(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105497014 B
(45)授权公告日 2021.03.30

(21)申请号 201510862701.0

(22)申请日 2011.12.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105497014 A

(43)申请公布日 2016.04.20

(30)优先权数据
61/426957 2010.12.23 US

(62)分案原申请数据
201180067142.4 2011.12.23

(73)专利权人 阿马曾提斯公司
地址 瑞士埃居布朗

(72)发明人 C.L.林施 W.布兰科-波斯 B.施奈德 C.托马斯 C.桑迪 J.奥维尔克斯 P.安德罗瓦 R.霍特库珀 E.皮里宁 L.穆希罗 D.热诺瓦

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 段菊兰 黄希贵

(51)Int.Cl.
A61K 31/366(2006.01)
A61P 3/04(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/22(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)
A61P 3/02(2006.01)
A23L 33/105(2016.01)

(56)对比文件
WO 2007127263 A2,2007.11.08
CN 101541182 A,2009.09.23
DOBROSLAWA BIALONSKA 等."Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay".《J. Agric. Food Chem》.2009,第57卷第10181-10186页.

审查员 焦士勇

权利要求书1页 说明书65页
序列表4页 附图42页

(54)发明名称

用于改善线粒体功能的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及鞣花酸在制备用于治疗或预防选自肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍的与线粒体功能相关的病症;用于与线粒体功能相关的体重控制;或用于增加与线粒体功能相关的肌肉性能或智力性能的药物中的用途。

CN 105497014 B

1.尿石素作为唯一活性成分在制备用于治疗肌肉疾病的药物中的用途。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述肌肉疾病是神经肌肉疾病。

3.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述肌肉疾病是肌病。

4.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述肌肉疾病是肌营养不良。

5.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述肌肉疾病是杜兴肌营养不良。

6.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述肌肉疾病是线粒体肌病。

7.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述尿石素选自尿石素A、尿石素B以及尿石素A和尿石素B的组合。

8.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述尿石素是尿石素A。

9.根据权利要求3所述的用途,其中所述尿石素选自尿石素A、尿石素B以及尿石素A和尿石素B的组合。

10.根据权利要求3所述的用途,其中所述尿石素是尿石素A。

11.根据权利要求4所述的用途,其中所述尿石素选自尿石素A、尿石素B以及尿石素A和尿石素B的组合。

12.根据权利要求4所述的用途,其中所述尿石素是尿石素A。

13.根据权利要求5所述的用途,其中所述尿石素选自尿石素A、尿石素B以及尿石素A和尿石素B的组合。

14.根据权利要求5所述的用途,其中所述尿石素是尿石素A。

15.根据权利要求6所述的用途,其中所述尿石素选自尿石素A、尿石素B以及尿石素A和尿石素B的组合。

16.根据权利要求6所述的用途,其中所述尿石素是尿石素A。

用于改善线粒体功能的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2011年12月23日、发明名称为“用于改善线粒体功能以及治疗神经变性疾病和认知障碍的组合物和方法”、申请号为201180067142.4的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据美国法典第35篇第119(e)条要求2010年12月23日提交的美国临时专利申请号61/426,957的权益。

技术领域

[0004] 本发明涉及鞣花酸在制备用于治疗或预防选自肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍的与线粒体功能相关的病症；用于与线粒体功能相关的体重控制;或用于增加与线粒体功能相关的肌肉性能或智力性能的药物中的用途。

背景技术

[0005] 鞣花鞣质(Ellagitannin)是在某些水果、浆果和坚果(诸如石榴、悬钩子、草莓、黑悬钩子、胡桃和杏仁)中富含的单体多酚、低聚多酚和聚合多酚。水果和浆果被广泛地在新鲜时消费,并作为饮料(诸如果汁),并且已经报道它们会促进健康。

[0006] 在商业的果汁加工方法中,鞣花鞣质(其在某些果皮中特别富含)被大量提取进果汁中。鞣花鞣质属于可水解的单宁化学类别,其在水解后释放鞣花酸。体外研究已经提示,浓度在10-100微摩尔(μM)范围内的鞣花鞣质具有潜在的抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗血栓、抗炎和抗血管生成作用。水果可能具有不同的鞣花鞣质(例如,其在从石榴制备的果汁中占优势),占优势的鞣花鞣质是安石榴苷(punicalagin)[2,3-六羟基联苯二甲酰基-4,6-gallagyl葡萄糖],其作为异构体的混合物存在。报道的石榴汁的有效抗氧化性能已经归因于安石榴苷异构体的高含量,其可以达到>2g/L果汁的水平。还已经将鞣花鞣质鉴别为石榴汁中的抗动脉粥样硬化活性化合物。还已经提出,石榴鞣花鞣质和石榴果实提取物会抑制人癌细胞的增殖和调节炎症性的亚细胞信号传递途径和细胞凋亡。参见,例如,Seeram等人.(2005)JNutrBiochem.16:360-7;Adams等人.(2006)JAgric Food Chem.54:980-85;Afaq等人.(2005)Photochem Photobiol.81:38-45;Afaq等人.(2005)Int J Cancer.113:423-33。还已经报道,石榴果实提取物会在植入了CWR22Rv1前列腺细胞的无胸腺裸鼠中减少前列腺肿瘤生长和前列腺血清抗原(PSA)水平。Malik等人.(2005)Proc NatlAcad Sci.102:14813-8。

[0007] 不幸的是,通常鞣花鞣质难以被人肠道吸收。但是,许多从鞣花鞣质衍生出的代谢物会被人肠道吸收,包括由共生微生物(即,肠微生物区系)在肠道中最终形成的某些代谢物。

[0008] 鞣花鞣质在体内生理条件下会释放出鞣花酸(ellagic acid),并且鞣花酸随后被肠中的肠微生物区系逐渐代谢以产生尿石素(urolithin)D、尿石素C、尿石素A(UA)和尿石

素B(UB)。所述代谢物一旦被吸收,它们发生葡糖醛酸化,并且一旦进入肝中,它们被进一步代谢以产生葡萄糖醛酸苷和/或硫酸盐,从而产生在胆汁中分泌的代谢物的组合。

[0009] 尿石素是鞣花酸、安石榴苷(PA)、石榴皮鞣质(punicalin)(PB)、新唢呐素(tellimagrandin)(TL)和其它鞣花鞣质的代谢物(Cerda,Espin等人.2004;Cerda,Periago等人.2005)。在石榴汁中富含鞣花酸(EA)(Gil,Tomas-Barberan等人.2000)。以前已经从石榴和其它植物中分离和表征了鞣花鞣质新唢呐素(TL)(Tanaka,Nonaka等人.1986;Tanaka,Nonaka等人.1986;Satomi,Umemura等人.1993)。UA、PA、PB、EA和TL的结构式显示在图1中。

