



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112675156 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(21) 申请号 202110076155.3

(22) 申请日 2021.01.20

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 冯海华 张迪 韦云飞 金美玉  
严斯如 覃海燕 王齐 王建锋  
邱家章

(74) 专利代理机构 长春市恒誉专利代理事务所  
(普通合伙) 22212

代理人 李荣武

(51) Int. Cl.

A61K 31/047 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

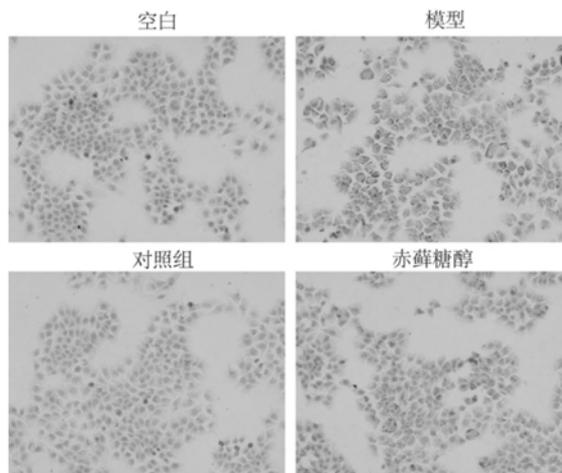
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

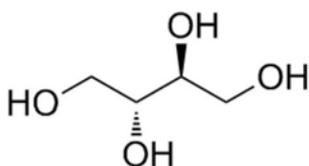
赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。本发明通过药理实验表明：赤藓糖醇对非酒精性脂肪肝小鼠模型和肝细胞脂质积聚模型有很好的治疗作用。实验结果证明赤藓糖醇可通过调节肝细胞乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 和胆固醇调节元件结合蛋白1c (SREBP-1c) 的表达,有效降低肝细胞内脂质含量;在非酒精性脂肪肝的小鼠中,赤藓糖醇显著降低肝脏中的脂质积累,并可显著抑制谷草转氨酶和谷丙转氨酶的水平。总之,赤藓糖醇可通过抑制SREBP-1和ACC的表达发挥对血脂的调节作用。



1. 赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇具有降低肝细胞内脂质水平的作用。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的非酒精性脂肪肝模型是由泰洛沙泊诱导的小鼠非酒精性脂肪肝。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇具有抑制胆固醇生成蛋白表达的功能。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇具有抑制脂肪合成蛋白表达的功能。
6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇可降低小鼠肝脏谷草/谷丙转氨酶的浓度。
7. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇的结构式如下:



8. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的赤藓糖醇的分子量为:122.120。

## 赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,具体为赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种非酒精作用引起的肝脏实质细胞变性和脂肪蓄积所导致的一系列综合征,根据病变组织是否伴有炎症反应和纤维化,又分为单纯性脂肪肝、脂肪肝炎以及与之相关的肝硬化和肝细胞癌。非酒精性脂肪肝分为原发和继发两种,原发类跟胰岛素抵抗和遗传有关,继发类与肥胖、糖尿病、高脂血症、环境等有关。

[0003] 目前现有的治疗NAFLD的药物主要包括:①胰岛素增强剂:噻唑烷二酮类的罗格列酮和吡格列酮,可通过改善肝脏脂肪变性和提高胰岛素敏感性从而缓解NAFLD的发生,但是其对缓解肝纤维化的作用不明显;②降血脂药物:贝特类、他汀类或罗布考,可通过降低血脂缓解NAFLD的发生;③针对肝病的药物,维生素E、多烯磷脂酰胆碱,可通过抗氧化、抗炎、抗纤维化,起到辅助肝病治疗的作用,从而缓解NAFLD发生。

[0004] 然而这些药的长期服用都会给肝脏带来一定的毒副作用。所以,研发出对人体危害小、作用疗效快的药物是我们首先要解决的问题。天然小分子化合物作为中药的成分已被大量研究。其对疾病的治疗效果好,毒副作用小,安全性高。目前,利用天然小分子化合物治疗NAFLD已受到大量研究者的关注。

[0005] 赤藓糖醇(Erythritol)是由小麦、玉米等淀粉进行酶解发酵后,分离、纯化并干燥而得来的。赤藓糖醇对血糖的影响小,机体耐受量高,且具有抗氧化活性。然而,赤藓糖醇对非酒精性脂肪肝的治疗作用未见研究和报道。

