



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112386601 B

(45) 授权公告日 2022.01.07

(21) 申请号 201910764988.1 *A61K 31/56* (2006.01)

(22) 申请日 2019.08.19 *A61P 3/02* (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号 *A61P 19/10* (2006.01)
 申请公布号 CN 112386601 A *A61P 19/08* (2006.01)
A61P 5/16 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.02.23 *A61P 13/12* (2006.01)

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院 *A23L 33/155* (2016.01)
 地址 518057 广东省深圳市南山区高新园
 南区粤兴一道18号香港理工大学产学
 研大楼205室
 审查员 程婷

(72) 发明人 黄文秀 董晓莉 于文轩

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所
 44237
 代理人 曹小翠

(51) Int. Cl.
A61K 31/593 (2006.01)

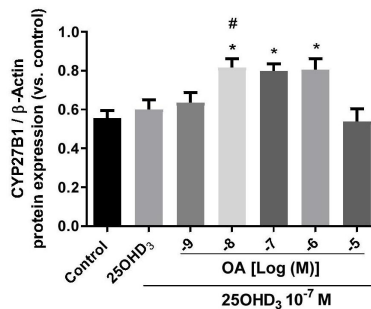
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

维生素D补充制剂及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种维生素D补充制剂及其应用。本发明所提供的维生素D补充制剂,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸。骨化二醇和齐墩果酸协同作用,可有效促进骨髓干细胞和成骨细胞表达CYP27B1,提高1,25-二羟基维生素D₃的合成,可快速补充人体尤其是特殊人群所需的维生素D₃,调节钙磷代谢,促进骨矿物质沉积,可应用于制备预防或治疗由维生素D缺乏引起的骨性疾病。



1. 一种维生素D补充制剂,其特征在于,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸;其中,所述骨化二醇为25-羟基维生素D₃;

所述骨化二醇与所述齐墩果酸的摩尔比为1 : (0.01-1)。

2. 根据权利要求1所述的维生素D补充制剂,其特征在于,所述骨化二醇与所述齐墩果酸的摩尔比为1 : 0.01、1 : 0.1或1 : 1。

3. 根据权利要求1或2所述的维生素D补充制剂,其特征在于,所述维生素D补充制剂还包括药学上可接受的辅料。

4. 根据权利要求1或2所述的维生素D补充制剂,其特征在于,所述维生素D补充制剂的剂型包括溶液剂、丸剂、片剂、胶囊剂、散剂、糊剂和气溶胶中的至少一种。

5. 权利要求1至4任一项所述的维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物中的应用;其中,所述骨性疾病包括:骨质疏松、佝偻病、软骨病、骨折和甲状旁腺功能亢进症中的至少一种。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述用于预防或治疗骨性疾病的药物经由口服给药、静脉内注射、静脉内输注、腹膜内注射、肌内注射和/或皮下注射施用至受试者。

维生素D补充制剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种维生素D补充制剂及其应用。

背景技术

[0002] 维生素D是人体必需的一种脂溶性维生素,属于类固醇衍生物,其中,与人体健康关系较为密切的是维生素D₂和D₃,为不同的维生素D原经紫外线照射后的衍生物。维生素D₂或D₃均无生物活性,其代谢途径包括:在皮肤合成或从胃肠道吸收后,经血液进入各组织,当其运送至肝脏时,可被CYP27A1基因编码的25-羟化酶催化代谢为具有一定生物活性的25-羟基维生素D₃,然后在存在于其他组织中的CYP27B1基因编码的25-羟维生素D-1 α -羟化酶(CYP27B1)的催化作用下进一步代谢成为活性更高的1,25-二羟基维生素D₃,之后,在CYP24A1基因编码的25-羟基维生素D₃-24-羟化酶(CYP24A1)的催化作用下可代谢为没有活性的1,24,25-(OH)₃-D₃。其中,在肾脏合成的1,25-二羟基维生素D₃作为内分泌激素,随即被转运到肠道、肾脏或其它靶组织中,实现其生物学功能,包括重要的钙磷代谢调节作用。在肾脏之外的组织,如骨组织中合成的1,25-二羟基维生素D₃作为旁分泌或自分泌激素,对骨髓干细胞、成骨、破骨、骨细胞进行精细调节,从而促进骨形成,抑制骨吸收,并促进骨矿物质沉积。

