



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114469922 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(21) 申请号 202210302481.6 *A61P 9/10* (2006.01)
(22) 申请日 2022.03.24 *A61P 9/12* (2006.01)
(71) 申请人 仲恺农业工程学院 *A61P 3/06* (2006.01)
地址 510000 广东省广州市海珠区纺织路 *A61P 1/16* (2006.01)
东沙街24号
(72) 发明人 宋德龙 李婵娟 陈社娇 沈欣宜
潘祥欢 李琪
(74) 专利代理机构 深圳市精英专利事务所
44242
专利代理师 谭穗平
(51) Int. Cl.
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

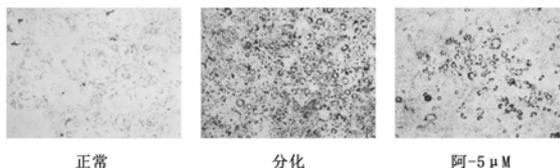
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用,涉及抗肥胖药物技术领域;本发明首次发现了阿魏酸乙酯能显著抑制3T3-L1前脂肪细胞分化过程中甘油三酯和总脂肪的积累,通过实验发现,其抑制效果优于阳性对照化合物小檗碱,且没有明显细胞毒性。此外,阿魏酸乙酯能抑制控制脂肪细胞分化和脂肪合成的转录因子PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、SCD-1和FABP4的表达量,而不影响AMPK的表达量。因此,本发明提供的含阿魏酸乙酯或其药用盐的药物具有良好的抑制脂肪细胞分化、降低脂肪细胞中油滴和甘油三酯生成的效果,揭示其在治疗或预防肥胖相关疾病方面有良好的发展前景。



正常

分化

阿-5 μ M

1. 阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物用于抑制3T3-L1前脂肪细胞的分化。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物用于抑制3T3-L1前脂肪细胞中脂肪和甘油三酯的合成与积累。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征在于,所述药物为可注射的溶液。
5. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征在于,所述药物为用于口服施用的药物。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述用于口服施用的药物还包括药学上可接受的载体和/或辅剂。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述用于口服施用的药物的剂型为片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、乳剂、糖浆剂、软膏剂或栓剂。
8. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肥胖相关疾病包括肥胖症、糖尿病、冠心病、高血压、高血脂、脂肪肝、动脉粥样硬化中的至少一种。

阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗肥胖药物技术领域,具体涉及阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 随着我国经济的迅速发展和人们生活水平的不断提高,生活方式和饮食结构大大改变,导致肥胖人数剧增。不加控制的肥胖将直接导致高脂血症、脂肪肝等严重疾病,威胁人民健康和生活质量。现在,肥胖已经是全球第五大致死因素,高脂血症也是危害我国人民健康的十大疾病之一。

[0003] 肥胖的发病机制复杂,目前仍缺乏很好的药物靶点。现有的抗肥胖药物都通过抑制神经摄食中枢发挥作用,带来种种副作用而无法被广泛应用,中国尚未批准此类抗肥胖药物上市。开发更有效、更安全的减肥药物成为了当今的研究热点和挑战。

[0004] 近十几年来的研究表明,脂肪组织不仅是个能量储存器官,还是个极其重要的分泌器官,在机体的能量和代谢调控方面发挥着重要作用。脂肪细胞功能的紊乱,与肥胖及其相关疾病的发生密切相关。脂肪细胞数目的增多或者体积的增大是肥胖的病理基础,因此抑制脂肪细胞分化是当前抗肥胖药物发展的一个重要方向。同时,脂肪细胞模拟了甘油三酯从头合成过程,能够用于评价脂肪细胞利用葡萄糖合成甘油三酯的能力。因此,3T3-L1前脂肪细胞是一种优秀的可用于抗肥胖药物筛选的模型,基于3T3-L1前脂肪细胞模型的抗肥胖药物表型筛选也可为抗肥胖药物提示新的作用靶点。

