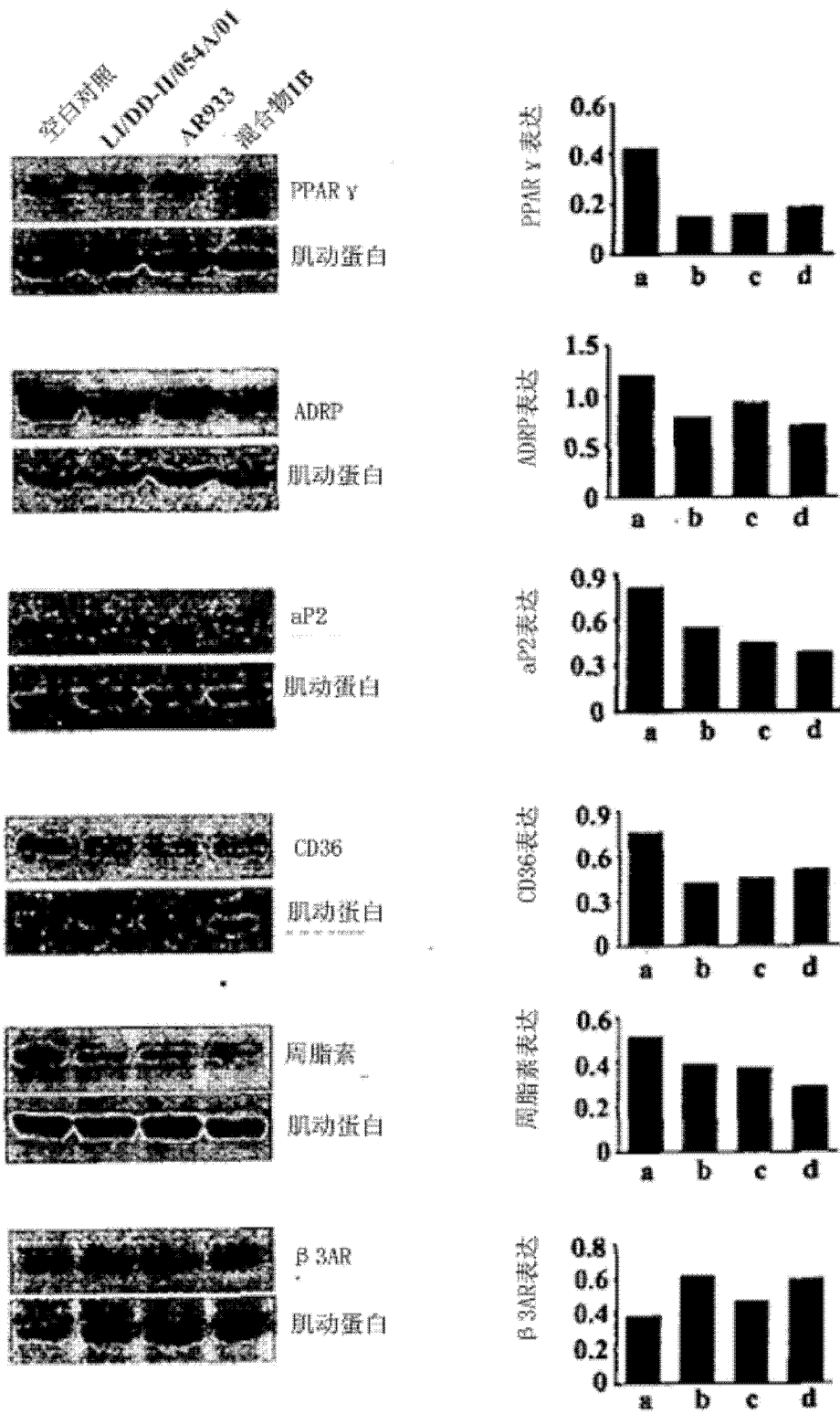


图 6

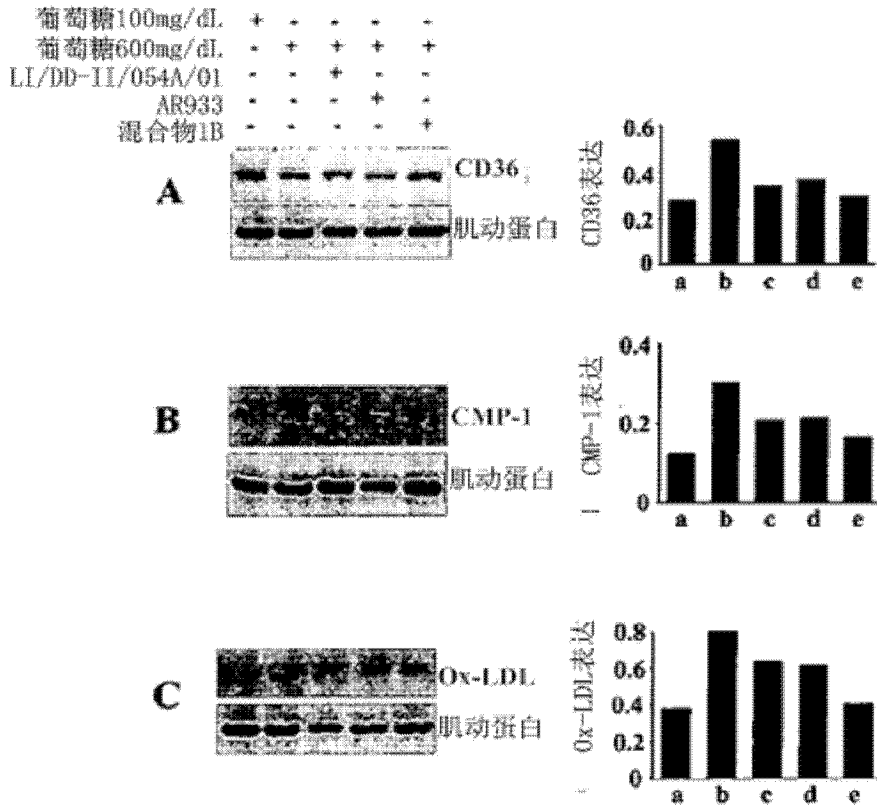


图 7