[0003] 维生素D缺乏容易导致多种骨性疾病,例如骨质疏松、佝偻病和软骨病等,而且,近年来的研究还发现心脏病、肺病、癌症、糖尿病、高血压、精神分裂症和多发性硬化等疾病形成都与维生素D缺乏密切相关。目前,预防或治疗维生素D缺乏疾病的主要策略是口服维生素D补充制剂,其中,以服用胆钙化醇(维生素D₃)和麦角钙化醇(维生素D₂)最为常见,胆钙化醇和麦角钙化醇本身不具备生物活性,需要在体内依次代谢为25-羟基维生素D₃和1,25-二羟基维生素D₃来发挥作用。

[0004] 然而,由于机体功能衰退或服用药物的拮抗作用,部分特殊人群的维生素D缺乏症的改善不能直接获益于胆钙化醇和麦角钙化醇的补充。对于老年骨质疏松患者,其胃肠道吸收能力弱,肝肾功能减退,使得维生素D₃无法通过代谢最终产生足够的25-羟基维生素D₃和1,25-二羟基维生素D₃。对于脂肪吸收障碍综合征患者,其不能直接吸收脂溶性维生素D。对于肾病综合征患者,其维生素D结合蛋白丢失,血1,25-二羟基维生素D₃浓度偏低。对于服用抗惊厥药物的患者,常因维生素D分解代谢增强而导致血25-羟基维生素D₃缺乏。因而,研发一种适用于特殊人群使用的维生素D补充制剂,具有重要现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的在于提供一种维生素D补充制剂,旨在提供一种适于特殊人群使用的维生素D补充制剂。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物中的应用。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供了下述具体技术方案:

[0008] 一种维生素D补充制剂,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸。

[0009] 本发明提供的维生素D补充制剂,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸,骨化二醇和齐墩果酸协同作用,可有效促进骨髓干细胞和成骨细胞表达CYP27B1,提高1,25-二羟基维生素D₃的合成,可快速补充人体尤其是特殊人群所需的维生素D₃,调节钙磷代谢,促进骨矿物质沉积,以有效预防或治疗由维生素D缺乏引起的骨性疾病。本发明通过联合使用骨化二醇和齐墩果酸,一方面,有效加速了骨化二醇代谢,并促进齐墩果酸被机体吸收利用,促进机体对骨化二醇和齐墩果酸的吸收利用,尤其利于特殊人群吸收利用,生物利用度高;另一方面,有效降低了单独使用骨化二醇和齐墩果酸的剂量,避免大剂量使用单一药物引起的组织细胞毒性。经过实验检测,将仅为骨化二醇的1%摩尔用量的齐墩果酸与骨化二醇联合使用,即可提升1,25-二羟基维生素D₃的合成量,且促进作用明显,可针对性地为特殊人群补充维生素D。

[0010] 相应的,上述维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物、功能性食品或食品添加剂中的应用。

[0011] 本发明提供的上述维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物、功能性食品或食品添加剂中的应用,上述维生素D补充制剂可有效促进1,25-二羟基维生素D₃的合成,且促细胞成骨分化作用明显,可应用于预防或治疗由维生素D缺乏引起的骨性疾病,例如老年骨质疏松。

附图说明

[0012] 图1为实施例1中齐墩果酸对成骨细胞CYP27B1表达活性的影响的研究结果;

[0013] 图2为实施例1中齐墩果酸与骨化二醇组合对促进合成1,25-二羟基维生素D₃的影响的研究结果;

[0014] 图3为实施例2中齐墩果酸对人骨髓间充质干细胞CYP27B1表达活性的影响的研究结果;

[0015] 图4为实施例2中齐墩果酸与骨化二醇组合对促进合成1,25-二羟基维生素D₃的影响的研究结果;

[0016] 图5为实施例3中骨化二醇(10⁻⁷M)与齐墩果酸(10⁻⁹-10⁻⁷M)组合对成骨细胞CYP27B1表达的影响的研究结果;

