



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109843313 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201780064498.X

(22)申请日 2017.10.18

(30)优先权数据

10-2016-0135251 2016.10.18 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/011501 2017.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/074831 K0 2018.04.26

(71)申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市城北区安岩路145高丽大
学校(安岩洞五街)(邮递区号:02841)

(72)发明人 林英姬 黄善煜 金政根 金准湖

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

代理人 马爽 臧建明

(51)Int.Cl.

A61K 36/605(2006.01)

A23L 33/105(2006.01)

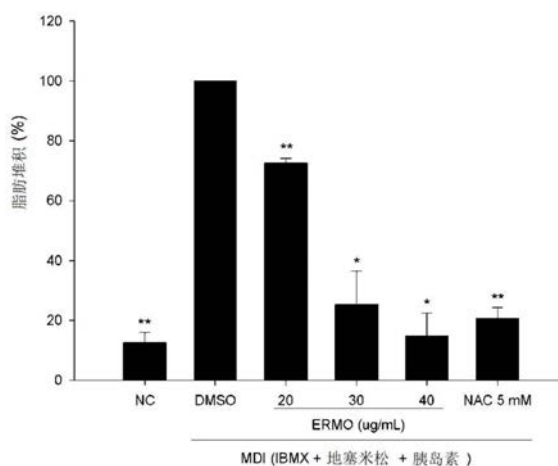
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

含有桑枝酒精萃取物的用于预防或治疗肥胖的组合物

(57)摘要

本发明涉及一种包括桑枝酒精萃取物作为有效成分的用于预防或治疗肥胖的组合物,由于其包括从作为天然物的桑枝萃取的桑枝酒精萃取物作为有效成分,因此可对人体无副作用地抑制脂肪细胞内的脂肪堆积、或抑制脂肪前驱细胞分化成脂肪细胞来预防或治疗肥胖。



1. 一种用于预防或治疗肥胖的组合物,包括桑枝酒精萃取物作为有效成分。
2. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗肥胖的组合物,其中所述桑枝酒精萃取物抑制脂肪堆积。
3. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗肥胖的组合物,其中所述桑枝酒精萃取物抑制脂肪细胞分化。
4. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗肥胖的组合物,其中所述桑枝酒精萃取物抑制选自自由过氧化物酶体增殖物-活化受体- γ 、CCAAT/增强子-结合蛋白- α 或固醇调节因子结合蛋白-1所组成的族群中的一种以上的转录因子的表现。
5. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗肥胖的组合物,其中所述组合物为药学组合物。
6. 根据权利要求5所述的用于预防或治疗肥胖的组合物,还包括药学上可容许的载体。
7. 一种用于预防或治疗肥胖的食品组合物,包括桑枝酒精萃取物作为有效成分。

含有桑枝酒精萃取物的用于预防或治疗肥胖的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包括桑枝 (*Ramulus mori*) 酒精萃取物的用于预防或治疗肥胖的组合物。

背景技术

[0002] 因由脂肪细胞产生的过量的脂肪而引发体脂肪堆积。已知因促进脂肪细胞分化引起的脂肪堆积成为肥胖的原因,而肥胖成为如第二型糖尿、高血压及心血管疾病的各种疾病的病因 (HAJER, G.R.、Van Haeften, T.W.、Visseren, F.L., 2008, 肥胖、糖尿病及心血管疾病的脂肪组织机能障碍 (Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases), 欧洲心脏杂志 (European heart journal), 29 (24), 2959-2971)。全世界的肥胖人口在2012年为21亿人, 预测2030年将增加到33亿人。目前, 已开发各种抗肥胖产品进行销售, 抗肥胖产品市场的规模呈持续增加的趋势。然而, 实情为目前正在市售的许多抗肥胖医药品因被报告表现出副作用 (例如, 增加引发精神疾病的危险、心肌梗塞、脑中风、与胃肠有关的副作用) 而取消产品许可 (Kang, J.G. 与 Park, C., 2012, 抗肥胖药品 (Anti-obesity drugs): 其效果及安全性的评估 (a review about their effects and safety), 糖尿病&新陈代谢杂志 (Diabetes&metabolism journal), 36 (1), 13-25)。因此, 目前正在积极地研究考虑到稳定性等且表现来自天然物的肥胖抑制效果的替代疗法 (Lai, C.、Wu, J.、Pan, M., 2015, 抗肥胖的功能性食品生物活性成分的分子机制 (Molecular mechanism on functional food bioactives for anti-obesity), 食品科学的当代观点 (Current Opinion in Food Science), 2, 9-13)。目前, 体脂肪减少效果得到食品医药品安全处的认证而正在市售的天然功能性原料有藤黄果皮萃取物、毛喉鞘蕊花萃取物、苏子叶萃取物、绿马黛萃取物、大豆胚芽萃取物等复合物、绿茶萃取物、香蜂草萃取物混合粉末、马黛热水萃取物、绞股蓝酒精萃取粉末、凹唇姜萃取粉末、乳铁蛋白、海带等复合萃取物、普洱茶萃取物、野生芒果籽萃取物、生咖啡豆萃取物、发酵醋石榴复合物、壳聚糖、壳寡糖、黑豆肽复合物、左旋肉碱酒石酸盐、共轭亚麻油酸、木槿属等复合萃取物等 (健康功能食品的功能性原料认证现况, 食品医药品安全处, 2015)。

