



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109745330 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201711061004.0  
 (22) 申请日 2017.11.02  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 109745330 A  
 (43) 申请公布日 2019.05.14  
 (73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院  
 地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园南区粤兴一道18号香港理工大学产学研大楼205  
 (72) 发明人 黄文秀 董晓莉 曹思思 王奕  
 (74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245  
 代理人 刘瑜 陈燕娴  
 (51) Int. Cl.  
 A61K 31/56 (2006.01)  
 A61P 19/10 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)  
 A61P 3/00 (2006.01)  
 A61P 9/00 (2006.01)  
 A61P 13/12 (2006.01)  
 A61P 17/06 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 A61P 37/02 (2006.01)  
 A61P 5/16 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106954861 A, 2017.07.18  
 JP 2016169172 A, 2016.09.23  
 JP 2014141444 A, 2014.08.07  
 张明发等. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展.《药物评价研究》.2014,  
 张明发等. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展.《药物评价研究》.2014,

审查员 程婷

权利要求书1页 说明书9页 附图8页

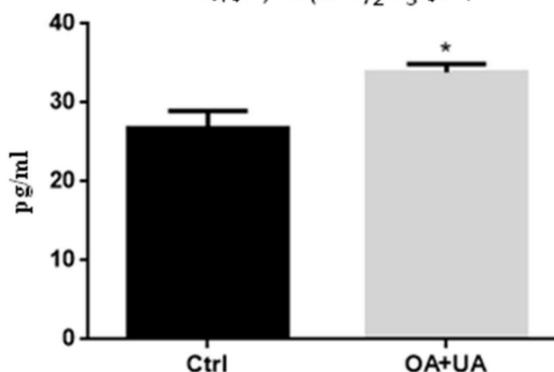
(54) 发明名称

齐墩果酸和熊果酸在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了齐墩果酸和熊果酸在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用。本发明发现了天然产物齐墩果酸和熊果酸以质量比3:1混合后,具有调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的作用,从而增加体内活性维生素D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)水平,改善钙平衡和增强骨密度。在此基础上,使用天然高分子玉米醇溶蛋白对齐墩果酸和熊果酸进行包裹,提高二者在外界环境条件下的稳定性,增加口服生物利用度,同时纳米颗粒的缓释技术减轻大剂量口服齐墩果酸和熊果酸对组织细胞的毒性作用。可用于治疗或预防活性维生素D<sub>3</sub>合成减少以及缺乏导致的骨质疏松、糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、甲状旁腺亢进、肾衰、牛皮癣、癌症以及免疫疾病。

血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平



1. 一种纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将玉米醇溶蛋白粉溶于有机溶剂溶液中,搅拌均匀,调节pH至7,得到玉米醇溶蛋白溶液;

(2) 将齐墩果酸溶于磷酸盐缓冲液中,搅拌均匀,得到OA溶液;将熊果酸溶于磷酸盐缓冲液中,搅拌均匀,得到UA溶液;

(3) 将步骤(2)中得到的OA溶液滴加到步骤(1)中得到的玉米醇溶蛋白溶液中,搅拌均匀,得到混合溶液I;将步骤(2)中得到的UA溶液滴加到步骤(1)中得到的玉米醇溶蛋白溶液中,搅拌均匀,得到混合溶液II;

(4) 将步骤(3)中得到的混合溶液I和混合溶液II分别干燥,得到OA包埋颗粒和UA包埋颗粒;

(5) 将步骤(4)中得到的OA包埋颗粒、UA包埋颗粒和水混合均匀,得到纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂;

步骤(2)中所述的齐墩果酸与所述玉米醇溶蛋白粉的质量比为1:10~50;

步骤(2)中所述的熊果酸与所述玉米醇溶蛋白粉的质量比为1:10~50;

步骤(5)中所述的OA包埋颗粒和UA包埋颗粒的质量比为3:1。

2. 根据权利要求1所述的纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂的制备方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的有机溶剂的浓度为10~20mM;

步骤(1)中所述的玉米醇溶蛋白溶液的浓度为0.5~5mg/mL;

步骤(2)中所述的OA溶液的浓度为1~10mg/mL;

步骤(2)中所述的UA溶液的浓度为1~10mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂的制备方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的有机溶剂为异丙醇;

步骤(4)中所述的干燥为喷雾干燥;

步骤(5)中所述的OA包埋颗粒的用量按每毫升水配比0.1~3g OA包埋颗粒计算;

步骤(5)中所述的UA包埋颗粒的用量按每毫升水配比0.1~3g UA包埋颗粒计算。

4. 一种纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂,其特征在于:通过权利要求1~3任一项所述的方法制备得到。

5. 权利要求4所述的纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂在制备防治骨质疏松的药物中的应用。

## 齐墩果酸和熊果酸在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,特别涉及齐墩果酸和熊果酸在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 维生素D也称抗佝偻病维生素,是一类脂溶性维生素,属类固醇化合物。在人类所需的维生素中,维生素D非常特殊,它是一种激素的前体,而且在阳光充足的情况下,人体自身可以合成(维生素D<sub>3</sub>)。活性维生素D<sub>3</sub>在调节机体代谢、维持正常生理功能方面发挥着不可替代的作用,它不仅参与矿物质代谢,还能抑制多种组织细胞增殖分化、抑制甲状旁腺激素分泌、改善糖代谢及免疫调节等。活性维生素D<sub>3</sub>作用于多种靶组织,生理作用也多种多样,因此活性维生素D<sub>3</sub>又被称为D激素,广泛用于治疗骨质疏松、糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、甲状旁腺亢进、肾衰、牛皮癣、癌症以及免疫疾病。

[0003] 当维生素D<sub>3</sub>被运到肝脏,在CYP27A1基因编码的25羟化酶作用下代谢为 25(OH)D<sub>3</sub>,之后在各种组织中的CYP27B1基因编码的25-羟维生素D-1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)的作用下进一步活化成为具有活性的1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,在CYP24A1基因编码的25-羟基维生素D<sub>3</sub>-24-羟化酶(CYP24A1)作用下代谢为没有活性的 24,25-二羟维生素D<sub>3</sub>。在肾脏合成的1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>随即被转运到肠道、肾脏或其它靶组织中,与靶器官及组织中的维生素D受体(VDR)结合形成激素-受体复合物,对靶基因的转录和翻译进行调控,实现其生物学功能,包括重要的钙磷代谢调节作用。

[0004] 血液中活性维生素D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)的水平调节比较复杂,主要通过内源性激素或细胞因子(如甲状旁腺激素PTH,成纤维细胞生长因子FGF23)作用于其位于肾脏的代谢酶(CYP27B1与CYP24A1),从而影响1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成。除了体内激素,自然界中尚未发现有直接通过调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶,尤其是CYP27B1合成酶,从而影响1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成的物质。

[0005] 齐墩果酸和熊果酸广泛存在于自然界多种植物中,两者分别属于 $\beta$ -香树脂醇型和 $\alpha$ -香树脂醇型五环三萜类化合物,互为同分异构体。齐墩果酸以游离形式分布于约60个科190种植物;而熊果酸则以同种方式分布于约27个科62种植物。齐墩果酸和熊果酸共同存在于多个植物中,如属于中药材的大枣、山楂、山茱萸、马鞭草、夏枯草、地肤子、槲寄生等植物中,齐墩果酸在不同植物中以不同比例存在。齐墩果酸和熊果酸具有抗炎、抗肿瘤、增强免疫等功能,并且二者混合后其活性较强。但是齐墩果酸和熊果酸难溶于水,生物利用度不高,限制了它们的广泛应用。

