

一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中的应用

相关申请的交叉引用

本申请要求享有于 2023 年 07 月 25 日提交的名称为“一种五灵制剂在制备预防或治疗
5 非酒精性脂肪肝的药物中的应用”的中国专利申请 202310919939.7 和 2024 年 03 月 07 日提
交的名称为“一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中的应用”的中国专利
申请 202410263883.9 的优先权，上述两个申请的全部内容通过引用并入本文中。

技术领域

本申请涉及中药领域，具体涉及一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的
10 物中的应用。

背景技术

脂肪肝以脂质在肝细胞的过量沉积为本质特征，当肝细胞内脂质蓄积超过肝湿重的
5%，或组织学上每单位面积见 1/3 以上的肝细胞脂变时，称为脂肪肝。非酒精性脂肪肝
(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是除酒精和其他明确的肝损伤因素外所致的，以
15 弥漫性肝细胞大泡性脂肪病变为主要特征的临床病理综合征。肝内脂质堆积是非酒精性脂
肪肝形成的主要原因，其病理学表现为肝细胞空泡样脂肪变性，肝小叶内炎症及肝细胞坏
死，气球样变等。随着全球肥胖和代谢综合征发病率的大幅上升，目前，NAFLD 已成为全
球最为常见的慢性肝脏代谢疾病，也是我国现今第一大慢性肝病。

非酒精性脂肪性肝病是慢性肝病(如肝纤维化和肝癌)和代谢紊乱(如肥胖、II型糖尿病
20 和动脉粥样硬化)的最常见前兆之一。NAFLD 患者无法从这种情况中康复，相反，该疾病
会继续发展为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝细胞纤维化、肝硬化，而且作为代谢综合征
的重要组分与心脑血管疾病密切相关，严重影响了人们的身体健康和生活质量，也给社会
带来沉重负担。

目前，针对于脂肪肝的治疗仍以去除病因、积极治疗原发病和坚持合理饮食为主，药
25 物仅起辅助治疗作用。目前临床上用于治疗脂肪肝的药物主要分为降血脂药、护肝降脂药
和中医中药，但是这些药物的成分复杂，制备工艺复杂。

发明内容

本申请提供了一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中的应用。

本申请的第一方面提供了一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中
30 的应用。

在一些实施方式中，以重量份计，五灵制剂包括：柴胡 200 份-400 份、灵芝 100 份-
200 份、丹参 200 份-350 份、五味子 250 份-350 份。

在一些实施方式中，以重量份计，五灵制剂包括：柴胡 300 份-350 份、灵芝 150 份-
180 份、丹参 300 份-350 份、五味子 300 份-350 份。

在一些实施方式中，以重量份计，五灵制剂包括：柴胡 342 份、灵芝 173 份、丹参 342 份、五味子 342 份。

在一些实施方式中，五灵制剂的剂型为成水煎剂、丸剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。

5 在一些实施方式中，五灵制剂选自五灵胶囊、五灵丸、五灵散中的任意一种。

在一些实施方式中，五灵制剂以成人 3g-6g/次的给药剂量给药，且每天共给药三次。

五灵制剂的药物有效成分包括柴胡、灵芝、丹参和五味子，成分简单，但四味药协同作用，在预防或治疗非酒精性脂肪肝方面发挥有效作用。

说明书附图

10 为了更清楚地说明本申请实施例的技术方案，下面将对本申请实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本申请的一些实施例，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，还可以根据附图获得其他的附图。

图 1 示出了本申请实施例 1 中五灵胶囊处理后斑马鱼肝脏脂肪染色强度典型图，其中黄色虚线框为肝脏。

15 图 2 示出了本申请实施例 1 中五灵胶囊处理后斑马鱼肝脏组织结构典型图，其中，黄色虚线框为分析部位斑马鱼肝脏，红箭头所指为肝细胞肿大，黑箭头所指为脂肪空泡样变性。

具体实施方式

20 下面结合实施例对本申请的实施方式作进一步详细描述。以下实施例的详细描述用于示例性地说明本申请的原理，但不能用来限制本申请的范围，即本申请不限于所描述的实施例。