[0003] 脂肪细胞 (adipocyte) 作为在脂肪组织中堆积脂肪的细胞, 发挥保持身体能量代谢的恒常性的作用。如果包括脂肪细胞的脂肪组织过度地堆积, 则会引发肥胖。因此, 脂肪细胞的分化成为脂肪堆积的原因, 而脂肪堆积与肥胖密切相关 (Ristow, M.、Muller-Wieland, D.、Pfeiffer, A.、Krone, W.、Kahn, C.R., 1998, 脂肪细胞分化的遗传调控因子的突变有关的肥胖 (Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation), 新英格兰医疗杂志 (New England Journal of Medicine), 339 (14), 953-959)。脂肪细胞 (adipocyte) 经由脂肪前驱细胞 (preadipocyte) 步骤而从间质前驱物 (mesenchymal precursor) 分化成脂肪细胞 (adipocyte), 在分化过程中, 通过形态变化、生物化学变化而在体内堆积脂肪。脂肪细胞的分化由特征性地表现到脂肪组织细胞的一连串的基因的表现变化诱导, 通过作用在这些基因的调节部位的转录因子

(transcription factor)的表现进行调节。胰岛素作为诱导脂肪细胞进行分化的激素,其是参与脂肪细胞代谢调节的主要外部因素。脂肪细胞在分化期间,CCAAT增强子-结合蛋白(CCAAT enhancer-binding-proteins,C/EBP)家族(family)、过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (peroxisome-proliferators activated-receptor- γ ,PPAR- γ)、固醇调节因子结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1,SREBP-1)等转录因子的表现增加,这些转录因子诱导相互转录而导致脂肪细胞分化。因此,需进行利用抑制这些转录因子的表现的无副作用的天然物的肥胖研究。

发明内容

[0004] 发明要解决的问题

[0005] 本发明的目的在于提供一种包括抑制脂肪堆积或脂肪细胞分化的桑枝酒精萃取物的用于预防或治疗肥胖的组合物。

[0006] 然而,本发明要解决的问题并不限制于以上所提及的问题,本技术领域内的普通技术人员可根据以下的记载明确地理解未提及的其他问题。

[0007] 解决问题的手段

[0008] 根据一实施例,提供一种包括桑枝(Ramulus mori)酒精萃取物作为有效成分的用于预防或治疗肥胖的组合物。

[0009] 根据一观点,所述桑枝酒精萃取物可抑制脂肪堆积。

[0010] 根据一观点,所述桑枝酒精萃取物可抑制脂肪细胞分化。

[0011] 根据一观点,所述桑枝酒精萃取物可抑制选自由过氧化物酶体增殖物-活化受体- γ (PPAR- γ)、CCAAT/增强子-结合蛋白- α (C/EBP- α)或固醇调节因子结合蛋白-1(SREBP-1)所组成的族群中的一种以上的转录因子的表现。

[0012] 根据一观点,所述组合物可为药学组合物。

[0013] 根据一观点,所述组合物还可包括药学上可容许的载体。

[0014] 根据一实施例,提供一种包括桑枝(Ramulus mori)酒精萃取物作为有效成分的用于预防或治疗肥胖的食品组合物。

[0015] 发明效果

[0016] 本发明的用于预防或治疗肥胖的组合物包括从作为天然物的桑枝萃取的桑枝酒精萃取物作为有效成分,因此可对人体无副作用地抑制脂肪细胞内的脂肪堆积、或抑制脂肪前驱细胞分化成脂肪细胞来预防或治疗肥胖。

附图说明

[0017] 图1是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的3T3-L1细胞内的细胞毒性程度的图表。

[0018] 图2是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的脂肪球的照片。

[0019] 图3是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的脂肪堆积的图表。

[0020] 图4a至图4c是表示与经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞内的脂肪细胞分化相关的基因的表现程度的图表。

[0021] 图5a及图5b是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的荧光激活细

胞分选 (FACS) 结果的图。

具体实施方式

[0022] 以下,参照附图,详细地对实施例进行说明。各图中所示的相同的参照符号表示相同的部件。

[0023] 可对以下说明的实施例施加各种变更。以下说明的实施例并非要限定实施方式,应理解为包括这些实施例的所有变更、等同物或替代物。

[0024] 实施例中所使用的术语仅用于对特定的实施例进行说明,并非想要限定实施例。只要未在文中明确地表示其他含义,则单数的表达包括复数的表达。在本说明书中,应理解为“包括”或“具有”等术语表示存在说明书中所记载的特征、数字、步骤、动作、构成要素、零件或其组合,而并非预先排除一个或一个以上的其他特征、数字、步骤、动作、构成要素、零件或其组合的存在可能性或附加可能性。

[0025] 只要未进行其他定义,则包括技术术语或科学术语在内的此处所使用的的所有术语具有与实施例所属的技术领域内的普通技术人员通常理解的内容相同的含义。与通常使用的词典中所定义的含义相同的术语应解释为具有与相关技术文中所具有的含义一致的含义,只要未在本申请案中明确地进行定义,则不解释为理想的含义或过度形式化的含义。

[0026] 另外,在参照附图进行说明时,与附图编号无关而对相同的构成要素赋予相同的参照符号,省略其重复说明。在对实施例进行说明时,在判断对相关公知技术的具体说明会不必要地混淆实施例的主旨的情况下,省略其详细说明。

[0027] 根据一实施例,提供一种包括桑枝 (*Ramulus mori*) 酒精萃取物作为有效成分的用于预防或治疗肥胖的组合物。尤其,所述桑枝酒精萃取物可抑制脂肪细胞内的脂肪堆积,也可抑制从脂肪前驱细胞向脂肪细胞的分化。

[0028] 本发明中所使用的“桑枝 (*Ramulus mori*)”作为登载为食品原料的物质,即便长期或大量使用也无副作用(例如,肝毒性),本发明的含有桑枝酒精萃取物的组合物即便经口投予也可充分地达成抑制脂肪堆积或抑制脂肪细胞分化的效果。