[0017] 图6为实施例4中骨化二醇(10⁻⁷M)与齐墩果酸(10⁻⁹-10⁻⁶M)组合对成骨分化的影响的研究结果。

[0018] 在附图中,横坐标为各成分的浓度大小,表示为其摩尔浓度的常用对数值(logM);*表示相对于空白组具有统计学差异p<0.05,**表示相对于空白组具有显著统计学差异p<0.01,***表示相对于空白组具有显著统计学差异p<0.001;#表示相对于骨化二醇组具有统计学差异p<0.05,##表示相对于骨化二醇组具有显著统计学差异p<0.01。

具体实施方式

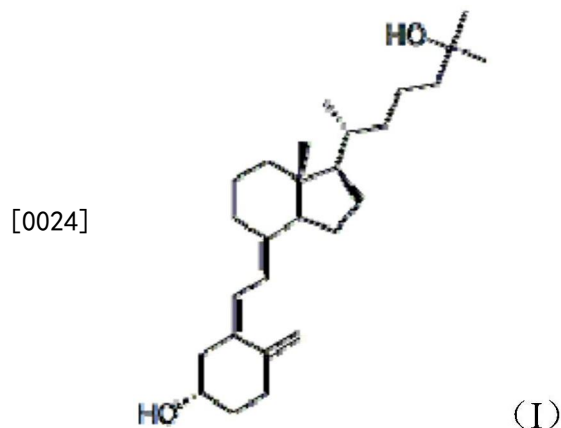
[0019] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0020] 为了提供一种适于特殊人群使用的维生素D补充制剂,本发明实施例提供了一种维生素D补充制剂,其具体技术方案如下:

[0021] 一种维生素D补充制剂,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸。

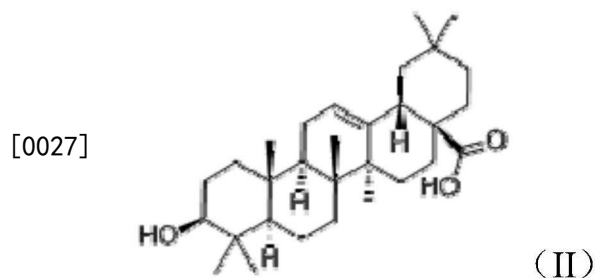
[0022] 本发明实施例提供的维生素D补充制剂,其活性成分包括:骨化二醇和齐墩果酸,骨化二醇和齐墩果酸协同作用,可有效促进骨髓干细胞和成骨细胞表达CYP27B1,提高1,25-二羟基维生素D₃的合成,可快速补充人体尤其是特殊人群所需的维生素D₃,调节钙磷代谢,促进骨矿物质沉积,以有效预防或治疗由维生素D缺乏引起的骨性疾病。本发明通过联合使用骨化二醇和齐墩果酸,一方面,有效加速了骨化二醇代谢,并促进齐墩果酸被机体吸收利用,同时提高了骨化二醇和齐墩果酸的生物利用度,利于人体尤其是特殊人群吸收利用;另一方面,有效降低了单独使用骨化二醇和齐墩果酸的剂量,避免大剂量使用单一药物引起的组织细胞毒性。经过实验检测,将仅为骨化二醇的摩尔用量的1‰的齐墩果酸与骨化二醇联合使用,即可提升1,25-二羟基维生素D₃的合成量,且促进作用明显,可针对性地为特殊人群补充维生素D。

[0023] 具体的,所述骨化二醇为25-羟基维生素D₃,具有如下化学结构I。其中,所述骨化二醇可选为市售化合物单体,也可选为采用本领域技术人员知晓的常规技术手段进行制备获得,或为含有该活性成分的天然提取物,本发明实施例不作具体限定。



[0025] 在本发明实施例中,所述骨化二醇作为本发明实施例的维生素D补充制剂主要的活性成分,为维生素D₃在肝脏的代谢产物,自身即具有一定的活性,与胆钙化醇和麦角钙化醇相比,无需经过肝脏代谢,减轻肝肾负担,胃肠道吸收好,利于特殊人群吸收利用,可稳步提升血中1,25-二羟基维生素D₃浓度,波动小,安全性高。

[0026] 具体的,所述齐墩果酸具有如下化学结构II。其中,所述齐墩果酸可选为市售化合物单体,也可选为采用本领域技术人员知晓的常规技术手段进行制备获得,或为含有该活性成分的天然提取物,本发明实施例不作具体限定。



