



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112352046 A

(43) 申请公布日 2021.02.09

(21) 申请号 201980043514.6

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2019.06.11

72001

(30) 优先权数据

2018-124613 2018.06.29 JP

代理人 张桂霞 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.28

(51) Int.Cl.

C12N 5/077 (2006.01)

A23L 33/175 (2006.01)

A61K 31/4172 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 21/00 (2006.01)

PCT/JP2019/023114 2019.06.11

C12N 1/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/004014 JA 2020.01.02

(71) 申请人 长濑产业株式会社

权利要求书1页 说明书10页

地址 日本大阪府大阪市

序列表2页 附图4页

(72) 发明人 小坂邦男

(54) 发明名称

麦角硫因、抗坏血酸2-葡萄糖苷、抗坏血酸和它们的组合的成肌分化促进作用

(57) 摘要

本发明提供包含麦角硫因、抗坏血酸2-葡萄糖苷、抗坏血酸和它们的组合的成肌分化促进用培养基和培养基添加剂、试剂盒、以及成肌分化促进用药物组合物和饮食品。

1. 用于促进成肌分化的培养基,该培养基包含麦角硫因。
2. 权利要求1所述的培养基,该培养基进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
3. 用于促进成肌分化的培养基添加剂,该培养基添加剂包含麦角硫因。
4. 权利要求3所述的培养基添加剂,该培养基添加剂进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
5. 用于促进成肌分化的试剂盒,该试剂盒包含麦角硫因。
6. 权利要求5所述的试剂盒,该试剂盒进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
7. 促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含麦角硫因的培养基来培养细胞。
8. 权利要求7所述的方法,其中,培养基是进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸的培养基。
9. 用于促进成肌分化的药物组合物,该药物组合物包含麦角硫因。
10. 权利要求9所述的药物组合物,该药物组合物进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
11. 权利要求9或10所述的药物组合物,该药物组合物用于促进肌肉的再生。
12. 用于促进成肌分化的饮食品,该饮食品包含麦角硫因。
13. 权利要求12所述的饮食品,该饮食品进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
14. 权利要求12或13所述的饮食品,该饮食品用于促进肌肉的再生。
15. 用于促进成肌分化的培养基,该培养基包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
16. 用于促进成肌分化的培养基添加剂,该培养基添加剂包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
17. 用于促进成肌分化的试剂盒,该试剂盒包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
18. 促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸的培养基来培养细胞。
19. 用于促进成肌分化的药物组合物,该药物组合物包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
20. 权利要求19所述的药物组合物,该药物组合物用于促进肌肉的再生。
21. 用于促进成肌分化的饮食品,该饮食品包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。
22. 权利要求21所述的饮食品,该饮食品用于促进肌肉的再生。

麦角硫因、抗坏血酸2-葡糖昔、抗坏血酸和它们的组合的成肌分化促进作用

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞的分化促进。详细而言，本发明涉及包含麦角硫因的成肌分化促进用培养基和培养基添加剂、以及成肌分化促进用药物组合物和饮食品(饮料和食品)等。

背景技术

[0002] 近年来，在老龄化社会的进程中，运动功能下降、跌倒/骨折的风险上升、运动障碍综合征等的肌肉量或肌力的下降所伴随的各种各样的障碍成为问题。为了治疗、改善这些障碍，肌肉的再生较为重要，肌肉的再生需要成肌分化。人们正在对成肌分化进行各种各样的研究(例如参照非专利文献1)。

[0003] 现有技术文献

非专利文献

非专利文献1:Onitsuka Y. Investigation of an efficient culture condition for the differentiation of murine skeletal myoblasts. Jpn. J. Vet. Res. 2013. 61 (1 & 2): 39.

发明内容

[0004] 发明所要解决的课题

为了治疗、改善运动障碍综合征等的需要肌肉再生的症状或状态，需要找到促进成肌分化的有效且安全的药剂或方法。

[0005] 用于解决课题的手段

为了解决上述课题，本发明人反复进行了深入研究，首次发现了：麦角硫因促进成肌分化；通过并用麦角硫因与抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸，成肌分化得到大幅促进；单独的抗坏血酸2-葡糖昔促进成肌分化；以及单独的抗坏血酸促进成肌分化，从而完成了本发明。

[0006] 因此，本发明提供下述的内容。

[0007] (1) 用于促进成肌分化的培养基，该培养基包含麦角硫因。

[0008] (2) (1)所述的培养基，该培养基进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。

[0009] (3) 用于促进成肌分化的培养基添加剂，该培养基添加剂包含麦角硫因。

[0010] (4) (3)所述的培养基添加剂，该培养基添加剂进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。

[0011] (5) 用于促进成肌分化的试剂盒，该试剂盒包含麦角硫因。

[0012] (6) (5)所述的试剂盒，该试剂盒进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。

[0013] (7) 促进细胞的成肌分化的方法，该方法包括：利用包含麦角硫因的培养基来培养细胞。

[0014] (8) (7)所述的方法，其中，培养基是进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血

酸的培养基。

[0015] (9) 用于促进成肌分化的药物组合物,该药物组合物包含麦角硫因。

[0016] (10) (9) 所述的药物组合物,该药物组合物进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。

[0017] (11) (9) 或 (10) 所述的药物组合物,该药物组合物用于促进肌肉的再生。

[0018] (12) 用于促进成肌分化的饮食品,该饮食品包含麦角硫因。

[0019] (13) (12) 所述的饮食品,该饮食品进一步包含抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸。

[0020] (14) (12) 或 (13) 所述的饮食品,该饮食品用于促进肌肉的再生。

[0021] 发明效果

根据本发明,提供包含麦角硫因的成肌分化促进用培养基和培养基添加剂、以及成肌分化促进用药物组合物和饮食品等。本发明的培养基、培养基添加剂、药物组合物和饮食品具有优异的成肌分化促进能力。本发明的药物组合物和饮食品特别是对老年人或负有外伤的人、病中/病后的人等有益。这些效果通过并用麦角硫因与抗坏血酸2-葡糖昔和/或抗坏血酸而大幅增强。另外,即使在抗坏血酸2-葡糖昔单独、抗坏血酸单独、或者将它们并用的情况下也可得到上述效果。麦角硫因是在生物体内发现的物质,抗坏血酸2-葡糖昔是被批准作为食品添加剂和准药品的物质,抗坏血酸是在水果、蔬菜等自然界中广泛存在的物质,因此本发明的培养基、培养基添加剂、药物组合物和饮食品的安全性高。

附图说明

[0022] [图1] 图1是显示麦角硫因给C2C12细胞的成肌分化带来的影响的显微照片。左侧的照片是分化前的C2C12细胞,中间的照片是使用未添加EGT的分化培养基进行了分化的C2C12细胞(对象),右侧的照片是使用添加有0.5mM EGT的分化培养基进行了分化的C2C12细胞。

[0023] [图2] 图2是显示麦角硫因给C2C12细胞的MyoD mRNA表达水平带来的影响的图。

[0024] [图3] 图3是显示麦角硫因给C2C12细胞的MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达水平带来的影响的图。