[0006] 纳米包裹技术近些年来被广泛地应用于食品和制药工业当中。在食品工业中,生物活性物质能够通过包裹有效减少其在储存运输过程中的挥发流失,与外界环境的隔绝能够减缓其氧化变质。在制药工业中,纳米包裹技术在药物传输系统中有着诸多优势,包裹着药物的纳米级颗粒由于其较小的尺寸、较大的表面以及较高的移动性能够有效地穿过细胞膜,从而提高其生物药效率。而且载药纳米颗粒的特殊壳-核结构能够有效地控制药物的释

放。

[0007] 玉米醇溶蛋白是玉米中的主要储存蛋白,由于其良好的生物相容性和降解性已经广泛用于食品工业和制药工程。玉米醇溶蛋白能够溶于70%~80%的酒精溶液,具备良好的溶剂挥发自组装呈球形(EISA)。大量水溶液加入其乙醇水溶液导致的极性改变能够快速得到球形微粒。这种基础结构的驱动力为蛋白质的二级结构从 $\alpha$ -螺旋到 $\beta$ -折叠的转变,蛋白疏水力的凝聚作用。这种自组装成球的性质使玉米醇溶蛋白能够不依赖乳化剂来包载药物制剂,例如5-生育酚,姜黄素,药物鱼油,维生素D等。

[0008] 综上所述,我们发现,除了体内激素,自然界中尚未发现有直接通过调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶,尤其是CYP27B1合成酶,从而影响1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成的物质。如果在天然植物化合物中,能够筛选到通过调节CYP27B1合成酶,从而影响1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成的物质,这将是填补此空白的重大发现。但是,很多天然化合物存在水溶性差、代谢快、生物利用度低、毒性高等缺点,限制了其体内应用。

### 发明内容

[0009] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供齐墩果酸和熊果酸在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂的制备方法。

[0011] 本发明的又一目的在于提供所述方法制备得到的纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂。

[0012] 本发明的目的通过下述技术方案实现:齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性的药物中的应用。

[0013] 所述的齐墩果酸和熊果酸的质量比优选为3:1;齐墩果酸和熊果酸通过调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性(增加CYP27B1合成酶活性,同时抑制CYP24A1活性),从而增加体内活性维生素D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)水平,改善钙平衡和增强骨密度,可应用于制备防治活性维生素D<sub>3</sub>合成减少以及缺乏导致的骨质疏松、糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、甲状旁腺亢进、肾衰、牛皮癣、癌症以及免疫疾病等药物。

[0014] 所述的药物可采用本领域的常规方法制成各种剂型,包括汤剂、片剂、胶囊剂、针剂、粉针剂、颗粒剂、冲剂、口服液和糖浆剂,或者采用微纳米技术制成的片剂、胶囊剂、针剂、粉针剂或颗粒剂等。

[0015] 一种纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂的制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1) 将玉米醇溶蛋白粉溶于有机溶剂溶液中,搅拌均匀,调节pH至7,得到玉米醇溶蛋白溶液;

[0017] (2) 将OA(齐墩果酸)溶于磷酸盐缓冲液中,搅拌均匀,得到OA溶液;将UA(熊果酸)溶于磷酸盐缓冲液中,搅拌均匀,得到UA溶液;

[0018] (3) 将步骤(2)中得到的OA溶液滴加到步骤(1)中得到的玉米醇溶蛋白溶液中,搅拌均匀,得到混合溶液I;将步骤(2)中得到的UA溶液滴加到步骤(1)中得到的玉米醇溶蛋白溶液中,搅拌均匀,得到混合溶液II;

[0019] (4) 将步骤(3)中得到的混合溶液I和混合溶液II分别干燥,得到OA包埋颗粒和UA

包埋颗粒；

[0020] (5) 将步骤(4)中得到的OA包埋颗粒、UA包埋颗粒和水混合均匀,得到纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂。

[0021] 步骤(1)中所述的有机溶剂优选为异丙醇。

[0022] 步骤(1)中所述的有机溶剂的浓度优选为10~20mM。

[0023] 步骤(1)中所述的玉米醇溶蛋白溶液的浓度优选为0.5~5mg/mL。

[0024] 步骤(2)中所述的OA(齐墩果酸)与所述玉米醇溶蛋白粉的质量比优选为1:10~50。

[0025] 步骤(2)中所述的OA溶液的浓度优选为1~10mg/mL。

[0026] 步骤(2)中所述的UA(熊果酸)与所述玉米醇溶蛋白粉的质量比优选为 1:10~50。

[0027] 步骤(2)中所述的UA溶液的浓度优选为1~10mg/mL。

[0028] 步骤(3)中所述的搅拌的时间优选为1~2h。

[0029] 步骤(4)中所述的干燥优选为喷雾干燥。

[0030] 步骤(5)中所述的水优选为蒸馏水。

[0031] 步骤(5)中所述的OA包埋颗粒和UA包埋颗粒的质量比优选为3:1。

[0032] 步骤(5)中所述的OA包埋颗粒的用量按每毫升水配比0.1~3g OA包埋颗粒计算。

[0033] 步骤(5)中所述的UA包埋颗粒的用量按每毫升水配比0.1~3g UA包埋颗粒计算。

[0034] 一种纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂,通过上述任一项所述的方法制备得到。

[0035] 所述的纳米包裹齐墩果酸和熊果酸的混合制剂在制备调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性、升高体内活性维生素D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)水平,改善钙平衡,增强骨密度,防治活性维生素D<sub>3</sub>合成减少和/或缺乏相关疾病药物中的应用。

[0036] 所述的活性维生素D<sub>3</sub>合成减少和/或缺乏相关疾病包括骨质疏松、糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、甲状旁腺亢进、肾衰、牛皮癣、癌症和免疫疾病。

[0037] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0038] 1、本发明一方面研制出有效增加体内活性维生素D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)水平,从而改善钙平衡和增强骨密度的天然产物最佳配比。

[0039] 2、本发明中两个活性化合物是从自然界广泛存在的植物中提取而来,其提取原材料来源广泛,可以实现规模化制备。

[0040] 3、本发明应用食材级纳米包裹技术,使用天然高分子玉米醇溶蛋白对齐墩果酸和熊果酸进行包裹,对比其他载体材料,天然的高分子材料具有较高的生物相容性和降解性,能有效控制药物释放,控制代谢,减低毒性;增加肠道和细胞吸收,提高其生物药效率。

[0041] 4、本发明发现了天然产物齐墩果酸和熊果酸以最佳配比(齐墩果酸:熊果酸=3:1)混合后,通过调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性,从而增加体内活性维生素 D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)水平,改善钙平衡和增强骨密度。在此基础上,发挥玉米醇溶蛋白包裹齐墩果酸和熊果酸后,提高二者在外界环境条件(温度,光照等)下的稳定性,增加口服生物利用度,同时纳米颗粒的缓释技术减轻大剂量口服齐墩果酸和熊果酸对组织细胞的毒性作用。