[0028] 齐墩果酸为广泛存在于自然界多种植物中的五环三萜类化合物, 药理作用范围广, 且其骨保护作用也已经被相关体内外实验证实。然而, 齐墩果酸在机体内的生物利用度较低, 不易于被胃肠道吸收, 且容易被分解代谢, 生物利用度低, 有效剂量较大, 这限制了其在骨保护方面的医药用途。本发明实施例将上述骨化二醇与上述齐墩果酸联合使用, 可促进所述齐墩果酸被胃肠道吸收利用, 提高齐墩果酸的血液浓度, 有效提升了齐墩果酸的生物利用度, 促进所述齐墩果酸在骨保护作用方面的医药用途。

[0029] 在本发明实施例中, 所述齐墩果酸既作为本发明实施例的维生素D补充制剂活性成分之一, 还作为上述骨化二醇的增效剂。所述齐墩果酸当所述齐墩果酸与上述骨化二醇联合使用时, 即便在低浓度例如 10^{-9} - 10^{-8} M所述齐墩果酸也能够显著提高成骨细胞内CYP27B1的表达水平, 并加速骨化二醇的代谢利用, 有效提高骨化二醇的生物利用度。在一些测试例中, 浓度为 10^{-9} - 10^{-6} M的齐墩果酸与浓度为 10^{-7} - 10^{-6} M的骨化二醇联合使用时, 其在促进CYP27B1的表达以及合成1,25-二羟基维生素D₃的作用相对于单独使用相同浓度的骨化二醇具有统计学差异 ($p < 0.01$), 反映了齐墩果酸对骨化二醇显著的增益作用。

[0030] 在本发明实施例中, 所述骨化二醇与上述齐墩果酸的摩尔比优选为1:(0.001-1), 更优选为1:(0.001-0.1)、1:(0.01-1)或1:(0.01-0.1), 在该摩尔比例范围内的骨化二醇与齐墩果酸的组合, 能够有效促进骨髓干细胞和成骨细胞表达CYP27B1, 提高1,25-二羟基维生素D₃的合成, 可快速补充人体尤其是特殊人群所需的维生素D₃。在一些测试例中, 浓度为 10^{-9} - 10^{-6} M的齐墩果酸和浓度为 10^{-6} M的骨化二醇联合用药组, 其在促进合成1,25-二羟基维生素D₃的作用相对于同等摩尔浓度的骨化二醇单独用药组具有极其显著的统计学差异 ($p < 0.001$) 或显著的统计学差异 ($p < 0.01$)。

[0031] 作为一种优选的实施方式, 所述骨化二醇与上述齐墩果酸的摩尔比为1:0.001。在一些测试例中, 浓度为 10^{-9} M的齐墩果酸与浓度为 10^{-6} M的骨化二醇联合使用时, 其在促进合成1,25-二羟基维生素D₃的作用相对于单独使用相同浓度的骨化二醇具有极其显著的统计学差异 ($p < 0.001$)。

[0032] 作为另一种优选的实施方式, 所述骨化二醇与上述齐墩果酸的摩尔比为1:0.1。在一些测试例中, 浓度为 10^{-8} M的齐墩果酸和浓度为 10^{-7} M的骨化二醇联合用药组, 在促进CYP27B1表达和碱性磷酸酶表达的效果, 相对于同等浓度的骨化二醇单独用药组具有统计学差异 ($p < 0.05$), 说明低浓度的齐墩果酸(10^{-8} M)与浓度为 10^{-7} M的骨化二醇联合用药时可显著加速25OH₂D₃的代谢, 促进细胞成骨分化。

[0033] 作为又一种优选的实施方式, 所述骨化二醇与上述齐墩果酸的摩尔比为1:0.01。在一些测试例中, 浓度为 10^{-8} M的齐墩果酸与浓度为 10^{-6} M的骨化二醇联合使用时, 其在促进合成1,25-二羟基维生素D₃的作用相对于单独使用相同浓度的骨化二醇具有极其显著的统计学差异 ($p < 0.001$)。