### 发明内容

[0006] (一)解决的技术问题

[0007] 鉴于现有技术的不足,本发明提供赤藓糖醇在防治非酒精性脂肪肝药物中的应用,并且说明了赤藓糖醇降脂保肝的作用机理。本发明中,首次提出了赤藓糖醇可以降低肝细胞的脂质水平和小鼠肝脏的脂质水平,显著降低了小鼠肝脏中谷草转氨酶和谷丙转氨酶的含量,从而发挥降脂保肝的作用。

[0008] (二)技术方案

[0009] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。

[0010] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇具有降低肝细胞内脂质水平的作用。

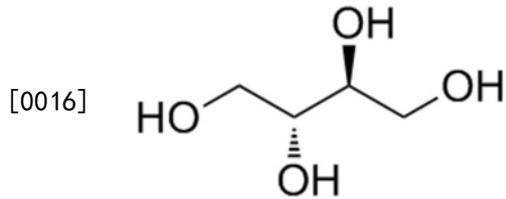
[0011] 进一步的,本发明所述的非酒精性脂肪肝模型是由泰洛沙泊诱导的小鼠非酒精性脂肪肝。

[0012] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇具有抑制胆固醇生成蛋白表达的功能。

[0013] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇具有抑制脂肪合成蛋白表达的功能。

[0014] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇可降低小鼠肝脏谷草/谷丙转氨酶的浓度。

[0015] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇的结构式如下:



[0017] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇的分子量为:122.120。

[0018] 进一步的,本发明所述的赤藓糖醇纯度99%,购自上海源叶科技源叶科技有限公司,CAS号:149-32-6,商品货号:S11140-100g。

[0019] (三)有益效果

[0020] 本次发明的赤藓糖醇在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用,具有以下有益效果:

[0021] 本次发明首次说明了赤藓糖醇的降脂保肝作用:赤藓糖醇(250mg/ml)可显著降低游离脂肪酸诱导的AML12细胞中的脂质积累;另外,赤藓糖醇可通过调节乙酰辅酶A羧化酶(ACC)和胆固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)的表达,降低HEPG2细胞的脂质含量;在非酒精性脂肪肝的小鼠中,赤藓糖醇(200mg/kg)显著降低肝脏中的脂质积累,并可显著抑制谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)的水平。总之,赤藓糖醇可通过抑制SREBP-1和ACC的表达从而发挥对脂质的调节作用。

### 附图说明

[0022] 图1是实施例1处理后,AML12细胞内脂滴的油红O染色图;

[0023] 图2是实施例2处理后,HEPG2细胞中SREBP-1c和ACC的表达图;

[0024] 图3是实施例3处理后,小鼠肝脏TG含量的测定图;

[0025] 图4是实施例4处理后,小鼠肝脏油红O染色图;

[0026] 图5是实施例5处理后,小鼠肝脏AST含量的测定图;

[0027] 图6是实施例5处理后,小鼠肝脏ALT含量的测定图;

[0028] \*表示与空白组相比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ;#表示与模型组相比,# $p < 0.05$ ,## $p < 0.01$ ;缩写词: TG:甘油三酯,ACC:乙酰辅酶A羧化酶,SREBP-1c:胆固醇调节元件结合蛋白1c,ALT:谷丙转氨酶,AST:谷草转氨酶。

### 具体实施方式

[0029] 本实施例详细操作方法如下:

[0030] 材料

[0031] 赤藓糖醇由上海源叶科技有限公司提供,商品货号:S11140-100g;SPF级雄性C57BL/6小鼠,20~22g,由辽宁长生生物技术有限公司提供;TG、AST、ALT测量试剂盒购自南京建成有限公司。

[0032] 实施例1 AML12细胞油红O染色实验

[0033] 实验方法:

[0034] (1) 培养AML12细胞并接种于六孔板中。细胞培养基配方为,4.5g/L葡萄糖的F12培养基、10%胎牛血清和1%青链霉素以及1%ITS,40ng/ml地塞米松(Sigma,D4902-100mg)。将细胞培养在5%CO<sub>2</sub>和温度为37℃的细胞培养箱内,培养12小时。

[0035] (2) 将原培养液去除,替换为只用4.5g/L葡萄糖的F12作为培养液培养细胞,饥饿AML12细胞3小时。

[0036] (3) 用250mg/ml赤藓糖醇和1000μM游离脂肪酸(油酸:棕榈酸=2:1)共孵育AML12细胞24小时;其中,分为空白组(F12培养基)、模型组(1000μM游离脂肪酸)、对照组(250mg/ml赤藓糖醇)、实验组(250mg/ml赤藓糖醇+1000μM游离脂肪酸)。