[0029] 根据一观点,所述桑枝酒精萃取物可抑制选自由过氧化物酶体增殖物-活化受体- γ (PPAR- γ)、CCAAT/增强子-结合蛋白- α (C/EBP- α) 或固醇调节因子结合蛋白-1 (SREBP-1) 所组成的族群中的一种以上的转录因子的表现。参照实施例5,可确认到如下情况:在经桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞内,作为与脂肪细胞分化有关的基因的PPAR- γ 、C/EBP- α 及SREBP-1的表现减少。桑枝酒精萃取物的浓度越增加,则基因PPAR- γ 、C/EBP- α 及SREBP-1的表现越会一并减少。

[0030] 本发明的组合物可为药学组合物,因此还可包括药学上可容许的载体。

[0031] 本发明中的术语“药学上可容许的载体”是指参与到将任意的对象组合物或成分从一个器官或身体部分搬运或传输到其他器官或身体部分的过程的如液体填充剂或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或胶囊化物质的制药上可容许的物质、组合物或媒介物,为了进行投予,本发明的组合物除记载的所述有效成分以外,还可包括药学上可容许的载体、赋形剂或稀释剂。作为所述载体、赋形剂及稀释剂,可列举乳糖、左旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、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、硬

脂酸镁及矿物油。

[0032] 另外,本发明的组合物可分别通过通常的方法剂型化成散剂、颗粒剂、锭剂、胶囊剂、悬浊液、乳液、糖浆、雾剂等口服型剂型、外用剂、栓剂或杀菌注射溶液的形态来使用。详细而言,在剂型化时,可使用通常使用的填充剂、增量剂、结合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂或赋形剂来调制。作为用以经口投予的固体制剂,包括锭剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,但并不限于此。这些固体制剂可在所述组合物中混合至少一种以上的赋形剂、例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等来调制。另外,除简单的赋形剂以外,也可使用如硬脂酸镁、滑石的润滑剂。作为用以口服的液态制剂,包括悬浮剂、耐溶液剂、油剂、糖浆剂等,但并不限于此,除作为经常使用的简单的稀释剂的水、液态石蜡以外,可添加多种赋形剂、例如润湿剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等来调制。用以非经口投予的制剂包括经杀菌的水溶液、非水性溶剂、悬浮剂、油剂、冷冻干燥制剂及栓剂。作为非水性溶剂及悬浮剂,可使用如丙二醇、聚乙二醇、橄榄油的植物性油、如油酸乙酯的可注射的酯等。作为栓剂的基剂,可使用合成脂肪酸酯、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂酸甘油酯、甘油明胶等。

[0033] 不仅如此,本发明的组合物可根据所期望的方法进行经口投予或非经口投予(例如,适用于静脉内投予、皮下投予、腹腔内投予或局部投予),优选为可经口投予。本发明中所使用的“桑枝”作为登载为食品原料的物质,即便长期或大量使用也无副作用(例如,肝毒性),即便经口投予也可充分地达成抑制脂肪堆积或抑制脂肪细胞分化的效果。投予量根据患者的状态、体重、疾病程度、药物形态、投予路径及时间而不同,但可由普通技术人员适当地选择。可视需要而一天投予1次或分数次来投予,为了预防或治疗肠病,可单独使用或与手术、激素治疗、药物治疗及使用生物学反应调节剂的方法并用。

[0034] 另一方面,本发明的用于预防或治疗炎症性肠病的组合物不仅可为药学组合物,而且也可作为食品组合物,可直接添加所述组合物、或与其他食品或食品成分一并使用。

[0035] 作为所述食品的示例,可列举肉类、香肠、面包、巧克力、糖果类、小吃类、点心类、披萨、方便面、其他面类、口香糖类、包括冰激淋类在内的乳品产品、各种汤、饮料、茶、饮剂、酒精饮料及维生素复合剂等,包括所有通常含义下的健康功能食品。

[0036] 本发明的组合物可像通常的健康功能食品一样含有各种香味剂或天然碳水化合物等作为补充成分。所述天然碳水化合物可为如葡萄糖、果糖的单糖、如麦芽糖、蔗糖的双糖、如糊精、环糊精的多糖、及木糖醇、山梨糖醇、赤藻糖醇等糖醇。作为甜味剂,可使用如索马甜、甜菊萃取物的天然甜味剂、或如糖精、阿斯巴甜糖的合成甜味剂等。

[0037] 另外,本发明的组合物可含有各种营养剂、维生素、电解质、调味剂、着色剂、果胶酸及其盐、褐藻酸及其盐、有机酸、保护性胶质增粘剂、pH值调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、酒精、使用在碳酸饮料的碳酸化剂等。除此之外,本发明的组合物可含有用以制造天然果汁、果汁饮料及蔬菜饮料的果肉。这些成分可独立使用或组合而使用。

[0038] 在以下的实施例中,在确认桑枝酒精萃取物是否有助于抑制脂肪堆积及抑制脂肪细胞分化前,对细胞实施毒性试验,在对3T3-L1preadipocyte(脂肪前驱细胞)(美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection),USA)投予物质后,执行抑制脂肪球堆积、抑制脂肪细胞分化的试验。

[0039] 实施例1:桑枝酒精萃取物的制备

[0040] 准备1kg的切碎的桑枝。在利用蒸馏水清洗干净后,添加8,000mL的80%酒精用乙

醇,在超声波清洗机(H0429115,Hwashin Instrument Co.)中萃取48小时。在利用玻璃纤维布(Glass Fiber Cloth,GFC)滤纸(Cat No.1822-047,Whatman)减压过滤萃取结束的酒精萃取物后,使用旋转式减压浓缩机(N-1000,Eyela)减压浓缩至约500mL。在-80℃的超低温冷冻库(DF8520,Ilshin Lab Co.)中冷冻浓缩的萃取物后,使用冷冻干燥机(FD8512,Ilshin Lab Co.)冷冻干燥48小时而将桑枝酒精萃取物制成粉末形态。