如本申请背景技术所分析的，现有技术中虽然有一些用于治疗非酒精性脂肪肝的中药组合物，但是这些中药组合物的组成复杂。另外，申请人对目前临床用于治疗慢性肝炎、乙肝、肝硬化、乙肝肝纤维化、代偿性肝硬化等方面具有疗效的药物进行研究，发现在上述病症方面具有效果的药物在治疗非酒脂肪肝方面并非具有指导作用，比如复方鳖甲软肝片对上述病症具有显著疗效，但是对非酒脂肪肝没有疗效。

在本申请一种实施方式中，提供了一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中应用。

30 五灵制剂的药物有效成分包括柴胡、灵芝、丹参和五味子，成分简单，但四味药协同作用，在预防或治疗非酒精性脂肪肝方面发挥有效作用。其中，柴胡辛行苦泄，性善条达肝气，疏肝解郁，用为君药；灵芝甘平，益气健脾，补中扶正；丹参活血化瘀，通经止痛，共为臣药；五味子酸甘性温，补气养阴，可佐助灵芝益气补中，并安定心神，消除郁闷不乐，还能防柴胡疏泄升散而耗气伤阴，保肝降酶，行佐制之用。诸药同用，肝脾同治，气血并调，收散兼用。诸药合用，共奏疏肝解郁，益气健脾，活血化瘀之功，可显著改善非

酒精性脂肪肝患者的肝区疼痛，脘腹闷胀、疲乏无力，食欲不振等症状，降低血生化指标。

5 为了进一步改善四味药的协同作用，在本申请一些实施方式中，以重量份计，优选五灵制剂包括：柴胡 200 份-400 份、灵芝 100 份-200 份、丹参 200 份-350 份、五味子 250 份-350 份。更优选以重量份计，五灵制剂包括：柴胡 300 份-350 份、灵芝 150 份-180 份、丹参 300 份-350 份、五味子 300 份-350 份。进一步优选以重量份计，五灵制剂包括：柴胡 342 份、灵芝 173 份、丹参 342 份、五味子 342 份。

本申请的五灵制剂可以以常规任意剂型使用，在一些实施方式中，上述五灵制剂的剂型为成水煎剂、丸剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。上述各剂型的制备工艺较为成熟，便于五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中的应用。

10 在一些实施方式中，五灵制剂选自五灵胶囊、五灵丸、五灵散中的任意一种。上述各制剂均为已有成药制剂，更有利于本申请应用的实施。

本申请发明人经过实验反复论证得到如下公式，利用本申请的斑马鱼的有效安全浓度采用以下公式计算得到等效的理论人用剂量：

$$\text{人 (g/次)} = [\text{斑马鱼用浓度 (}\mu\text{g/mL)} \times 6/100] \times 2。$$

15 基于上述换算，在一些实施方式中，五灵制剂以成人 3g-6g/次的给药剂量给药，且每天共给药三次。上述给药剂量对非酒精性脂肪肝具有显著的治疗效果且对人体副作用较小。

以下将结合实施例和对比例，进一步说明本申请的有益效果，但本发明范围不限于这些实施例。

实施例 1

20 所用五灵胶囊由清华德人西安幸福制药有限公司提供。

1. 实验原理及方法

25 实验原理：斑马鱼和人在肝脏结构、功能和遗传学方面相似性高，除免疫 Kupffer 细胞外，斑马鱼含人肝脏中其他细胞类型，并拥有相同功能，包括胆汁分泌、糖原和脂质储存、胰岛素反应、异生物质和氮代谢以及血清蛋白的分泌，如补体和凝血因子、转铁蛋白和白蛋白样蛋白。斑马鱼受精 5 天内肝脏功能发育完全，可进行所有肝功能评估，斑马鱼是研究肝病疾病的重要模型。高糖高脂饲喂斑马鱼，其所提供的能量往往超过鱼自身所需，过剩的能量以脂肪的形式储存在肝脏中，使肝脏中脂肪含量持续增加，诱发肝细胞脂肪变性，最终导致脂肪肝。

样品配制信息：

30 五灵胶囊，溶剂为标准稀释水。

阳性对照：阿托伐他汀钙片（以下简称阿托伐他汀钙），白色片剂，批号 FR7909，辉瑞制药有限公司，溶剂为 DMSO。

实验动物：

斑马鱼均饲养于 28℃的养鱼用水中（水质：每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450~550 μS/cm；pH 为 6.5~8.5；硬度为 50~100 mg/L CaCO₃），由本公司养鱼中心繁殖提供，实验动物使用许可证号为：SYXK（浙）2022-0004，饲养管理符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求，IACUC 伦理审查号：IACUC-2023-7689-01。