[0005] 阿魏酸乙酯是阿魏酸的亲酯衍生物,以往对阿魏酸乙酯的活性研究集中在抗氧化和保护应激损伤方面,研究显示其可诱导血红素氧合酶1(HO-1),保护大鼠神经元免受氧化应激损伤,此外对过氧化氢损害的人主动脉血管内皮细胞有保护作用、对CCl₄引起的小鼠极性肝损伤有保护作用。

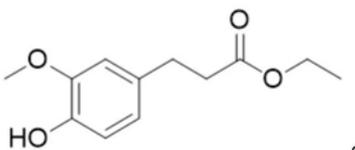
发明内容

[0006] 为克服现有的技术缺陷,本发明的目的在于提供了阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用。本发明首次发现了阿魏酸乙酯化合物能显著抑制3T3-L1前脂肪细胞分化过程中甘油三酯和总脂肪的积累,且没有明显细胞毒性,揭示其在治疗或预防肥胖相关疾病方面有良好的发展前景。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提供了以下技术方案:

[0008] 本发明提供了阿魏酸乙酯或其药用盐在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的应用。

[0009] 具体地,阿魏酸乙酯的结构式为:



[0010] 在本发明中,阿魏酸乙酯的药用盐可以为:钠盐、钾盐、铵盐、氨基酸盐、乳酸盐、盐酸盐、磷酸盐、醋酸盐、苹果酸盐、枸橼酸盐或天冬氨酸盐等,本发明不对药物盐做具体限定。

[0011] 本发明所述的药物,该药物以为阿魏酸乙酯或其药用盐主要活性成分(有效剂量),不排除配制体系和给药方式的变动、对上述阿魏酸乙酯进行简单化学修饰调整后的衍生物以及多化合物合用等情况,即不排除将阿魏酸乙酯与现有的具有治疗肥胖相关疾病的一种或多种化合物合用的情况。

[0012] 在本发明中,可将本发明提供的阿魏酸乙酯或其药用盐作为活性成分配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的载体介质;配制好的药物可以通过常规途径进行给药,包括但不限于口服、喷雾吸入、直肠用药、鼻腔用药、颊部用药、局部用药和非肠道用药,如皮下、静脉、肌内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内和颅内注射或输入,或借助外植储器用药。其中,优选的给药方式为口服、腹膜内或静脉内给药方式。

[0013] 当本发明提供的药物的剂型为用于口服施用的药物时,其含有安全有效量的本发明的上述化合物或其药用盐以及药学上可接受的载体和/或辅剂,口服施用的药物可制成片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、乳剂、糖浆剂、软膏剂、栓剂等常用剂型;本发明中,不对载体和/或辅剂做具体限定。

[0014] 本发明提供的药物还可以被制成注射剂,可以在无菌环境下与注射用水、生理盐水、葡萄糖水制成注射剂,上述注射剂均可通过常规方法进行制备。

[0015] 具体地,所述药物用于抑制3T3-L1前脂肪细胞的分化。

[0016] 更具体地,所述药物用于抑制3T3-L1前脂肪细胞中脂肪和甘油三酯的合成与积累。

[0017] 本发明提供的药物可以用作但不局限于治疗肥胖症以及肥胖并发症;所述肥胖并发症包括但不限于以下任意一种或组合:糖尿病、冠心病、高血压、高血脂、脂肪肝以及动脉粥样硬化。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0019] 本发明首次发现了阿魏酸乙酯能显著抑制3T3-L1前脂肪细胞分化过程中甘油三酯和总脂肪的积累,通过实验发现,其抑制效果优于阳性对照化合物小檗碱,且没有明显细胞毒性。此外,阿魏酸乙酯能抑制控制脂肪细胞分化和脂肪合成的转录因子PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、SCD-1和FABP4的表达量,而不影响AMPK的表达量。因此,本发明所述的含阿魏酸乙酯或其药用盐的药物具有良好的抑制脂肪细胞分化、降低脂肪细胞中油滴和甘油三酯生成的效果,揭示其在学习或预防肥胖相关疾病方面有良好的发展前景。