[0041] 实施例2:脂肪细胞的准备

[0042] 利用含有10%小牛血清(bovine calf serum,BCS)及1%青霉素-链霉素(HyClone,Logan,UT,USA)的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,DMEM)在5%CO₂、37℃环境下培养3T3-L1脂肪前驱细胞(preadipocytes)(美国模式培养物集存库,USA)。每两天更换成新鲜的培养基进行培养而实施抑制脂肪球堆积及抑制向脂肪细胞的分化的试验。

[0043] 实施例3:细胞毒性评估

[0044] 为了评估桑枝酒精萃取物(ERMO)的细胞毒性,将3T3-L1细胞的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)游离程度用作指标。在将3T3-L1细胞以 5×10^3 细胞/孔(cells/well)的浓度接种到96孔盘后,培养24小时。接着,在培养基中添加试样,1小时后利用EZ-LDH细胞毒性检测试剂盒(cell cytotoxicity assay kit,Daeil Lab Service Co., Seoul,Korea)测定细胞毒性。根据下式计算细胞毒性。

[0045] $\%LDH\text{释放} = (\text{培养基中的LDH} / \text{总LDH}) \times 100$ 。

[0046] 在分别按照20μg/ml、30μg/ml、40μg/ml、50μg/ml、100μg/ml的浓度准备桑枝酒精萃取物后,分别利用这些桑枝酒精萃取物对3T3-L1细胞进行处理。测定与桑枝酒精萃取物的浓度对应的LDH游离程度。

[0047] 图1是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的3T3-L1细胞内的细胞毒性程度的图表。

[0048] 参照图1,与桑枝酒精萃取物的浓度对应的LDH游离程度如下:20μg/ml ($16.9 \pm 1.0\%$)、30μg/ml ($15.8 \pm 1.6\%$)、40μg/ml ($14.6 \pm 0.8\%$)、50μg/ml ($13.1 \pm 1.3\%$)、100μg/ml ($14.6 \pm 0.8\%$)。在与对照组($17.2 \pm 1.1\%$)进行比较时,在大部分情况下未观察到十分显著的LDH流出。根据无显著的LDH流出的结果,可确认到桑枝酒精萃取物无细胞毒性。

[0049] 实施例4:脂肪堆积评估

[0050] 为了将3T3-L1细胞诱导成脂肪细胞,在含有10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)与1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中进行二苯基甲烷二异氰酸酯(Diphenylmethane diisocyanate,MDI)(5μg/ml的胰岛素、0.5mM的3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine,IBMX)及1.0μM的地塞米松(dexamethasone))处理后诱导分化两天。在利用生理盐水(磷酸盐缓冲盐水(Phosphate Buffered Saline,PBS))清洗诱发分化的3T3-L1细胞后,利用10%福尔马林固定1小时。在利用双蒸水(ddH₂O)清洗2次固定的细胞后,在60%异丙醇中处理5分钟,之后利用油红O(Oil Red O)溶液(溶解到60%异丙醇)染色10分钟。在染色后,利用ddH₂O清洗4次,利用100%异丙醇脱色10分钟,之后利用显微镜观察细胞,另外,测定500nm的吸光度。

[0051] 图2是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的脂肪球的照片。

[0052] 参照图2,观察到在桑枝酒精萃取物处理组中脂肪球依赖于桑枝酒精萃取物的浓

度而明显地减少。

[0053] 另外,将仅经用作溶剂的二甲基亚砜(DMSO)处理的试样结果换算成100%来对脂肪进行定量测定。

[0054] 图3是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的脂肪堆积的图表。

[0055] 参照图3,观察到在桑枝酒精萃取物处理组中脂肪堆积减少,20 μ g/ml (72.5 $\pm$ 1.6%)、30 μ g/ml (25.3 $\pm$ 11.3%)、40 μ g/ml (14.7 $\pm$ 7.7%),即,观察到与用作阳性对照组的经作为抗氧化剂的n-乙酰半胱氨酸((n-acetyl cysteine,NAC),5mM)处理的组相似的程度脂肪堆积(20.6 $\pm$ 3.7%),可知桑枝酒精萃取物(ERMO)对脂肪细胞具有优异的脂肪堆积抑制效果。

[0056] 实施例5:与脂肪细胞分化相关的基因的表现的测定

[0057] 在使用AccuZol试剂(reagent)(Bioneer,Daejun,Korea)从诱发分化的细胞萃取总信使核糖核酸(Messenger Ribonucleic Acid,mRNA)后,利用NanoDrop(ND-1000,Thermo Scientific)进行定量。使用Revert Aid第一链互补脱氧核糖核酸(Complementary Deoxyribonucleic Acid,cDNA)合成试剂盒(First Strand cDNA synthesis kit)(Thermo Scientific,Waltham,MA,USA)使1 μ g的mRNA反转录而制备cDNA。利用StepOne Plus实时(Real-Time)聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)系统(System)(AppliedBiosystems,Foster City,CA,USA)设备执行定量实时RT-PCR(qPCR),qPCR中所使用的引物如下述表1。PCR反应是在95 $^{\circ}$ C下反应10分钟后,反复进行40次在95 $^{\circ}$ C下反应15秒、在60 $^{\circ}$ C下反应1分钟。将 β -肌动蛋白(β -actin)基因用作内对照(endogenous control),将未经任何处理的样品(阴性对照组:Negative control)的基因表现量设为1来进行相对定量($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(method))。

[0058] [表1]

[0059]

基因	引物	序列
PPAR γ	正向	5'CAA GCC CTT TAC CAC AGT TGA 3'
	反向	5'CAG GTT CTA CTT TGATCG CAC TT 3'
C/EBP α	正向	5'TGG ACA AGA ACA GCA ACG AG 3'
	反向	5'TCA CTG GTC AAC TCC AGC AC 3'
SREBP-1	正向	5'AAC CAG AAG CTC AAG CAG GA 3'
	反向	5'TTT CAT GCC CTC CAT AGA CA 3'
β -肌动蛋白	正向	5'CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG 3'
	反向	5'ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA 3'