[0034] 作为再一种优选的实施方式, 所述骨化二醇与上述齐墩果酸的摩尔比为1:1。在一些测试例中, 浓度为 10^{-7} M的齐墩果酸和浓度为 10^{-7} M的骨化二醇联合用药组, 其在促进碱性磷酸酶表达的作用相对于同等浓度的骨化二醇单独用药组具有统计学差异 ($p < 0.05$)。

[0035] 在本发明实施例中, 所述维生素D补充制剂还包括药学上可接受的辅料、佐剂和前药中的至少一种, 活性成分骨化二醇和齐墩果酸以有效剂量与上述药学上可接受的辅料、佐剂和前药中的至少一种进行均匀混合。有效剂量是指治疗有效量, 是指足以对个体显示

益处或临床意义的本发明实施例的骨化二醇和齐墩果酸的使用剂量。本领域技术人员将会理解,给药的量或剂量以及给药时程将取决于被治疗的疾病的性质和严重性、被治疗的受试者的年龄和一般状况以及给药方式等。所述药学上可接受的辅料是指本领域技术人员已知的适合于特定的给药模式的任何辅料,例如在具体实施例中,该药学上可接受的辅料可以包括与本发明实施例活性成分配伍的一种或多种药学上可接受的载体、溶剂、赋形剂、缓冲剂、润滑剂。其中,辅料应当是无毒的、不干扰或不损害本发明实施例活性成分的效力,且该辅料所选用可以根据上述实施例所述维生素D补充制剂的具体剂型而灵活选用。所述载体包括但不限于糖类诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖,淀粉诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物诸如梭甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素等。所述赋形剂包括但不限于可可脂,栓剂蜡,油类诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油,二醇类如丙二醇,酯类如油酸乙酯和十二酸乙酯,以及琼脂等。所述缓冲剂包括但不限于氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无致热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇和磷酸盐缓冲溶液等中的至少一种。所述润滑剂包括但不限于十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁等。进一步的,根据本领域技术人员的判断,着色剂、释放剂、包衣剂、增甜剂、调味剂、芳香剂、防腐剂 and 抗氧化剂也可以作为所述辅料。

[0036] 作为优选,所述维生素D补充制剂的剂型包括溶液剂、丸剂、片剂、胶囊剂、散剂、糊剂、气溶胶和贴剂中的至少一种。

[0037] 作为一种实施方式,所述维生素D补充制剂为用于预防或治疗维生素D缺乏疾病的药物、功能性食品或食品添加剂。在一些实施例中,所述维生素D缺乏疾病包括骨性疾病,包括但不限于骨质疏松、佝偻病、软骨病、骨折、甲状旁腺功能亢进症和慢性肾脏病等。

[0038] 作为另一种的实施方式,所述维生素D补充制剂经由口服给药、静脉内注射、静脉内输注、腹膜内注射、肌内注射和/或皮下注射施用至受试者。

[0039] 相应的,上述维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物、功能性食品或食品添加剂中的应用。

[0040] 本发明实施例提供的上述维生素D补充制剂在制备用于预防或治疗骨性疾病的药物、功能性食品或食品添加剂中的应用,上述维生素D补充制剂可有效促进1,25-二羟基维生素D₃的合成,且促细胞成骨分化作用明显,可应用于预防或治疗由维生素D缺乏引起的骨性疾病,例如老年骨质疏松。

[0041] 在本发明实施例中,所述骨性疾病可以理解为由缺乏维生素D导致的骨性疾病。作为一种优选的实施方式,所述骨性疾病包括:骨质疏松、佝偻病、软骨病、骨折、甲状旁腺功能亢进症和慢性肾脏病中的至少一种。在一些实施例中,将上述维生素D补充制剂应用在制备用于预防或治疗老年骨质疏松症的药物。

[0042] 作为优选,所述用于预防或治疗骨性疾病的药物、功能性食品或食品添加剂经由口服给药、静脉内注射、静脉内输注、腹膜内注射、肌内注射和/或皮下注射施用至受试者。

[0043] 为使本发明上述实施细节和操作能清楚地被本领域技术人员理解,以及本发明实施例维生素D补充制剂及其应用的进步性能显著地体现,以下通过实施例对本发明的实施进行举例说明。

[0044] 以下实施例中各成分的浓度均为摩尔浓度(mol/L, M),其中,骨化二醇标记为25OHD₃,齐墩果酸标记为OA,1,25-二羟基维生素D₃标记为1,25(OH)₂D₃,由CYP27B1基因编码

