

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104138596 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201410348223. 7

(22) 申请日 2014. 07. 22

(71) 申请人 张喜田

地址 200023 上海市卢湾区打浦路 666 弄 2
号 2001 室

申请人 孙非

(72) 发明人 孙非 梁重阳 张喜田

(51) Int. Cl.

A61K 38/16(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

重组灵芝免疫调节蛋白在延缓衰老药物中的
应用

(57) 摘要

本发明涉及重组灵芝免疫调节蛋白在延缓衰
老药物中的应用。通过对实验动物血清中总蛋白
含量的测定及血清中生长激素、性激素、甲状腺激
素和促甲状腺素含量的测定，发现重组灵芝免疫
调节蛋白(rLZ-8)能够调节在衰老过程中的激素
水平，使激素水平恢复正常，延缓机体衰老进程，
表明了可在延缓衰老药物中的应用。

1. rLZ-8 在延缓衰老药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用, rLZ-8 升高体内总蛋白、生长激素、甲状腺激素以及促甲状腺激素的含量。
3. 如权利要求 1 所述的应用, rLZ-8 降低体内促卵泡生成素、促黄体生成素含量的同时升高睾酮、孕酮、雌二醇的含量,有效调节体内性激素平衡。
4. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于该药物制剂核心成分是由权利要求 1 所述的 rLZ-8 和任选的药学可接受的辅剂组成。
5. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于给药途径为口服和非肠道给药,其中,口服包括口服液,片剂,丸剂和胶囊;非肠道给药包括外用药和注射剂。

重组灵芝免疫调节蛋白在延缓衰老药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,涉及利用基因重组手段得到的重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)在制备延缓衰老药物中的应用。

背景技术

[0002] 延缓人类的衰老是人类的渴望,研发抗衰老的药物是本发明的目的。

衰老(aging, senescence)又称老化,通常是指在正常状况下生物发育成熟后,随年龄增加,自身机能减退,内环境稳定能力与应激能力下降,结构、组分逐步退行性变,趋向死亡,不可逆转的现象。衰老过程在整体、组织、细胞,乃至分子水平皆有所体现。随年龄增加,器官、组织的实质细胞数、反应敏感性及功能均逐步下降。但不同器官老化速度及老化方式有所不同。衰老时细胞增殖能力下降,功能细胞数逐渐减少,激素分泌失衡,蛋白酶活性降低,胶原、弹力蛋白、结缔组织充斥其间、互相交联,使脏器萎缩,功能下降。

随着医学科技的发展,出现了各种不同治疗机制的衰老的药物,其中,化学药物方面:有抗氧化剂(如维生素E、维生素C、抗氧化酶SOD等)、抗衰老激素(如褪黑激素、胸腺素等)、营养素(如核酸等)、单胺氧化酶抑制剂(如普鲁卡因等)、免疫调节剂(如转移因子等)、生化制剂(唾液腺等)、大脑功能促进药(如脑复康等)等。化药主要特点是见效快,稳定性差,易反弹,副反应比较大,不能增加物种的最高寿限。

本发明通过rLZ-8对衰老大鼠机体激素水平的研究,证明rLZ-8延缓衰老大鼠的进程。

发明内容

[0003] 本发明涉及rLZ-8在制备延缓衰老药物中的应用,通过一系列实验手段和结果表明rLZ-8对D-半乳糖导致衰老大鼠激素水平具有显著地调节作用,具体发明内容如下:

本发明以Wistar大鼠作为研究对象,采用D-半乳糖导致亚急性衰老复制大鼠衰老模型,设计了包括正常对照组、模型组、阳性对照药维生素E(100mg/kg)、rLZ-8低剂量组(5μg/kg)、rLZ-8中剂量组(10μg/kg)、rLZ-8高剂量(50μg/kg)在内的6个实验组。给药方式与程序设计为腹腔注射给药,每天给药一次,连续给药8周,各组大鼠每周称体重一次,于治疗8周后进行取材。分别对衰老模型大鼠的体重,血清中总蛋白含量、血清中生长激素(GH)、性激素[睾酮(T)孕酮(P)雌二醇(E₂)促卵泡生成素(FSH)促黄体生成素(LH)]、甲状腺激素(FT₄)和促甲状腺素(TSH)含量等方面进行了测定,分别采用了碘[¹²⁵I]游离甲状腺素放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]游离三碘甲状腺原氨酸放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]人促甲状腺素放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]孕酮放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]人促黄体生成素放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]人生长激素放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]人促卵泡生成激素放射免疫分析药盒,碘[¹²⁵I]睾酮放射免疫分析药盒等等对上述方面进行了测定,测定结果表明,rLZ-8能够明显改善D-半乳糖致亚急性衰老大鼠的一般状态,大鼠血清中GH含量明显升高,且血中E₂、P和T含量升高,FSH、LH含量降低,及FT₃、FT₄和TSH含量升高。