[0025] [图4] 图4是显示抗氧化剂依达拉奉对C2C12细胞的MyH2 mRNA表达水平没有影响的图。

[0026] [图5] 图5是显示麦角硫因和抗坏血酸2-葡糖昔的并用、和抗坏血酸2-葡糖昔的单独使用给C2C12细胞的MyH2 mRNA的表达水平(上图)和ACTA1 mRNA的表达水平(下图)带来的影响的图。图中,EGT表示使用添加了麦角硫因的培养基,AG表示使用添加了抗坏血酸2-葡糖昔的培养基,E+AG表示使用添加了麦角硫因和抗坏血酸2-葡糖昔的培养基。NT表示使用未添加麦角硫因和抗坏血酸2-葡糖昔的培养基。

[0027] [图6] 图6是显示麦角硫因和抗坏血酸的并用、和抗坏血酸的单独使用给C2C12细胞的MyH2 mRNA的表达水平(上图)和ACTA1 mRNA的表达水平(下图)带来的影响的图。图中,EGT表示使用添加了麦角硫因的培养基,VC表示使用添加了抗坏血酸的培养基,E+VC表示使用添加了麦角硫因和抗坏血酸的培养基。NT表示使用未添加麦角硫因和抗坏血酸的培养基。

具体实施方式

[0028] 在第1方案中,本发明提供:用于促进成肌分化的培养基,该培养基包含麦角硫因。

[0029] 本发明人首次发现了:麦角硫因促进成肌分化。

[0030] 已知麦角硫因(以下,称为EGT)是含硫氨基酸的一种,具有以抗氧化能力为首的各種生理活性。另外,暗示了其抗氧化能力高于维生素C、维生素E、半胱氨酸、谷胱甘肽。还显示了EGT具有紫外线吸收效果、黑色素产生抑制作用、活性氧种的消除能力、抑制皱纹或松弛的形成的弹性蛋白酶活性抑制作用、抑制雀斑的形成的酪氨酸酶活性抑制作用。因此,EGT是尤其在美容/食品业界受到关注的化合物之一。然而,EGT促进成肌分化却是由本发明人首次发现的。

[0031] 本说明书中,成肌分化是指由具有分化成骨骼肌的能力的干细胞或肌前体细胞分化成肌管细胞。本发明的培养基用于促进这些细胞的分化。干细胞是中胚层系干细胞。中胚层系干细胞可以是存在于生物体内的干细胞,也可以是来自于iPS细胞或ES细胞的干细胞。骨骼肌的肌前体细胞是已知的,可例示卫星细胞和成肌细胞(肌母细胞,myoblast)。在特别的方案中,成肌分化是指由卫星细胞或成肌细胞分化成肌管细胞。卫星细胞具有类成体干细胞的性质,是肌细胞的前体细胞。卫星细胞被激活而分化成成肌细胞。成肌细胞通过细胞分裂进行生长后分化成成肌细胞。肌细胞彼此融合,形成多核的肌管细胞。然后,肌管细胞成熟为肌纤维,形成肌肉组织。卫星细胞、成肌细胞、肌细胞、肌管细胞等为本领域技术人员所已知。

[0032] 用于本发明的EGT可以是游离的形态,也可以是盐的形态。EGT的盐可在EGT的羧基的带负电的氧与例如氢离子或碱金属离子之间形成,也可在三甲基氨基的带正电的氮与例如卤化物离子之间形成。另外,用于本发明的EGT可以是水合物。

[0033] 是否分化成肌肉,可根据是否以何种程度表达作为肌特异性蛋白的肌球蛋白来确认。本说明书中,成肌分化的促进是指干细胞或肌前体细胞中的肌球蛋白基因表达水平增大。在特别方案中是指卫星细胞或成肌细胞变成高度表达肌球蛋白mRNA的细胞。例如,成肌分化的促进可定义为:来自卫星细胞或成肌细胞的肌细胞使作为肌肉标志物的肌球蛋白mRNA的基因表达水平增加至1.5倍以上、优选2倍以上、更优选3倍以上。另外,例如成肌分化的促进是指,与不存在EGT时相比,使卫星细胞或成肌细胞中的MyoD mRNA的表达增加至1.5倍以上、优选2倍以上。

[0034] 本发明的培养基可以是在已知的培养基中添加EGT而得到的培养基。优选的是,本发明的培养基是在用于成肌分化的培养基中添加EGT而得到的培养基。关于培养基中的EGT的添加量,本领域技术人员可根据干细胞或肌前体细胞(例如卫星细胞或成肌细胞)的种类、培养温度、培养时间等培养条件、培养基组成等适当确定。例如,可以在成肌分化用的已知的低血清培养基中添加约0.001mM~约1.0mM、优选约0.1mM~约0.5mM的EGT,但并不限于这些量。

[0035] 本发明的培养基可以是液体、半固态、固体等任一种形态,没有特别限定。通常,本发明的培养基为液体培养基。或者,本发明的培养基可以是组合物的形态。例如,可以是可直接使用的液体培养基组合物的形态,也可以是使用水等介质进行稀释而达到所期望的成分浓度的浓缩液、糊、粉末、颗粒等组合物的形态。

[0036] 在第2方案中,本发明提供:用于促进成肌分化的培养基添加剂,该培养基添加剂

包含EGT。

[0037] 本发明的添加剂在调制培养基时添加,或者添加在调制完的培养基中。或者,本发明的添加剂可添加在培养中途的培养基中。

[0038] 关于本发明的添加剂中的EGT量,在添加至培养基的情况下是指达到所期望的EGT浓度的量。关于培养基中的EGT浓度如以上所说明。本发明的添加剂除了包含EGT以外,还可包含1种或其以上的成分,例如可包含细胞的生长所需的营养成分、或者成纤维细胞生长因子(FGF)、或肝细胞生长因子(hepatic growth factor) (HGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子(insulin growth factor) (IGF)等促进成肌分化的成分等。

[0039] 本发明的添加剂的形态可以是任一种形态,可以是粉末、颗粒、片剂等固体、糊等半固体、或者浓缩液等液体。

[0040] 在第3方案中,本发明提供:用于促进成肌分化的试剂盒,该试剂盒包含EGT。

[0041] 通常,本发明的试剂盒中所含的EGT是装在容器中。对容器的形状、材质没有特别限定。该容器中可包含除了EGT以外的成分。本发明的试剂盒除了包含EGT的容器以外,还可包含例如包含细胞的生长所需的营养成分、或者促进成肌分化的成分等的1个或其以上的容器。本发明的试剂盒可包含上述培养基或上述培养基添加剂。通常,本发明的试剂盒附带操作说明书。

[0042] 在第4方案中,本发明提供:促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含EGT的培养基来培养细胞。在本发明的方法中,培养卫星细胞或成肌细胞。培养基组成、培养温度、培养时间等培养条件为本领域技术人员所已知。

[0043] 在第5方案中,本发明提供:用于促进成肌分化的药物组合物,该药物组合物包含EGT。本发明的药物组合物的给予(给药)对象只要是通过使肌肉再生而受益的动物即可,对动物种类没有特别限定。给予本发明的药物组合物的动物优选为人,但也可以是狗、猫、马、牛等除了人以外的动物。