的25-羟维生素D-1 α -羟化酶标记为CYP27B1。

[0045] 实施例1

[0046] 本实施例研究了齐墩果酸(oleanolic acid,OA)对成骨细胞内CYP27B1表达活性的影响,CYP27B1催化25OH₃D₃代谢为1,25(OH)₂D₃。

[0047] 1、选择MG-63人成骨样细胞系,随机分为多个测试组:空白组、浓度为10⁻⁷M的甲状旁腺素(PTH)组、浓度为10⁻⁶M的25OH₃D₃组以及浓度分别为10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵M的齐墩果酸组,空白组不加入任何底物;将各测试组孵育MG-63细胞24小时后,检测各组成骨细胞的CYP27B1酶表达水平,以 β -Actin作为内参蛋白。

[0048] 如图1结果显示,齐墩果酸在较高浓度(10⁻⁶-10⁻⁵M)和较低浓度(10⁻⁹-10⁻⁸M)时均可显著提高MG-63细胞中CYP27B1酶的表达水平,较低浓度(10⁻⁹、10⁻⁸M)的齐墩果酸相对于空白组具有显著统计学差异(p<0.01)或统计学差异(p<0.05),说明齐墩果酸能够在低浓度水平(10⁻⁹-10⁻⁸M)下即可促进成骨细胞CYP27B1的表达。

[0049] 2、选择MG-63人成骨样细胞系,随机分为多个测试组:空白组、骨化二醇(25OH₃D₃)单独用药组、PTH和骨化二醇联合用药组以及OA和骨化二醇联合用药组;其中,测试组中,骨化二醇的终浓度为10⁻⁶M,PTH的终浓度为10⁻⁷M,OA的终浓度为10⁻⁹M,空白组不加入任何底物;然后,将各测试组孵育MG-63细胞4小时,测定细胞培养液中1,25(OH)₂D₃浓度。

[0050] 如图2结果所示,空白组没有合成1,25(OH)₂D₃,说明25OH₃D₃可作为CYP27B1催化生成1,25(OH)₂D₃的底物,而且,OA(10⁻⁹M)和25OH₃D₃(10⁻⁶M)联合用药组在促进合成1,25(OH)₂D₃的作用,相对于25OH₃D₃(10⁻⁶M)单独用药组具有极其显著的统计学差异(p<0.001),说明低浓度的齐墩果酸(10⁻⁹M)即可显著加速25OH₃D₃的代谢,显示其对成骨细胞中CYP27B1表达活性的刺激作用,具有促进成骨分化过程的潜力。

[0051] 实施例2

[0052] 本实施例研究了齐墩果酸(oleanolic acid,OA)对人骨髓间充质干细胞内CYP27B1表达活性的影响。

[0053] 1、选择人骨髓间充质干细胞,随机分为多个测试组:空白组、浓度为10⁻⁷M的甲状旁腺素(PTH)组以及浓度分别为10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶的齐墩果酸组,空白组不加入任何底物;将各测试组孵育人骨髓间充质干细胞24小时后,检测各组CYP27B1的表达水平,以 β -Actin作为内参蛋白。

[0054] 如图3结果显示,不同浓度的齐墩果酸可不同程度的提高人骨髓间充质干细胞中CYP27B1的表达水平,浓度为10⁻⁹M的齐墩果酸相对于空白组具有统计学差异(p<0.05),浓度为10⁻⁸M的齐墩果酸相对于空白组具有显著统计学差异(p<0.01),说明齐墩果酸能够在低浓度水平(10⁻⁹-10⁻⁸M)下可显著提高人骨髓间充质干细胞内CYP27B1的表达。

[0055] 2、选择人骨髓间充质干细胞,随机分为多个测试组:空白组、骨化二醇(25OH₃D₃)单独用药组以及OA和骨化二醇联合用药组;其中,测试组中,骨化二醇的终浓度为10⁻⁶M,OA的终浓度为10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶M,空白组不加入任何底物;然后,将各测试组孵育人骨髓间充质干细胞4小时,测定细胞培养液中1,25(OH)₂D₃浓度。