[0020] 本发明附加的方面和优点将在下面的描述中部分给出,这些将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0021] 图1为阿魏酸乙酯抑制3T3-L1细胞中总脂肪积累的油红O染色图;

[0022] 图2为阿魏酸乙酯抑制3T3-L1细胞中甘油三酯生成的活性数据示意图;

[0023] 图3为阿魏酸乙酯对3T3-L1的细胞毒性测试结果示意图;

[0024] 图4为阿魏酸乙酯对3T3-L1细胞中AMPK的mRNA表达量的测试结果示意图;

[0025] 图5为阿魏酸乙酯对3T3-L1细胞中PPAR γ 、sREBP-1c、FABP4、FAS、SCD-1的mRNA表达量的测试结果示意图。

具体实施方式

[0026] 为了更充分的理解本发明的技术内容,下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步介绍和说明;显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例;基于本发明中的实施例,本领域技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 对于本领域的技术人员来说,通过阅读本说明书公开的内容,本发明的特征、有益效果和优点将变得显而易见。

[0028] 除非另外指明,所有百分比、分数和比率都是按本发明组合物的总重量计算的。本文术语“重量含量”可用符号“%”表示。

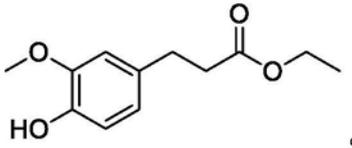
[0029] 术语“包含”为开放式表达,即包括本发明所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

[0030] 需要说明的是,图1-图5中的“阿”为“阿魏酸乙酯”。

[0031] 实施例1

[0032] 本实施例的目的在于提供阿魏酸乙酯,该阿魏酸乙酯采用现有的合成方法制得,具体方法步骤参见文献(李东明,吕彤,陈晶,张远.合成阿魏酸乙酯方法的研究[J].当代化工,2005,34(5):318-320+340)。

[0033] 制备得到的阿魏酸乙酯的结构式为:



[0034] 对采用上述方法制备而成的阿魏酸乙酯进行相关测试。

[0035] 实施例2

[0036] 阿魏酸乙酯对3T3-L1前脂肪细胞的活性测试

[0037] 具体测试方法如下:

[0038] (1) 细胞培养

[0039] 3T3-L1(小鼠胚胎成纤维细胞,前脂肪细胞)采用完全培养基(DMEM培养基中添加10%胎牛血清、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素)在37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂的培养箱中培养。

[0040] (2) 药物干预

[0041] 待测化合物(小檗碱、阿魏酸乙酯)以DMSO配成10mM母液,测试时稀释成不同浓度工作液(1 μ M和10 μ M)。为校正母液溶剂DMSO影响,空白对照添加0.1%DMSO。

[0042] 3T3-L1接种于48孔板中培养至完全接触(第0天),将培养基换成分化培养基I或加入指定浓度待测化合物的分化培养基I培养3天(第3天)。分化培养基I配方:完全培养基中添加2 μ g/mL胰岛素、100ng/mL地塞米松、0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤和10ng/mL生物素。

[0043] 分化培养基和待测化合物作用第3天,将培养基更换成分化培养基II或加入指定浓度待测化合物的分化培养基II继续培养3天(第6天)。分化培养基II配方:完全培养基中

添加2 μ g/mL胰岛素。

[0044] 第6天,收获细胞进行甘油三酯或油红O染色分析。

[0045] (3) 甘油三酯测试

[0046] 收获处理后的3T3-L1细胞,冰PBS (0.2M NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 3mMKCl, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) 洗涤两次,超声破碎细胞,使用甘油三酯试剂盒和多功能酶标仪检测546nm处吸光度,从而计算细胞破碎液中甘油三酯含量。结果以空白对照细胞甘油三酯含量百分比的形式表示。

[0047] (4) 油红O染色

[0048] 3T3-L1细胞以10% (V/V) 福尔马林溶液室温固定1小时,以新制备的油红O工作溶液60 $^{\circ}$ C染色30分钟,蒸馏水洗两次,则总脂肪被油红O染成红色,以装有CCD数码相机的倒置显微镜观察并拍照。拍摄过程中放大倍数和光强度不变。