[0010] 已经做出了大量工作来理解代谢障碍、神经变性和认知减退的机制,以便更好地设计治疗方式,包括基于天然产物的那些。关键性发现之一是,减退的线粒体能量产生(与增加的氧化性应激和细胞凋亡相对应)的影响,其在变性疾病和老化过程中起重要作用。现已证实,多种变性疾病是由线粒体DNA(mtDNA)或核DNA(nDNA)编码的线粒体基因中的突变造成。重要的是,体细胞mtDNA突变随着年龄在有丝分裂后组织(其与线粒体功能的年龄相关性减退有关)中积累,并被视作老化和衰老中的重要因素。遗传疾病可以源自mtDNA碱基置换和重排突变,并且可以影响中枢神经系统(CNS)、心肌和骨骼肌、以及肾、内分泌和血液系统。

[0011] 线粒体通过氧化磷酸化(OXPHOS)产生大部分的细胞能量,并且它们产生大部分的有毒活性氧(ROS)作为副产物。抑制OXPHOS的遗传缺陷也会造成OXPHOS电子向ROS产生的重定向,从而增加氧化性应激。线粒体能量产生的下降和氧化性应激的增加可以影响线粒体通透性转换孔(mtPTP)以启动程序性细胞死亡(细胞凋亡)。认为这3个因素的相互作用在变性疾病的病理生理学和影响身体全部组织的老化过程中起重要作用。

[0012] 在正常的脑中,最佳的认知功能主要依赖于神经元的活动和神经元之间的通信,非常复杂的细胞能够传递电信号和引起化学性神经传递。神经元功能依赖于较长的且复杂的细胞过程,其可以延伸数厘米或甚至数米来连接神经元或靶细胞,并且可以发生超过100,000次突触接触。这样,神经元高度地依赖于能量供给,并且因此暴露于氧化性应激损伤。认知功能依赖于在神经元的复杂网络内发生的细胞内信号传递的谨慎平衡。最佳认知功能可以被众多因素损伤,所述因素例如老化、细胞应激、慢性应激和神经变性障碍。通过在思考、学习、记忆、机敏方面的能力下降和/或受损的心理学技能,以及通过抑郁和焦虑,可以表征认知减退。

[0013] 还已经证实,线粒体功能在代谢障碍中是重要的。已经将糖尿病和肥胖与线粒体功能受损相关联。已经提出,线粒体的偶联效率或制备ATP所需的氧消耗的比例与肥胖水平有关,高偶联效率可能导致更高的脂肪储存物沉积(Harper,Green等人.2008)。在糖尿病中,近期的工作已经提出,线粒体功能障碍是肌细胞和脂肪细胞中的胰岛素不敏感性的原因,其根源是能量供给不足或胰岛素信号传递途径中的缺陷(Wang,Wang等人.2010)。

发明内容

[0014] 本发明涉及可以用于多种治疗用途的、包含化合物或化合物前体的组合物,所述治疗用途包括、例如,治疗和/或预防与线粒体活性下降或不足有关的疾病或障碍,包括老化或应激、糖尿病、肥胖和神经变性疾病。这些相同的化合物和组合物还可以有利地用于通常健康的个体中以增加或维持代谢速率、降低体脂百分比、增加或维持肌肉质量、控制体

重、改善或维持智力性能(包括记忆)、改善或维持肌肉性能、改善或维持心境和控制应激。

[0015] 本发明的一个目的提供了用于预防或治疗疾病状态的植物提取物、其活性级分或一种或多种可从其中分离的或合成的活性组分或代谢物,所述疾病状态开始于或者特征在于:(i)线粒体活性不足;(ii)代谢障碍诸如糖尿病和肥胖;(iii)认知功能减退;或(iv)心境障碍。

[0016] 因此,在第一方面,本发明提供了用作线粒体功能诱导物的水果提取物、其活性级分或一种或多种可从其中分离的活性组分。

[0017] 本文中使用的术语“级分”表示纯化的或部分纯化的提取物。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了用于预防或治疗疾病状态的水果提取物、其活性级分或一种或多种可从其中分离的活性组分,所述疾病状态开始于或者特征在于线粒体功能下降。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了在上文中定义的水果或提取物、或其活性级分、或一种或多种可从其中分离的活性组分用于制备药剂的用途,所述药剂用于:(i)预防或治疗疾病状态,所述疾病状态开始于或者特征在于线粒体功能下降;或(ii)改善认知或肌肉功能。这样的疾病状态可以包括、但不限于,神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、焦虑障碍、代谢障碍、糖尿病和肥胖。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了用于制备药剂的方法,所述药剂用于:(i)预防或治疗疾病状态,所述疾病状态开始于或者特征在于线粒体功能下降;或(ii)改善认知或肌肉功能;所述方法的特征在于,使用在上文中定义的水果、或其提取物或活性级分、或一种或多种可从其中分离的活性组分作为所述药剂的必需成分。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了包含活性组分和药学上可接受的载体的药物组合物,所述活性组分源自在上文中定义的水果或提取物或活性级分或一种或多种可从其中分离的活性组分。

[0022] 本发明的一个目的是,提供植物提取物、其活性级分、或一种或多种可从其中分离的或合成的活性组分或代谢物,其用于治疗会受益于线粒体活性增加的受试者中的疾病或障碍,用于(i)改善脑功能,(ii)改善代谢功能,包括糖尿病或肥胖,(iii)改善肌肉性能,和(iv)增加组织ATP水平。

[0023] 本发明的一个目的是,提供提取物、组合物和化合物,其是神经保护性的、神经营养性的和/或促进神经突生长晕(neurite outgrowth)并从而改善认知功能,以及这些化合物和组合物的使用方法。

[0024] 本发明的一个目的是,提供用于改善、保护和维持脑功能和认知的化合物和组合物。本发明的另一个目的是,改善、控制心境障碍和保护免于心境障碍。本发明的另一个目的是,保护免于应激诱发的或应激相关的障碍或征状。

[0025] 本发明的一个目的是,提供神经保护性化合物,其用于保护脑免于损伤,以及改善正常成年人的认知性能和记忆。本发明的另一个目的是,提供刺激神经元可塑性的新化合物。众所周知,神经元可塑性是记忆和认知功能所必需的关键过程。这样的化合物可以影响神经突生长晕、每个细胞的分支的数目、每个细胞的平均突起(mean processes)和甚至形成的突触的数目。

[0026] 本发明也涉及与鞣花鞣质(在石榴和其它水果中发现的生物活性的天然化合物)

有关的几种多酚化合物及其衍生物，以及含有这些化合物的生物活性的天然提取物。这些化合物包括鞣花鞣质、安石榴苷和鞣花酸，它们都存在于石榴中，但是也可以从其它水果和浆果中分离出，以及这些化合物的代谢物。如在本文中公开的，现已证实这些化合物对(i)线粒体功能、(ii)细胞代谢和(iii)神经元可塑性具有有益作用。

[0027] 使用在神经元细胞培养物和原代细胞中的神经突生长晕和突起形成(process formation)的体外建模，检验了不同化合物的有益效果。如上所述，老化、神经变性和慢性应激对神经突生长晕具有负面影响。值得注意的是，已经发现，本发明的化合物具有神经保护性能，在PC-12细胞和原代中脑神经元中表现出强刺激活性，并在动物模型中改善认知功能和记忆。