[0042] 5、本发明发现齐墩果酸和熊果酸以最佳配比(齐墩果酸:熊果酸=3:1)混合后,具有调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性(增加CYP27B1合成酶活性,同时抑制CYP24A1活性)的作用,

从而增加体内活性维生素D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 水平。

[0043] 6、本发明提供相应药品、功能性食品或食品添加剂的制备方法及进行有关的体内体外活性确认,通过调节维生素D<sub>3</sub>代谢酶活性,从而增加体内活性维生素D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 水平,从而改善钙平衡和增强骨密度。可用于治疗或预防活性维生素D<sub>3</sub>合成减少以及缺乏导致的骨质疏松、糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、甲状旁腺亢进、肾衰、牛皮癣、癌症以及免疫疾病等。

#### 附图说明

[0044] 图1是按不同比例混合的化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)对HKC-8细胞中维生素D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)转录启动子活性的影响图(FSK表示毛喉素,作为阳性对照;C表示空白对照;\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.C.)。

[0045] 图2是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对HKC-8细胞中维生素D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)基因和蛋白表达的影响图以及蛋白印迹图(FSK表示毛喉素,作为阳性对照;C表示空白对照;\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.C.);其中,图A为对HKC-8细胞中维生素D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)基因表达的影响;图B为对HKC-8细胞中维生素D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)蛋白表达的影响;图C为蛋白印迹图(蛋白免疫印迹实验显示不同组样本的CYP27B1和内参 $\beta$ -actin蛋白表达,泳道1为空白对照;泳道2为毛喉素处理组,阳性对照组;泳道3为OA和UA之3:1比例混合物10<sup>-9</sup>M浓度处理组;泳道4为OA和UA之3:1比例混合物10<sup>-7</sup>M浓度处理组;泳道5为OA和UA之3:1比例混合物10<sup>-5</sup>M浓度处理组)。

[0046] 图3是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对更年期骨质疏松症模型鼠体内活性1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平的影响图(\*p<0.05,vs.Ctrl);其中,Ctrl:空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);OA+UA:齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物并喂食正常钙饮食)。

[0047] 图4是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对更年期骨质疏松症模型鼠股骨远端松质骨骨密度、骨量以及骨小梁厚度的影响图(\*p<0.05,vs.Ctrl);其中,图A为骨密度,图B为骨量,图C为骨小梁厚度;Ctrl表示空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);OA+UA表示齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物并喂食正常钙饮食)。

[0048] 图5是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对老年骨质疏松症模型鼠体内活性1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平以及血清甲状旁腺激素(PTH)水平的影响图(\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.MCD);其中,图A为血清1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平,图B为血清甲状旁腺激素;Mature表示年轻鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);MCD表示老年鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);HCD表示老年鼠阳性对照组(灌胃蒸馏水,并喂食高钙饮食);OA+UA表示老年鼠齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物(3:1)并喂食正常钙饮食)。

[0049] 图6是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对老年骨质疏松症模型鼠钙平衡的影响图(\*p<0.05,\*\*p<0.01vs.MCD);其中,Mature:年轻鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);MCD:老年鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂

食正常钙饮食);HCD:老年鼠阳性对照组(灌胃蒸馏水,并喂食高钙饮食);OA+UA:老年鼠齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物(3:1)并喂食正常钙饮食)。

[0050] 图7是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对老年骨质疏松症模型鼠股骨远端松质骨密度、骨容量和骨小梁分离度指标的影响图(\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.MCD);其中,图A为骨密度,图B为骨量,图C为骨小梁厚度;Mature表示年轻鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);MCD表示老年鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);HCD表示老年鼠阳性对照组(灌胃蒸馏水,并喂食高钙饮食);OA+UA表示老年鼠齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物(3:1)并喂食正常钙饮食)。

[0051] 图8是化合物齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)以最佳比例混合后(OA:UA=3:1)对老年骨质疏松症模型鼠腰椎(L4)松质骨密度、骨量、骨小梁数目、骨小梁厚度和骨小梁分离度指标的影响图(\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.MCD);其中,图A为骨密度,图B为骨量,图C为骨小梁数目,图D为骨小梁厚度,图E为骨小梁分离度;Mature表示年轻鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);MCD表示老年鼠空白对照组(灌胃蒸馏水,并喂食正常钙饮食);HCD表示老年鼠阳性对照组(灌胃蒸馏水,并喂食高钙饮食);OA+UA表示老年鼠齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合处理组(灌胃齐墩果酸和熊果酸混合物(3:1)并喂食正常钙饮食)。

[0052] 图9是齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)三比一混合物,纳米包裹齐墩果酸(NO)和纳米包裹熊果酸(NUA)三比一混合制剂对HKC-8细胞生长的影响图。

[0053] 图10是纳米包裹齐墩果酸(NO)和纳米包裹熊果酸(NUA)按不同比例(NO:NUA=1:3,1:1,3:1)的混合制剂对HKC-8细胞中维生素D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)转录启动子活性的影响图(\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001vs.C;FSK表示毛喉素,作为阳性对照;C表示空白对照)。

## 具体实施方式

[0054] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0055] 实施例1 细胞实验

[0056] (1) 齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)不同比例混合对CYP27B1启动子活性的调节作用:

[0057] 实验选用HKC-8细胞(由美国Department of Pathology of Johns Hopkins University的教授Prof.Racusen的实验室提供,参考文献如下:Racusen LC, Monteil C, Sgrignoli A, Lucskay M, Marouillat S, Rhim JG, et al. (1997). Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 129:318-329.), 运用插入CYP27B1 转录启动子序列的pGL-3-basic vector(pGL-3-basic vector由美国the University of California San Francisco的教授Dr.Farzana Perwad的实验室提供的:参考文献如下:Chanakul A, Zhang MY, Louw A, Armbrecht HJ, Miller WL, Portale AA, et al. (2013). FGF-23 regulates CYP27B1 transcription in the kidney and in extra-

renal tissues. PLoS One 8:e72816.) , 转染HKC-8细胞, 观察OA和UA不同质量比混合后(OA:UA=1:3; OA:UA=1:2; OA:UA=1:1; OA:UA=2:1; OA:UA=3:1) 对其转录启动子活性影响; 其中, 以 $10^{-5}$ M Forskolin (FSK, 毛喉素) 作为阳性对照, 利用不同浓度( $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M), 不同混合比例的OA、UA混合物与HKC-8细胞孵育24小时后, 测定启动子活性。

[0058] 结果发现(图1), OA:UA=3:1的混合比例, 在其浓度为 $10^{-7}$ M到 $10^{-5}$ M时都能够显著增加CYP27B1转录启动子的活性。而OA与UA的其它混合比例, 都未能表现出较明显的增加CYP27B1转录启动子活性的作用。因此, OA:UA=3:1 的混合比例被筛选出为调节维生素D<sub>3</sub>代谢合成酶的最佳混合比例。

[0059] (2) 齐墩果酸(OA)和熊果酸(UA)最佳比例混合物相比较二者单独对 CYP27B1基因和蛋白表达的作用:

[0060] 经过以上实验的筛选, OA:UA=3:1(质量比)被发现为调节CYP27B1合成酶的最佳混合比例。因此, OA与UA按照此最佳比例混合后, 配成不同浓度的 OA和UA混合物( $10^{-9}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M), 再与HKC-8细胞孵育24小时后, 收集细胞RNA或蛋白进行基因或蛋白表达的测定, 观察不同浓度混合物对CYP27B1基因和蛋白表达的影响(以 $10^{-5}$ M Forskolin (FSK) 作为阳性对照)。

