



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109535075 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201710858321.9

(22)申请日 2017.09.21

(71)申请人 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园
南区粤兴一道18号香港理工大学产
学研大楼205室

(72)发明人 陈舜宏 林剑虹 张焕 于文轩
吴任丰

(74)专利代理机构 深圳中一专利商标事务所
44237

代理人 官建红

(51)Int.Cl.

C07D 215/26(2006.01)

A61K 31/4709(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

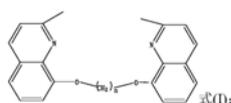
权利要求书1页 说明书7页 附图8页

(54)发明名称

喹啉类二聚体及其制备方法和应用

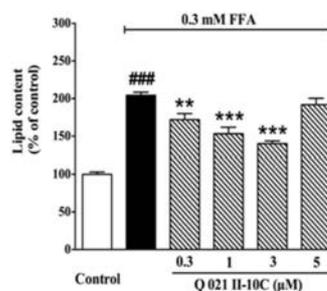
(57)摘要

本发明涉及喹啉类药物技术领域,具体公开一种喹啉类二聚体及其制备方法和应用。所述喹啉类二聚体具有如式(I)所示的通式:

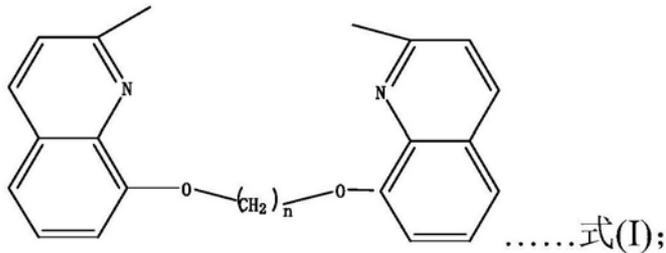


其中, n=10。本发明的喹啉类

二聚体,具有生物活性,可以于制备预防非酒精性脂肪肝的药物或者制备治疗酒精性脂肪肝的药物,制备的药物对脂肪肝具有明显的抑制作用。



1. 一种喹啉类二聚体,其特征在于:所述喹啉类二聚体具有如式(I)所示的通式:



其中, $n=10$ 。

2. 如权利要求1所述的喹啉类二聚体的制备方法,至少包括以下步骤:

步骤S01、将8-羟基-2-甲基喹啉与双卤代烷溶解于有机溶剂中,获得混合溶液,并向所述混合溶液中加入碳酸钾,搅拌溶解,获得反应液;

步骤S02、将所述反应液加热至 $90\sim 110^{\circ}\text{C}$,并在所述温度下进行回流反应,获得包含所述喹啉类二聚体的产物。

3. 如权利要求2所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:所述步骤S01中,各反应原料的投料量按照摩尔比为8-羟基-2-甲基喹啉:双卤代烷:碳酸钾= $(25\sim 35):(5\sim 15):(27\sim 35)$ 。

4. 如权利要求2~3任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:所述双卤代烷的通式为 $\text{CH}_2)_n(\text{X})_2$,其中,X为Cl或Br, $n=10$ 。

5. 如权利要求2~3任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:还包括对获得的包含所述喹啉类二聚体的产物进行萃取、干燥的步骤。

6. 如权利要求5所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:所述萃取为采用乙酸乙酯进行反复萃取;和/或所述干燥为采用无水硫酸钠进行干燥。

7. 如权利要求2~3任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:还包括向包含所述喹啉类二聚体的产物中加入过量的水以水解过量的所述卤代烷的步骤。

8. 如权利要求2~3任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法,其特征在于:所述有机溶剂为乙腈。

9. 如权利要求1所述的喹啉类二聚体或者如权利要求2~8任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法制备的喹啉类二聚体在用于制备预防非酒精性脂肪肝药物中的应用。

10. 如权利要求1所述的喹啉类二聚体或者如权利要求2~8任一项所述的喹啉类二聚体的制备方法制备的喹啉类二聚体在用于制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。

喹啉类二聚体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及喹啉类药物技术领域,尤其涉及一种喹啉类二聚体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是一组与遗传、环境以及代谢应激相互作用的临床代谢综合征,病理特点是弥漫性肝细胞脂肪性病变。按其疾病的发展,可表现为单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪性肝纤维化和肝硬化。许多研究同时证实NAFLD可增加心血管疾病发病风险和2型糖尿病发病率;NAFLD持续存在并被认为是导致肝癌的重要因素之一。因此,进行NAFLD的防治具有重要的现实意义。

[0003] NAFLD是欧美等西方发达国家最常见的慢性肝病,普通成人平均患病率为20%~30%,其中NASH和肝硬化分别占10%~20%和2%~3%。近年我国随着人们生活水平的提高、膳食结构的改变以及滥用药物等因素影响,NAFLD的发病率呈逐年上升趋势,2016最新报告指出中国在NAFLD全球发病率方面,已经上升至首位,导致预期寿命缩短,严重危害国民健康。而且随着肥胖症儿童的增多,NAFLD的患病年龄也有下降的趋势。