[0056] 如图4结果所示,OA(10⁻⁹-10⁻⁷M)和25OH₃D₃(10⁻⁶M)联合用药组相对于25OH₃D₃(10⁻⁶M)单独用药组具有极其显著的统计学差异(p<0.001),说明不同浓度的齐墩果酸(10⁻⁹-10⁻⁷M)可显著加速25OH₃D₃的代谢,显示其对人骨髓间充质干细胞中CYP27B1的诱导表达作用,具有

促进成骨分化过程的潜力。

[0057] 实施例3

[0058] 本实施例研究了浓度为 10^{-7} M的骨化二醇与浓度为 10^{-9} - 10^{-7} M的齐墩果酸联合用药对成骨细胞内CYP27B1表达活性的影响。

[0059] 1、选择MG-63人成骨样细胞系,随机分为多个测试组:空白组、骨化二醇(250HD_3)单独用药组以及OA和骨化二醇联合用药组;其中,测试组中,骨化二醇的终浓度为 10^{-7} M,OA的终浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M,空白组不加入任何底物;然后,将各测试组孵育MG-63细胞24小时,检测各组成骨细胞的CYP27B1表达水平,以 β -Actin作为内参蛋白。

[0060] 如图5结果显示,OA (10^{-8} M) 和 250HD_3 (10^{-7} M) 联合用药组相对于 250HD_3 (10^{-7} M) 单独用药组具有统计学差异 ($p < 0.05$),说明低浓度的齐墩果酸 (10^{-8} M) 可显著加速 250HD_3 的代谢,显示其对成骨样细胞中CYP27B1表达的重要作用,具有促进成骨分化过程的潜力。

[0061] 实施例4

[0062] 本实施例研究了浓度为 10^{-7} M的骨化二醇与浓度为 10^{-9} - 10^{-6} M的齐墩果酸联合用药对成骨细胞分化的影响。

[0063] 1、选择人骨髓干细胞,随机分为多个测试组:空白组、骨化二醇(250HD_3)单独用药组以及OA和骨化二醇联合用药组;其中,测试组中,骨化二醇的终浓度为 10^{-7} M,OA的终浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M,空白组不加入任何底物;然后,将各测试组孵育MG-63细胞7天,检测各组碱性磷酸酶(ALP)的活性水平。

[0064] 如图6结果显示,OA (10^{-8}) 和 250HD_3 (10^{-7} M) 联合用药组相对于 250HD_3 (10^{-7} M) 单独用药组具有显著的统计学差异 ($p < 0.01$),OA (10^{-7} M) 和 250HD_3 (10^{-7} M) 联合用药组相对于 250HD_3 (10^{-7} M) 单独用药组具有统计学差异 ($p < 0.05$),说明齐墩果酸可显著提高成骨细胞的碱性磷酸酶的活性,促进成骨细胞分化。