[0028] 在一个方面，本发明涉及包含本发明的化合物或其混合物的组合物，诸如药物。所述组合物也可以任选地含有额外治疗剂，或者可以与其它治疗性化合物联合施用。还提供了包装产品，其含有上述组合物和标签和/或说明书，所述标签和/或说明书是关于用于改善记忆和认知性能和/或用于治疗与在老年人中发现的病症的典型脑损伤有关的疾病或病症。

[0029] 本发明的一个方面是，包含有效量的石榴提取物的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0030] 本发明的一个方面是，包含有效量的鞣花鞣质的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0031] 本发明的一个方面是，包含有效量的安石榴苷的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0032] 本发明的一个方面是，包含有效量的鞣花酸的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0033] 本发明的一个方面是，包含有效量的尿石素的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0034] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是肥胖。

[0035] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是代谢速率下降。

[0036] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是代谢综合征。

[0037] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是糖尿病。

[0038] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是心血管疾病。

[0039] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是高脂血症。

[0040] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是神经变性疾病。

[0041] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是认知障碍。

[0042] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是心境障碍。

[0043] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是应激。

[0044] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是焦虑障碍。

[0045] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于体重控制。

[0046] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于增加肌肉性能。

[0047] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于增加智力性能。

[0048] 本发明的一个方面是，增加或维持线粒体功能的方法。所述方法包括下述步骤：使细胞与有效量的尿石素或其前体接触，以增加线粒体的功能。

[0049] 本发明的一个方面是，治疗、预防、或控制与线粒体功能改变或线粒体密度下降有关的线粒体相关疾病或病症的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗与线粒体功能改变或线粒体密度下降有关的疾病或病症。

[0050] 本发明的一个方面是，增加代谢速率的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以增加代谢速率。

[0051] 本发明的一个方面是，预防或治疗代谢综合征的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗代谢综合征。

[0052] 本发明的一个方面是，预防或治疗肥胖的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗肥胖。

[0053] 本发明的一个方面是，预防或治疗心血管疾病的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗心血管疾病。

[0054] 本发明的一个方面是，治疗高脂血症的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以治疗高脂血症。在一个实施方案中，所述高脂血症是高甘油三酯血症。在一个实施方案中，所述高脂血症是游离脂肪酸升高。

[0055] 本发明的一个方面是，治疗代谢障碍的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗代谢障碍。在一个实施方案中，所述代谢障碍是糖尿病。在一个实施方案中，所述代谢障碍是肥胖。

[0056] 本发明的一个方面是，治疗神经变性疾病的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗神经变性疾病。在一个实施方案中，所述神经变性疾病选自：艾滋病痴呆复合征(AIDS dementia complex)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)、肾上腺脑白质营养不良(adrenoleukodystrophy)、亚历山大病(Alexander disease)、阿耳珀病(Alper's disease)、共济失调性毛细血管扩张(ataxia telangiectasia)、巴藤病(Batten disease)、牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathy,BSE)、卡纳万病(Canavan disease)、皮质基底变性(corticobasal degeneration)、克雅病(Creutzfeldt-Jakob disease)、痴呆伴列维小体(dementia with路易小体)、家族致命性失眠症(fatal familial insomnia)、额颞叶退化(frontotemporal lobar degeneration)、亨廷顿病(Huntington's disease)、肯尼迪氏病(Kennedy's disease)、克拉伯病(Krabbe disease)、莱姆病(Lyme disease)、马查多-约瑟夫病(Machado-Joseph disease)、多发性

硬化(multiple sclerosis)、多系统萎缩(multiple system atrophy)、神经棘红细胞增多症(neuroacanthocytosis)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease)、帕金森病(Parkinson's disease)、皮克病(Pick's disease)、原发性侧索硬化(primary lateral sclerosis)、进行性核上麻痹(progressive supranuclear palsy)、雷夫叙姆病(Refsum disease)、Sandhoff病(Sandhoff disease)、弥散性脱髓鞘硬化(diffuse myelinoclastic sclerosis)、脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxia)、亚急性脊髓混合变性(subacute combined degeneration of spinal cord)、脊髓痨(tabes dorsalis)、泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease)、中毒性脑病(toxic encephalopathy)、传播性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathy)和刺猬摇摆综合征(wobbly hedgehog syndrome)。在一个实施方案中,所述神经变性疾病选自:阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病和帕金森病。在一个实施方案中,所述神经变性疾病是阿尔茨海默氏病。

[0057] 本发明的一个方面是,改善认知功能的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体,以改善认知功能。在一个实施方案中,所述认知功能选自:知觉、记忆、注意力、言语理解、言语产生、阅读理解、意像建立、学习和推理。在一个实施方案中,所述认知功能选自:知觉、记忆、注意力和推理。在一个实施方案中,所述认知功能是记忆。

[0058] 本发明的一个方面是,治疗认知障碍的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗认知障碍。在一个实施方案中,所述认知障碍选自:谵妄、痴呆、学习障碍、注意力缺陷障碍(ADD)和注意力缺陷伴多动障碍(ADHD)。在一个实施方案中,所述认知障碍是学习障碍。在一个实施方案中,所述认知障碍是注意力缺陷障碍(ADD)。在一个实施方案中,所述认知障碍是注意力缺陷伴多动障碍(ADHD)。

[0059] 本发明的一个方面是,治疗应激诱发的或应激有关的认知缺陷的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗所述应激诱发的或应激有关的缺陷。

[0060] 本发明的一个方面是,治疗心境障碍的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗心境障碍。在一个实施方案中,所述心境障碍选自:抑郁症、产后抑郁症、心境恶劣和双相型障碍。在一个实施方案中,所述心境障碍是抑郁症。在一个实施方案中,所述心境障碍是心境恶劣。

[0061] 本发明的一个方面是,治疗应激诱发的或应激有关的心境障碍(例如,心境恶劣)的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗应激诱发的或应激有关的心境障碍。

[0062] 本发明的一个方面是,治疗焦虑障碍的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗焦虑障碍。在一个实施方案中,所述焦虑障碍选自:广泛性焦虑障碍、惊恐障碍、惊恐障碍伴广场恐怖、广场恐怖、社交焦虑障碍、强制性障碍(obsessive-compulsive disorder)和创伤后应激障碍。在一个实施方案中,所述焦虑障碍是广泛性焦虑障碍。在一个实施方案中,所述焦虑障碍是创伤后应激障碍。

[0063] 本发明的一个方面是,治疗应激诱发的或应激有关的焦虑的方法。所述方法包括下述步骤:给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗应激诱发的或

应激有关的焦虑。

[0064] 本发明的一个方面是，增强肌肉性能的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以增加肌肉性能。在一个实施方案中，所述肌肉性能选自：强度、速度和耐力。

[0065] 本发明的一个方面是，治疗肌肉或神经肌肉疾病的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗肌肉或神经肌肉疾病。在一个实施方案中，所述肌肉或神经肌肉疾病是肌病。在一个实施方案中，所述肌肉或神经肌肉疾病是肌营养不良。在一个实施方案中，所述肌肉或神经肌肉疾病是杜兴肌营养不良。

[0066] 本发明的一个方面是，促进神经突生长晕的方法。所述方法包括下述步骤：使神经细胞与有效量的尿石素或其前体接触，以促进神经突生长晕。在一个实施方案中，所述接触包括：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以促进神经突生长晕。