[0004] 现有的治疗NAFLD主要包括两个方面,一是改变生活方式;一是药物治疗(如抗氧化剂、胰岛素增敏剂、他汀类、减肥手术)。(1) 由于脂肪肝早期无明显症状而容易被忽视,单纯性脂肪肝属可逆性疾病,早期诊断并及时治疗常可以恢复正常。改变生活方式(运动或者控制饮食)仍然是NAFLD的一线治疗方案,但容易被忽视和难以坚持。对于重度肥胖患者,生活方式干预效果并不理想。待肝脏发生脂肪性肝炎或者肝硬化病变时,针对肝脏脂肪蓄积和代谢应激治疗。(2) 抗氧化剂维生素E是非糖尿病有肝炎的一线药物,可以改善单纯性脂肪肝及降低转氨酶水平,但对肝纤维化没有改善。(3) 胰岛素增敏剂吡格列酮可明显减轻脂肪性肝炎患者肝脏脂肪变性,改善脂肪性肝炎及肝纤维化,但长期吡格列酮治疗可能导致脂肪性肝炎患者增加充膀胱癌的发生,在使用该药物时需要考虑长期治疗的安全性问题。(4) 代谢应激损伤后引起氧化应激治疗:服用己酮可可碱一年可明显减轻NASH患者肝脏脂肪变性,可是及后的大规模试验中,其有效性尚未确立。(5) 对准肠道的药物:索利霉素是临床试验中新一代大环内脂类抗菌素,老鼠模型已证明减少肝脏脂肪变性和炎症,降低血糖水平和下调肝脏的糖异生酶,可是其机制还未精准确定,安全性和有效性还需要通过临床试验才能确立。

[0005] 存在于自然植物中的含氮生物碱是自然界中一种基本的具有生物活性的物质,它拥有广泛的生物活性,例如抗真菌、细菌,抑制HIV-1病毒增殖等。尚未有报导表明以喹啉结构为基础的喹啉类二聚体有改善脂肪肝的作用。因此对其进行合成,研究是否可以筛选出有助改善脂肪肝的新型二聚体药物的潜力小分子化合物有重要意义。

发明内容

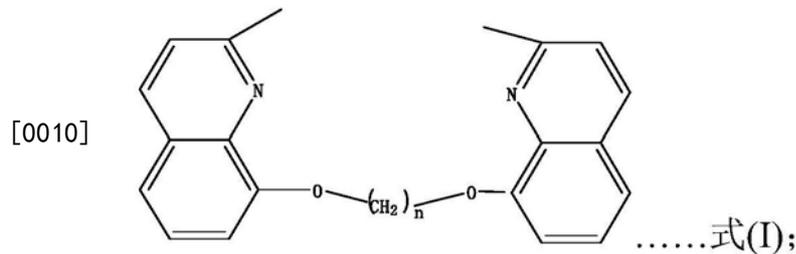
[0006] 针对现有治疗脂肪肝的药物存在的安全性、有效性等无法确定问题,本发明提供

一种喹啉类二聚体及其制备方法。

[0007] 进一步地,在上述喹啉类二聚体的基础上,本发明还提供由上述喹啉类二聚体的应用。

[0008] 为达到上述发明目的,本发明实施例采用了如下的技术方案:

[0009] 一种喹啉类二聚体,具有如式(I)所示的通式:



[0011] 其中, $n=10$ 。

[0012] 相应地,该喹啉类二聚体的制备方法,至少包括以下步骤:

[0013] 步骤S01、将8-羟基-2-甲基喹啉与双卤代烷溶解于有机溶剂中,获得混合溶液,并向所述混合溶液中加入碳酸钾,搅拌溶解,获得反应液;

[0014] 步骤S02、将所述反应液加热在 $90\sim 110^{\circ}\text{C}$,并在所述温度下进行回流反应,获得包含所述喹啉类二聚体的产物。

[0015] 进一步地,上述所述的喹啉类二聚体或者如上述所述的喹啉类二聚体的制备方法制备的喹啉类二聚体在用于制备预防非酒精性脂肪肝药物中的应用。

[0016] 以及上述所述的喹啉类二聚体或者如上述所述的喹啉类二聚体的制备方法制备的喹啉类二聚体在用于制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的应用。

[0017] 本发明提供的喹啉类二聚体,通过烷基碳链将两个喹啉单体连接后形成的喹啉类二聚体,表现出一定的生物活性。

[0018] 本发明提供的喹啉类二聚体的制备方法,工艺条件简单,获得的产物产率高,适合大规模工业化生产。

[0019] 本发明提供的喹啉类二聚体,由于具有一定的生物活性,因此可以作为预防酒精性脂肪肝药物的原料,包含喹啉类二聚体的预防非酒精性脂肪肝药物,具有有效抑制脂肪肝的作用。

[0020] 同时本发明提供的喹啉类二聚体,由于表现出一定的生物活性,不仅可以作为预防酒精性脂肪肝药物的原料,也可以作为治疗酒精性脂肪肝药物的原料之一,包含喹啉类二聚体的治疗非酒精性脂肪肝的药物,可以有效改善脂肪肝。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0022] 图1是本发明喹啉类二聚体中 $n=1$ 的二聚体(简称为Q021III-1C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;