[0049] (5) 结果处理

[0050] 根据甘油三酯试剂盒和多功能酶标仪检测546nm处吸光度,减去空白对照组的本底吸光度值,比上阴性对照组细胞吸光度值,结果以阴性对照组细胞甘油三酯含量百分比的形式表示。所有数据均表示为平均值 \pm 标准方差。

[0051] 测试结果如图1和图2所示,图1所示图片均在相同放大倍数和光强度下得出。由图1可知,阿魏酸乙酯能抑制3T3-L1前脂肪细胞中油滴的合成与积累。由图2可知,阿魏酸乙酯能显著抑制3T3-L1前脂肪细胞中甘油三酯的合成与积累,其IC₅₀=1.55 \pm 0.20 μ M。

[0052] 实施例3

[0053] 阿魏酸乙酯对3T3-L1的细胞毒性测试

[0054] 利用3T3-L1细胞模型,应用MTT法评估阿魏酸乙酯的细胞毒性。

[0055] 具体测试方法如下:

[0056] (1) 配置MTT溶液:取125mg MTT粉末用50ml无菌PBS (0.01mM, pH=7.4) 溶解,配成2.5mg/mL,在超声清洗仪振荡数10秒,过滤除菌,然后于4 $^{\circ}$ C避光保存。两周内使用有效,最好现配现用。

[0057] (2) 3T3-L1细胞培养:3T3-L1细胞使用含10%牛血清的DMEM培养基,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱进行培养。

[0058] (3) 接种细胞:将生长良好的3T3-L1细胞,小心弃去培养皿内的大部分细胞培养液,然后800rpm/min离心3min;弃去离心后的上清液,重新加入培养基,用血细胞计数板计数。用8道加样器吸取单细胞悬液加入96孔板中,100 μ l/孔,即50000个细胞/孔。

[0059] (4) 药物干预:在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱培养24h,待细胞贴壁后,分别用培养基稀释不同浓度药物处理细胞,设立不加任何处理因素的对照组、空白孔,每个浓度设3个平行复孔,将阿魏酸乙酯配置成5 μ M和10 μ M两个浓度。加入待测药物溶液至100 μ l微孔中,与细胞于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱培养48h。每孔加入2.5mg/mL的MTT 20 μ L,于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱培养4h。弃去上清,每孔加100 μ L的DMSO,振荡20min,测量492nm处吸收值(A)。

[0060] 细胞毒性评价:各组细胞抑制率(%) = 1 - { (试验组A值 - 空白组A值) / (对照组A值 - 空白组A值) } \times 100%,进而得出各组细胞抑制率。

[0061] (5) 实验结果:测试结果如图3所示,根据图3结果显示,可以看出阿魏酸乙酯对3T3-L1细胞无明显毒性。

[0062] 实施例4

[0063] 荧光定量PCR

[0064] 使用RNAiso Plus提取3T3-L1细胞的总RNA,通过Oligo dT18将1 μ g总RNA逆转录为cDNA,通过定量PCR技术,使用Toyobo公司ThunderBird SYBR qPCR Mix试剂按照说明书对引物进行PCR扩增。每组样品3个复孔,以保证实验数据的有效性。使用 β -actin为内参,检测目的基因相对于内参基因的表达变化来定量。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析数据(即实验组目的基因相对于对照组的表达量的变化倍数)。

[0065] 所用引物为:

[0066] β -actin,sense 5' -TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-3' and antisense 5' -TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3' ;

[0067] AMPK,sense 5' -AAGCCGACCCAATGACATCA-3' and antisense 5' -CTTCCTTCGTACACGCAAAT-3' ;

[0068] PPAR γ ,sense 5' -TGCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3' ,antisense 5' -GAAATCAACTGTGGTAAAGGGC-3' ;

[0069] sREBP-1c,sense 5' -CAGCTCAGAGCCGTGGTGA-

[0070] 3' and antisense 5' -TGTGTGCACTTCGTAGGGTC-3' ;

[0071] FABP4,sense 5' -GTCACCATCCGGTCAGAGAGTAC-3' ,antisense 5' -TCGTCTGCGGTGATTTTCATC-3' .