[0061] 结果发现(图2), OA:UA=3:1的混合物虽在 $10^{-5}$ M的高浓度下才表现出对 CYP27B1的基因表达影响, 但其在 $10^{-7}$ M的浓度下已经可以显著增加CYP27B1 的蛋白表达。结果表明, OA:UA=3:1可明显增加活性1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成酶 CYP27B1的表达。

[0062] 实施例2 动物实验验证(更年期骨质疏松症模型)

[0063] 本实施例将齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)后, 喂食于5月龄去卵巢雌性大鼠, 喂食6周后, 检测体内血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平, 肠道钙吸收和钙平衡, 骨密度等指标, 验证齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)在体内调节维生素D<sub>3</sub>代谢, 以及改善钙平衡和骨密度的作用。

[0064] 1. 材料与方法

[0065] 1.1 动物与材料

[0066] 动物:20只5月龄SPF级雌性去卵巢SD大鼠(平均体重250g), 购自美国普渡大学实验动物中心。

[0067] 1.2 实验方法

[0068] 1.2.1 实验分组和药物处理:动物适应环境后, 喂食中等正常钙饮食(0.6% (w/w) Ca, MCD) 并将动物随机分为2组, 每组10只。分别为:①空白对照组(Ctrl); ②齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合物处理组(OA+UA)。齐墩果酸和熊果酸按比例混合于水中, 按照齐墩果酸每日剂量23.6mg/kg/day; 而熊果酸每日剂量8.6mg/kg/day给予大鼠灌胃; 空白对照组均按照1ml蒸馏水/100g体重灌胃大鼠, 实验持续6周。整个实验期间自由饮用蒸馏水, 每天清晨给大鼠喂食, 食物量按照大鼠适应期摄食量最少的一组折算。饲养环境12小时光照/黑暗交替, 室温(23~25)℃。

[0069] 1.2.2 样本收集和保存:6周后, 将大鼠置于代谢笼中, 收集其24小时的尿液与粪便, 保存于-20℃。大鼠在轻度乙醚麻醉下, 腹主动脉取血, 离心得血清, 保存于-80℃。同时, 连同肌肉和结缔组织, 完整收集动物股骨、胫骨和脊椎, 以湿润纱布包起, 保存于-20℃。

[0070] 1.2.3 钙含量测定以及肠钙吸收率以及钙平衡计算:收集的尿液与粪便经过处理

后,使用商品化的试剂盒(钙测定试剂盒(邻甲酚酞络合酮比色法),购买于北京中生北控生物科技股份有限公司)测定其钙含量。肠钙吸收率(%) = (食钙量 - 粪钙量) / 食钙量 × 100; 钙平衡(mg/24h) = 食钙量 - 粪钙量 - 尿钙量

[0071] 1.2.4 血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平和PTH测定:血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平的检测使用Immundiagnostik AG, Bensheim公司的试剂盒完成。血清PTH水平的检测使用Immutopics, Inc.公司的试剂盒完成。

[0072] 1.2.5 MicroCT检测骨密度:大鼠胫骨或股骨或脊椎置入锥形管,放于microCT待测槽内,根据软件程序,扫描大鼠胫骨头端或股骨头端松质骨,以及腰椎(L2-4节)松质骨,取得骨密度和骨容量等参数。

[0073] 1.2.6 统计学分析:数据以平均值±标准误表示。使用GraphPad公司统计分析软件Prism 5对数据进行one-way ANOVA检验来比较整体差异,两组间差异进一步使用Tukey's test进行差异显著性检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

[0074] 2. 结果:结果发现(图3和4),齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)喂食于5月龄更年期骨质疏松症模型大鼠6周后,大鼠体内活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平明显升高。与此同时,齐墩果酸和熊果酸三比一混合物处理后,大鼠骨密度等指标均有改善,具体表现为大鼠股骨远端松质骨的骨密度增加,骨容量显著增高,以及骨小梁厚度明显增多。

[0075] 实施例3 动物实验验证(老年骨质疏松症模型)

[0076] 本实施例将齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)后,喂食于11月龄老年雌性大鼠,喂食12周后,检测体内血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平以及血清甲状旁腺激素(PTH)水平,肠道钙吸收和钙平衡,骨密度等指标,验证齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)在体内调节维生素D代谢,以及改善钙平衡和骨密度的作用。

[0077] 1. 材料与方法

[0078] 1.1 动物与材料

[0079] 动物:24只11月龄SPF级雌性SD大鼠(平均体重389g),以及作为对照组的8只3月龄SPF级雌性SD大鼠(平均体重220g),购自广东省医学实验动物中心(动物合格证号:SCXK(粤)2003-0002)。

[0080] 1.2 实验方法

[0081] 1.2.1 药物处理:动物适应环境两周后,喂食中等正常钙饮食(0.6% (w/w) Ca, MCD)并将动物随机分为4组。分别为:①年轻鼠空白对照组(Mature);②老年鼠空白对照组(MCD);③老年鼠阳性对照组(喂食高钙饮食,1.2% (w/w) Ca, HCD);④老年鼠齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)处理组(OA+UA)。每组8只,除了老年鼠阳性对照组外,其它各组均喂食中等钙饮食(0.6% (w/w) Ca, MCD)。齐墩果酸和熊果酸按比例混合于水中,按照齐墩果酸每日剂量23.6mg/kg/day;而熊果酸每日剂量8.6mg/kg/day给予大鼠灌胃;其它各组均按照1ml蒸馏水/100g体重灌胃大鼠,实验持续12周。整个实验期间自由饮用蒸馏水,每天清晨给大鼠喂食,食物量按照大鼠适应期摄食量最少的一组折算。饲养环境12小时光照/黑暗交替,室温(23~25)℃。

[0082] 1.2.2 样本收集和保存:12周后,将大鼠置于代谢笼中,收集其24小时的尿液与粪便,保存于-20℃。大鼠在轻度乙醚麻醉下,腹主动脉取血,离心得血清,保存于-80℃。同时,连同肌肉和结缔组织,完整收集动物股骨、胫骨和脊椎,以湿润纱布包起,保存于-20℃。

[0083] 1.2.3 钙含量测定以及肠钙吸收率以及钙平衡计算:收集的尿液与粪便经过处理后,使用商品化的试剂盒测定其钙含量。肠钙吸收率(%)=(食钙量-粪钙量)/食钙量×100;钙平衡(mg/24h)=食钙量-粪钙量-尿钙量

[0084] 1.2.4 血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平和PTH测定:血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平的检测使用Immundiagnostik AG,Bensheim公司的试剂盒完成。血清PTH水平的检测使用Immutopics, Inc.公司的试剂盒完成。

[0085] 1.2.5 MicroCT检测骨密度:大鼠胫骨或股骨或脊椎置入锥形管,放于microCT待测槽内,根据软件程序,扫描大鼠胫骨头端或股骨头端松质骨,以及腰椎(L2-4节)松质骨,取得骨密度和骨容量等参数。