经过上述实验一系列结果表明,rLZ-8通过调节D-半乳糖致亚急性衰老大鼠GH、性激

素及甲状腺激素水平,以延缓大鼠衰老。

具体实施方式:

实施例 1:衰老动物模型的建立

1. 实验材料

健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,由吉林大学实验动物中心提供;天平,1ml 一次性注射器,rLZ-8(吉大钻智中心提供),D-半乳糖(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),维生素 E。

2. 实验方法

本实验采用 D-半乳糖造成大鼠亚急性衰老模型。首先,将 D-半乳糖溶于生理盐水中,配成 5% D-半乳糖生理盐水溶液注射液,按照每天 500mg/kg 的剂量给予大鼠腹腔注射,正常对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,连续造模 8 周,各组大鼠每周称重一次,同时测定大鼠血清中总蛋白含量。

3. 实验结果

表 1 大鼠亚急性衰老模型机体指标变化

造模天数	体重 (g)	总蛋白含量 (g/L)
第 4 周	259.38±44.71	60.03±7.66
第 8 周	232.23±62.96	50.63±5.83

实验结果表明,在体重方面,随着造模时间的延长,大鼠模型体重出现大幅下降趋势,血清中总蛋白含量也随造模时间延长出现含量减低的现象,说明造模实验方法适合本实验,说明造模实验成功。

实施例 2 rLZ-8 对大鼠衰老模型的缓解作用

1. 实验材料

健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,由吉林大学实验动物中心提供;天平,1ml 一次性注射器,rLZ-8(吉大钻智中心提供),D-半乳糖(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),维生素 E。碘 [¹²⁵I] 游离甲状腺素放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 游离三碘甲状腺原氨酸放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 人促甲状腺素放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 孕酮放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 人促黄体生成素放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 人生长激素放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 人促卵泡生成激素放射免疫分析药盒,碘 [¹²⁵I] 睾酮放射免疫分析药盒,以上分析药盒均购自北京北方生物技术研究所,批号:130902。碘 [¹²⁵I] 雌二醇放射免疫分析药盒,购自深圳拉尔文生物工程技术有限公司,批号:130820,考马斯亮蓝试剂盒,购自南京建成。

2. 实验方法

2.1 实验分组与给药程序:

选 72 只健康的,体重在 200–250g 之间的 Wistar 大鼠,按体重随机分为 6 组,每组 12 只,腹腔注射给药,每天给药一次。正常对照组:给予等体积生理盐水;模型组:给予等体积生理盐水;维生素 E 组:给予维生素 E 100mg/kg;rLZ-8 高剂量给予 rLZ-8 50μg/kg;rLZ-8 中剂量组给予 rLZ-8 蛋白 10μg/kg;rLZ-8 低剂量组给予 rLZ-8 蛋白 5μg/kg。

2.2 实验检测项目与方法:

本实验采用 D-半乳糖造成大鼠亚急性衰老模型。首先,将 D-半乳糖溶于生理盐水中,配成 5% D-半乳糖生理盐水溶液注射液,按照每天 500mg/kg 的剂量给大鼠腹腔注射,正常对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,连续造模 8 周,各组大鼠每周称重一次。造模成功后,连续给药 8 周,各组大鼠每周称体重一次,于治疗 8 周后进行取材。观察各组大鼠的食

欲、体重、行为、毛色及光泽度等一般状态的改变情况。大鼠摘眼球取血,3500r/min 离心,10min,取上清,采用考马斯亮蓝法测定血清中总蛋白含量。放射免疫分析法(RIA)测定大鼠血清中生长激素(GH)水平变化。采用放射免疫分析法(RIA)测定各组大鼠血清中睾酮(T)、孕酮(P)、雌二醇(E₂)、促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH)的含量。采用放射免疫分析法(RIA)测定各组大鼠血清中游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、游离甲状腺素(FT₄)、促甲状腺素(TSH)的水平变化,具体检测方法见检测试剂盒。实验数据用均数与标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,均数两两比较 q 检验,检验结果均取 $p < 0.05$ 作为差异考察统计学意义。