[0065] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

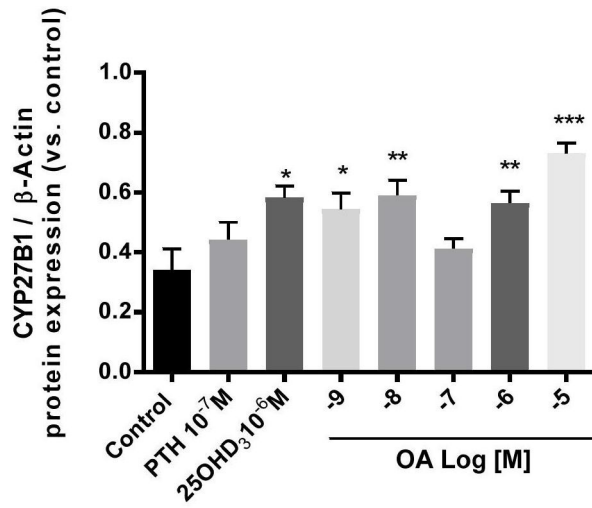


图1

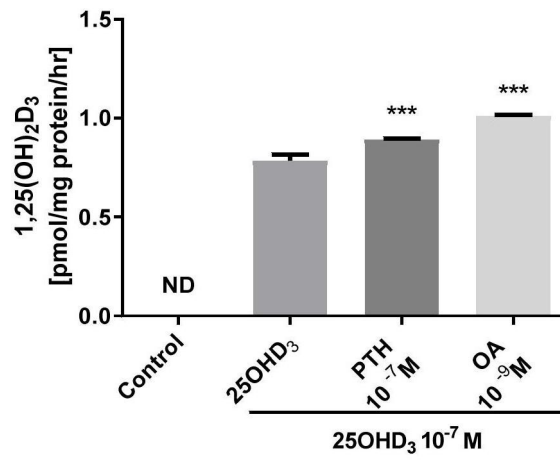


图2

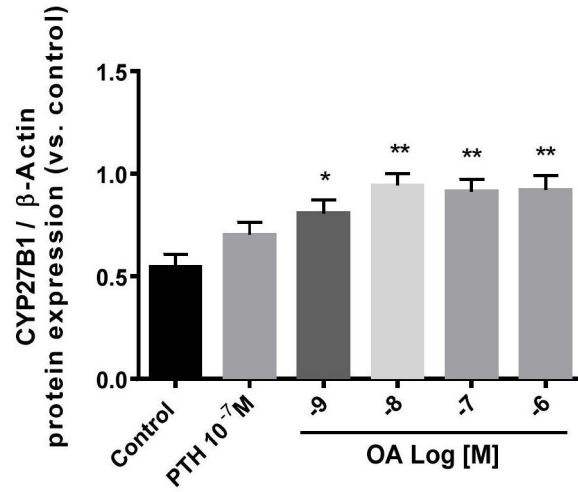


图3

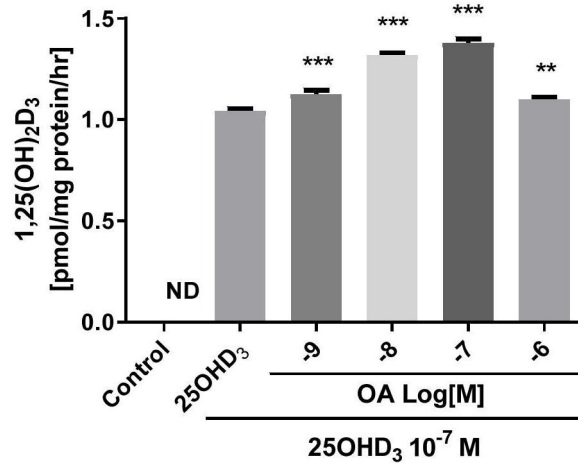


图4

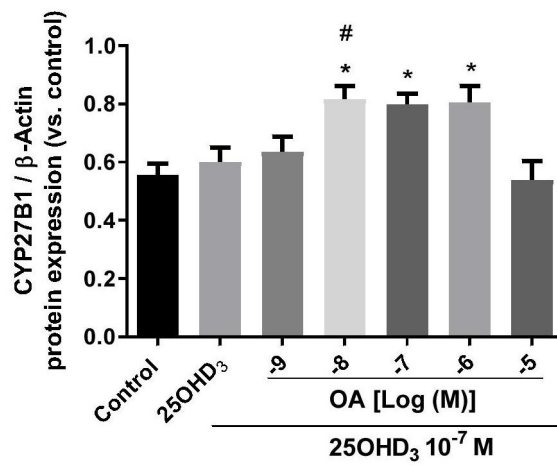


图5

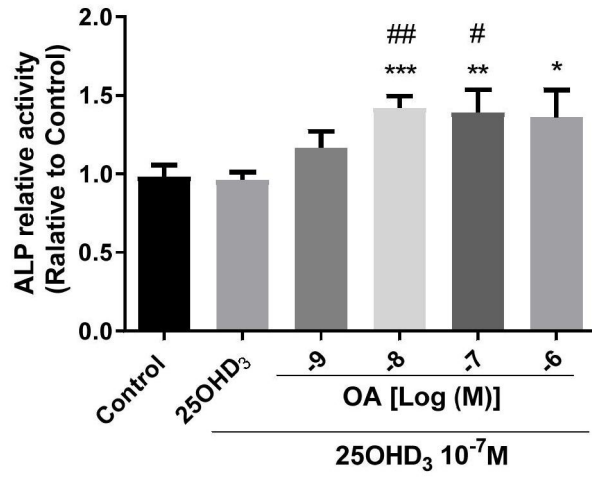


图6