[0037] (4) 弃去细胞培养基,用PBS清洗细胞2次,然后用4%多聚甲醛(ORO Fixative固定液)固定20-30分钟。

[0038] (5) 弃去固定液,用蒸馏水清洗细胞2次,加入60%异丙醇浸洗5分钟。

[0039] (6) 弃去60%异丙醇,加入0.5%油红O染色液染色10-20分钟。

[0040] (7) 弃去染色液,蒸馏水清洗细胞3-5次,直到无多余染色。加入苏木精染色液,复染细胞核1-2分钟。

[0041] (8) 弃去染液,水洗2-5次,用光学显微镜观察脂滴,观察倍数为200倍。

[0042] (9) 实验结果见附图1。

[0043] 附图1AML12细胞油红O染色结果显示,模型组可增加AML12细胞内脂滴的生成,并且实验组赤藓糖醇可显著减少由1000μM游离脂肪酸诱导的脂滴增加。

[0044] 实验例2Western blot检测HEPG2细胞中脂质调控蛋白表达

[0045] 实验方法

[0046] (1) 培养HEPG2细胞并接种于六孔板中,每孔密度为1×10<sup>6</sup>个细胞。细胞培养基配方为,4.5g/L葡萄糖的DMEM培养基、10%胎牛血清和1%青链霉素。将细胞培养在5%CO<sub>2</sub>和温度为37℃的细胞培养箱内,培养12小时。

[0047] (2) 将原培养液去除,替换为只用4.5g/L葡萄糖的DMEM作为培养液培养细胞,饥饿HEPG2细胞3小时。

[0048] (3) 用250mg/ml赤藓糖醇和1000μM游离脂肪酸(油酸:棕榈酸=2:1)共孵育HEPG2细胞24小时;其中,分为空白组(DMEM培养基)、模型组(1000μM游离脂肪酸)、对照组(250mg/ml赤藓糖醇)、实验组(250mg/ml赤藓糖醇+1000μM游离脂肪酸)。

[0049] (4) 吸取培养基,用PBS清洗细胞,细胞刮刮脱细胞,收集至离心管,1000转/分离心5分钟。洗涤后收集细胞沉淀到洁净的EP管中。

[0050] (5) 实验于低温中操作。用裂解液、磷酸酶抑制剂以及1%PMSF混合制成蛋白裂解液,加到EP管中,震匀,提取HEPG2细胞中的总蛋白。

[0051] (6) 利用SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶)电泳对蛋白质样品进行分离,转移到固相载体—PVDF膜上。

[0052] (7) 用5%脱脂牛奶溶液将PVDF膜室温封闭1小时(或者4℃冰箱封闭4小时)。

[0053] (8) 用目标蛋白的抗体(一抗)处理PVDF膜,充分孵育并在4℃冰箱内过夜。

[0054] (9) 用抗兔或抗鼠的带有辣根过氧化物酶偶联的二抗对PVDF膜室温处理1小时。

[0055] (10) 用超敏发光液ECL检测蛋白条带,并用ImageJ凝胶分析软件计算出蛋白条带的灰度值。

[0056] (11) 实验结果见附图2。

[0057] 附图2结果显示,赤藓糖醇可以抑制HEPG2细胞中ACC和SREBP-1c的表达。以上结果说明,赤藓糖醇可以调节脂质平衡。

[0058] 实施例3小鼠肝脏中TG的测定

[0059] 实验方法:

[0060] (1) 将小鼠饲养在温度为 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为40%-80%的SPF环境中。

[0061] (2) 实验前小鼠分笼,并禁食12小时,然后用50mg/kg、100mg/kg、200mg/kg的赤藓糖醇腹腔注射小鼠1小时后用500mg/kg的泰洛沙泊腹腔注射小鼠12小时。将小鼠随机分为七组:空白组(生理盐水)、模型组(500mg/kg泰洛沙泊)、对照组(200mg/kg赤藓糖醇)、药物低剂量组(50mg/kg赤藓糖醇+500mg/kg泰洛沙泊)、药物中剂量组(100mg/kg赤藓糖醇+500mg/kg泰洛沙泊)、药物高剂量组(200mg/kg赤藓糖醇+500mg/kg泰洛沙泊)、药物阳性对照组(100mg/kg非诺贝特+500mg/kg泰洛沙泊)。