3. 实验结果

3.1 一般状态

正常对照组大鼠活泼好动,饮食正常,体重明显增加,毛发色泽光亮、浓密,皮肤弹性良好。模型组大鼠造模后,逐渐表现出四肢无力,行动缓慢,倦怠,大鼠皮肤松弛毛色发黄,失去光泽,并出现干枯脱落。各治疗组大鼠在行动与毛发状态方面与模型组相比较有所改善。

3.2 体重变化

实验过程中,正常对照组大鼠体重逐渐增加,模型组与各给药组大鼠体重在给药前均减少,给药 8 周后体重均有不同程度增加,与给药前相比,rLZ-8 低、中剂量组大鼠体重虽也增加,但未见统计学意义,而 rLZ-8 高剂量组体重增加明显($p < 0.05$),具有统计学意义。

表 2 各组大鼠体重变化(单位:g)($\bar{x} \pm s$, n=12)

	正常组	阴性对照组	维生素 E 组	rLZ-8 高剂量组	rLZ-8 中剂量组	rLZ-8 低剂量组
造模前	210.4 ± 21.09	203.08 ± 12.00	208.36 ± 7.16	205.46 ± 14.55	204.00 ± 15.62	208.93 ± 9.57
给药前	312.2 ± 73.94	201.62 ± 47.10	195.86 ± 31.52	203.85 ± 42.95	199.31 ± 46.12	197.29 ± 34.19
给药后	371.9 ± 115.15**	215.7 ± 41.59	241.3 ± 54.64***	248.6 ± 66.95##	232.7 ± 52.34*	217.70 ± 54.94

与造模前相比: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$;与给药前相比: $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$ 。

3.3 rLZ-8 对各组大鼠总蛋白含量的影响

rLZ-8 对各组大鼠总蛋白含量的影响结果如表 3,与正常对照组比较,阴性对照组大鼠血清中总蛋白含量明显减少($p < 0.05$);与阴性对照组相比,维生素 E 组与 rLZ-8 高剂量组大鼠血清中总蛋白含量增加($p < 0.05$),具有统计学差异。

表 3 各组大鼠血清中总蛋白含量($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	总蛋白含量(g/L)
正常对照组	67.12 ± 11.53
阴性对照组	47.03 ± 8.23*
维生素 E 组	59.68 ± 9.03 [#]
rLZ-8 高剂量组	58.71 ± 7.13 [#]
rLZ-8 中剂量组	51.14 ± 11.52
rLZ-8 低剂量组	53.45 ± 10.02

与正常对照组相比: $*p < 0.05$;与阴性对照组相比: $^{\#}p < 0.05$ 。

3.3 rLZ-8 对各组大鼠生长激素含量的影响

采用放射免疫分析法检测大鼠血清中生长激素水平,见表 4,结果显示,与正常对照组比较,阴性对照组大鼠血清中 GH 含量降低($p < 0.05$);与阴性对照组相比,维生素 E 组与各给药组血清中 GH 含量增加,且以 rLZ-8 高剂量组增加明显($p < 0.01$)。

表 4 血清中生长激素含量(单位:ng/mL)($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	生长激素(GH)含量
----	------------

正常对照组	3.82±0.48
阴性对照组	2.86±0.99*
维生素E组	3.99±0.93 [#]
rLZ-8 高剂量组	4.44±0.79** ^{##}
rLZ-8 中剂量组	3.90±1.01 [#]
rLZ-8 低剂量组	3.92±0.94 [#]

与正常对照组相比：^{*} $p<0.05$ ；与阴性对照组相比：[#] $p<0.05$ 。

3.4 rLZ-8 对各组大鼠性激素含量的影响

采用放射免疫分析法检测大鼠血清中性激素水平,由表 5 可以看出：

(1) 与正常对照组比较,阴性对照组大鼠血清中促卵泡激素含量明显增加($p<0.01$) ;与阴性对照组相比,各组大鼠血清中促卵泡激素含量均降低($p<0.05$),其中 rLZ-8 高剂量组能够明显降低促卵泡激素的含量($p<0.01$),差异具有统计学意义。

(2) 阴性对照组大鼠血清中促黄体生成素含量较正常组明显增加($p<0.01$) ;与阴性对照组相比,各组大鼠血清中促黄体生成素含量均降低,具有统计学差异($p<0.05$), rLZ-8 高剂量与 rLZ-8 中剂量组促黄体生成素含量明显降低($p<0.01$)。