[0060] 图4a至图4c是表示与经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞内的脂肪细胞分化相关的基因的表现程度的图表。

[0061] 参照图4a至图4c,为了评估桑枝酒精萃取物(ERMO)对与脂肪细胞分化相关的基因的表现的阻碍,在利用MDI诱导3T3-L1细胞分化后,对基因表现执行qPCR分析,结果可知过氧化物酶体增殖物-活化受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ ,PPAR- γ)、CCAAT/增强子-结合蛋白- α (CCAAT/enhancer-binding proteins- α ,C/EBP- α)及固醇调节因子结合蛋白-1(SREBP-1)均依赖于浓度而减少。

[0062] 更详细而言,将仅经用作溶剂的DMSO处理的试样结果换算成1而对相对表现量进行比较,结果可确认到如下情况:参照图4a,PPAR- γ 减少为20 μ g/ml (0.85 ± 0.03)、30 μ g/ml (0.55 ± 0.04)、40 μ g/ml (0.47 ± 0.04);参照图4b,C/EBP- α 为20 μ g/ml (0.76 ± 0.04)、30 μ g/ml (0.30 ± 0.02)、40 μ g/ml (0.23 ± 0.04);参照图4c,SREBP-1减少为20 μ g/ml (0.88 ± 0.001)、30 μ g/ml (0.74 ± 0.01)、40 μ g/ml (0.60 ± 0.02)。

[0063] 实施例6:抑制脂肪细胞分化的评估

[0064] 为了评估脂肪细胞的分化是否得到抑制,在100mm的培养皿中培养3T3-L1细胞后,添加桑枝酒精萃取物而诱导细胞分化18小时。在回收细胞后,利用70%乙醇在4℃下固定至少2小时,之后利用PBS进行清洗,在300x g下离心分离5分钟而回收细胞。利用FxCycle碘化丙啶(PI)/核糖核酸酶(Ribonuclease,RNase)染色液(Staining solution)(Invitrogen Molecular Probes,Carlsbad,CA,USA)在室温下将固定的细胞染色30分钟。利用流式细胞仪(flow cytometry)(BD Caliber,Franklin Lakes,NJ,USA)对染色的细胞进行分析。

[0065] 即,为了评估桑枝酒精萃取物(ERMO)对3T3-L1细胞向脂肪细胞的分化的抑制,在利用MDI诱导3T3-L1细胞分化后,对分化初期过程中的细胞进行荧光激活细胞分选(FACS)分析,将各阶段的细胞比率量化。

[0066] 图5a及图5b是表示经一实施例的桑枝酒精萃取物处理的脂肪细胞的FACS结果的图。

[0067] 根据图5a的FACS结果,可知通过桑枝酒精萃取物处理而S阶段的细胞减少且G₀/G₁细胞增加。参照图5b,还可知如下情况:将FACS结果量化,结果与仅经用作溶剂的DMSO处理的组相比,通过桑枝酒精萃取物(ERMO)处理,G₀/G₁周期的细胞依赖于浓度而增加。更具体而言,G₀/G₁周期细胞比率在仅经用作溶剂的DMSO处理的试样中为30.86%,在经20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml的桑枝酒精萃取物(ERMO)处理的组中,分别增加为55.41%、62.49%、70.78%。这种结果意味着3T3-L1脂肪前驱细胞(preadipocytes)因桑枝酒精萃取物(ERMO)处理而停止在G₀/G₁周期,因此可确认到桑枝酒精萃取物(ERMO)抑制3T3-L1细胞向脂肪细胞分化。

[0068] 利用SigmaPlot版本(Version)10.0及统计产品与服务解决方案(Statistical Product and Service Solutions,SPSS)版本21执行本发明的所有实施例中所使用的统计分析,如果实施单因素方差分析(One-way analysis of variation,ANOVA)而观察到显著性,则为了确认与溶剂对照组存在显著差异的试验组而实施邓尼特t-检验(Dunnett's t-test)(*p<0.05)。

[0069] 如上所述,通过限定的实施例与附图对实施例进行了说明,但本技术领域内的普通技术人员可根据以上所记载的内容实现各种修正及变形。例如,即便按照与所说明的方法不同的顺序执行所说明的技术和/或按照与所说明的方法不同的形态结合或组合所说明的构成要素、或由其他构成要素或等同物代替或取代所说明的构成要素,也可达成适当的结果。