- [0023] 图2是本发明喹啉类二聚体中 $n=2$ 的二聚体(简写为Q021II-2C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0024] 图3是本发明喹啉类二聚体中 $n=3$ 的二聚体(简写为Q021II-3C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0025] 图4是本发明喹啉类二聚体中 $n=4$ 的二聚体(简写为Q021II-4C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0026] 图5是本发明喹啉类二聚体中 $n=5$ 的二聚体(简写为Q021II-5C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0027] 图6是本发明喹啉类二聚体中 $n=6$ 的二聚体(简写为Q021II-6C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0028] 图7是本发明喹啉类二聚体中 $n=7$ 的二聚体(简写为Q021II-7C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0029] 图8是本发明喹啉类二聚体中 $n=8$ 的二聚体(简写为Q021II-8C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0030] 图9是本发明喹啉类二聚体中 $n=9$ 的二聚体(简写为Q021II-9C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0031] 图10是本发明对照组中采用尼罗红试剂对L02细胞进行染色的染色效果图;
- [0032] 图11是本发明采用尼罗红试剂对脂肪酸(FFA)进行染色的染色效果图;
- [0033] 图12是本发明采用尼罗红试剂对包含脂肪酸(FFA)和浓度为 $0.3\mu\text{M}$ 喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)进行染色的染色效果图;
- [0034] 图13是本发明采用尼罗红试剂对包含脂肪酸(FFA)和浓度为 $1\mu\text{M}$ 喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)进行染色的染色效果图;
- [0035] 图14是本发明采用尼罗红试剂对包含脂肪酸(FFA)和浓度为 $3\mu\text{M}$ 喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)进行染色的染色效果图;
- [0036] 图15是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02细胞脂质堆积图;
- [0037] 图16是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)对L02细胞毒性的作用示意图;
- [0038] 图17是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)对LC3B-II蛋白水平的表达;
- [0039] 图18是本发明LC3B-II蛋白水平的柱状图;
- [0040] 图19是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)对GFP-LC3转染的空白对照图;
- [0041] 图20是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)对GFP-LC3转染图;
- [0042] 图21是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)的GFP-LC3Dots/cell图;
- [0043] 图22是本发明喹啉类二聚体中 $n=10$ 的二聚体(简写为Q021II-10C)对PPAR α 蛋白水平的表达;

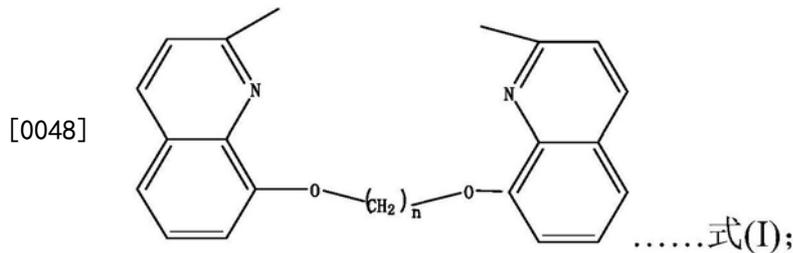
[0044] 图23是本发明PPAR α 蛋白水平的柱状图；

[0045] 其中,Lipid content表示脂含量;FFA表示游离脂肪酸;Control表示空白对照组;cell viability表示细胞活性;LC3B-II protein level表示LC3B-II蛋白水平;#p<0.05、##p<0.01、###p<0.001,均是相对于空白对照组;*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001,均是相对于FFA组。

具体实施方式

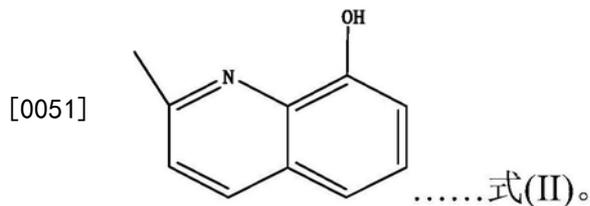
[0046] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0047] 本发明实施例提供喹啉类二聚体。所述喹啉类二聚体具有如式(I)所示的通式:



[0049] 其中,n=10。

[0050] 该喹啉类二聚体可以采用如结构式(II)所示的物质作为原料,与双卤代烷进行反应获得。



[0052] 具体地,上述结构式(II)所示的物质为8-羟基-2-甲基喹啉;双卤代烷的通式为 $(CH_2)_n(X)_2$,其中,X为Cl或Br,n=10,双卤代烷既可以是直链结构也可以是支链结构。优选直链双卤代烷,直链双卤代烷在与8-羟基-2-甲基喹啉进行反应时,生成的喹啉类二聚体,中间连接的碳链为直链,生物活性明显。

[0053] 根据合成的喹啉类二聚体的n值的不同,可将合成的物质按照n值做如下的简称:n=1,简称Q021II-1C;n=2,简称Q021II-2C;n=3,简称Q021II-3C;n=4,简称Q021II-4C;n=5,简称Q021II-5C;n=6,简称Q021II-6C;n=7,简称Q021II-7C;n=8,简称Q021II-8C;n=9,简称Q021II-9C;n=10,简称Q021II-10C。