[0044] 通过促进成肌分化,可促进肌肉的再生。本说明书中,肌肉的再生是指使因某些因素而减少的肌肉量恢复到原来的水平、或者使因某些因素而减少的肌力恢复到原来的水平。作为本发明的药物组合物的具体用途,可例示:抑制肌少症、促进损伤时的肌肉再生等,但并不限于这些用途。卫星细胞存在于肌纤维的细胞膜与基底膜之间。

[0045] 若肌肉受到受伤等刺激,则卫星细胞被激活,分化成成肌细胞。

[0046] 成肌细胞分化成肌细胞,形成肌管。肌管形成肌纤维或者与肌纤维融合而使骨骼肌再生。由于EGT会促进卫星细胞或成肌细胞向肌细胞的成肌分化,所以可将本发明的药物组合物用于促进肌肉的再生、尤其是骨骼肌的再生。再生的肌肉可位于任意的部位。

[0047] 作为肌肉量、尤其是骨骼肌量的测定方法,可列举:BIA法、采用CT或MRI的方法、DXA法、超声回声法、用肉眼观察的方法等,但并不限于这些。作为肌力、尤其是骨骼肌力的测定方法,可列举:测定握力、背肌力、脚伸展力、步行速度的方法,仰卧起坐、立定跳远、投球等,但并不限于这些。

[0048] 本发明的药物组合物例如可利用混合、混炼、搅拌、干燥、粉碎、压片、增溶等已知的手段和方法进行制造。本发明的药物组合物通常包含载体或赋形剂。载体或赋形剂为本领域技术人员所已知,可根据给予部位、给予途径、所含的EGT的量等进行选择。

[0049] 本发明的药物组合物的剂型可以是任意的剂型,没有特别限定。作为剂型,例如可

以是注射剂、输液剂、口服液剂、洗剂等液体,也可以是乳霜、糊剂、软膏等半固体,还可以是片剂(tablet)、粉末、颗粒、锭剂(troche)、栓剂等固体,可以是可在用时调制的冻干粉末。

[0050] 本发明的药物组合物的给予途径可以是任意的途径,例如可列举:肌肉注射、皮下注射、皮内注射、静脉注射、输液、经皮给予、从颊粘膜给予、经肛门给予、口服给予等,但没有特别限定。在再生骨骼肌的情况下,本发明的药物组合物优选进行肌肉注射。

[0051] 基于本发明的药物组合物的EGT的给予量是指可在生物体内促进成肌分化的量、或者可使肌肉再生的量。基于本发明的药物组合物的EGT的给予量根据所希望的肌肉再生的程度、给予部位或给予途径等而不同,例如在对成人进行口服给予的情况下,每天通常可以是1mg~5000mg、优选为10mg~1000mg,但并不限于这些量。关于EGT的给予量,例如医生可边观察肌肉的尺寸或量边适当确定。

[0052] 本发明的药物组合物可1天给予1次~数次。本发明的药物组合物可每天或者每1天~数天进行给予。可持续给予本发明的药物组合物直至出现所期望的肌肉再生效果为止。

[0053] 在第6方案中,本发明提供用于促进成肌分化的饮食品。本发明的饮食品给予到通过使肌肉再生而受益的动物。对动物种没有特别限定,优选为人。动物种可以是狗、猫、马等除了人以外的动物。

[0054] 本发明的饮食品除了包括普通食品以外,还包括健康食品、特定保健食品、营养功能食品、功能性标示食品等。

[0055] 本发明的饮食品可作为补充剂(supplement)提供。补充剂的形态可以是任一种形态,没有特别限定。

[0056] 本发明的饮食品的形态可以是任意的形态,没有特别限定。例如,本发明的饮食品例如可以是在现有的饮食品中添加EGT而得到的饮食品。例如还可以是片剂、粉末、颗粒、锭剂、糖果、果汁、果子露、饮料、调味料等形态。补充剂可利用依据已知的药物组合物的制造方法的方法或者依据已知的饮食品的制造方法的方法进行制造。

[0057] 如以上说明的那样,由于EGT促进卫星细胞或成肌细胞向肌细胞的成肌分化,所以可使用本发明的饮食品以促进肌肉的再生、尤其是骨骼肌的再生。作为本发明的饮食品的具体用途,可例示:抑制肌少症、促进损伤时的肌肉再生等,但并不限于这些用途。再生的肌肉可位于任意的部位。

[0058] 基于本发明的饮食品的EGT的摄取量是指可在生物体内促进成肌分化的量、或者是可使肌肉再生的量。基于本发明的饮食品的EGT的摄取量根据所希望的肌肉再生的程度、肌肉再生部位等而不同,例如在对成人进行口服给予的情况下,每天通常可以是1mg~5000mg、优选为10mg~1000mg,但并不限于这些量。

[0059] 本发明的饮食品可1天摄取1次~数次。本发明的饮食品可每天或者每1天~数天摄取。可持续给予本发明的饮食品直至出现所期望的肌肉再生效果为止。

[0060] 如上所述,本发明人首次发现了:通过并用EGT与抗坏血酸2-葡萄糖昔(以下,称作AG)和/或抗坏血酸(以下,称作VC),成肌分化得到大幅促进。因此,以上说明的本发明的培养基、培养基添加剂、试剂盒、药物组合物和饮食品除了包含EGT以外,还可包含AG和/或VC。另外,在以上说明的本发明的细胞的成肌分化促进方法中,可并用EGT与AG和/或VC。通过并用EGT与AG和/或VC,可进一步促进成肌分化和肌肉的再生。

[0061] AG是维生素C衍生物,是在抗坏血酸的2-位的羟基上以 α -配位结合有葡萄糖的物质。AG是稳定性高、而且对生物体的安全性高的物质。AG被批准作为食品添加剂或准药品的有效成分,例如用作美白用化妆品的主剂、或者食品的营养强化剂。VC还作为维生素C而已知,是自然界中广泛可见的具有抗氧化作用的物质。VC作为抗氧化剂或营养强化剂等用于食品、药品、准药品、化妆品等。因此,包含AG和/或VC的本发明的培养基、培养基添加剂、试剂盒、药物组合物和饮食品、以及使用AG和/或VC的本发明的细胞的成肌分化促进方法对细胞或生物体的安全性高。需要说明的是,用于本发明的VC可以是游离形态,也可以是盐的形态。作为VC的盐,可列举:钠盐、钾盐、钙盐等,但并不限于这些。

[0062] 而且,如上所述,本发明人首次发现了:即使是单独的AG也会促进成肌分化;即使是单独的VC也会促进成肌分化;以及即使并用AG和VC,成肌分化也会得到促进。因此,本发明提供以下内容。

[0063] (a) 用于促进成肌分化的培养基,该培养基包含AG和/或VC。

[0064] (b) 用于促进成肌分化的培养基添加剂,该培养基添加剂包含AG和/或VC。

[0065] (c) 用于促进成肌分化的试剂盒,该试剂盒包含AG和/或VC。

[0066] (d) 促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含AG和/或VC的培养基来培养细胞。