仪器、耗材与试剂:

解剖显微镜（SZX7, OLYMPUS, Japan）；CCD 相机（VertA1, 上海土森视觉科技有限公司, China）；精密电子天平（CP214, OHAUS, America）；6 孔板（浙江贝兰伯生物技术有限公司, China）；双人单面净化工作台（SW-CJ-215KS, 上海苏净实业有限公司, China）；切片机（KD2258, 金华科迪医疗器械有限公司, China）；生物显微镜（CX31, OLYMPUS, Japan）。

二甲基亚砜（DMSO, 批号 BCCD8942, Sigma, Switzerland）；甲基纤维素（批号 C2004046, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, China）；无水乙醇（批号 20230329, 国药集团化学试剂有限公司, China）；油红 O（批号 SHBN4926, Sigma, USA）；1, 2-丙二醇（批号 20211117, 国药集团化学试剂有限公司, China）；4%组织细胞固定液（批号 20221014, 北京索莱宝科技有限公司, China）；二甲苯（批号 C14165111, 上海麦克林生化科技有限公司, China）；PBS 缓冲液（批号 70115000, Biosharp, China）；Mayer 苏木素染色液（批号 20220120, 上海依赫生物科技有限公司, China）；伊红染色液（批号 20220120, 上海依赫生物科技有限公司, China）；中性树胶（批号 330A021, Solarbio, China）；高效切片石蜡（熔点 54-56℃, 批号 20201020, 上海华永石蜡有限公司, China）；高效切片石蜡（熔点 62-64℃, 批号 20210828, 上海华永石蜡有限公司, China）。

实验方法如下:

(1) 确定五灵胶囊的 MTC

随机选取受精后 5dpf 黑色素等位基因突变型 AB 品系斑马鱼于烧杯中，每烧杯均处理 30 尾斑马鱼。样品设置 5 个检测浓度组，样品以溶液形式添加微孔板/烧杯中给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，共七个实验组，每烧杯容量为 25 mL。检测浓度组水溶给予五灵胶囊（浓度见表 1），除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予高糖高脂饲料建立斑马鱼食物（高糖高脂饲料）诱导的脂肪肝模型（具体为白天水溶给予 1.5 mg/mL 的蛋黄粉溶液，晚上水溶给予 30 mg/mL 的葡萄糖溶液，建立斑马鱼食源性脂肪肝模型）。28 °C 处理 2 天后，统计各实验组的斑马鱼死亡数量与毒性情况，确定样品的 MTC。结果记录在表 1 中。

表 1 五灵胶囊对食源性脂肪肝辅助保护功效浓度摸索实验结果（n = 30）

组别	浓度（μg/mL）	死亡数（尾）	死亡率（%）	表型
正常对照组	-	0	0	未见明显异常

模型对照组	-	0	0	未见明显异常
	25	0	0	与模型对照组状态相似
检测浓度组	50	0	0	与模型对照组状态相似
	100	6	20	-
	200	30	100	-
	400	30	100	-

可见，五灵胶囊对食源性脂肪肝辅助保护功效斑马鱼 MTC 为 50.0 μg/mL。

(2) 肝脏脂肪变性程度

随机选取 5 dpf 黑色素等位基因突变 Albino 品系斑马鱼于烧杯中，每烧杯均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予五灵胶囊（浓度见表 2），样品以溶液形式添加烧杯中给予样品，同时设置正常对照组、模型对照组、阳性对照（阳性对照阿托伐他汀钙 11.6 μg/mL 浓度）和样品 3 个检测浓度组（分别为 MTC 50μg/mL、1/2MTC 25.0μg/mL 和 1/4MTC12.5μg/mL），共六组，每烧杯容量为 25 mL。除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予高糖高脂饲料建立斑马鱼食物（高糖高脂饲料）诱导的脂肪肝模型（具体地白天水溶给予 1.5 mg/mL 的蛋黄粉溶液，晚上水溶给予 30 mg/mL 的葡萄糖溶液，建立斑马鱼食源性脂肪肝模型）。28 °C处理 2 天后，用油红 O 进行整体脂肪染色，染色后每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼置于解剖显微镜下拍照，使用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件采集数据，分析斑马鱼肝脏染色强度，以该指标的统计学分析结果评价五灵胶囊食源性脂肪肝辅助保护功效。统计学处理结果采用 mean ± SE 表示。用 SPSS26.0 软件进行统计学分析，p <0.05 表明差异具有统计学意义。肝脏脂肪染色强度的图片记录在图 1 中，数据记录在表 2 中。