[0054] 本发明的喹啉类二聚体,具有一定的生物活性,可以用于药物的制备中。

[0055] 进一步地,本发明提供的喹啉类二聚体可以由以下步骤制备:

[0056] 步骤S01、将8-羟基-2-甲基喹啉与双卤代烷溶解于有机溶剂中,获得混合溶液,并向所述混合溶液中加入碳酸钾,搅拌溶解,获得反应液;

[0057] 步骤S02、将所述反应液加热至90~110 $^{\circ}C$,并在该温度下进行回流反应,获得包含所述喹啉类二聚体的产物。

[0058] 下面对制备方法做进一步的解释说明:

[0059] 具体地,在制备喹啉类二聚体时,反应原料8-羟基-2-甲基喹啉、双卤代烷以及碳酸钾的投料比例,按照摩尔比为8-羟基-2-甲基喹啉:双卤代烷:碳酸钾=(25~35):(5~15):(27~35)。

[0060] 双卤代烷可以稍微过量,在反应结束并冷却后,向所述反应溶液中加入过量去离子水,使剩余的双卤代烷发生水解。

[0061] 优选地,所述有机溶剂为乙腈。

[0062] 步骤S02反应结束后,还包括采用乙酸乙酯萃取包含所述喹啉类二聚体的产物,反复萃取3~5次,然后将萃取后的有机层进行合并,并通过干燥剂对上述有机层进行干燥处理。

[0063] 干燥处理后还通过减压抽滤去除残留的溶剂,最后通过硅胶柱色谱纯化产品,获得高纯度的喹啉类二聚体产物。经过薄层色谱分析,得到的n值不同的喹啉类二聚体产率基本为n=1,12%;n=2,1%;n=3,45%;n=4,23%;n=5,92%;n=6,42%;n=7,43%;n=8,37%;n=9,少量;n=10,22%左右。

[0064] 本发明实施例提供的喹啉类二聚体的制备方法,工艺条件简单,获得的产物产率高,适合大规模工业化生产。

[0065] 由于本发明提供的喹啉类二聚体具有一定的生物活性,可以作为预防非酒精性脂肪肝药物的活性成分,也可以作为治疗非酒精性脂肪肝药物的活性成分。因此,可以应用于预防非酒精性脂肪肝药物的制备以及治疗非酒精性脂肪肝药物的制备中。

[0066] 进一步地,本发明还提供了一种肠溶衣小丸的配方,该肠溶衣小丸可用于预防和/或治疗非酒精性脂肪肝。

[0067] 所述肠溶衣小丸配方按照重量百分比,包括以下配方组分:

活性剂	20%~25%;
填充剂	60%~65%;
密封衣	1.0%~1.5%;
肠溶衣	10.0%~12.0%;
助流剂	0.18%~0.25%;
增塑剂	0.60%~1.0%;
中和剂	0.20%~0.30%;
表面活性剂	0.01%~0.02%;
润滑剂	2.5%~3.0%。

[0069] 具体地,优选地,上述活性剂为喹啉类二聚体中的Q021II-10C;填充剂为微晶纤维素;密封衣为Opadry II Clear(透明欧巴代);

[0070] 所述肠溶衣为Eudragit®L30D-55干燥聚合物;助流剂为甘油三酯和甘油二酯;所述增塑剂为柠檬酸三乙酯;中和剂为氢氧化钠或者氢氧化钾;所述表面活性剂为聚山梨酯

80;所述润滑剂为滑石粉。

[0071] 上述肠溶衣小丸在制备时,需要添加适量的纯净水作为溶媒,以便于各个组分进行搅拌融合。

[0072] 为了验证本发明提供的喹啉类二聚体在调节脂肪肝的机制及作用,下面采用游离脂肪酸(FFA)诱导人肝细胞(L02)脂肪变性模型进行验证试验。

[0073] (1) 游离脂肪酸制备及药物处理

[0074] 依据已有的方法,如按照Gómez-Lechón et al.2007;J.-w.Wang et al.2014提到的,使用游离脂肪酸混合物(油酸:棕榈酸=2:1)处理细胞建立模型来模仿人体慢性良性脂肪肝。

[0075] 将100mM的棕榈酸溶解于由水和乙醇按照水:乙醇=1:1(v/v)形成的混合溶剂中,于80℃放置5min,而后用10%无游离脂肪酸的胎牛血清蛋白溶液(BSA)将所述棕榈酸溶液稀释至10mM,并于37℃放置1h使其充分溶解。

[0076] 将10mM的油酸溶于10%无游离脂肪酸的BSA溶液备用。

[0077] 使用10%无游离脂肪酸的BSA溶液及乙醇处理空白组细胞(Control)。

[0078] (2) 细胞培养、药物处理方式及细胞存活率测定

[0079] 用含10%胎牛血清及100U/mL青霉素/链霉素的培养液(DMEM,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)培养人体肝脏细胞L02(上海生物科学研究所,中国)。细胞在含5%CO₂、37℃的湿润培养箱中生长。将细胞铺板于96孔板,6孔板,或共聚焦培养皿中使其达到70-80%融合率。