[0072] SCD-1,sense,5' -TGTTTCGTTGCCACTTTCTTG-3' ,antisense 5' -GCTAATGTTCTTGTGCATAAGGAC-3' ;

[0073] FAS,sense,5' -TATCAAGGAGGCCCATTTTGC-3' ,antisense 5' -TGTTTCCACTTCTAAACCATGCT-3' .

[0074] (4) 结果处理

[0075] 检测目的基因相对于内参基因的表达变化来定量。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析数据(即实验组目的基因相对于对照组的表达量的变化倍数)。

[0076] 测试结果如图4和图5所示,图4和图5中,横坐标表示所添加的化合物及对应的浓度;由测试结果可知:5 μ M浓度下的阿魏酸乙酯不影响AMPK的mRNA表达量,同时阿魏酸乙酯能显著下调PPAR γ 、sREBP-1c、FABP4、FAS、SCD-1的mRNA表达量,且阿魏酸乙酯下调PPAR γ 、sREBP-1c、FABP4、FAS、SCD-1的mRNA表达量的效果优于小檗碱。

[0077] 由图1-5的药效试验结果可知,阿魏酸乙酯具有良好的抑制脂肪细胞分化、降低脂肪细胞中油滴和甘油三酯的效果。同时,阿魏酸乙酯能抑制控制脂肪细胞分化和脂肪合成的转录因子PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、SCD-1和FABP4的表达量,而不影响AMPK的表达量。因此,本发明所述的含阿魏酸乙酯或其药用盐的药物具有良好的抑制脂肪细胞分化、降低脂肪细胞中油滴和甘油三酯生成的效果,揭示其在治疗或预防肥胖相关疾病方面有良好的发展前景。

[0078] 以上对本发明实施例所提供的技术方案进行了详细介绍,本文中应用了具体个例对本发明实施例的原理以及实施方式进行了阐述,以上实施例的说明只适用于帮助理解本发明实施例的原理;同时,对于本领域的一般技术人员,依据本发明实施例,在具体实施方式以及应用范围上均会有改变之处,综上所述,本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