[0067] 下述实施方案可以与描述的发明的每个方面和实施方案有关，并且在适当时彼此相关。

[0068] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体是分离的尿石素。

[0069] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体是分离的尿石素前体。

[0070] 在一个实施方案中，所述尿石素选自：尿石素A、尿石素B、尿石素C、尿石素D、以及它们的代谢物，包括、例如，它们的葡糖醛酸化的、甲基化的和硫酸化的形式，和这些尿石素的组合。

[0071] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为选自浆果、葡萄、石榴、玫瑰果和坚果的天然食物来施用。

[0072] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为经过加工的食物产品来施用，包括、例如，果汁、浓缩物或提取物，其基于选自浆果、葡萄、石榴、玫瑰果和坚果的天然食物。

[0073] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为石榴汁、浓缩物或提取物来施用。

[0074] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为鞣花鞣质来施用。

[0075] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为安石榴苷来施用。

[0076] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为鞣花酸来施用。

[0077] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为尿石素来施用。

[0078] 在一个实施方案中，口服施用所述尿石素或其前体。

[0079] 在一个实施方案中，胃肠外施用所述尿石素或其前体。

[0080] 在一个实施方案中，至少每周施用所述尿石素或其前体。在不同的实施方案中，每周施用所述尿石素或其前体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28次。

[0081] 在一个实施方案中，至少每天施用所述尿石素或其前体。在不同的实施方案中，每天施用所述尿石素或其前体1、2、3、4、5、6、7或8次。

[0082] 在一个实施方案中，以等于或相当于0.1-150毫克(mg)尿石素/千克(kg)体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以等于或相当于2-120mg尿石素/kg体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以等于或相当于4-90mg尿石素/kg体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以等于或相当于8-30mg尿石素/kg体重的剂量施用所述尿石素或其前体。

[0083] 在一个实施方案中，以足以达到至少0.001微摩尔(μM)的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.01μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.1μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少1μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少10μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。

[0084] 在一个实施方案中，以足以达到至少0.001微摩尔(μM)的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.01μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.1μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少1μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少10μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。

[0085] 在一个实施方案中，所述受试者没有正在接受尿石素或其前体以治疗需要施用尿石素或其前体或代谢物的其它病症，所述其它病症选自：动脉粥样硬化、血栓形成、癌症、不希望的血管生成、感染和炎症。

附图说明

[0086] 图1描绘了尿石素A(UA)、鞣花酸(EA)、新唢呐素(TL)、安石榴苷(PA)和石榴皮鞣质(PB)的结构式。

[0087] 图2描绘了鞣花酸(EA)和它的代谢物：尿石素D(UD)、尿石素C(UC)、尿石素A(UA)和尿石素B(UB)，它们由动物(包括人类)中的肠微生物区系产生。

[0088] 图3的一对条形图描绘了响应于指定浓度的鞣花酸(上图)和尿石素A(下图)的线粒体基因表达水平。

[0089] 图4的条形图描绘了在有指定浓度的安石榴苷、鞣花酸、尿石素A或阴性对照存在下在体外测量的柠檬酸合酶(CS)活性。

[0090] 图5A的免疫印迹(IB)集合描绘了指定浓度的鞣花酸(EA)和尿石素A(UA)对AMP-活化的蛋白激酶(AMPK)和活化的、磷酸化的AMPK(P-AMPK)的水平的影响。P-AMPK：磷酸化的AMPK。对照：阴性对照；RSV：白藜芦醇阳性对照。

[0091] 图5B的条形图描绘了图5A中的条带的密度计分析，显示了与对照处理的细胞相比，在处理以后的活化的P-AMPK的相对水平。

[0092] 图6的条形图描绘了在用0.5μM指定的化合物处理以后，PC-12细胞培养物的总细胞数目。PA，安石榴苷；PB，石榴皮鞣质；UA，尿石素A；EA，鞣花酸；T1，新唢呐素。

[0093] 图7的条形图描绘了在用0.5μM指定的化合物处理以后，PC-12细胞中的平均神经突生长晕(μm)。生长晕按照细胞来表示。SP，SP600125；dbcAMP，双丁酰环AMP；PA，安石榴苷；PB，石榴皮鞣质；UA，尿石素A；EA，鞣花酸；T1，新唢呐素。

[0094] 图8的条形图描绘了在用0.5μM指定的化合物处理以后，表现出广泛神经突生长晕(>20μm)的PC-12细胞的百分比。SP，SP600125；dbcAMP，双丁酰环AMP；PA，安石榴苷；PB，石榴皮鞣质；UA，尿石素A；EA，鞣花酸；T1，新唢呐素。

[0095] 图9的条形图描绘了在用0.5μM指定的化合物处理以后，PC-12细胞中的平均突起

形成。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;PA,安石榴苷;PB,石榴皮鞣质;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0096] 图10的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,每个原代多巴胺能的酪氨酸羟化酶(TH)阳性的神经元细胞的平均生长晕。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0097] 图11的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,表现出广泛神经突生长晕(>20μm)的原代多巴胺能的TH阳性的神经元的百分比。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0098] 图12的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,在原代多巴胺能的TH阳性的神经元中形成的突起的平均数目。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0099] 图13的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,在原代多巴胺能的TH阳性的神经元中的最大突起长度。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0100] 图14的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,每个原代多巴胺能的TH阳性的神经元的平均分支。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0101] 图15的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,每个原代多巴胺能的TH阳性的神经元的平均树突数目。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0102] 图16的条形图描绘了在用0.1μM指定的化合物处理以后,每个原代多巴胺能的TH阳性的神经元的平均树突长度。SP,SP600125;dbcAMP,双丁酰环AMP;UA,尿石素A;EA,鞣花酸;Tl,新唢呐素。

[0103] 图17的3组条形图描绘了尿石素A、安石榴苷和石榴提取物(PE)治疗对高脂肪饮食(HFD)饲喂的小鼠中的肥胖发作的影响。尿石素A作为食物混合物来施用;PE和安石榴苷通过管饲法来施用。(A)表示为相对于初始体重的增加百分比的体重跟踪。(B)治疗5周后通过EchoMRI测得的脂肪量百分比。(C)治疗5周后通过EchoMRI测得的瘦体重(lean mass)百分比。群体组成:HFD对照(食物混合物):n=10;HFD对照(管饲法):n=10;HFD+尿石素A(食物混合物):n=9;HFD+安石榴苷(管饲法):n=8;HFD+PE(管饲法):n=7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。对于图A,通过双因素方差分析(2-way ANOVA)来分析结果。指出了p的值。

[0104] 图18的2对条形图描绘了鞣花酸和尿石素A对饲喂标准食物饮食的小鼠的瘦体重和脂肪量的影响。(A)在治疗2周后通过EchoMRI测得的瘦体重(肌肉)百分比。(B)在治疗2周后通过EchoMRI测得的脂肪量(肌肉)百分比。群体组成:食物饮食对照(食物混合物):n=8;食物饮食+鞣花酸(食物混合物):n=7;食物饮食+尿石素A(食物混合物):n=7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。