[0080] 用MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)法测定不同处理条件下细胞存活率。喹啉类二聚体(Q021II-1C-10C)溶解在二甲基亚砷中配成储存液浓度,喹啉类二聚体在加入游离脂肪酸造模前2h加入细胞内,再共同作用24h后,弃掉培养液,将其换成含0.5mg/mL MTT的培养液,37℃下培育2h。而后将培养液弃掉,每孔加入100μL DMSO使产生的甲瓚晶体充分溶解。于570nm波长及655nm参考波长下读取吸光值测定细胞存活率。设定空白组细胞存活率为100%,计算结果,具体结果详见说明书附图1~9、15所示。

[0081] 从图1~9、15可知,采用游离脂肪酸(FFA)诱导的L02脂肪肝细胞模型对合成的喹啉类二聚体(Q021II-1C~10C)进行筛选,实验结果发现Q021II-10C具有抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02肝细胞质堆积的作用,和正常组相比,^{####}p<0.001,和脂肪酸(FFA)相比,^{**}p<0.01,^{***}p<0.001;而Q021II-1C~9C则没有抑制脂肪酸(FFA)诱导的L02肝细胞质堆积的作用,和正常组相比,^{####}p<0.001。

[0082] (3) 尼罗红(Nile red)试剂染色

[0083] 用尼罗红试剂对L02细胞进行染色,测定细胞内中性脂滴堆积。喹啉类二聚体在加入游离脂肪酸造模前2小时加入细胞内,再共同作用24h后,使用磷酸盐缓冲液清洗,并用4%多聚甲醛室温下固定20min。再次清洗后,用3μM的尼罗红(Sigma-Aldrich)溶液于室温下染色15min。再次清洗,除去多余染料。使用CLARIOstar荧光酶标仪(BMG Labtech)于488nm激发波长520nm发射波长下测定荧光值。使用HyD探测器共聚焦激光扫描显微镜(TCS SP8,Leica)采集图像。具体详见说明书附图10~16。

[0084] 从图10可知,中性脂肪(图中白色点所示),正常组中性脂肪较少;

- [0085] 从图11可知,中性脂肪(图中白色点所示),脂肪酸组(模型组)中性脂肪明显增多;
- [0086] 从图12可知,中性脂肪(图中白色点所示),0.3 μ M Q021II-10C组降低中性脂肪;
- [0087] 从图13可知,中性脂肪(图中白色点所示),1 μ M Q021II-10C组降低中性脂肪;
- [0088] 从图14可知,中性脂肪(图中白色点所示),3 μ M Q021II-10C组降低中性脂肪;
- [0089] 从图15可知,和正常组比,^{###} $p < 0.001$;和脂肪酸(FFA)组相比,^{**} $p < 0.01$,^{***} $p < 0.001$;
- [0090] 从图16可知,Q021II-10C对L02肝细胞没有毒性。
- [0091] (4) GFP-LC3转染
- [0092] 使用病毒表达GFP-LC3 (human; Ad-GFP-LC3) 基因。将GFP-LC3cDNA克隆到pLenti-CMV-Puro-DEST载体 (Addgene) 中。而后将构建好的GFP-LC3质粒连同psPAX2, pMD2.G各1 μ g转入HEK293T细胞中,使其产生病毒。
- [0093] 将L02细胞以 4×10^5 密度铺板于6孔板,隔天加入500 μ L制备好的GFP-LC3病毒血清和1mL含8 μ g/mL polybrene的新鲜培养液。两天后用1 μ g/mL嘌呤霉素筛选成功转入GFP-LC3的细胞。3-5天后收集含嘌呤霉素抗性基因的细胞,此时所得的细胞为可稳定表达GFP-LC3的细胞。将所得细胞铺板后,Q021II-10C加入游离脂肪酸造模前2小时加入细胞内,再共同作用24小时后处理,于荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i,Nikon Instrument Inc.,USA)下检测绿色荧光蛋白的表达。每次实验计数不少于50个细胞。检测结果详见说明书附图17~21。
- [0094] 从图17可知,Q021II-10C能增强自噬蛋白(LC3II)水平表达;
- [0095] 从图18可知,Q021II-10C能增强LC3II蛋白表达水平,和正常组比,[#] $p < 0.01$;和脂肪酸(FFA)组相比,^{*} $p < 0.05$;
- [0096] 从图19可知,所见正常组GFP-LC3Punta很少,GFP-LC3Punta为散在的绿色点形状(图白色部分);
- [0097] 从图20可知,L02肝细胞转染GFP-LC3后,Q021II-10C能促进GFP-LC3Punta增多;GFP-LC3Punta为散在的绿色点形状(图白色部分)
- [0098] 从图21可知,Q021II-10C促进GFP-LC3Punta增多,并且和正常组比,^{###} $p < 0.001$ 。
- [0099] (5) Western免疫印迹检测蛋白表达
- [0100] Q021II-10C加入游离脂肪酸造模前2小时加入细胞内,再共同作用24小时后处理细胞,提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。蛋白样本变性后进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,以5%牛血清白蛋白(BSA)封闭1h,加入相应浓度的抗体,孵育一抗过夜,TBST洗膜后加入二抗(1:1000),室温孵育2h。TBST洗膜后用ECL发光液显色成像。实验重复3次。Quantity One软件比较目的条带相对灰度值。测试结果详见说明书附图22~23。
- [0101] 从图22中可知,Q021II-10C促进PPAR α 蛋白的表达;
- [0102] 从图23可知,Q021II-10C促进PPAR α 蛋白表达水平,并且和正常组比,[#] $p < 0.05$;和脂肪酸(FFA)组相比,^{*} $p < 0.05$ 。
- [0103] 由以上机制研究结果表明Q021II-10C能有效促进自噬蛋白和PPAR α 蛋白表达水平来抑制脂肪酸诱导的L02肝细胞脂质堆积,从而起到改善脂肪肝的作用。
- [0104] 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、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