表 2

组别	浓度（μg/mL）	肝脏脂肪染色强度（像素，mean ± SE）
正常对照组	-	6137 ± 165***
模型对照组	-	24601 ± 695
阳性对照组	11.6	11925 ± 650***
	12.5	19332 ± 871***
检测浓度组	25.0	12023 ± 910*
	50.0	9243 ± 792***

***表示与模型对照组比较， $p < 0.001$ 。

可见，五灵胶囊具有食源性脂肪肝辅助保护功效。

(3) 肝脏病理切片

随机选取 5 dpf 野生型 Albino 品系斑马鱼，每烧杯均处理 30 尾斑马鱼，样品以溶液形式添加烧杯中给予样品，每烧杯容量为 25 mL，同时设置正常对照组、模型对照组、阳性对照（阳性对照阿托伐他汀钙 11.6 $\mu\text{g/mL}$ 浓度）和样品 3 个检测浓度组（分别为 MTC50 $\mu\text{g/mL}$ 、1/2MTC 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 1/4MTC12.5 $\mu\text{g/mL}$ ），共六组。除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予高糖高脂饲料建立斑马鱼食物（高糖高脂饲料）诱导的脂肪肝模型（具体地白天水溶给予 1.5 mg/mL 的蛋黄粉溶液，晚上水溶给予 30 mg/mL 的葡萄糖溶液，建立斑马鱼食源性脂肪肝模型）。28 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 天后，将各组斑马鱼经过固定、脱水、包埋、切片、H&E 染色等步骤，进行组织病理学观察分析。

病理切片照片见图 2。在上述实验条件下，正常对照组斑马鱼肝脏病理组织学观察显示肝细胞规则清晰，肝细胞结构正常，边缘清晰。模型对照组斑马鱼肝脏病理组织学检查显示肝细胞结构模糊，肝细胞核肿大（红色箭头所指），肝组织出现脂肪空泡样变性（黑色箭头所指），表示模型建立成功。阳性对照阿托伐他汀钙组斑马鱼肝脏病理组织学检查显示肝细胞结构较模型对照组清晰，肝细胞肿大减少，肝组织脂肪空泡样变性减少，表明阿托伐他汀钙对高糖高脂诱导的斑马鱼食源性脂肪肝有改善功效。五灵胶囊在 12.5、25.0 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组斑马鱼肝脏病理组织学检查显示肝细胞结构较模型对照组清晰，肝细胞肿大减少，肝组织脂肪空泡样变性减少，表明五灵胶囊对高糖高脂诱导的斑马鱼食源性脂肪肝具有辅助保护功效，具体表现为对肝脏组织的恢复。

需要说明的是，本申请不限于上述实施方式。上述实施方式仅为示例，在本申请的技术方案范围内具有与技术思想实质相同的构成、发挥相同作用效果的实施方式均包含在本申请的技术范围内。此外，在不脱离本申请主旨的范围内，对实施方式施加本领域技术人员能够想到的各种变形、将实施方式中的一部分构成要素加以组合而构筑的其它方式也包含在本申请的范围。

权利要求

1. 一种五灵制剂在制备预防或治疗非酒精性脂肪肝的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，以重量份计，所述五灵制剂包括：柴胡 200 份-400 份、灵芝 100 份-200 份、丹参 200 份-350 份、五味子 250 份-350 份。
3. 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，以重量份计，所述五灵制剂包括：柴胡 300 份-350 份、灵芝 150 份-180 份、丹参 300 份-350 份、五味子 300 份-350 份。
4. 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，以重量份计，所述五灵制剂包括：柴胡 342 份、灵芝 173 份、丹参 342 份、五味子 342 份。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用，其特征在于，所述五灵制剂的剂型为成水煎剂、丸剂、口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂、膏剂或散剂剂型。
6. 根据权利要求5所述的应用，其特征在于，所述五灵制剂选自五灵胶囊、五灵丸、五灵散中的任意一种。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的应用，其特征在于，所述五灵制剂以成人 3g-6g/次的给药剂量给药，且每天共给药三次。