[0105] 图19的一对图和相应的条形图对描绘了鞣花酸和尿石素A对饲喂标准食物饮食的小鼠中的氧耗量的影响。(A)在20h时段内的氧耗量跟踪。实心条对应于黑暗期(晚7点至早7点)。其它条对应于光照期。(B)表示为曲线下面积(AUC)的氧耗量。群体组成:食物饮食对照

(食物混合物):n＝8;食物饮食+鞣花酸(食物混合物):n＝7;食物饮食+尿石素A(食物混合物):n＝7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。对于图A,通过双因素方差分析(2-way ANOVA)来分析结果。指出了p的值(食物饮食对照相对于食物饮食+治疗)。

[0106] 图20的一系列图和对应的系列条形图描绘了尿石素A、安石榴苷和石榴提取物(PE)对饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠的氧耗量的影响。(A)在20h时段内的氧耗量跟踪。实心条对应于黑暗期(晚7点至早7点)。其它条对应于光照期。(B)表示为曲线下面积(AUC)的氧耗量。群体组成:HFD对照(食物混合物):n＝10;HFD对照(管饲法):n＝10;HFD+尿石素A(食物混合物):n＝9;HFD+安石榴苷(管饲法):n＝8;HFD+PE(管饲法):n＝7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。对于图A,通过双因素方差分析(2-way ANOVA)来分析结果。

[0107] 图21的一对图和相应的条形图对描绘了鞣花酸和尿石素A对饲喂标准食物饮食的小鼠的换气比值(RER)的影响。(A)在20h时段内的RER跟踪。实心条对应于黑暗期(晚7点至早7点)。其它条对应于光照期。(B)表示为平均RER的RER。群体组成:食物饮食对照(食物混合物):n＝8;食物饮食+鞣花酸(食物混合物):n＝7;食物饮食+尿石素A(食物混合物):n＝7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。对于图A,通过双因素方差分析(2-way ANOVA)来分析结果。指出了p的值(食物饮食对照相对于食物饮食+治疗)。

[0108] 图22的一系列图和对应的系列条形图描绘了尿石素A、安石榴苷和石榴提取物(PE)对饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠的换气比值(RER)的影响。(A)在20h时段内的RER跟踪。(B)表示为平均RER的RER。群体组成:HFD对照(食物混合物):n＝10;HFD+尿石素A(食物混合物):n＝9;HFD+安石榴苷(食物混合物):n＝10;HFD+PE(食物混合物):n＝10。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。对于图A,通过双因素方差分析(2-way ANOVA)来分析结果。

[0109] 图23的2组图描绘了尿石素A、安石榴苷和石榴提取物(PE)对饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠的甘油三酯和游离脂肪酸的影响。(A)治疗14周的HFD饲喂的小鼠中的甘油三酯的血浆水平。(B)治疗14周的HFD饲喂的小鼠中的游离脂肪酸的血浆水平。群体组成:HFD对照(食物混合物):n＝10;HFD对照(管饲法):n＝10;HFD+尿石素A(食物混合物):n＝9;HFD+安石榴苷(管饲法):n＝8;HFD+PE(管饲法):n＝7。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。

[0110] 图24的一系列图描绘了尿石素A、鞣花酸和安石榴苷对饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠的糖血的影响。(A)用含有尿石素A的食物混合物治疗10周的HFD饲喂的小鼠的葡萄糖耐量试验。(B)用含有鞣花酸的食物混合物治疗10周的HFD饲喂的小鼠的葡萄糖耐量试验。(C)用含有安石榴苷的食物混合物治疗10周的HFD饲喂的小鼠的葡萄糖耐量试验。群体组成:HFD对照(食物混合物):n＝10;HFD+尿石素A(食物混合物):n＝9;HFD+安石榴苷(食物混合物):n＝10。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05(Student氏t-检验)。

[0111] 图25的线图和条形图描绘了尿石素A(UA)对老(10天龄)漂亮新小杆线虫(漂亮新小杆线虫)中的基础的和解偶联的呼吸(氧耗量)的影响。(A)用0.1％DMSO处理的10天龄对照虫和用30μM尿石素A(在0.1％DMSO中)处理的10天龄虫中的基础的和解偶联的呼吸(FCCP)。(B)用媒介物(0.1％DMSO)或30μM尿石素A(在0.1％DMSO中)处理的10天龄对照虫中的解偶联的(FCCP)呼吸的代表性曲线下面积(AUC)。将结果表示为平均值±SEM。*p<0.05

(Student氏t-检验)。OCR,氧消耗速率。

[0112] 图26的条形图描绘了尿石素A对漂亮新小杆线虫肌肉中的线粒体的影响。转基因的漂亮新小杆线虫菌株SJ4103显示出由靶向线粒体膜的绿色荧光蛋白(GFP)的肌肉特异性表达引起的荧光。通过荧光的增加来显示漂亮新小杆线虫肌肉中的线粒体存在。将结果表示为平均值±SEM。*p＝0.0014(Student氏t-检验)。

[0113] 图27的条形图描绘了在有或没有石榴提取物治疗下遭受慢性应激小鼠的可动性。

[0114] 图28的条形图描绘了在有或没有石榴提取物治疗下处于焦虑诱导背景中的小鼠的“僵硬”应答的程度。

[0115] 图29的条形图描绘了石榴提取物施用对小鼠的焦虑诱导的后腿站立抑制程度的影响。

[0116] 图30的条形图描绘了石榴提取物施用对小鼠的焦虑诱导的理毛行为抑制程度的影响。

[0117] 图31的线图描绘了当重复暴露于没有不良作用的背景时对特定不利背景的记忆的消失。显示了下述小鼠的数据:已经经历生命早期应激的小鼠,正常后腿站立的对照小鼠,和已经经历生命早期应激、但是用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠。将僵硬(%)表示为初次暴露于背景期间的僵硬时间的百分比。

[0118] 图32的图描绘了慢性应激对小鼠在莫里斯水迷宫中的有效学习的影响。

[0119] 图33的条形图描绘了石榴提取物施用对慢性应激小鼠在莫里斯水迷宫中的学习性能的影响。

[0120] 图34的图描绘了在莫里斯水迷宫(认知学习的一种量度)中在训练期中的几个试验到隐藏的平台的累积距离。显示了下述小鼠的数据:已经经历生命早期应激的小鼠,正常后腿站立的对照小鼠,和已经经历生命早期应激、但是用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠。到平台的距离是在观察期(60秒)中就所有测量的间隔(25间隔/秒)而言在小鼠和隐藏的平台之间的累积距离的总和。

[0121] 图35的条形图描绘了当用石榴提取物1108或对照(Ctrl)治疗时老龄大鼠在社会识别试验中的记忆。

[0122] 图36的条形图描绘了用石榴提取物1108或对照(Ctrl)治疗的老龄大鼠的莫里斯水迷宫结果。

[0123] 图37的条形图描绘了阿尔茨海默病小鼠模型5XFAD(经过治疗和未经治疗)以及正常对照小鼠在Y型迷宫中的正确改变的百分比。显著性:**p<0.01,*p<0.05,单因素方差分析。