[0086] 1.2.6 统计学分析:数据以平均值±标准误表示。使用GraphPad公司统计分析软件Prism 5对数据进行one-way ANOVA检验来比较整体差异,两组间差异进一步使用Tukey's test进行差异显著性检验。P<0.05表示差异有显著性。

[0087] 2. 结果:结果发现(图5~图8),齐墩果酸和熊果酸最佳比例混合(齐墩果酸:熊果酸=3:1)喂食于11月龄老年骨质疏松症模型大鼠12周后,大鼠体内血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平未见明显升高,此结果可能与老年鼠模型中,血清1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>水平并未见明显降低以及作用时程有关。但是,齐墩果酸和熊果酸三比一混合物可显著降低血清PTH水平,从而能大大减轻PTH的溶骨作用,减低骨质流失。钙平衡数据显示,齐墩果酸和熊果酸三比一混合物显著改善了老年鼠模型中大大降低的钙平衡。同时,大鼠服用齐墩果酸和熊果酸三比一混合物12周后,大鼠股骨远端松质骨的骨密度增加,骨容量增多,骨小梁分离度减低;腰椎(L2-L4)松质骨骨密度明显增加,骨容量增多,骨小梁数目增多,骨小梁厚度增厚,以及骨小梁分离度显著减低。齐墩果酸和熊果酸三比一混合物对大鼠腰椎松质骨的骨密度等指标的改善优于其在股骨远端松质骨的作用。结果进一步表明,齐墩果酸和熊果酸三比一混合物对大鼠钙平衡和骨密度等指标的改善作用与高钙饮食的改善作用相当。

[0088] 实施例4 纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂的制作

[0089] (1) 将玉米醇溶蛋白粉溶于10~20mM异丙醇溶液中,搅拌均匀,调节pH至7,得到玉米醇溶蛋白溶液;控制溶液中玉米黄粉浓度为0.5~5mg/mL;

[0090] (2) 将OA或UA溶解于磷酸盐缓冲液中,搅拌均匀,得到OA或UA溶液;控制其浓度为1~10mg/mL;

[0091] (3) 将步骤(2)中得到的OA或UA溶液滴加至步骤(1)中得到的玉米醇溶蛋白溶液中,搅拌1~2h,得到混合溶液;所得溶液中OA或UA与玉米醇溶蛋白的质量比为1:10~1:50;

[0092] (4) 将步骤(3)中得到的混合溶液喷雾干燥后,干燥密封保存,得到OA或UA的包埋颗粒(纳米包裹齐墩果酸或纳米包裹熊果酸)。

[0093] (5) 将OA和UA的包埋颗粒按照质量比为3:1的比例混悬于蒸馏水中,制成纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂,其中,OA或UA包埋颗粒的用量按每毫升水配比0.1~3g OA或UA包埋颗粒计算。

[0094] 实施例5 纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂对细胞药效和毒性测试

[0095] 实验选用HKC-8细胞,首先观察纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂在高浓度时对细胞的毒性作用。在此基础上,运用插入CYP27B1转录启动子序列的pGL-3-basic vector转染HKC-8细胞,10<sup>-5</sup>M Forskolin (FSK) 作为阳性对照,观察OA:UA=3:1(质量比)的

混合比例与纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂对其转录启动子活性影响。

[0096] 结果发现,OA:UA=3:1的混合比例,在其浓度为 $10^{-5}$ M时,与HKC-8细胞孵育24小时以及48小时后对细胞有明显的杀伤作用,毒性较大。如图9所示,“OA+UA (3:1)  $10^{-5}$ M-24h”以及“OA+UA (3:1)  $10^{-5}$ M-48h”处理组,视野下大面积 HKC-8细胞变亮堆积在一起,细胞生长状况不良,接近凋亡。然而,纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂,在相同的浓度 $10^{-5}$ M时,与HKC-8细胞孵育24以及48小时后,细胞均未表现出大面积的细胞凋亡。与未经纳米包裹的齐墩果酸和熊果酸三比一混合物比较,纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂,能够明显减轻化合物在高浓度对细胞的损伤作用。

[0097] 图10为纳米包裹齐墩果酸(NOA)和纳米包裹熊果酸(NUA)按不同质量比(NO:A:NUA=1:3,1:1,3:1,其制备方法参考实施例4,区别在于:OA和UA 包埋颗粒的质量比分别为1:3,1:1,3:1)的混合制剂对HKC-8细胞中维生素 D<sub>3</sub>合成酶1 $\alpha$ -羟化酶(CYP27B1)转录启动子活性的影响。从图中可以看出,纳米包裹齐墩果酸和熊果酸三比一混合制剂对CYP27B1转录启动子的活性测试发现,其在24小时作用后,对CYP27B1转录启动子活性影响不大;而在48小时作用后,才表现出对CYP27B1转录启动子活性的显著升高作用。此结果表明,纳米包裹齐墩果酸和熊果酸后,一方面降低了其对细胞的直接毒性作用,另一方面纳米的缓释作用使齐墩果酸和熊果酸的作用效果时间延长。

[0098] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

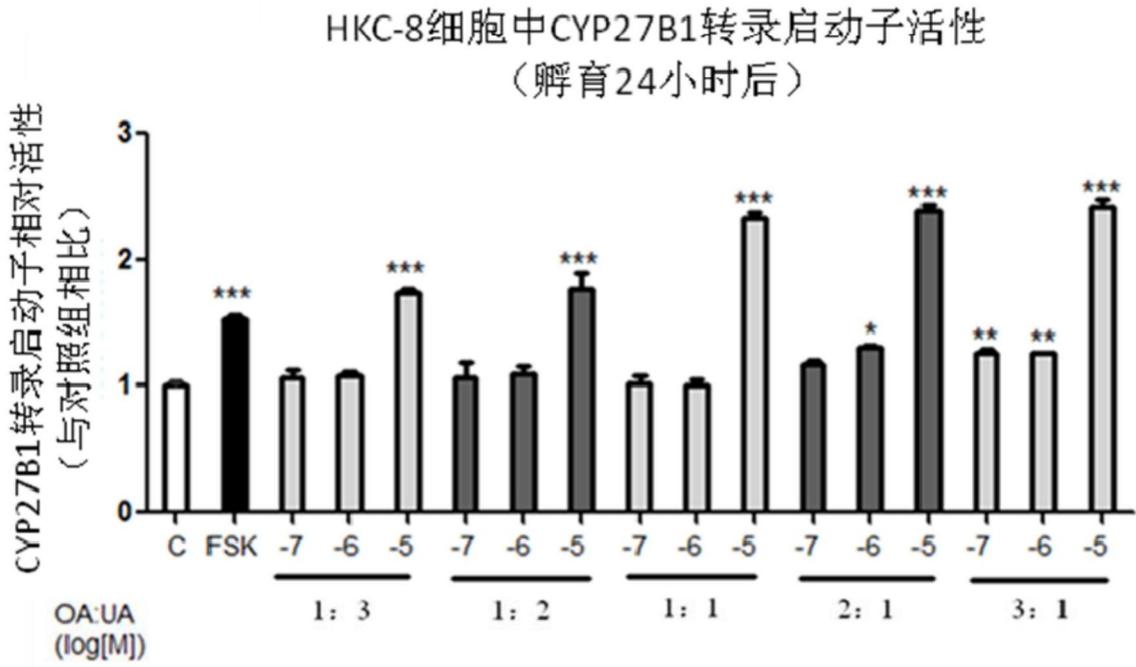
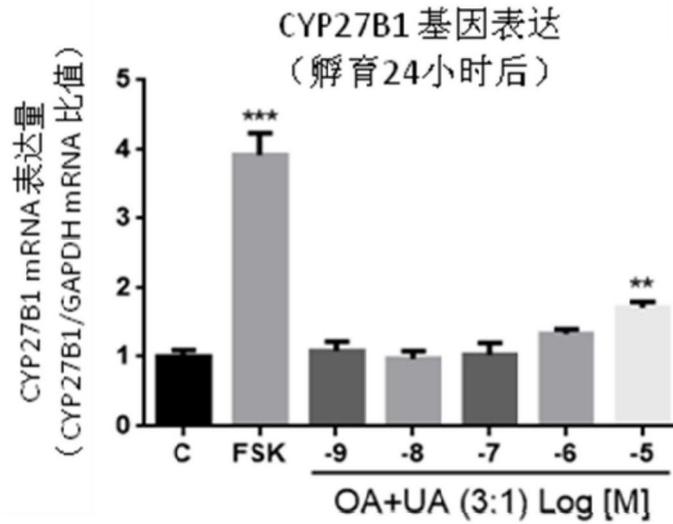
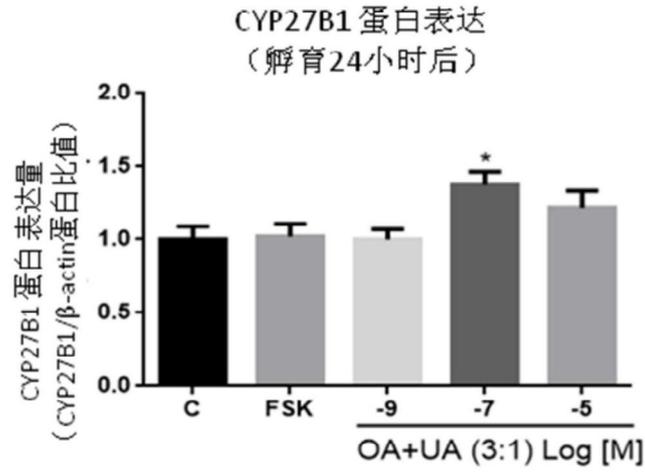