[0067] (e) 用于促进成肌分化的药物组合物,该药物组合物包含AG和/或VC。

[0068] (f) (e) 所述的药物组合物,该药物组合物用于促进肌肉的再生。

[0069] (g) 用于促进成肌分化的饮食品,该饮食品包含AG和/或VC。

[0070] (h) (g) 所述的饮食品,该饮食品用于促进肌肉的再生。

[0071] 关于本发明的培养基中的AG的添加量,本领域技术人员可根据所培养的干细胞或肌前体细胞(例如卫星细胞或成肌细胞)的种类、培养温度、培养时间等培养条件、培养基组成等适当确定。例如,可在成肌分化用的已知的低血清培养基中添加约0.05mM~约5mM、优选约0.2mM~约2mM的AG。本发明的培养基中的VC的添加量与AG的添加量一样。

[0072] 基于本发明的药物组合物的AG的给予量根据所希望的肌肉再生的程度、给予部位或给予途径而不同,例如在对成人进行口服给予的情况下,每天通常可以是约10mg~约10000mg、优选为约100mg~约1000mg。关于AG的给予量,医生例如可边观察肌肉的尺寸或量边适当确定。基于本发明的药物组合物的VC的给予量与AG的给予量一样。

[0073] 基于本发明的饮食品的AG的摄取量根据所希望的肌肉再生的程度、肌肉再生部位等而不同,例如在成人摄取的情况下,每天通常可以是约1mg~约10000mg、优选为约10mg~约1000mg。基于本发明的饮食品的VC的摄取量与AG的摄取量一样。

[0074] 本发明进一步提供下述内容。

[0075] (i) 用于促进成肌分化的培养基的制造方法,该制造方法包括:添加EGT。

[0076] (j) 用于促进成肌分化的培养基添加剂的制造方法,该制造方法包括:添加EGT。

[0077] (k) 用于促进成肌分化的试剂盒的制造方法,该制造方法包括:添加EGT。

[0078] (l) 用于促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含EGT的培养基来培养细胞。

[0079] (m) 用于在需要促进成肌分化的对象中促进成肌分化的方法,该方法包括:对该对象给予包含EGT的药物组合物。

- [0080] (n) (n) 所述的方法,该方法用于使肌肉再生。
- [0081] (o) 用于促进成肌分化的方法,该方法包括:摄取包含EGT的饮食品。
- [0082] (p) (o) 所述的方法,该方法用于使肌肉再生。
- [0083] 在上述各方法中,可并用EGT与AG和/或VC。
- [0084] 本发明进一步提供下述内容。
- [0085] (q) EGT用于制造培养基的应用,该培养基用于促进成肌分化。
- [0086] (r) EGT用于制造培养基添加剂的应用,该培养基添加剂用于促进成肌分化。
- [0087] (s) EGT用于制造试剂盒的应用,该试剂盒用于促进成肌分化。
- [0088] (t) EGT用于促进培养基中的细胞的成肌分化的应用。
- [0089] (u) EGT用于制造药物的应用,该药物用于促进对象中的成肌分化。
- [0090] (v) 上述应用,其中,该药物是用于在对象中使肌肉再生的物质。
- [0091] (w) 麦角硫因用于制造饮食品的应用,该饮食品用于促进对象中的成肌分化。
- [0092] (x) (w) 所述的应用,其中,该饮食品是用于在对象中使肌肉再生的物质。
- [0093] (y) EGT用于在对象中促进成肌分化的应用。
- [0094] (z) (y) 所述的应用,该应用是用于在对象中使肌肉再生。
- [0095] 在上述各应用中,可并用EGT与AG和/或VC。
- [0096] 本发明进一步提供下述内容。
- [0097] (aa) 用于促进成肌分化的培养基的制造方法,该制造方法包括:添加AG和/或VC。
- [0098] (bb) 用于促进成肌分化的培养基添加剂的制造方法,该制造方法包括:添加AG和/或VC。
- [0099] (cc) 用于促进成肌分化的试剂盒的制造方法,该制造方法包括:添加AG和/或VC。
- [0100] (dd) 用于促进细胞的成肌分化的方法,该方法包括:利用包含AG和/或VC的培养基来培养细胞。
- [0101] (ee) 用于在要求促进成肌分化的对象中促进成肌分化的方法,该方法包括:对该对象给予包含AG和/或VC的药物组合物。
- [0102] (ff) (ee) 所述的方法,该方法用于使肌肉再生。
- [0103] (gg) 用于促进成肌分化的方法,该方法包括:摄取包含AG和/或VC的饮食品。
- [0104] (hh) (gg) 所述的方法,该方法用于使肌肉再生。
- [0105] 本发明进一步提供下述内容。
- [0106] (ii) AG和/或VC用于制造培养基的应用,该培养基用于促进成肌分化。
- [0107] (jj) AG和/或VC用于制造培养基添加剂的应用,该培养基添加剂用于促进成肌分化。
- [0108] (kk) AG和/或VC用于制造试剂盒的应用,该试剂盒用于促进成肌分化。
- [0109] (ll) AG和/或VC用于促进培养基中的细胞的成肌分化的应用。
- [0110] (mm) AG和/或VC用于制造药物的应用,该药物用于促进对象中的成肌分化。
- [0111] (nn) 上述应用,其中,该药物是用于在对象中使肌肉再生的物质。
- [0112] (oo) AG和/或VC用于制造饮食品的应用,该饮食品用于促进对象中的成肌分化。
- [0113] (pp) (oo) 所述的应用,其中,该饮食品是用于在对象中使肌肉再生的物质。
- [0114] (qq) AG和/或VC用于在对象中促进成肌分化的应用。

[0115] (rr) (qq) 所述的应用,该应用是用于在对象中使肌肉再生。

[0116] 以下,给出实施例,以进一步详细且具体地说明本发明。实施例是用于说明的例子,并不限定本发明的范围。

[0117] 实施例1

将C2C12细胞悬浮于含有10%胎牛血清的Dulbecco's改良Eagle培养基(以下,称作生长培养基)中,调整至 65×10^4 个/ml的细胞密度。将每1.5ml的该细胞悬浮液添加至6孔板,在5%CO₂的培养箱中培养24小时。去除生长培养基后,分别添加2ml含有0.5mM EGT的含2%马血清的Dulbecco's改良Eagle培养基(以下,称作分化培养基)。每隔一天将分化培养基更换成新的培养基,并持续进行培养。对照组除了不含EGT以外,进行完全相同的操作。更换成分化培养基后,在第6天利用显微镜(尼康:Eclipse Ts2)来观察细胞的形态,并进行摄影。结果见图1。通过添加EGT,促进了由C2C12细胞向成肌细胞的分化,并形成了更多的肌管细胞。