[0070] 因此,其他实现、其他实施例及与权利要求等同的内容也属于随附的权利要求的范围。

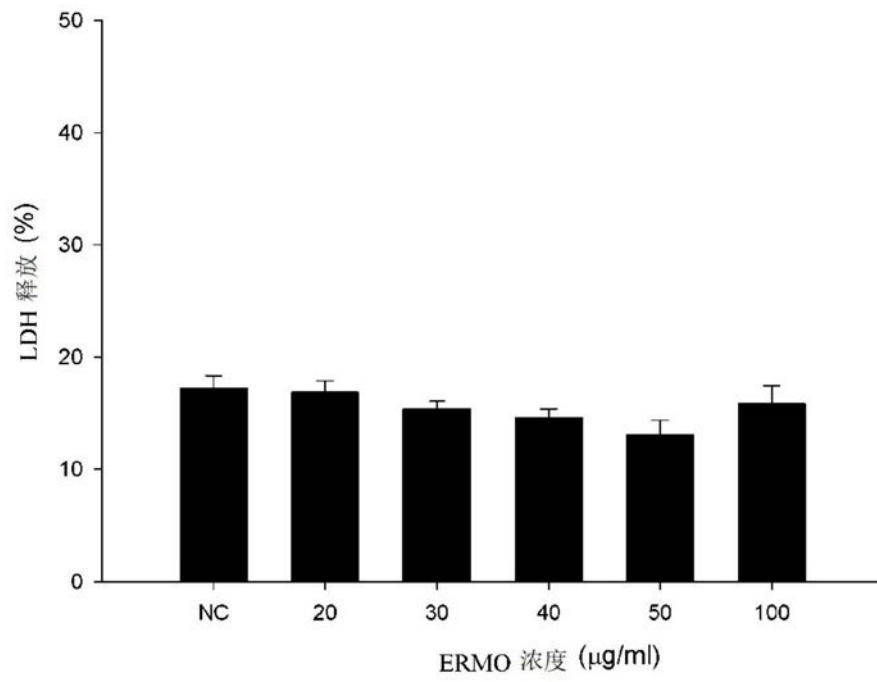


图1

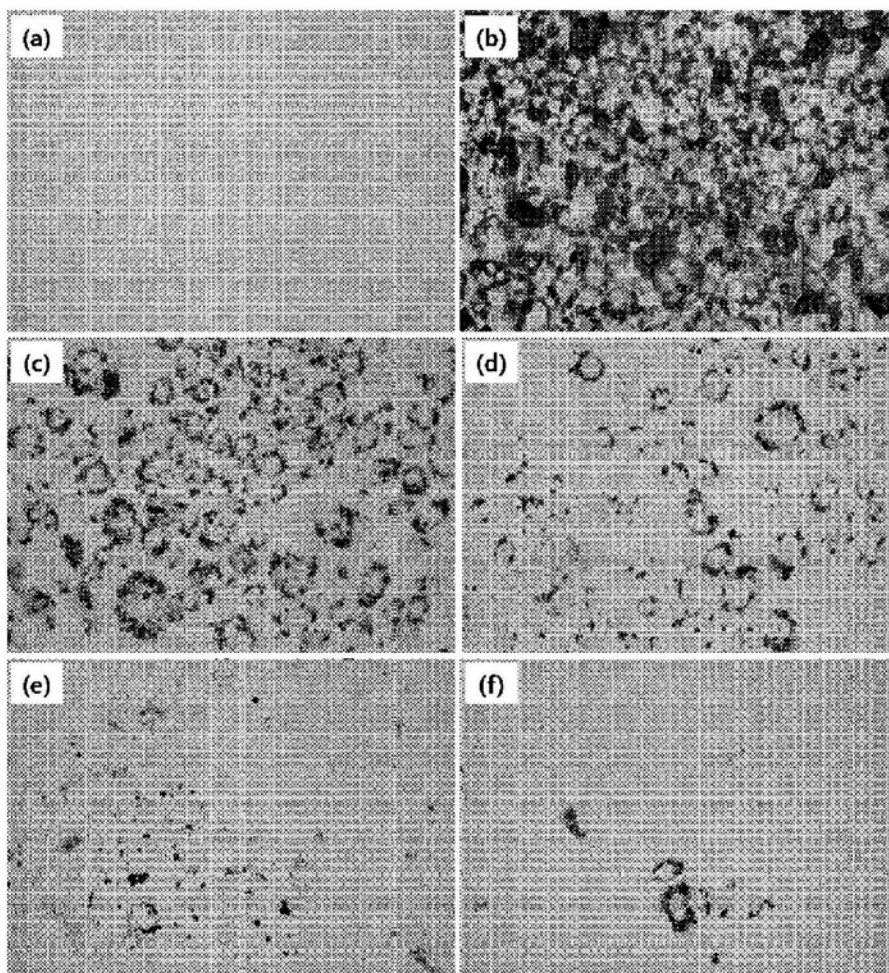


图2