[0062] (3) 完整取出小鼠肝脏,根据实验目的切块。

[0063] (4) 准确称量肝脏重量,按重量(g):体积(ml)=1:9的比例,加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制成10%的组织匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液,再用生理盐水稀释至适宜浓度待测。

[0064] (5) 按照说明书,利用TG测试盒检测小鼠肝脏中的TG的含量,并用酶标仪测定各孔吸光度值。

[0065] (6) 实验结果见附图3。

[0066] 附图3结果显示,与空白组相比,浓度为500mg/kg的泰洛沙泊可明显的提升小鼠肝脏内的TG含量。与模型组相比,高剂量组赤藓糖醇可显著降低小鼠肝脏中TG含量( $p<0.05$ )。

[0067] 实施例4小鼠肝细胞油红O染色

[0068] (1) 取适当体积小鼠肝脏,用OCT包埋剂固定到样品托中心位置,静置待包埋剂发白后,固定到样品台固定器上。

[0069] (2) 调节刀片和样品之间距离,修片(贴片用载玻片置于室温)。

[0070] (3) 在染色前提前取出自然晾干,待载玻片上无水汽后进行油红O染色。

[0071] 实验结果见附图4,浓度为500mg/kg的泰洛沙泊可明显增加小鼠肝细胞中的脂质积累。与模型组相比,实验组赤藓糖醇可显著缓解小鼠肝脂质积聚。

[0072] 实施例5小鼠肝脏中AST、ALT含量的测定

[0073] (1) - (4) 实验步骤与实施例3相同

[0074] (5) 按照说明书,利用测试盒检测小鼠肝脏中的AST、ALT的含量,并用酶标仪测定各孔吸光度值。

[0075] 附图5、图6结果显示,与空白组相比,浓度为500mg/kg的泰洛沙泊可显著增加小鼠肝脏中ALT、AST的含量。与模型组相比,不同浓度的赤藓糖醇均可显著降低小鼠肝脏中的AST、ALT含量。

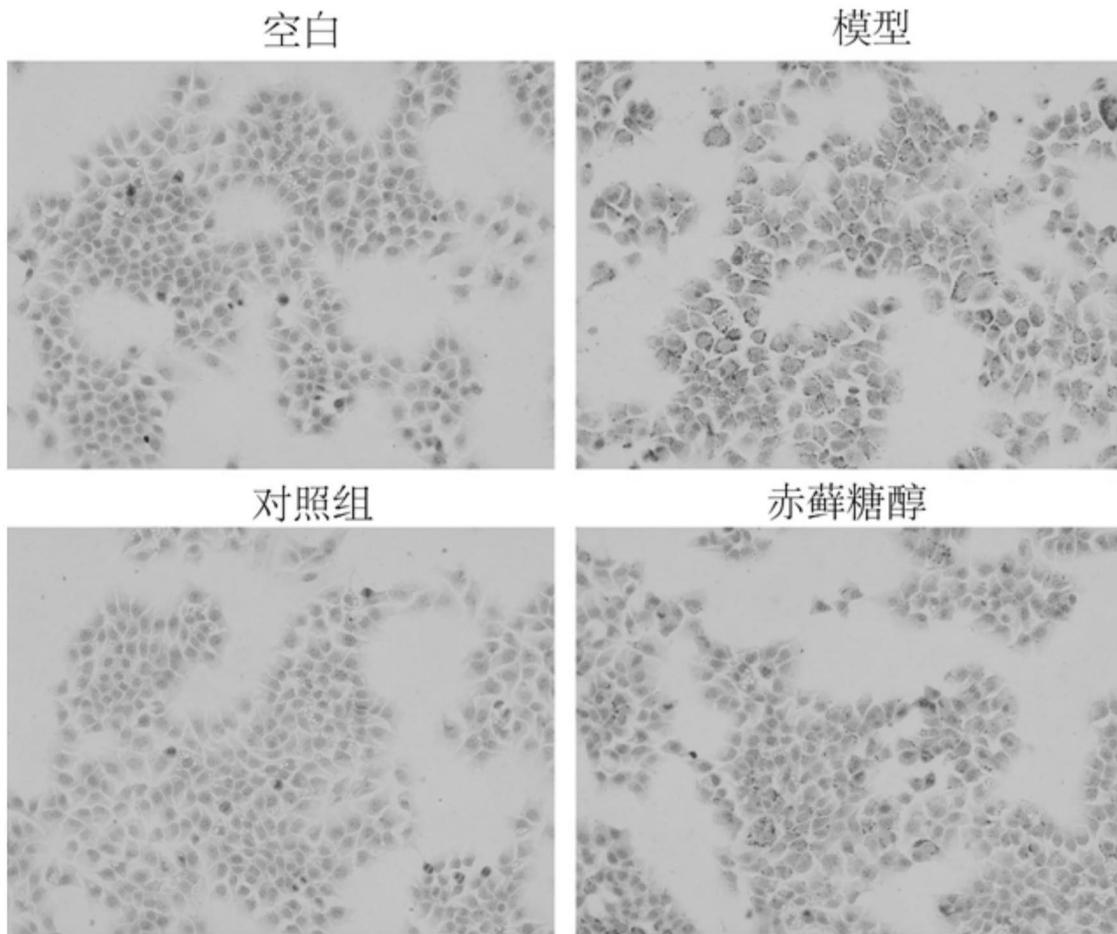
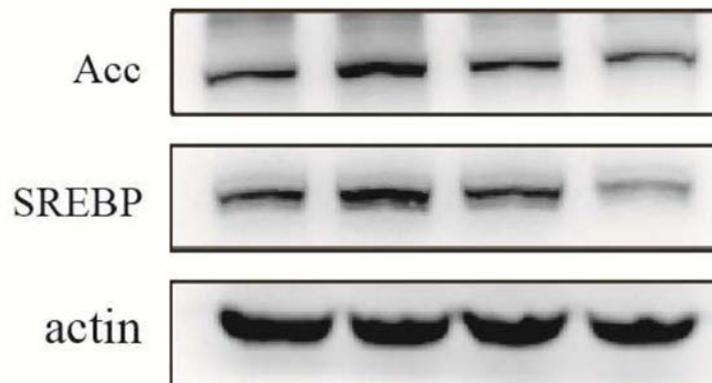