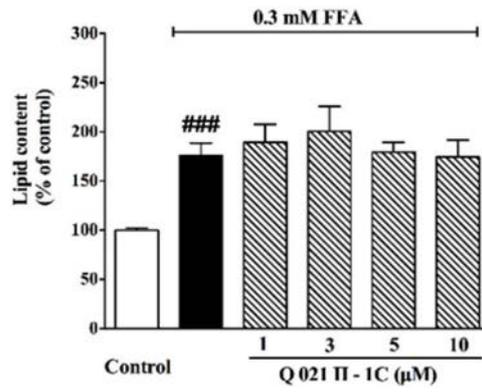


图1

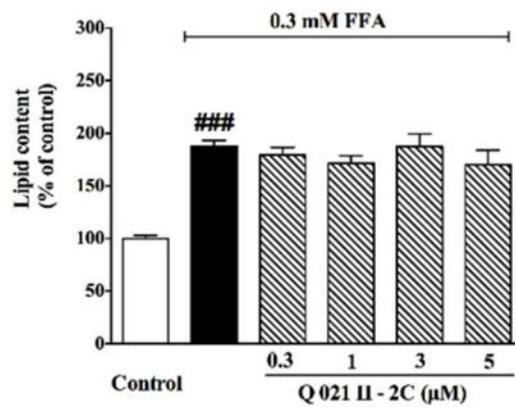


图2

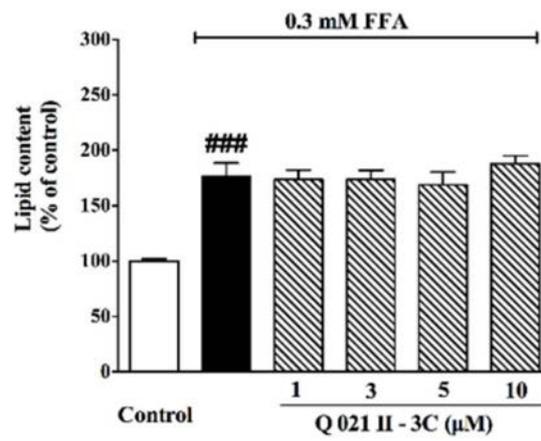


图3

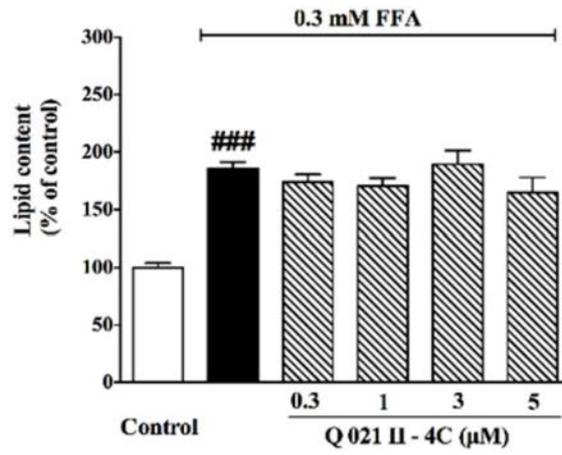


图4

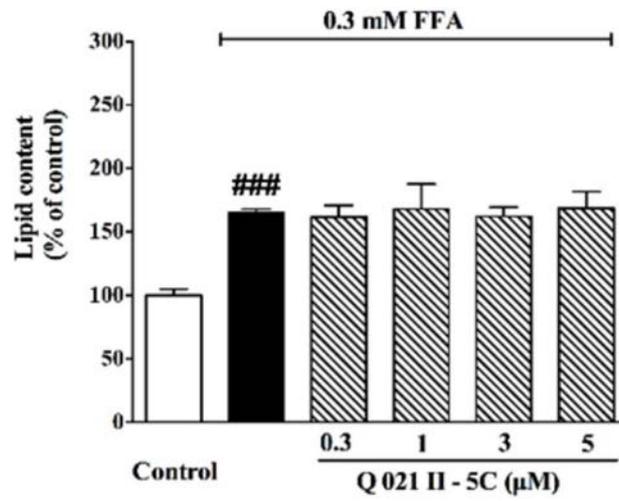


图5

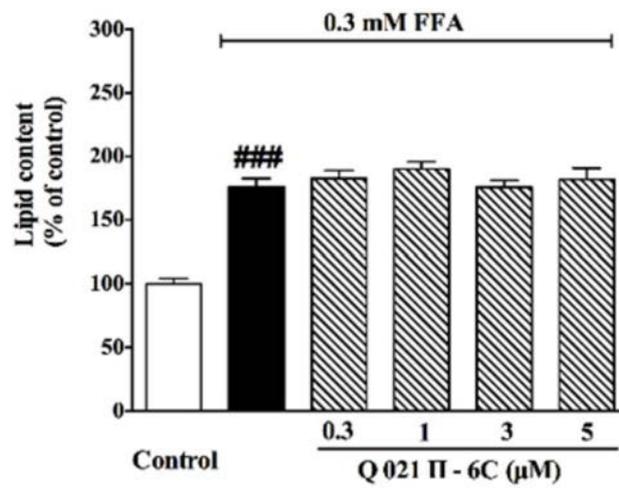


图6

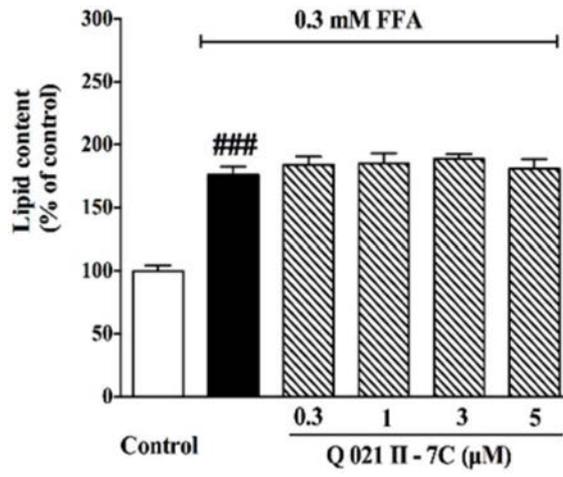


图7

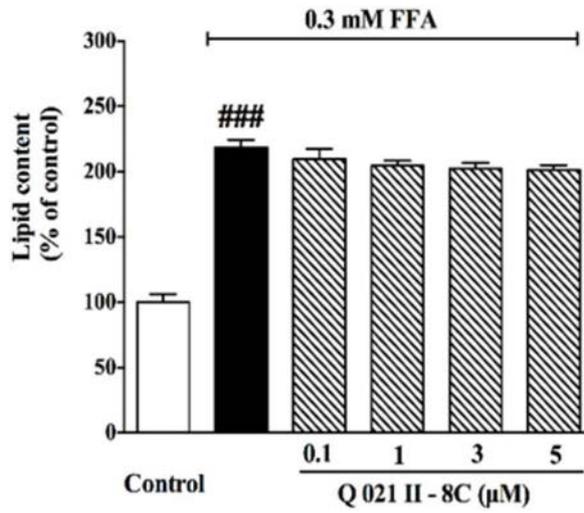