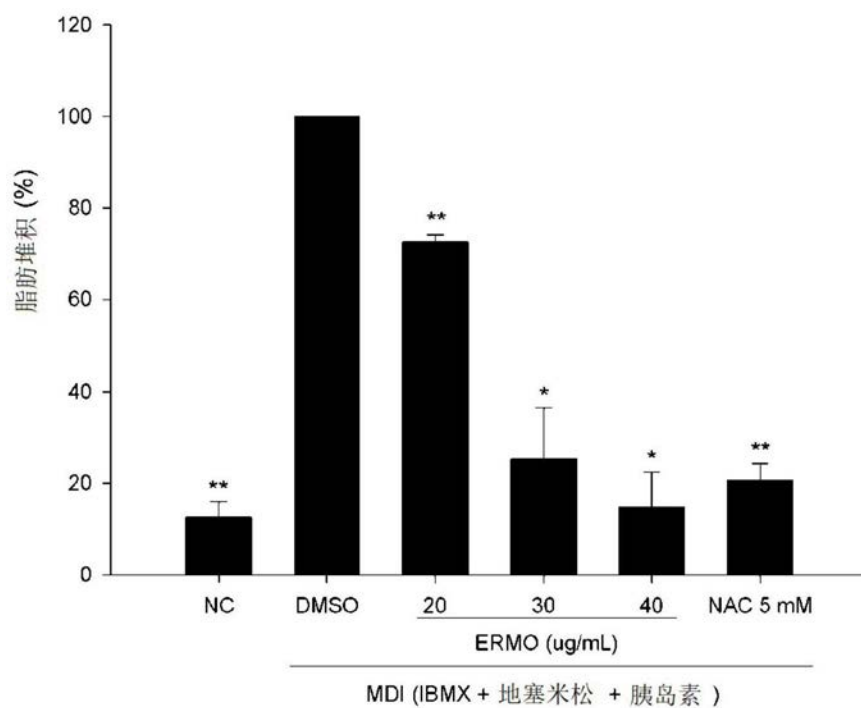


图3

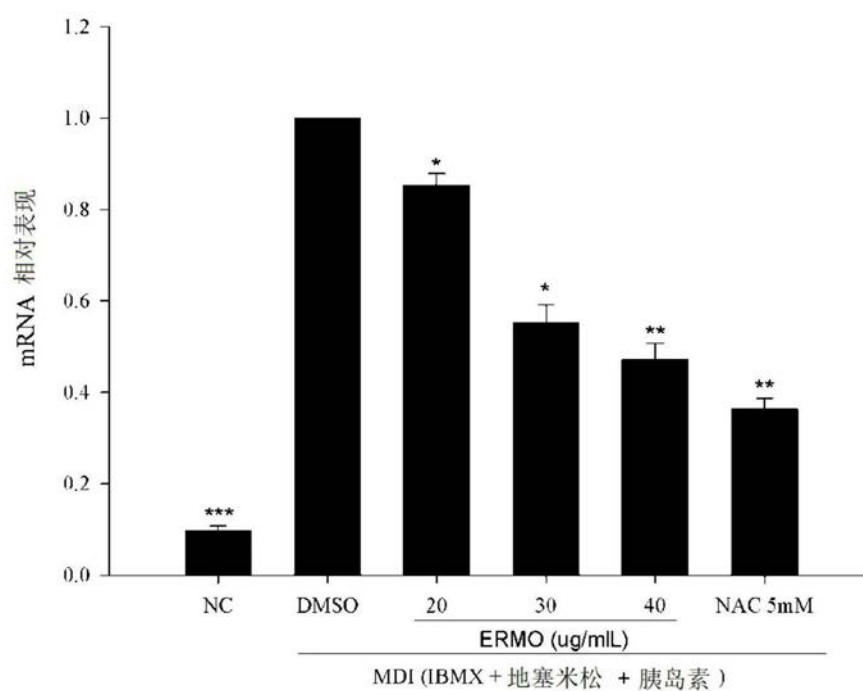


图4a

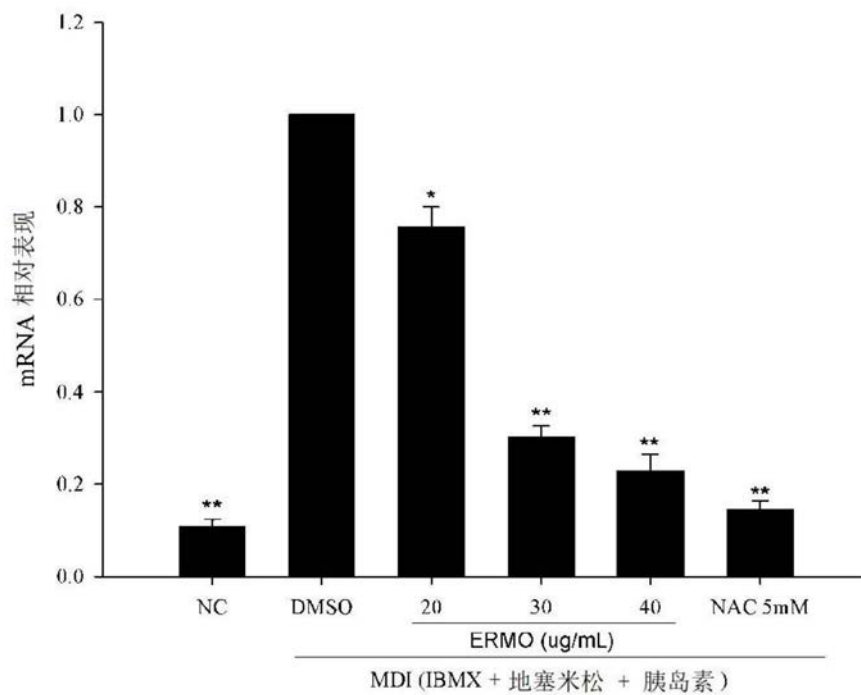


图4b