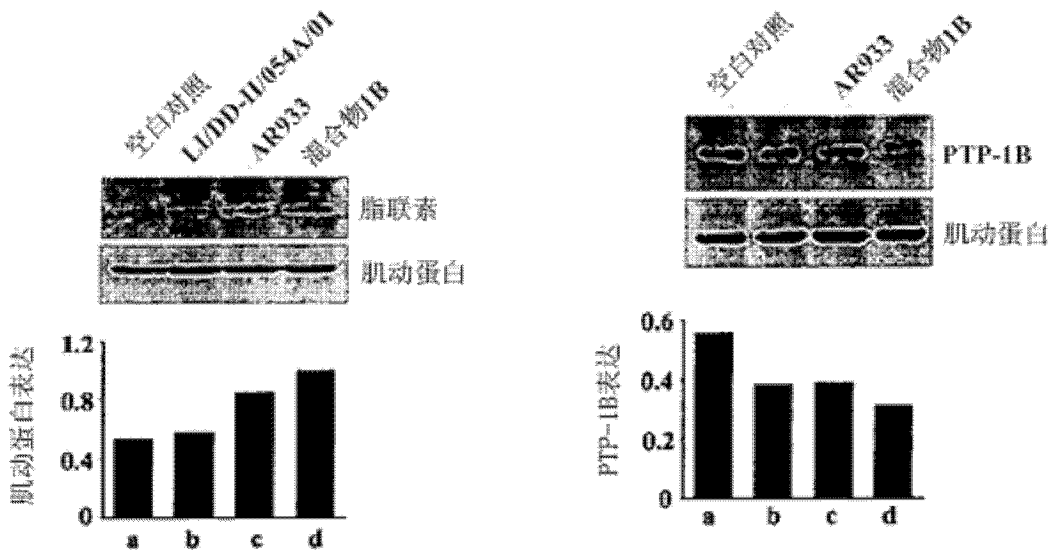


图 8

图 9

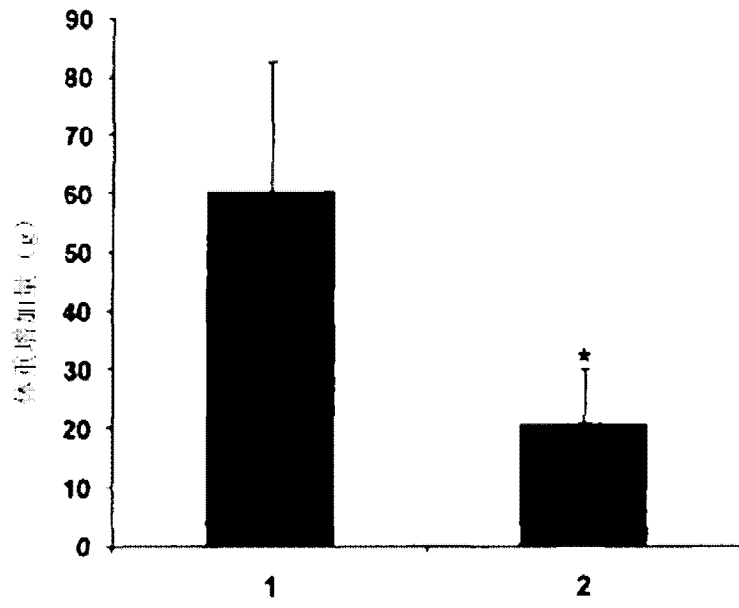


图 10A