图8

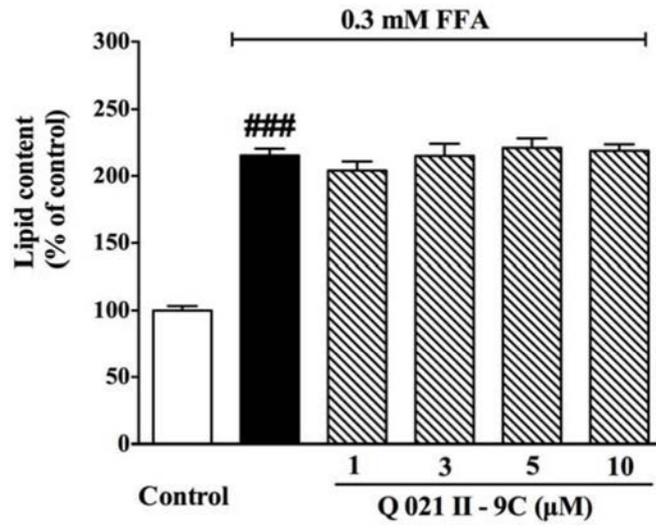


图9

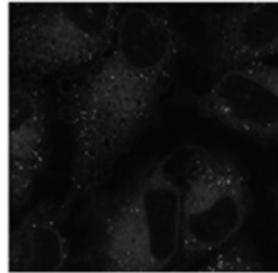


图10

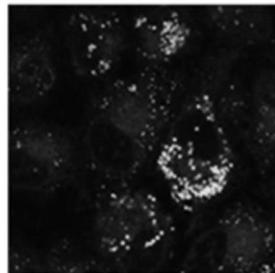


图11

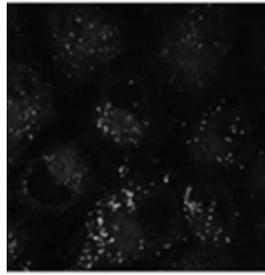


图12

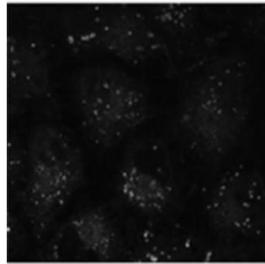


图13

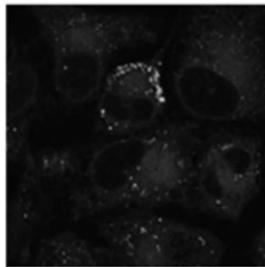


图14

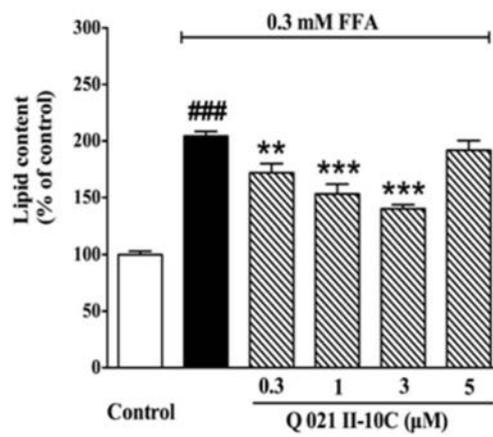