[0124] 图38的条形图描绘了用石榴衍生的提取物31008、61109、71109或对照(媒介物)治疗的、阿尔茨海默氏病模型转基因小鼠(hAPP-Tg)的莫里斯水迷宫结果。也显示了用对照(媒介物)治疗的野生型小鼠(Non-Tg)的结果。

[0125] 图39的条形图描绘了已经经历生命早期应激的小鼠相对于正常后腿站立的对照小鼠、和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠的暗/亮盒结果。将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05,(Student氏t-检验)。

[0126] 图40的条形图描绘了已经经历生命早期应激的小鼠相对于正常后腿站立的对照小鼠、和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠的高架零迷宫的结果。

将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05,(Student氏t-检验)。

[0127] 图41的条形图描绘了已经经历生命早期应激的小鼠相对于正常后腿站立的对照小鼠、和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠的强迫游泳试验的结果。将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05,**p<0.01(Student氏t-检验)。

[0128] 图42的条形图描绘了在第一次轻度电击(其在4min时进行)过程中在背景恐惧训练范例中的训练结果。显示了已经经历生命早期应激的小鼠相对于正常后腿站立的对照小鼠、和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠的结果。将结果表示为平均值±SEM。

[0129] 图43的条形图描绘了当重复暴露于没有不良作用的背景时对特定不利背景的记忆的消失。显示了下述小鼠的数据:已经经历生命早期应激的小鼠,正常后腿站立的未应激的对照小鼠,和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠。将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05,#p=0.05(Student氏t-检验)。将正常的未应激的动物与生命早期应激的动物(即,母体分离)进行对比。将安石榴苷治疗的生命早期应激的动物与未治疗的生命早期应激的动物进行对比。

[0130] 图44的线图证实了通过从旋转杆落下的延迟期(按秒计)测得的动作学习水平。显示了下述小鼠的数据:已经经历生命早期应激的小鼠,正常后腿站立的对照小鼠,和已经经历生命早期应激并用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠。将结果表示为平均值±SEM。

[0131] 图45的图描绘了在莫里斯水迷宫(认知学习的一种量度)中在训练期内的逃逸延迟期(按秒计)。显示了下述小鼠的数据:已经经历生命早期应激的小鼠,正常后腿站立的对照小鼠,和已经经历生命早期应激并已经用鞣花鞣质安石榴苷治疗的小鼠。将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05(Student氏t-检验)。

[0132] 图46的条形图描绘了石榴衍生的化合物对正常小鼠的背景识别的影响,所述小鼠未经过治疗或者用安石榴苷或尿石素A治疗过。将结果表示为平均值±SEM。显著性:*p<0.05(Student氏t-检验)。

[0133] 图47的条形图描绘了石榴衍生的化合物对正常小鼠关于特定背景的记忆保留的影响,所述小鼠未经过治疗或者用安石榴苷或尿石素A治疗过。将结果表示为平均值±SEM。使用单因素方差分析或重复测量方差分析、随后的Fisher事后LSD多重比较检验,分析显著性数据。*p<0.05。

[0134] 图48的线图证实了通过从旋转杆落下的延迟期(按秒计)测得的肌肉性能和运动技能。显示了下述小鼠的数据:正常后腿站立的未经治疗的对照小鼠,和已经用鞣花鞣质安石榴苷治疗过的小鼠。显著性:*通过方差分析,p<0.05。

[0135] 图49的线图证实了通过小鼠在高速跑台上奔跑的能力测得的肌肉性能水平和耐力。显示了下述小鼠的数据:正常后腿站立的未经治疗的对照小鼠,和已经用尿石素A治疗过的小鼠。显著性:*p<0.05,**p<0.01(Student氏t-检验)。

具体实施方式

[0136] 在生物学和心理学中,术语“应激”表示人或其它动物没有对生理、心境或身体威胁(无论实际的还是想象的)适当地做出应答的后果。内分泌学家Hans Selye于二十世纪三十年代首次在生物背景中采用了术语“应激”。他以后将该概念扩宽并推广,以包括对任何

需求的不适当的生理学应答。它涵盖了宽范围的现象，从轻度刺激至可能造成严重健康破坏的剧烈功能障碍。

[0137] 应激的所有这些精神生物学特征可能代表氧化性应激的表现，所述氧化性应激是活性氧的产生和表现与生物系统的容易地将反应性中间体解毒或者修复形成的损伤的能力之间的失衡。组织的正常氧化还原态的紊乱可以通过过氧化物和自由基的产生而造成毒性效应，所述过氧化物和自由基会损伤细胞的所有组分，包括蛋白、脂质和DNA。一些反应性的氧化物质甚至可以通过被称作“氧化还原信号传递”的现象而充当信使。

[0138] 在人类中，氧化性应激涉入许多疾病。例子包括：动脉粥样硬化、帕金森病、心力衰竭、心肌梗塞、阿尔茨海默氏病、精神分裂症、双相型障碍、脆性X综合征和慢性疲劳综合症。

[0139] 在正常条件下在人类中的活性氧的一种来源是，在氧化磷酸化过程中活化氧从线粒体的渗漏。

[0140] 能够产生超氧化物(O_2^-)的其它酶是黄嘌呤氧化酶、NADPH氧化酶和细胞色素P450。多种酶(包括几种氧化酶)会产生过氧化氢(另一种强氧化剂)。活性氧在细胞信号传递(被称作氧化还原信号传递的过程)中起重要作用。因而，为了维持适当的细胞体内稳态，必须在活性氧产生和消耗之间达成平衡。

[0141] 被充分研究的细胞抗氧化剂是超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶。不太充分研究的酶抗氧化剂包括过氧化氧化还原蛋白和新近发现的硫氧还蛋白。具有抗氧化性能(尽管该作用不是主要的)的其它酶包括对氧磷酶、谷胱甘肽-S转移酶和醛脱氢酶。

[0142] 在辐照和高氧以后，氧化性应激会促成组织损伤。它疑似在神经变性疾病中是重要的，所述神经变性疾病包括阿尔茨海默氏病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)和亨廷顿病。还认为氧化性应激与某些心血管疾病有关，因为血管内皮中的低密度脂蛋白(LDL)的氧化是斑块形成的前体。氧化性应激也在低氧后由氧再灌注损伤引起的缺血性级联中起作用。该级联包括中风和心脏病发作。氧化性应激还已经涉入慢性疲劳综合症。

[0143] 值得注意的是，发明人已经发现，源自鞣花鞣质的某些化合物可用于治疗和预防应激(包括氧化性应激)的生理学和心理学表现。不希望受限于任何特定作用机制，据信，所述化合物会对线粒体发挥有益效果，从而促进和恢复重要的线粒体功能，并抵消应激诱发的线粒体功能障碍。根据本发明，已经发现这些相同的化合物可用于治疗和预防与线粒体功能障碍有关的多种病症、疾病和障碍中的任一种，包括、但不限于，神经变性疾病和认知障碍、代谢障碍(包括胰岛素抗性)、心境障碍和焦虑障碍。