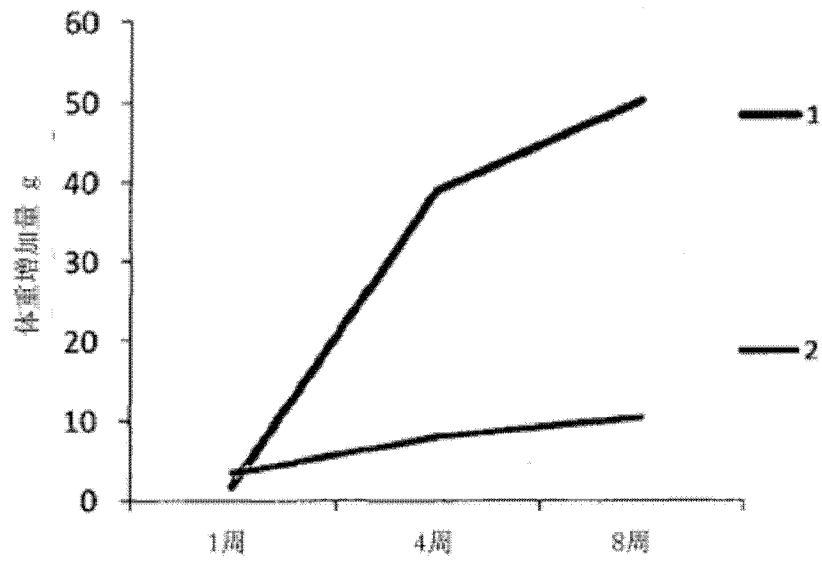


图 10B

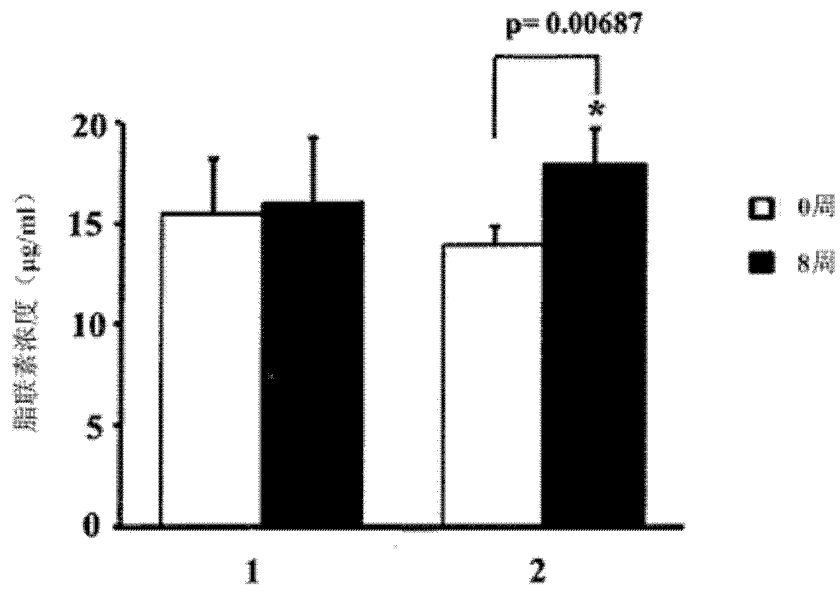


图 11