(3) 与正常对照组相比,阴性对照组大鼠血清中雌二醇含量明显降低($p<0.01$) ;与阴性对照组相比,rLZ-8 低、中、高剂量组血清中雌二醇含量均有所增加,其中 rLZ-8 低、高剂量组增加明显($p<0.05$),差异具有统计学意义。

(4) 与正常组相比,阴性对照组大鼠血清中孕酮含量明显降低($p<0.05$) ;与阴性对照组相比,维生素 E 组与 rLZ-8 各给药组血清中孕酮含量均增加,且以 rLZ-8 中、高剂量组增加明显($p<0.01$),具有统计学意义。

(5) 与正常组相比,阴性对照组大鼠血清中睾酮含量明显降低($p<0.01$) ;与阴性对照组相比,rLZ-8 高剂量组血清中孕酮含量明显增加($p<0.05$),具有统计学意义。

表 5 各组大鼠血清中性激素含量(±s, n=12)

组 别	促卵泡激素(FSH)	促黄体生成素(LH)	雌二醇(E ₂)	孕酮(P)	睾酮(T)
正常对照组	0.63±0.19	1.54±0.32	4.11±1.36	1.49±0.93	1.19±0.50
阴性对照组	1.20±0.43**	2.89±0.54**	2.23±0.56**	0.59±0.20*	0.31±0.18**
维生素E组	0.68±0.20 ^{##}	1.83±0.27 ^{##}	2.60±0.68**	1.02±0.64	0.57±0.26 ^{##}
rLZ-8 高剂组	0.67±0.19 ^{##}	1.85±0.46 ^{##}	3.15±0.83 [#]	1.43±0.63 ^{##}	0.55±0.029 ^{##}
rLZ-8 中剂组	0.71±0.21 [#]	2.00±0.36 ^{##}	2.77±0.85	1.29±0.51 ^{##}	0.46±0.25*
rLZ-8 低剂组	0.76±0.26 [#]	2.24±0.42 ^{##}	2.97±0.78 [#]	1.16±0.70	0.33±0.19**

与正常对照组相比：^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$;与模型组相比：[#] $p<0.05$, ^{##} $p<0.01$ 。

3.5 rLZ-8 对各组大鼠甲状腺激素和促甲状腺激素含量的影响

采用放射免疫分析法检测大鼠血清中甲状腺激素和促甲状腺激素水平,结果如表 6 所示：

(1) 与正常对照组相比,阴性对照组大鼠血清中 FT₃ 含量明显降低($p<0.05$) ;与阴性对照组相比,维生素 E 组与 rLZ-8 各给药组大鼠血清中 FT₃ 含量均增加,且以 rLZ-8 高剂量组增加明显($p<0.05$),具有统计学差异。

(2) 与正常对照组相比,阴性对照组大鼠血清中 FT₄ 含量降低($p<0.01$) ;与阴性对照组相比,rLZ-8 高剂量和 rLZ-8 低剂量组大鼠血清中 FT₄ 含量增加明显($p<0.05$),具有统计学差异。

(3) 与正常对照组相比,阴性对照组大鼠血清中 TSH 含量明显降低($p<0.05$) ;与阴性对

照组相比,维生素E组与各 rLZ-8 给药组 TSH 含量均有所增加($p<0.05$),差异具有统计学意义。

表 6 甲状腺激素和促甲状腺激素含量(单位:ng/mL)($\pm s$, n=12)

组 别	游离三碘甲状腺原氨酸 (FT ₃)	游离甲状腺素 (FT ₄)	促甲状腺素 (TSH)
正常对照组	2.62±0.47	4.95±0.90	0.51±0.37
阴性对照组	1.84±0.31**	2.82±1.16**	0.20±0.08*
维生素E组	2.16±0.33 [#]	4.03±0.83 [#]	0.33±0.08**
rLZ-8高剂量组	2.72±0.41 [*]	4.10±1.20 [*]	0.35±0.09**
rLZ-8中剂量组	2.15±0.48	3.61±1.63	0.32±0.08*
rLZ-8低剂量组	2.12±0.74	2.99±1.16**	0.28±0.04**

与正常对照组相比:^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$;与阴性对照组相比:[#] $p<0.05$, ^{##} $p<0.01$ 。