图1

赤藓糖醇 (250 $\mu$ M)	-	-	+	+
油酸+棕榈酸 ( $\mu$ M)	-	+	-	+



空白 模型 对照组 赤藓糖醇

图2

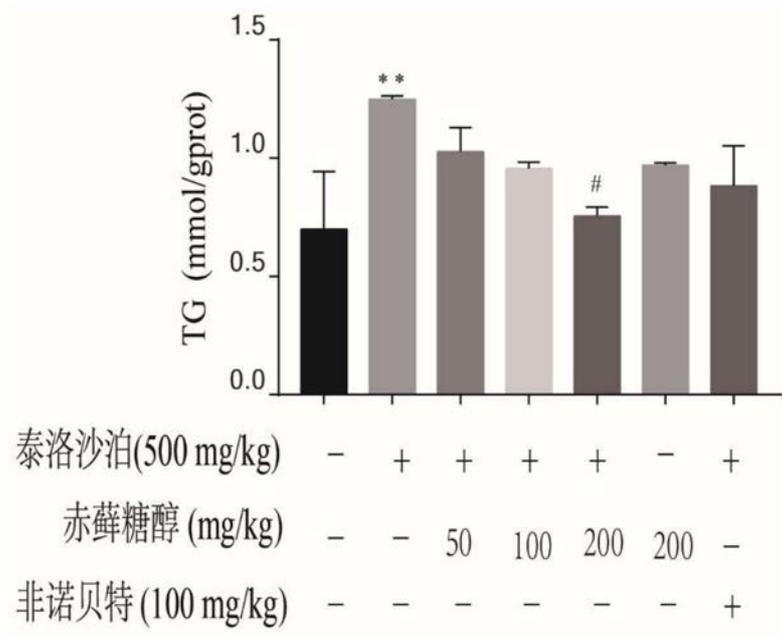


图3