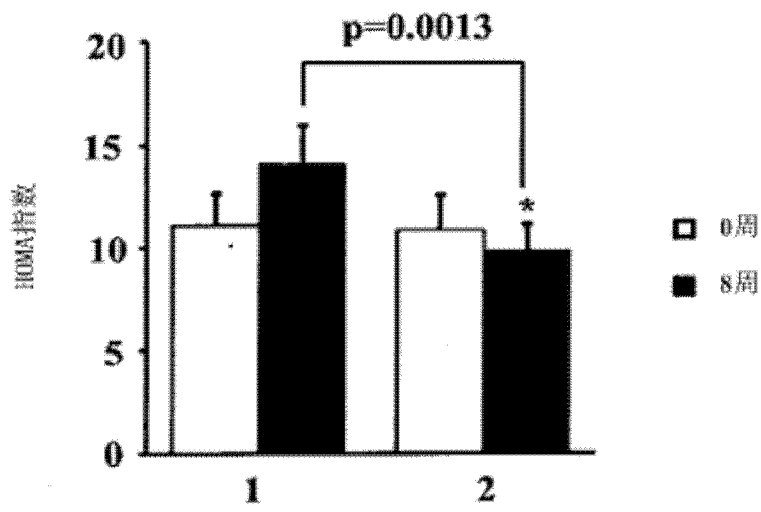


图 12

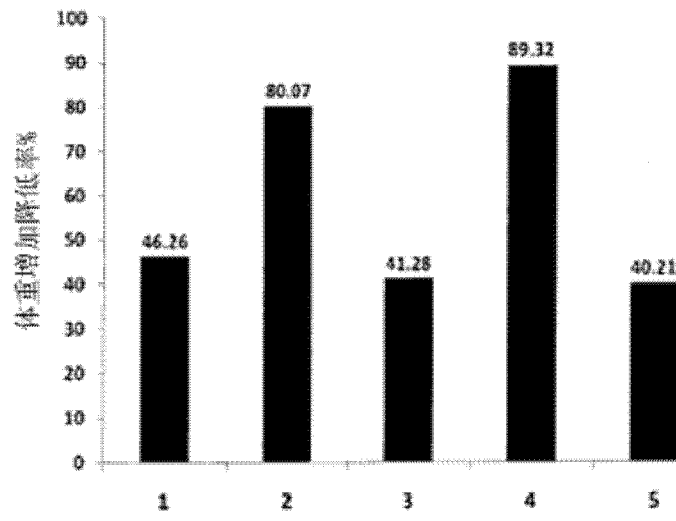


图 13