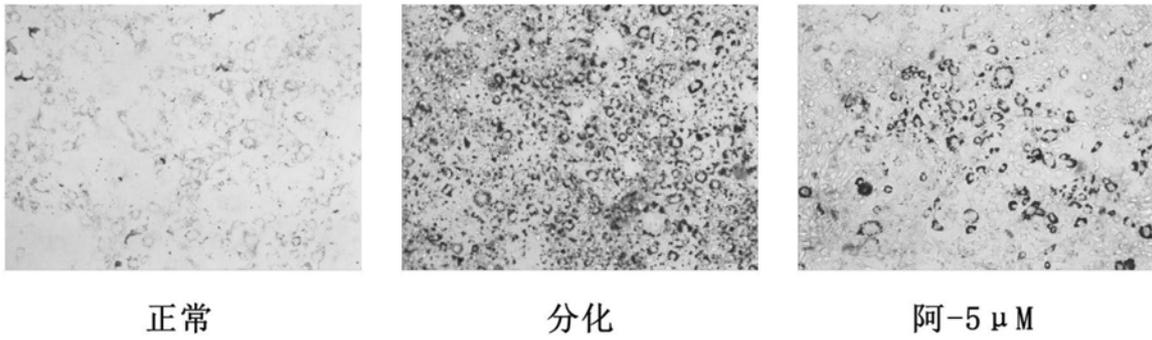


图1

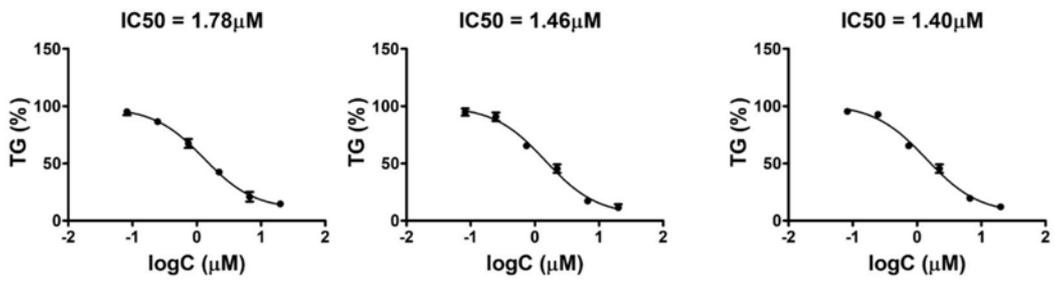


图2

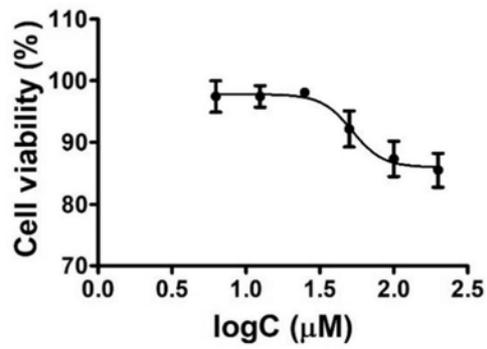


图3

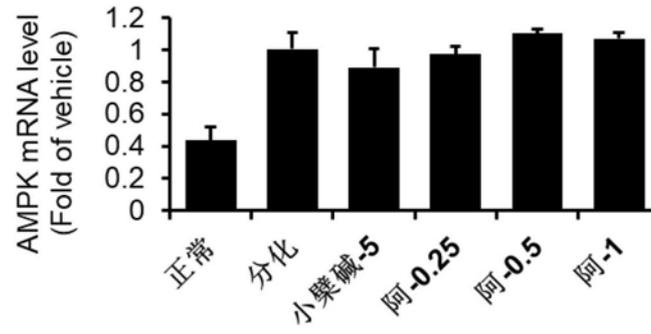


图4

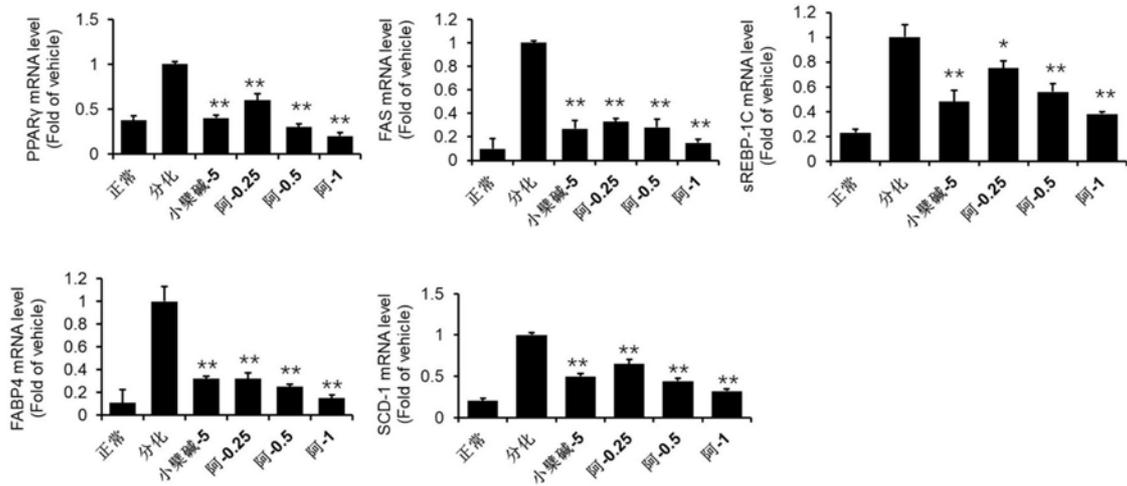


图5