图1

A.



B.



C.

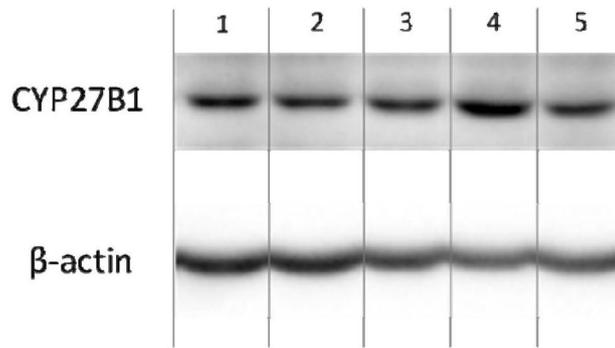


图2

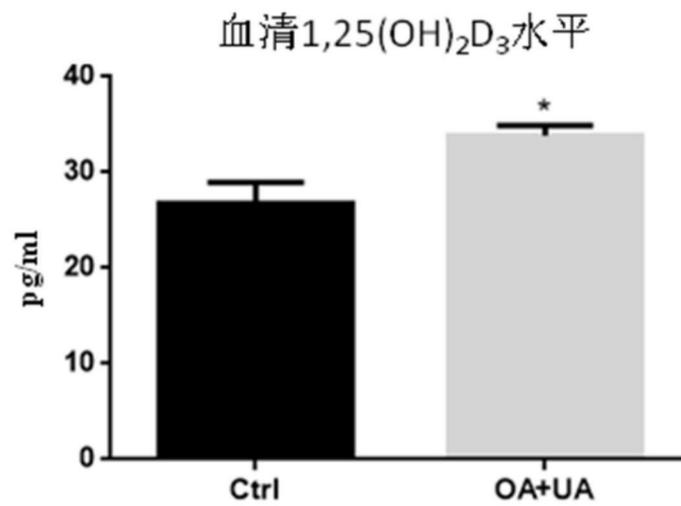
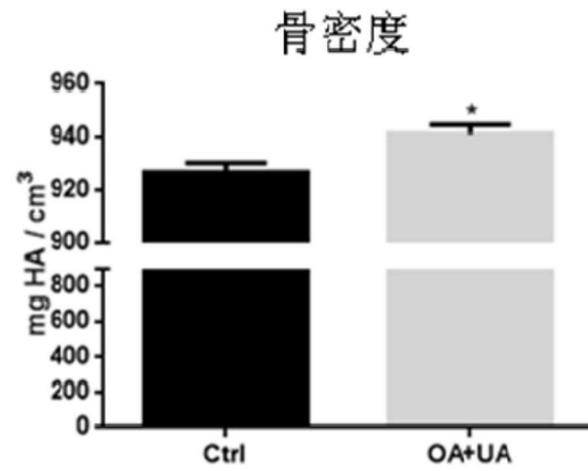
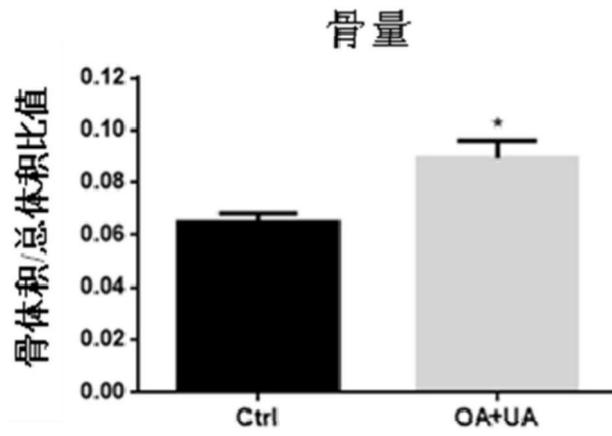


图3

A.



B.



C.

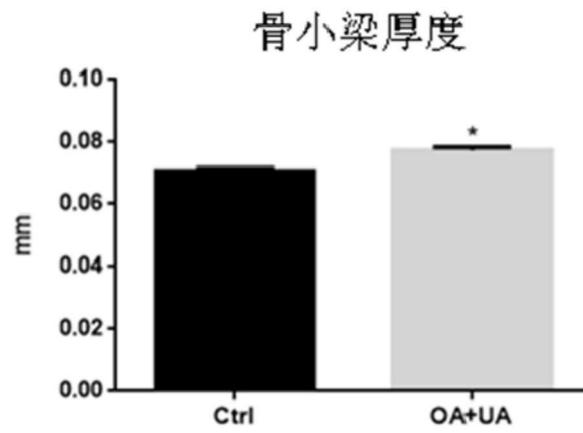
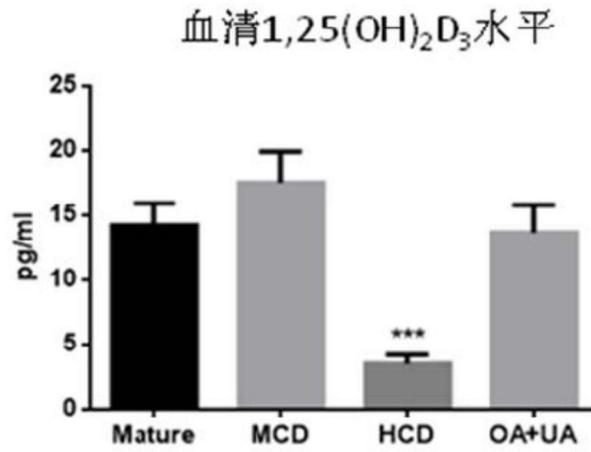


图4

A.