[0144] 鞣花鞣质(ET)是被包括在所谓的“可水解的单宁”内的多酚，其中六羟基联苯甲酸与糖(最常见的是β-D-葡萄糖)形成二酯。ET可以作为复合聚合物存在，所述复合聚合物达到至多4000和更高的分子量。这些聚合物可以用酸或碱水解以产生鞣花酸(EA)，后者可以间接地用于定量ET。EA又是包括尿石素在内的其它代谢产物的来源。

[0145] 许多含有鞣花鞣质的植物种已经被用于治疗疾病，特别是在亚洲(Okuda等人、2009)。这些包括：仙鹤草(仙鹤草)(agrimoniin)、山茶花(Cameliajaponica)(山茶鞣质A)、山茱萸(Cornus officinalis)(cornussin A)、童氏老鹳草(Geranium thunbergii)(老鹳草素)、日本水杨梅(日本水杨梅)(gemin-A)、枫香(Liquidambarformosana)(木麻黄鞣亭)、野胡桐(野胡桐)(野桐鞣酸)、月见草(Oenothera erythrosepala)(月见草鞣质B)、石榴(石

榴,pomegranate)(石榴皮亭B)、玫瑰花(玫瑰花)(玫瑰鞣质)和诃子(诃子)(云实鞣酸),以及其它。这些药用植物的主要用途已经与它们的抗氧化、止泻、抗微生物和免疫调节活性相关联。

[0146] 鞣花鞣质还大量存在于许多浆果中,包括草莓、红悬钩子和黑悬钩子(Zafrilla等人,2001)、乌饭树和黑莓。还已经在苹果、樱桃、云莓、越橘、醋栗、葡萄、酸橙、芒果、菠萝、石榴、洋李、大黄中发现了鞣花鞣质。Serrano等人.(2009)MolNutrFoodRes.53:S310-29。可以从中国甜茶Rubus suavissimus S.Lee的叶子中分离出鞣花鞣质Rubusuaviin C。还已经在坚果中鉴别出可察觉量的鞣花鞣质,所述坚果包括胡桃(Fukuda等人,2003)、开心果、腰果、栗、橡实(Cantos等人,2003)、长山核桃(Villarreal-Lozoya等人,2007)和花生。

[0147] 它们也在石榴(Gil等人,2000)和圆叶葡萄(Lee和Talcott,2002)中富含,且是木材、尤其是橡木的重要组分(Glabasnia和Hofmann,2006)。通过在不同的老化过程中从木材向食物基质的迁移,鞣花鞣质可以掺入食物产品(诸如葡萄酒和威士忌酒)中。还已经在几类蜂蜜中发现了鞣花酸,并且已经建议将它作为石南蜜的花标志物(Ferreres等人,1996)。游离的鞣花酸和不同的糖苷衍生物也存在于这些食物产品中,包括葡萄糖苷、鼠李糖苷、阿糖胞苷和对应的乙酰基酯(Zafrilla等人,2001)。

[0148] 许多研究已经证实,几种食物产品的鞣花鞣质含量可以是非常高的(表1)。例如,一杯石榴汁(200mL)可以提供多达共计1g的鞣花鞣质和鞣花酸,一份悬钩子(100g悬钩子)可以提供约300mg,一份草莓可以提供70mg,4个胡桃可以提供约400mg鞣花鞣质。

[0149] 代表性的饮食鞣花鞣质包括:石榴的安石榴苷,草莓和悬钩子的地榆素-H-6,以及胡桃的长梗马兜铃素。所有这些在水解后会释放鞣花酸,尽管其它代谢物也可以产生,且是各种鞣花鞣质的特征(例如,gallagic和ter-gallagic acids)。

[0150] 表1.不同食物产品中的鞣花鞣质(ET)和鞣花酸(EA)含量

[0151]

食物	含量
新鲜水果	
悬钩子	263–330 mg/100 g 鲜重
悬钩子	51–330 mg/100 g 鲜重
草莓	77–85 mg/100 g 鲜重
草莓	25 mg/100 g 鲜重
云莓	315 mg/100 g 鲜重
云莓	56–360 mg/100 g 鲜重
黑莓	1.5–2.0 mg/g 干重
极地莓	69–320 mg/100 g 鲜重
石榴	35–75 mg/100 g 鲜重(假种皮)
圆叶葡萄	36–91 mg/100 g 鲜重
坚果	

[0152]

胡桃	802 mg/50 g (8 个坚果)
美洲山核桃	20.96–86.2 mg/g (EA)
栗	1.61–24.9 mg/kg 干重(EA)
经过加工的水果	
石榴汁	1500–1900 mg/L (安石榴苷)
石榴汁	2020–2660 mg/L (ET 和 EA)
石榴汁	5700 mg/L (ET 和 EA)
悬钩子果酱	76 mg/100 g 鲜重
草莓果酱	24 mg/100 g 鲜重
圆叶葡萄汁	8–84 mg/L
葡萄酒	
橡木老化的红葡萄酒	9.4 mg/L
橡木老化的红葡萄酒	50 mg/L
圆叶葡萄酒	2–65 mg/L
酒	
威士忌酒	1–2 mg/L
科尼亚克白兰地酒	31–55 mg/L

[0153] f.w.,鲜重

[0154] d.w.,干重

[0155] 鞣花鞣质具有巨大的结构变异性,从而形成二聚体和低聚体衍生物。它们还具有比没食子鞣质更广泛的分布。其它鞣花鞣质及其报道的来源显示在表2中。

[0156] 表2.其它鞣花鞣质.

[0157]

	分子量	来源	参考文献
		欧洲橡木心材	(Puech, Mertz 等人. 1999)
2-O-没食子酰基-石榴皮鞣质			
Casaurictin		木麻黄, Stachyrus 植株	Wikipedia
栗木鞣花素和 Vecalagin	934.63	石榴树皮	(Tanaka, Nonaka 等人. 1986)
栗木素			
木麻黄鞣亭		*日本椴*	

[0158]

木麻黄鞣质		大花紫薇(banaba)树叶	(Bai, He 等人. 2008)
木麻黄鞣宁		大花紫薇树叶	(Bai, He 等人. 2008)
木麻黄鞣宁		石榴	
诃黎勒酸		诃子	
云实鞣酸		诃子	
鞣料云实精		石榴	
楝木鞣质 E			
表石榴素（Epipunicacortein）A		大花紫薇树叶	(Bai, He 等人. 2008)
紫薇花素 B		大花紫薇树叶	(Bai, He 等人. 2008)
Gemin D		日本梭	
石榴皮亭 A		石榴	
石榴皮亭 B		石榴	
大丁香素			
印车前明碱		大花紫薇树叶	(Bai, He 等人. 2008)
Lambertianin C		悬钩子	(Gasperotti, Masuero 等人.)
长梗马兜铃素	784.52	石榴树皮和果皮	(Tanaka, Nonaka 等人. 1986)
石榴素（punicacortein）A		石榴	
石榴素 B		石榴	
石榴素 C		石榴	
石榴素 D		石榴	
石榴叶鞣质		石榴	
安石榴苷		石榴	
石榴皮鞣质		石榴	
石榴皮葡萄糖酸		石榴	
Roburin A			
Roburin B			
Roburin C			
Roburin D			
Roburin E			
Rubusuaviin C		茶叶	
地榆素 H-4		圆叶葡萄	(Lee, Johnson 等人. 2005)
地榆素 H-5		圆叶葡萄	(Lee, Johnson 等人. 2005)
地榆素 H-6		悬钩子，地榆	(Vrhovsek, Palchetti 等人. 2006)