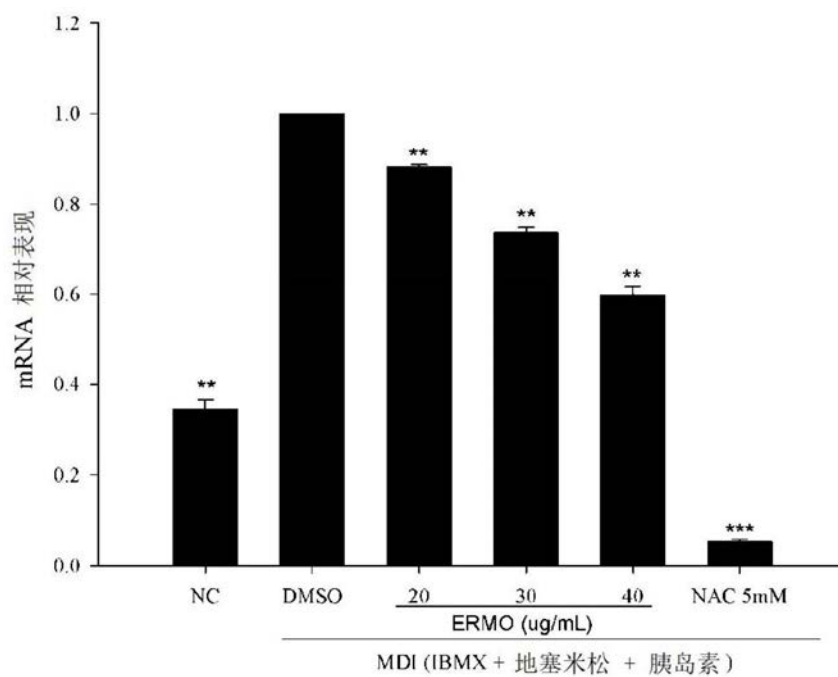


图4c

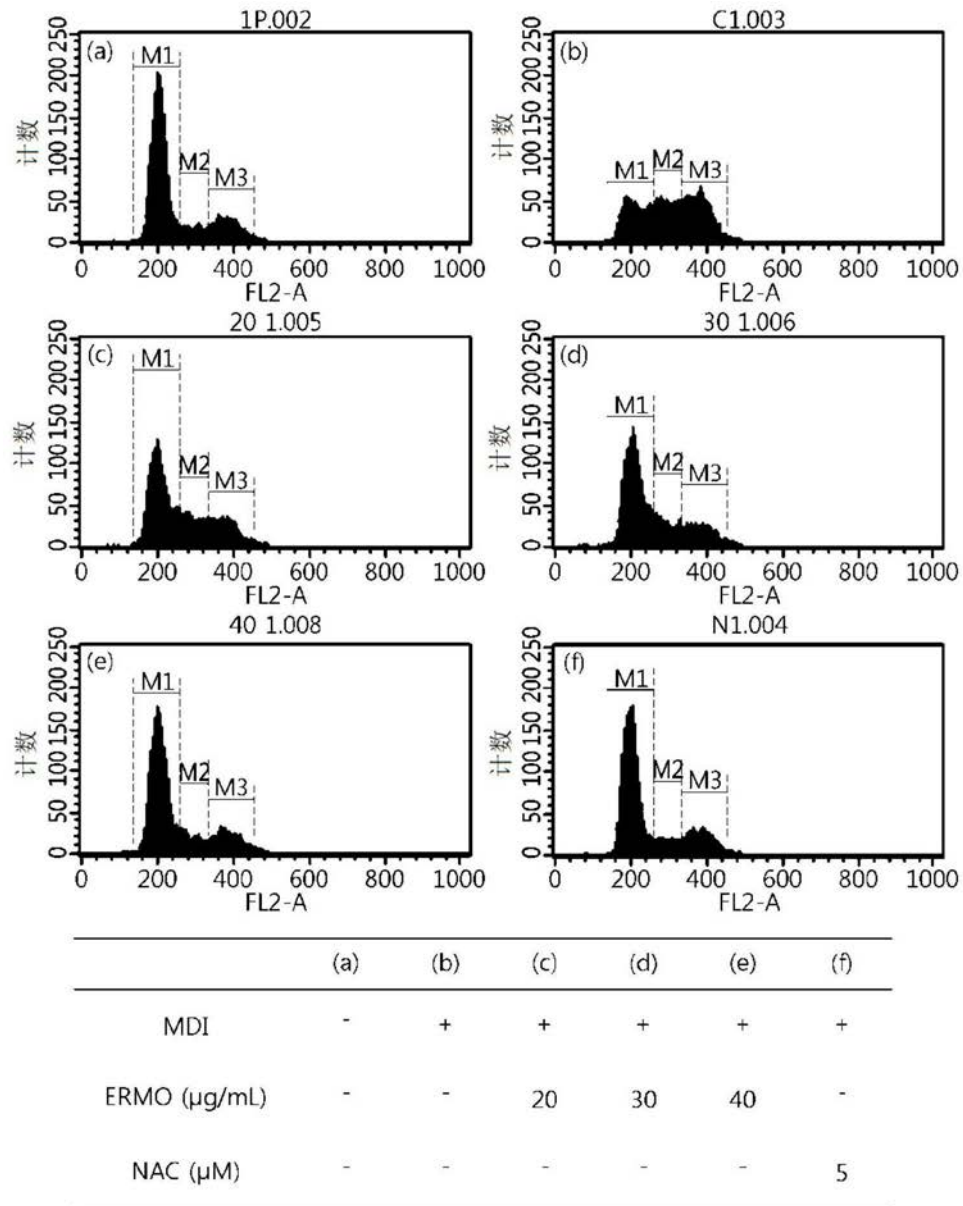


图5a

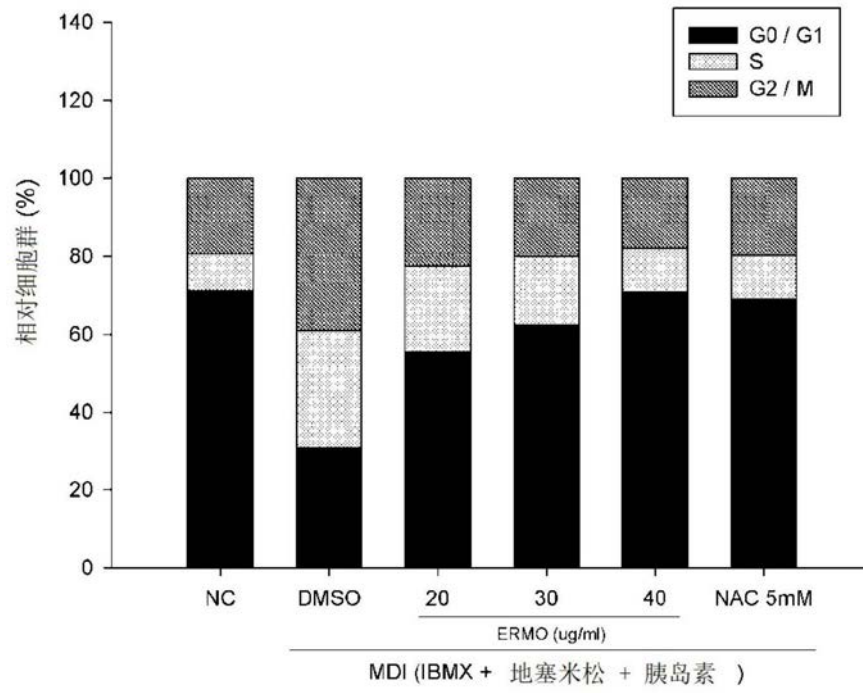


图5b