[0118] 实施例2

将C2C12细胞悬浮在生长培养基中,调整至 65×10^4 个/ml的细胞密度。将每1.5ml的该细胞悬浮液添加至6孔板,在5%CO₂培养箱中培养24小时。去除生长培养基后,分别添加2ml含0.1mM或0.5mM EGT的分化培养基。对照组(以下,简记为NT)除了不含EGT以外,进行完全相同的操作。2天后,去除培养基,分别添加1ml TRIzol (Invitrogen) 使细胞溶解。将细胞溶解液回收到微量离心管中,按照TRIzol的操作方案(protocol)回收RNA。将所回收的RNA通过逆转录试剂盒(Takara Bio)得到了mRNA的互补链DNA。使用TB GreenTMPremix Ex TaqTMII (Takara Bio),按照其操作方案,在所得的互补链DNA中添加以下的引物DNA (MyoD [NM_010866]: 正向引物5 'AGTGAATGAGGCCTCGAGA3' (SEQ ID NO: 1)、反向引物5 'GCATCTGAGTCGCCACTGTA3' (SEQ ID NO: 2)、PPIA [NM_008907]: 正向引物5 'GTCTCCTTCGAGCTGTTGC3' (SEQ ID NO: 3)、反向引物5 'GATGCCAGGACCTGTATGCT3' (SEQ ID NO: 4)),加载至CFX96 TouchTM实时PCR分析系统(Bio-Rad),从而测定了MyoD和PPIA的基因表达量。MyoD作为诱导肌肉分化的主调节因子(master regulator)而已知。PPIA作为管家基因而已知,使用PPIA基因表达量作为内标。通过用MyoD mRNA的表达量除以PPIA mRNA的表达量进行校正,算出了MyoD mRNA表达水平。图2中,以NT的MyoD mRNA表达水平作为1,显示了添加EGT时的基因表达水平(相对值)。MyoD mRNA表达水平依赖于EGT的浓度而增加。

[0119] 实施例3

将C2C12细胞悬浮在生长培养基中,调整至 65×10^4 个/ml的细胞密度。将每1.5ml的该细胞悬浮液添加至6孔板,在5%CO₂培养箱中培养24小时。去除生长培养基后,添加2ml含有0.5mM EGT的分化培养基。对照组(NT)除了不含EGT以外,进行完全相同的操作。2天后去除培养基,分别添加1ml TRIzol (Invitrogen),按照TRIzol的操作方案回收RNA。将所回收的RNA通过逆转录试剂盒(Takara Bio)转换成互补链DNA。使用TB GreenTMPremix Ex TaqTMII (Takara Bio),按照其操作方案,在所得的互补链DNA中添加以下的引物DNA (MyH2 [NM_001039545]: 正向引物5 'GAGCAAAGATGCAGGGAAA G3' (SEQ ID NO: 5)、反向引物5 'TAAGGGTTGACGGTGACACA3' (SEQ ID NO: 6)、ACTA1 [NM_001272041]: 正向引物5 'CGACATCAGG AAGGACCTGT3' (SEQ ID NO: 7)、PPIA [NM_008907]: 正向引物5 'GTCTCCTTCGAGCTGTTGC3' (SEQ ID NO: 3)、反向引物5 'GATGCCAGGACCTGTATGCT3' (SEQ

ID NO: 4)), 加载至CFX96 TouchTM实时PCR分析系统(Bio-Rad), 从而测定了MyH2、ACTA1和PPIA的基因表达量。通过用肌球蛋白重链2 (MyH2) 和 α 肌动蛋白 (ACTA1) 的mRNA的表达量除以PPIA mRNA的表达量进行校正, 算出了MyH2和ACTA1 mRNA表达水平。图3中, 以NT的mRNA表达水平作为1, 显示了添加EGT时的基因表达水平(相对值)。通过添加EGT, MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达水平上升。

[0120] (比较例)

将C2C12细胞悬浮在生长培养基中, 调整至 65×10^4 个/ml的细胞密度。将每1.5ml的该细胞悬浮液添加至6孔板, 在5%CO₂培养箱中培养24小时。去除生长培养基后, 分别添加2ml含有0.5mM EGT或25 μ M依达拉奉(以下, 简记为Edv)、50 μ M Edv的分化培养基。Edv是强效的合成抗氧化剂。每隔一天将培养基更换成新的培养基, 并持续进行培养。对照组(NT)除了不含EGT以外, 进行完全相同的操作。4天后, 去除培养基, 分别添加1ml TRIzol (Invitrogen), 按照TRIzol的操作方案回收RNA。将所回收的RNA通过逆转录试剂盒(Takara Bio)得到了mRNA的互补链DNA。使用TB GreenTMPremix Ex TaqTMII试剂盒(Takara Bio), 按照其操作方案, 在所得的互补链DNA中添加以下的引物DNA (MyH2 [NM_001039545]: 正向引物5 'GAGCAAAGATGCAGGGAAAG3' (SEQ ID NO: 5)、反向引物5 'TAAGGGTTGACGGTGACACA3' (SEQ ID NO: 6)、PPIA [NM_008907]: 正向引物5 'GTCTCCTTCGAGCTGTTGC3' (SEQ ID NO: 3)、反向引物5 'GATGCCAGGACCTGTATGCT3' (SEQ ID NO: 4)), 加载至CFX96 TouchTM实时PCR分析系统(Bio-Rad), 从而测定了MyH2和PPIA的基因表达量。通过用MyH2 mRNA的表达量除以PPIA mRNA的表达量进行校正, 算出了MyH2 mRNA表达水平。图4中, 以NT的MyH2 mRNA表达水平作为1, 显示了添加EGT或Edv时的基因表达水平(相对值)。

[0121] 抗氧化剂Edv对C2C12的MyH2表达水平没有影响。由该结果可知:若仅仅是抗氧化效果, 则MyH2表达水平不会上升。

[0122] 实施例4

研究了在使用仅添加了EGT的分化培养基的情况下、使用添加了EGT和AG的分化培养基的情况下、和使用仅添加了AG的分化培养基的情况下C2C12细胞的MyH2和ACTA1的mRNA的表达量。作为AG, 使用林原制造的AA2G (注册商标)。将分化培养基中的EGT的浓度设为0.5mM、AG的浓度设为1.0mM。实验顺序与实施例3一样。对照组(NT)除了不含EGT和AG以外, 进行完全相同的操作。结果见图5。结果确认到:通过在培养基中添加EGT和AG, MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达大幅增加。这些结果显示:通过并用EGT和AG, 成肌分化得到大幅促进。还确认到:即使是在培养基中仅添加AG的情况下, MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达也会增加。该结果显示:即使单独使用AG, 成肌分化也得到促进。

[0123] 实施例5

研究了在使用仅添加了EGT的分化培养基的情况下、使用添加了EGT和VC的分化培养基的情况下、和使用仅添加了VC的分化培养基的情况下C2C12细胞的MyH2和ACTA1的mRNA的表达量。将分化培养基中的EGT的浓度设为0.5mM、将VC的浓度设为0.5mM。实验顺序与实施例3一样。对照组(NT)除了不含EGT和VC以外, 进行完全相同的操作。结果见图6。确认到:通过在培养基中添加EGT和VC, MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达大幅增加。这些结果显示:通过并用EGT和VC, 成肌分化得到大幅促进。还确认到:即使是在培养基中仅添加VC的情况下, MyH2 mRNA和ACTA1 mRNA的表达也会增加。该结果显示:即使单独使用VC, 成肌分化也会得