B.

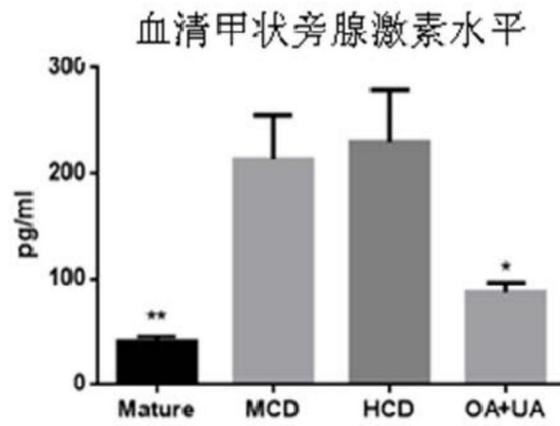


图5

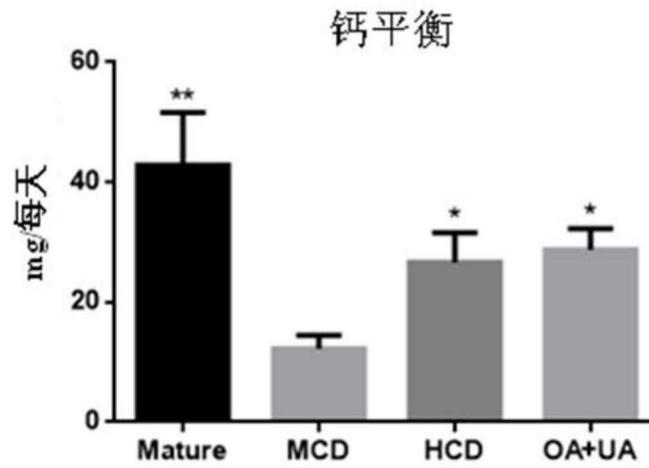
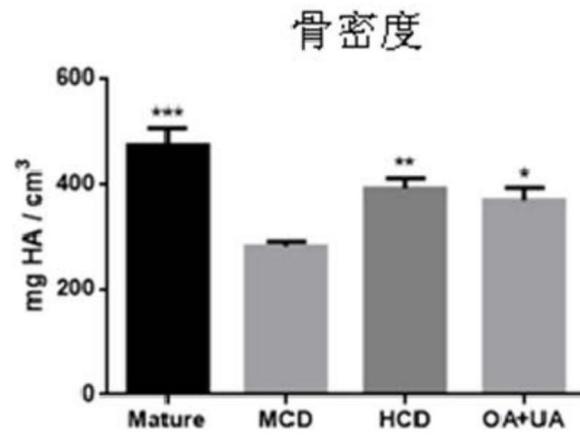
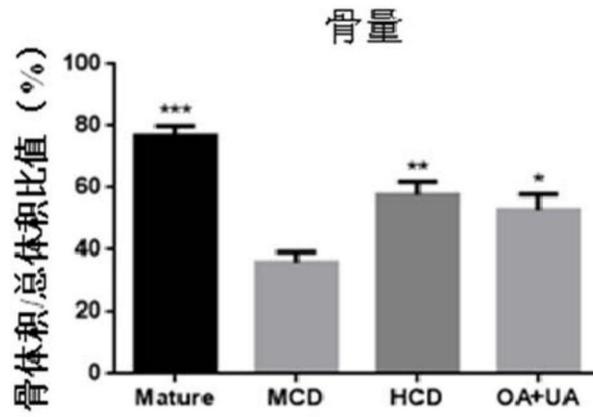


图6

A.



B.



C.

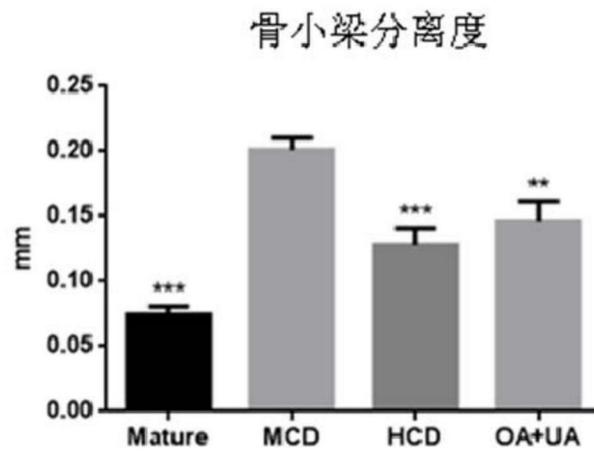
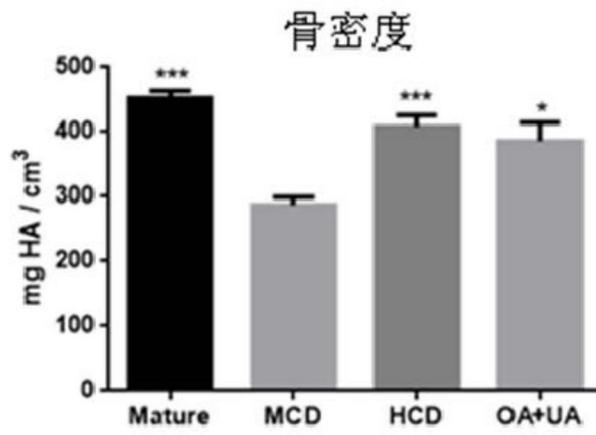
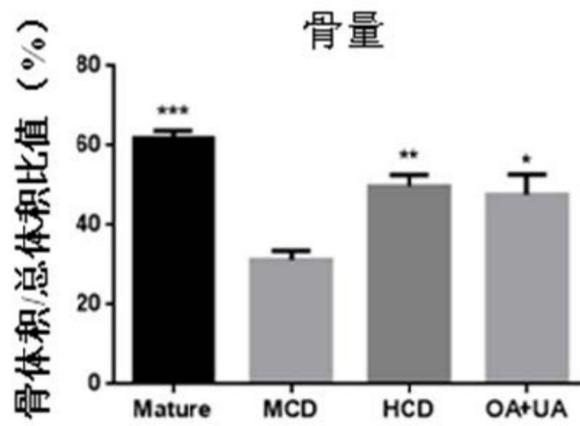


图7

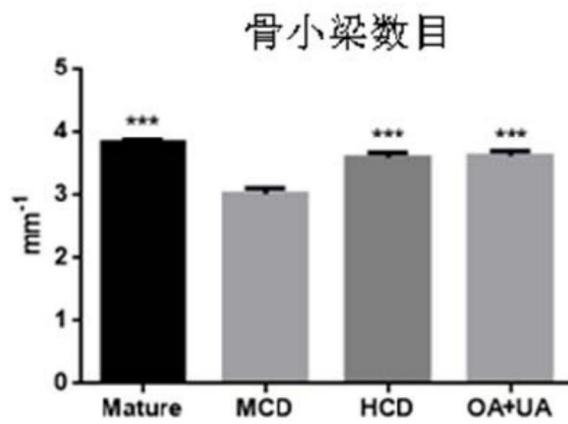
A.