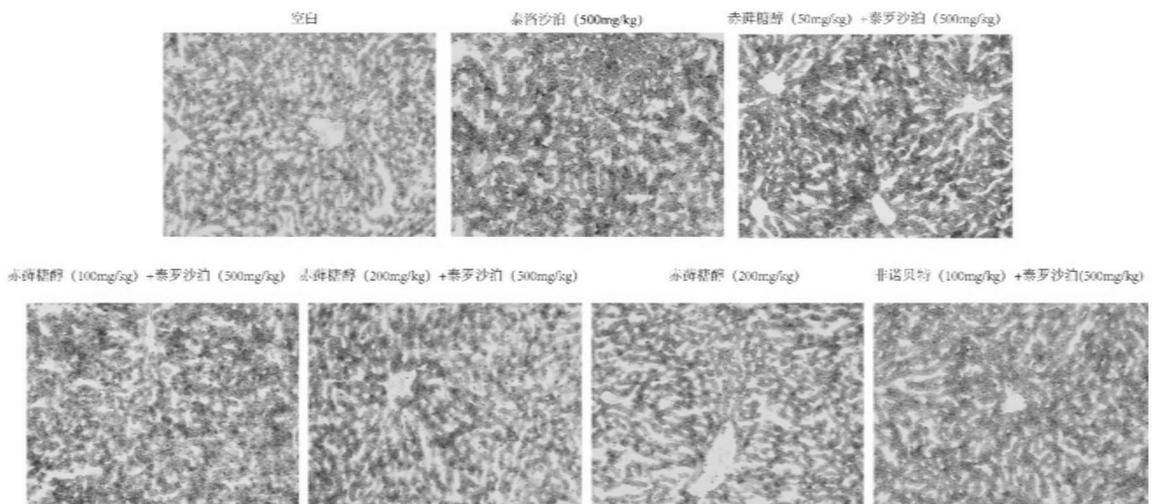


图4

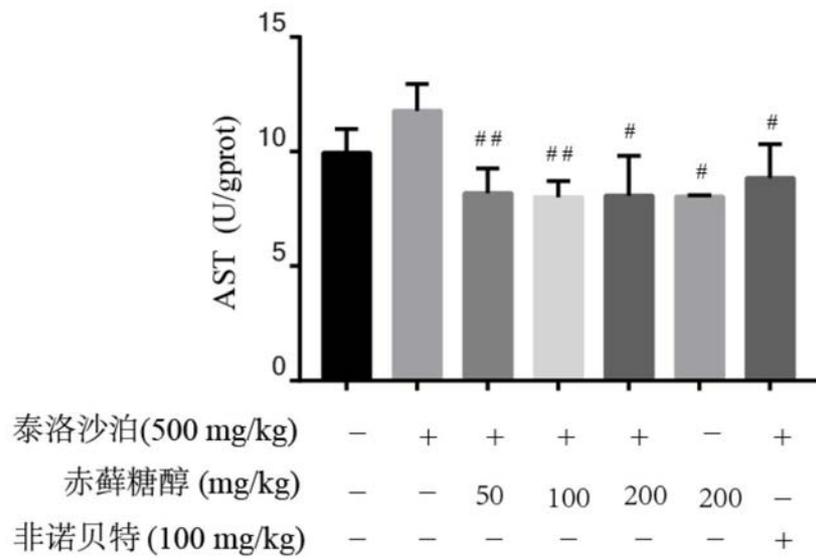


图5

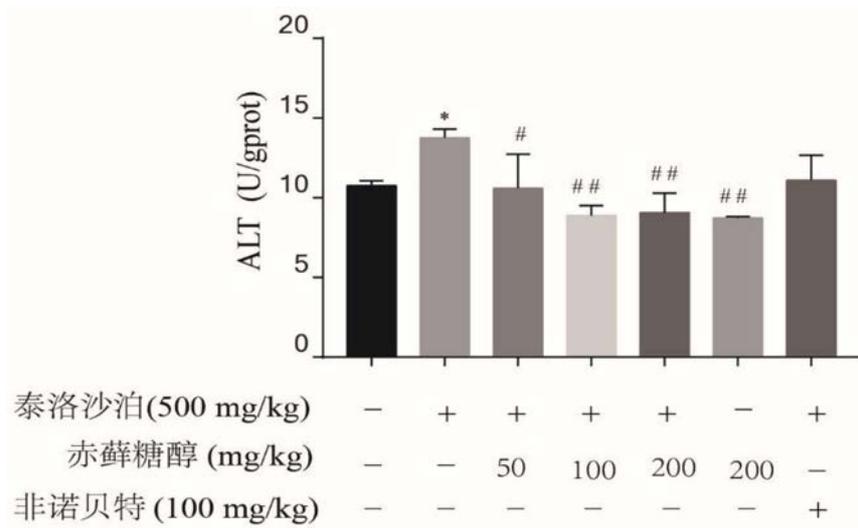


图6