到促进。

[0124] 产业实用性

本发明可在药品、食品等领域和研究试剂等领域应用。

[0125] 序列表自由文本

SEQ ID NO:1表示用于扩增MyoD基因的正向引物的核苷酸序列。

[0126] SEQ ID NO:2表示由于扩增MyoD基因的反向引物的核苷酸序列。

[0127] SEQ ID NO:3表示用于扩增PPIA基因的正向引物的核苷酸序列。

[0128] SEQ ID NO:4表示用于扩增PPIA基因的反向引物的核苷酸序列。

[0129] SEQ ID NO:5表示用于扩增MyH2基因的正向引物的核苷酸序列。

[0130] SEQ ID NO:6表示用于扩增MyH2基因的反向引物的核苷酸序列。

[0131] SEQ ID NO:7表示用于扩增ACTA1基因的正向引物的核苷酸序列。

<110> 长濑产业株式会社
<120> 麦角硫因、抗坏血酸2-葡萄糖苷、抗坏血酸和它们的组合的成肌分化促进作用
<130> 674885
<150> JP 2018-124613
<151> 2018-06-29
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于扩增MyoD基因的正向引物的核苷酸序列
<400> 1
agtgaatgag gccttcgaga 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于扩增MyoD基因的反向引物的核苷酸序列
<400> 2
gcatctgagt cgccactgta 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于扩增PPIA基因的正向引物的核苷酸序列
<400> 3
gtctccttcg agctgtttgc 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于扩增PPIA基因的反向引物的核苷酸序列
<400> 4

gatgccagga cctgtatgct	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于扩增MyH2基因的正向引物的核苷酸序列	
<400> 5	
gagcaaagat gcagggaaag	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于扩增MyH2基因的反向引物的核苷酸序列	
<400> 6	
taagggttga cggtgacaca	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于扩增ACTA1基因的正向引物的核苷酸序列	
<400> 7	
cgacatcagg aaggacctgt	20