图15

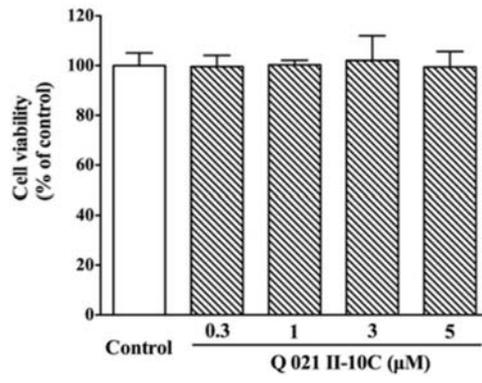


图16



图17

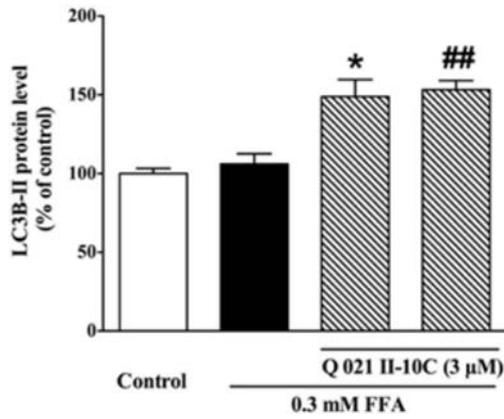


图18

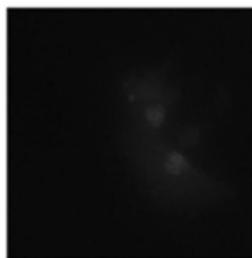


图19

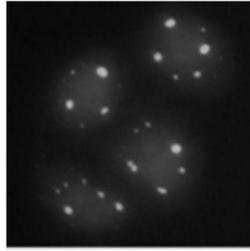


图20

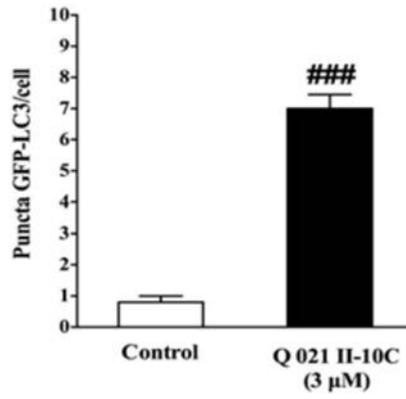


图21

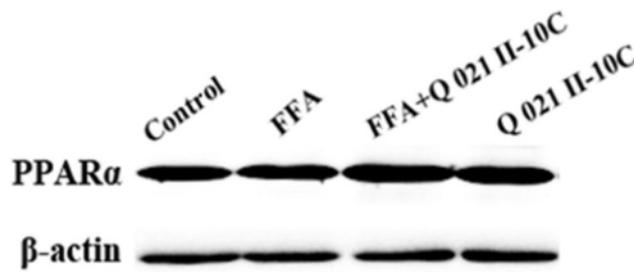


图22

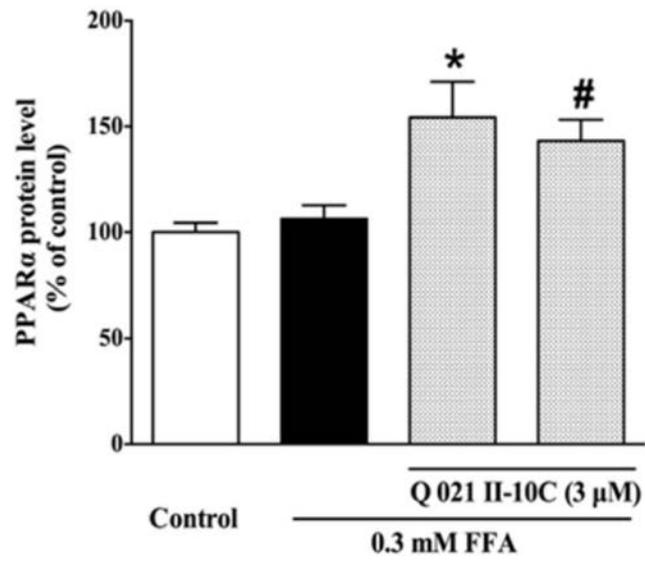


图23