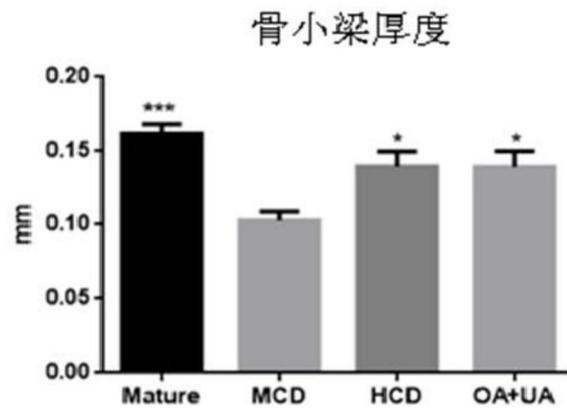
B.



C.



D.



E.

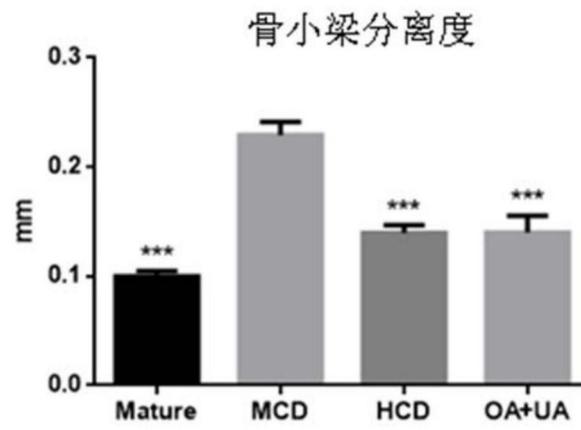


图8

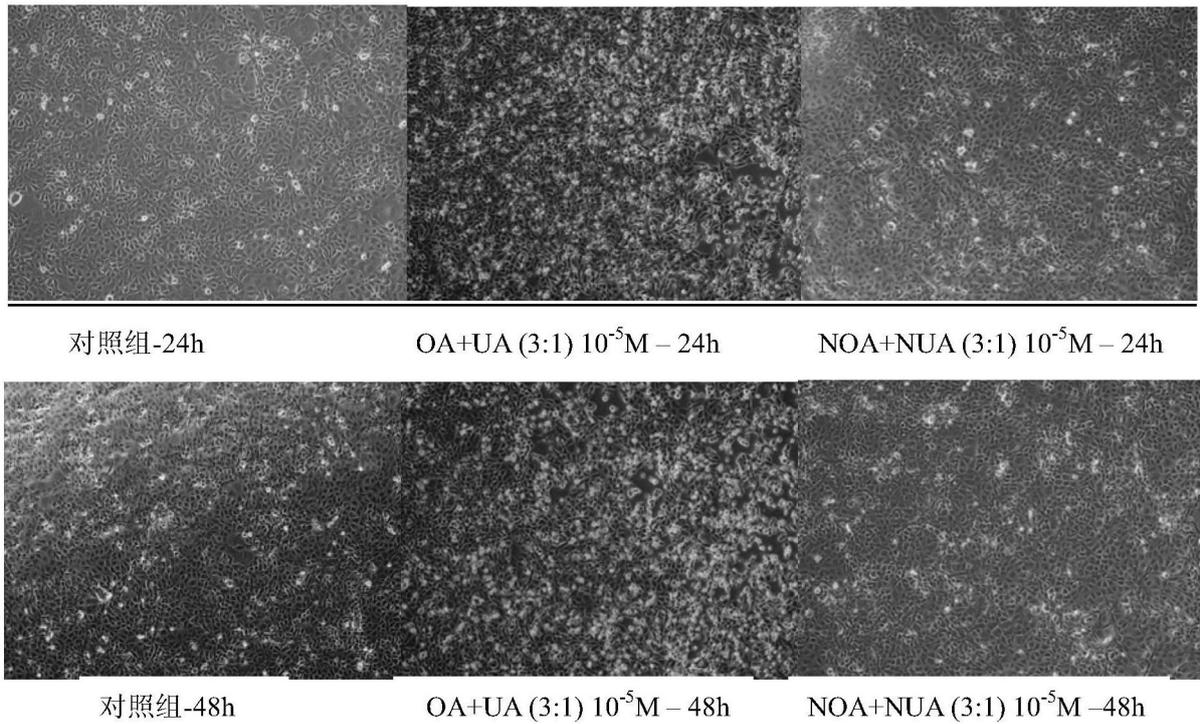


图9

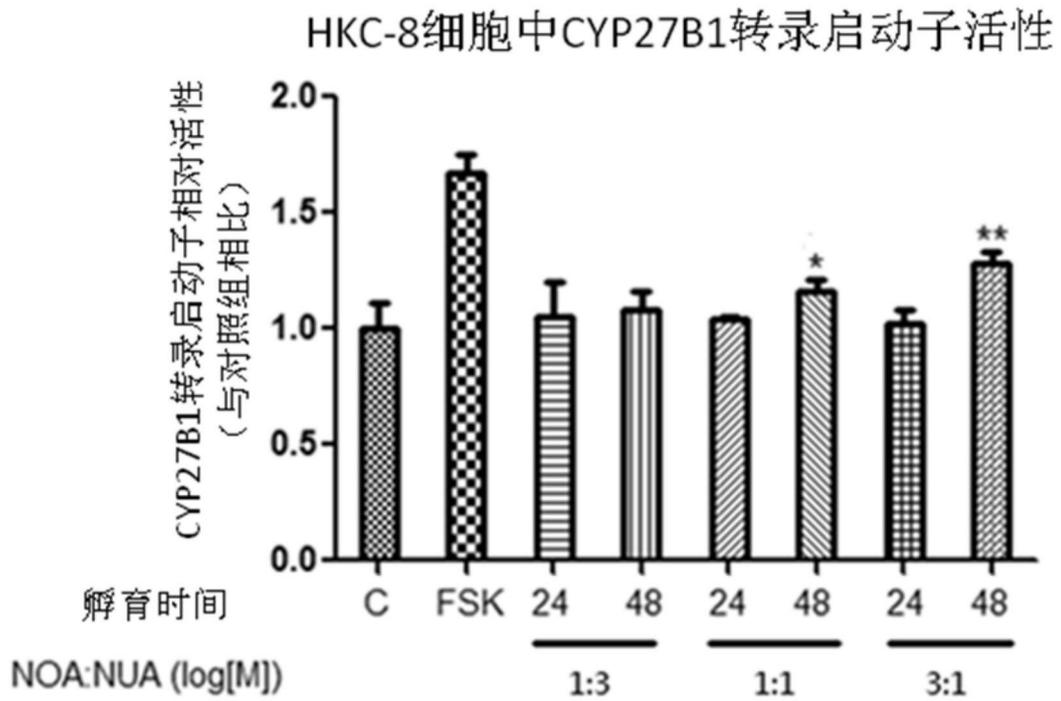


图10