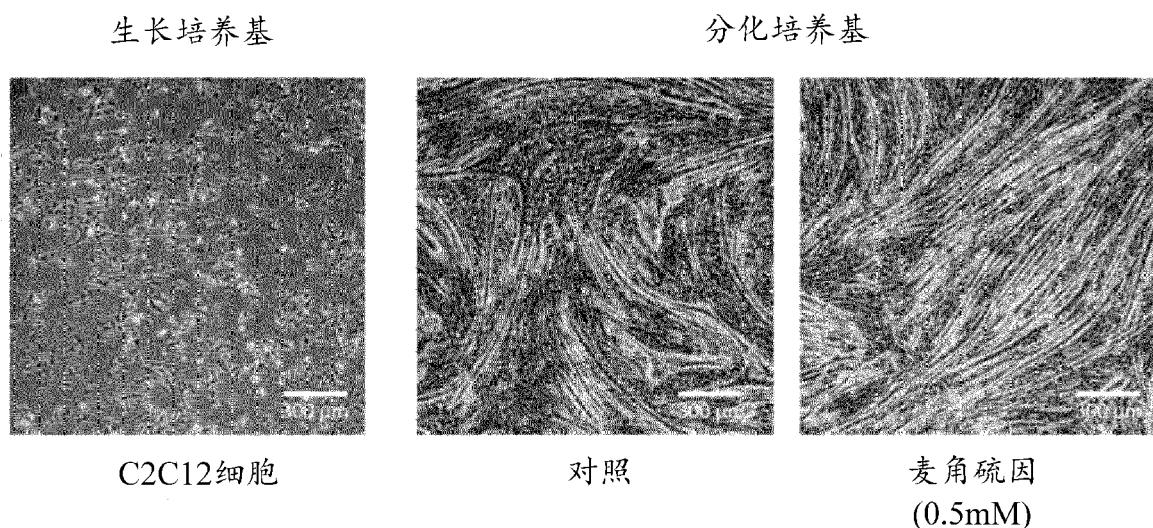


图 1

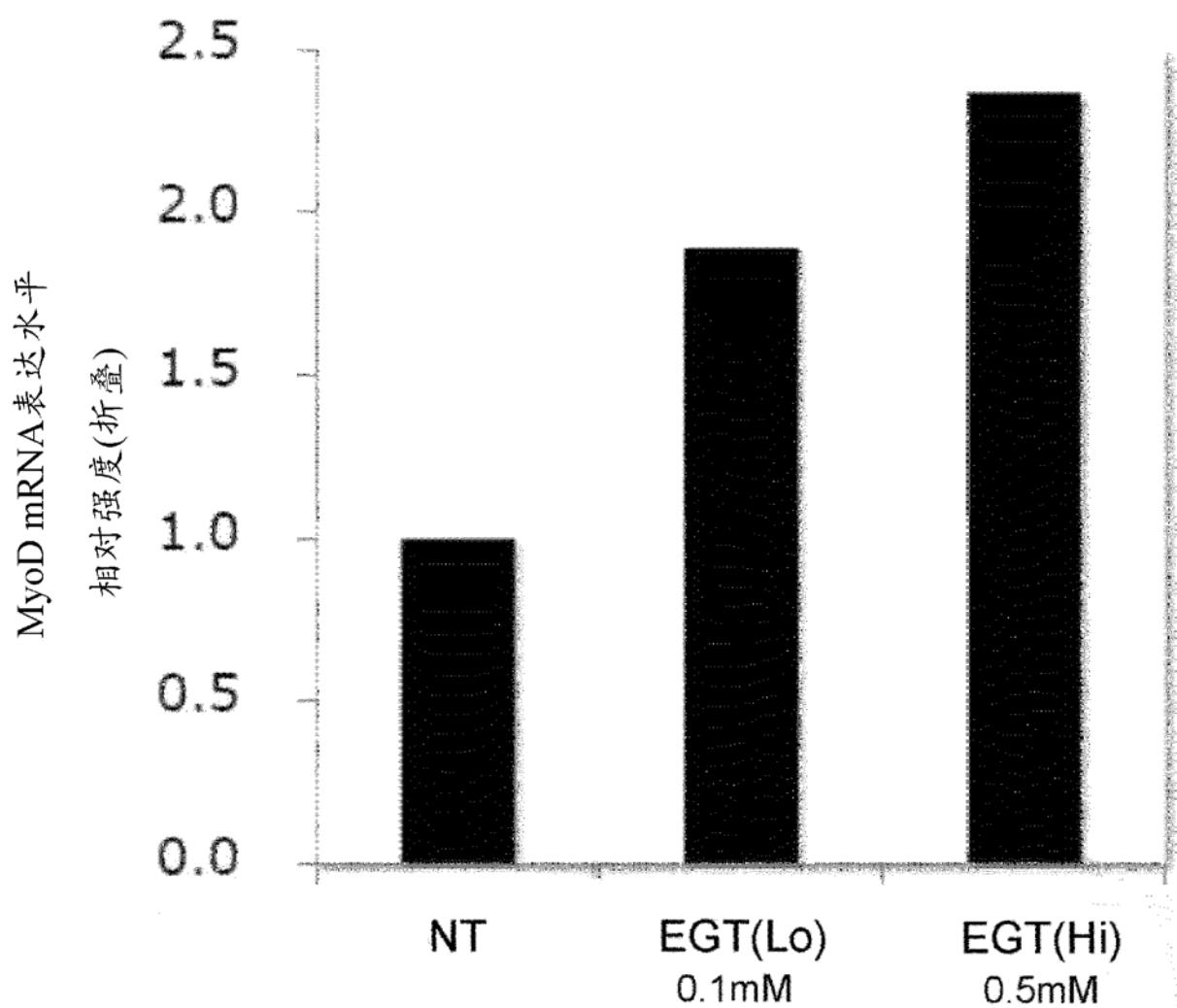


图 2

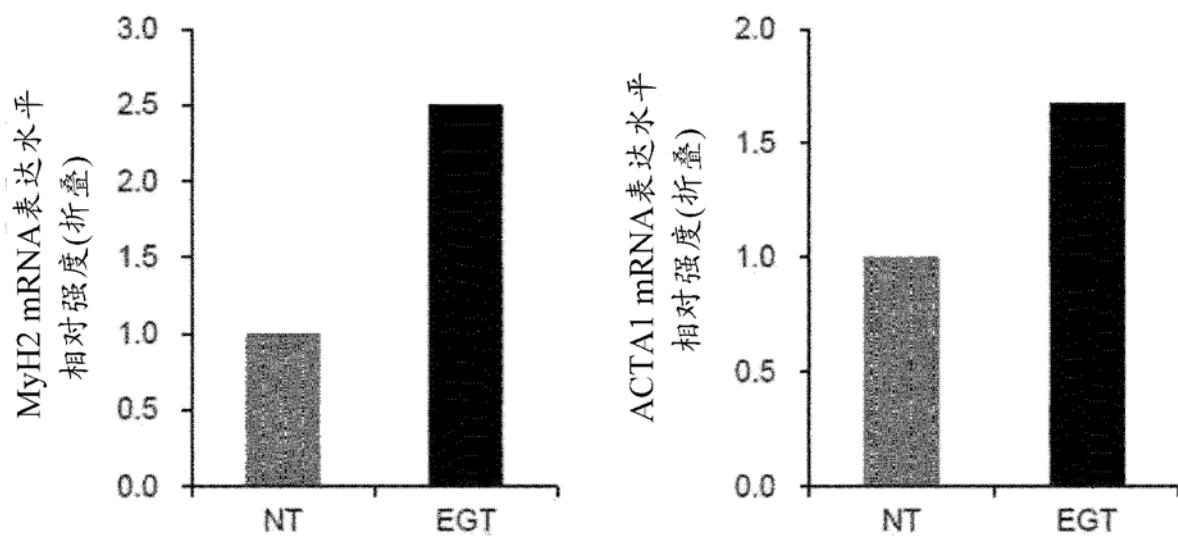


图 3

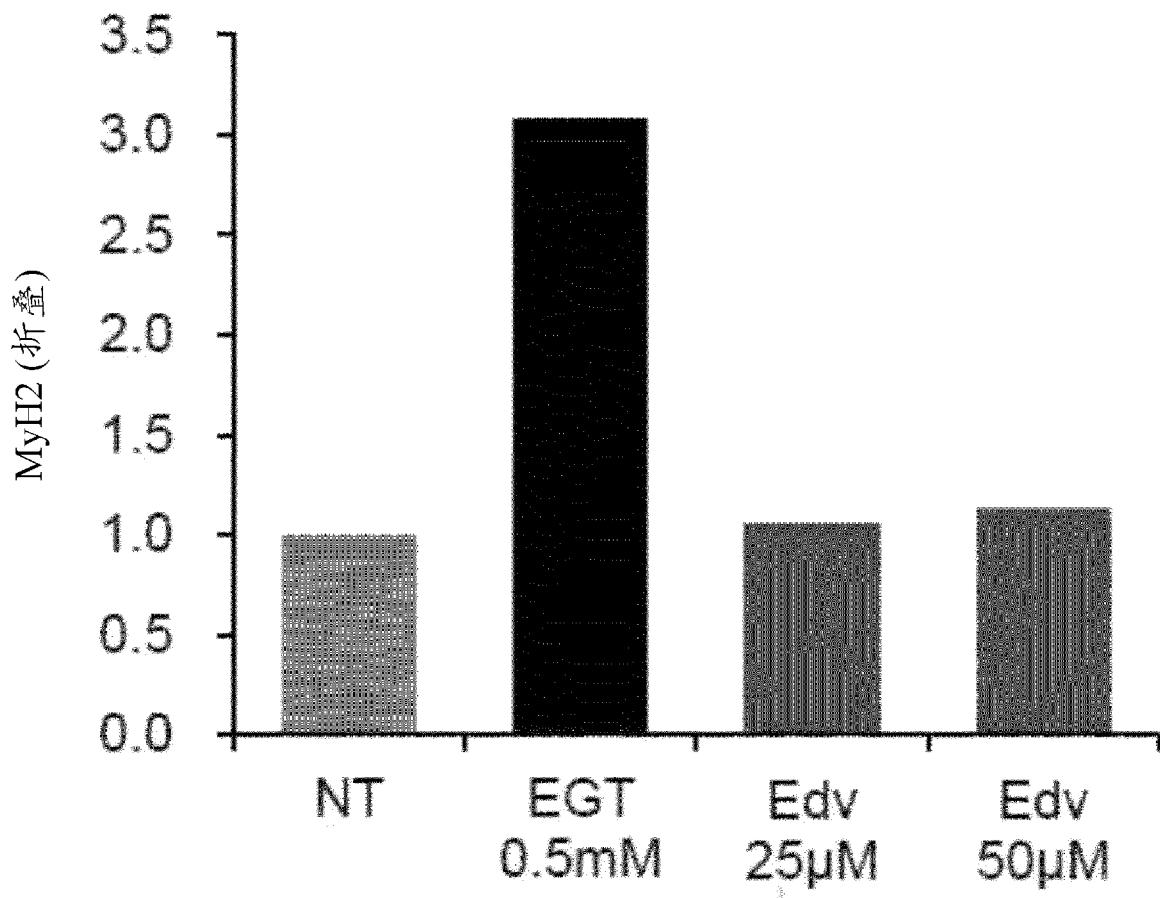


图 4

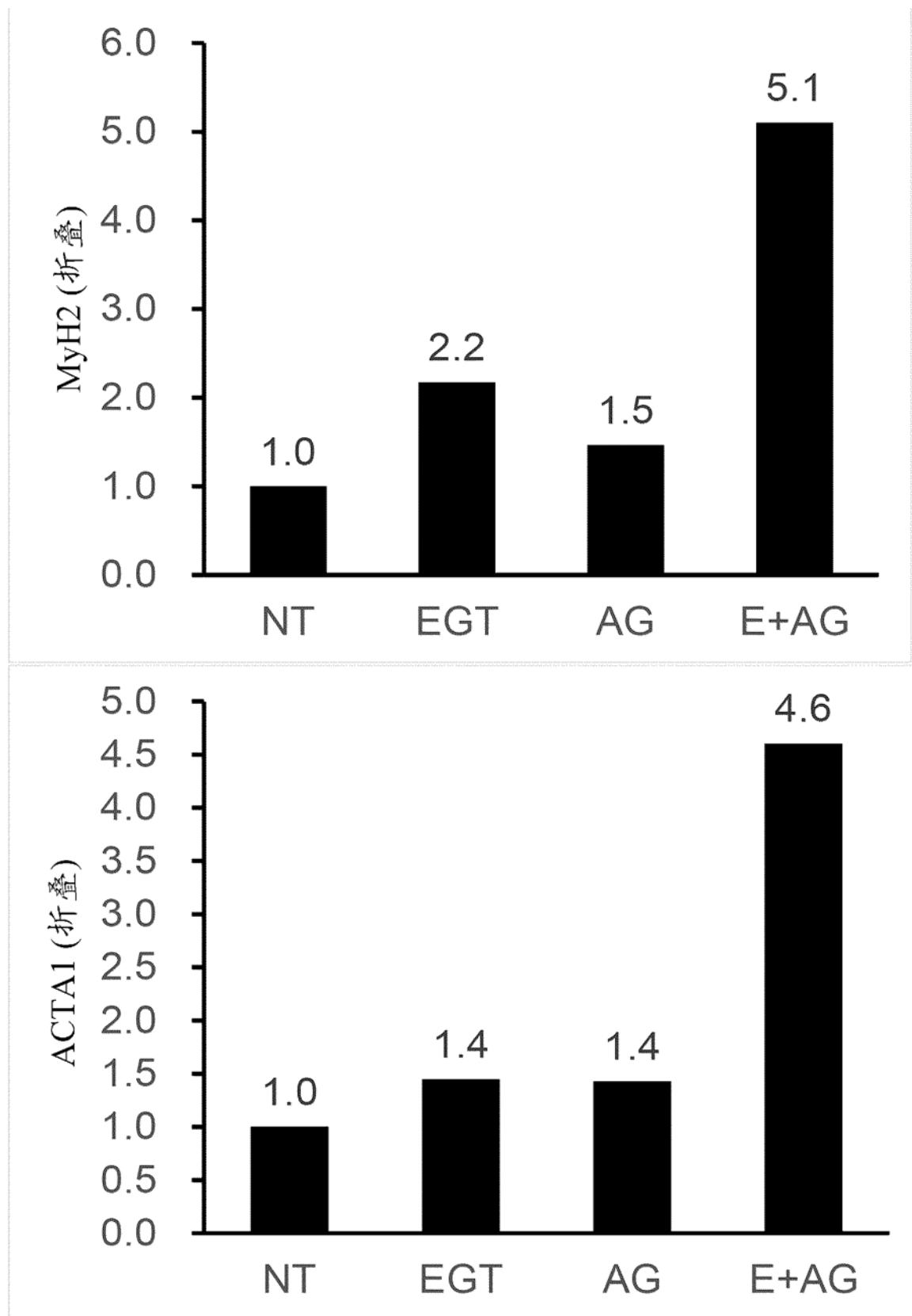


图 5

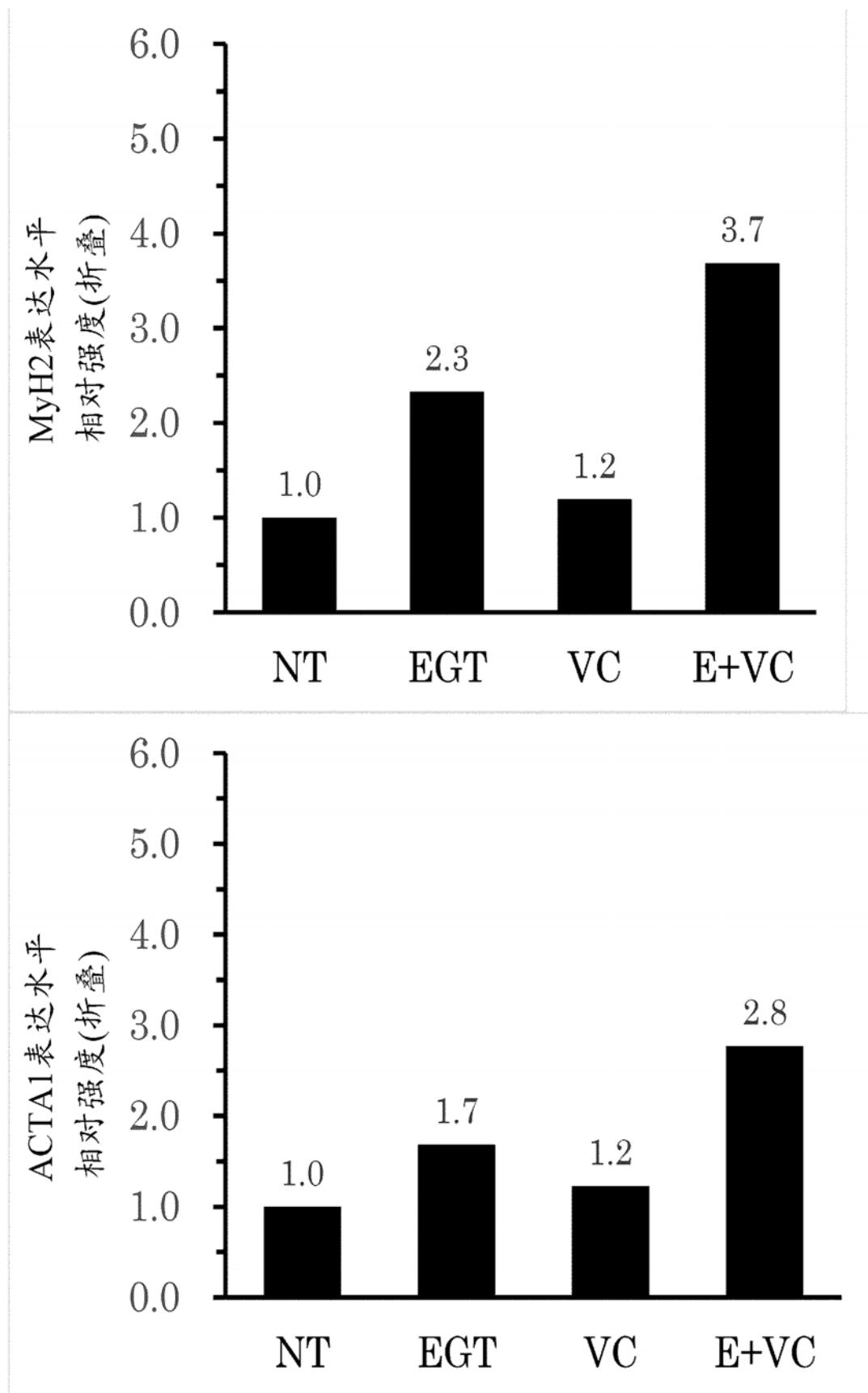


图 6