[0159]

地榆素 H-10			
旌节花素		大花紫薇树叶	(Bai, He 等人. 2008)
小木麻黄素			
新唢呐素 I		石榴	
Tellimigrandin II		石榴	
诃子鞣质			
榄仁黄素 A			
榄仁黄素 B			
Tergallagin		榄仁树	
富贵草碱 /Gallagyldilacton		石榴	

[0160] 从榄仁树属植物的不同物种中可以分离出许多潜在活性的鞣花鞣质。具体地，已经在几个榄仁树属种中鉴别出了安石榴苷和石榴皮鞣质，包括、例如，榄仁树、诃子、千果榄仁和T.citrine。还已经从鼠尾草半日花(一种地中海灌木)和毛风车子(一种非洲灌木)中分离出了安石榴苷。

[0161] 鞣花酸通常以相对较低的量存在于植物组织中。认为鞣花酸源自鞣花鞣质，后者当从六羟基联苯甲酸分解时，会自发地转化成鞣花酸。鞣花酸的一些其它来源显示在表3中。

[0162] 表3.含有鞣花酸的来源.

[0163]

水果	量	参考文献
Acai	55.4±1.39 mg/L 新鲜果肉	(Del Pozo-Insfran, Brenes 等人. 2004)
Umbu	314 mg/100 g 干重(市售)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo 等人.)
Camu-camu	490 mg/100 g 干重	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo 等人.)
Cagaita	289 mg/100 g 干重(市售)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo 等人.)
Araçá	262 mg/100 g 干重 218 mg/100 g 干重(市售)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo 等人.)
Cambuci	240 mg/100 g 干重 512 mg/100 g 干重(市售)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo 等人.)
圆叶葡萄	219 mg/100 g 干重	(Lee, Johnson 等人. 2005)

[0164] 石榴(Punica granatum)果实是古老的药用食物，其已经在民间医学中使用了数个世纪。它们在新鲜时消费和作为果汁消费，它是鞣花鞣质和鞣花酸的优良来源。石榴果皮和果汁中的鞣花鞣质包括：石榴皮鞣质、安石榴苷、鞣料云实精、木麻黄鞣宁、富贵草碱/gallagyldilacton、长梗马兜铃素、新唢呐素、石榴皮亭A和石榴皮亭B。石榴植株的其它部分含有其它的鞣花鞣质，包括石榴叶鞣质、石榴素A、石榴素B、石榴素C、石榴素D和石榴皮葡萄糖酸。商业的果汁含有gallagyl-型鞣花鞣质，包括安石榴苷异构体(1500-1900mg/L)、未分类的可水解的单宁(400-500mg/L)和鞣花酸和它的糖苷(120-260mg/L)(Gil等人、2000)。

在石榴皮中富含安石榴苷,即其中gallagic acid和鞣花酸与葡萄糖分子连接的鞣花鞣质。安石榴苷异构体和鞣花酸衍生物不存在于假种皮汁中,但是在工业果汁加工过程中,它们被从包围假种皮的外壳和膜中提取出,并大量释放进果汁中。

[0165] 可以如下制备本发明的提取物:首先将水果制汁,例如,使用本领域已知的标准的工业制汁方法可以将石榴制汁,所述方法可以包括:通过对整个水果施加压力而将完整水果制汁,或者首先将石榴去壳,然后对剩余物施加压力,所述剩余物由假种皮、包围假种皮的膜材料和在去壳过程中产生的外壳材料。可替换地,可以对外壳(它是鞣花鞣质、尤其是安石榴苷的丰富来源)进行制汁过程,包括水提取。替代性的、非水提取方法可以采用其它溶剂,诸如乙醇、丙酮或甲醇,作为例子。

[0166] 所述提取物通常是水性提取物,其基本上可由水果汁组成,任选地加入额外的水。这样的水性提取物可以通过例如标准技术进行浓缩、富集或提炼,例如,在减压下蒸发和过滤方法。浓缩物的例子是浓缩了至少2倍、更经常至少4倍(例如至少8倍、至少40倍、至少100倍、至少200倍或至少1000倍)的那些。

[0167] 可以将所述提取物分级分离,以分离出其中的一种或多种活性组分,例如,通过分子量过滤,或在合适的固体载体上的色谱法,或通过溶剂提取,所述固体载体例如琼脂糖凝胶(就尺寸排阻色谱法而言)或离子交换柱(使用在适当处理过的二氧化硅或氧化铝(例如ODS包被的二氧化硅)上的HPLC)。

[0168] 体外消化模拟研究已经证实,一般而言,鞣花鞣质在胃的生理条件下是非常稳定的。酸性条件(HCl,pH 1.8-2.0)和胃酶不会水解原始的鞣花鞣质来释放出游离鞣花酸(EA),并且没有观察到鞣花鞣质的降解(Tomas-Barberan等人,2009)。尽管胃似乎是吸收游离EA的首要地方,但是不会吸收鞣花鞣质。但是,在小肠的生理条件下,存在游离EA从鞣花鞣质的释放。该水解似乎是由于pH条件(中性至弱碱性pH,7.0-7.3),而不是胰腺酶和胆汁盐的作用(Larrosa等人,2006)。

[0169] 动物研究也已经用于评价EA和鞣花鞣质的生物利用度和代谢。Doyle和Griffiths(1980)报道了EA在大鼠中的快速吸收和代谢。这些作者在粪便和尿中检测出了尿石素A(UA)和其它代谢物(最可能是尿石素B(UB))。UA和UB均被证实为具有微生物区系起源,因为均未在无菌动物中发现。在尿或粪便中没有检测出未改变的EA。这些尿石素主要被肠细胞吸收和葡糖醛酸化。在该情况下,不会产生甲醚,因为UA和UB在它们的分子中不具有邻-二羟基基团,因此不是儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)的底物。就UB而言,细胞色素P450可以引入额外的羟基,并且这会增加葡糖醛酸化的可能性和增强代谢物的排泄。Teel和Martin(1988)发现,在小鼠的尿、胆汁和血液中检测出游离EA和一些缀合物(硫酸酯、葡萄糖醛酸苷和谷胱甘肽缀合物)。^{3}H-EA的吸收主要发生在口服给药的2小时以内。在血液、胆汁和组织中的水平较低,并且吸收的化合物在尿中排泄。在24h以后,在胃肠道中残留超过半数的施用的^{3}H-EA。

[0170] 已经在人类中评估了不同的饮食ET和EA衍生物的代谢。在包括40位健康志愿者(分成4组)的研究中,施用不同的含有ET的食品,包括草莓(250g)、红悬钩子(225g)、胡桃(35g)和橡木老化的红葡萄酒(300mL)。草莓和悬钩子均含有ET地榆素H-6;胡桃含有ET长梗马兜铃素;和橡木老化的葡萄酒含有ET栎木鞣花素。在服用后,在8、16、32、40和56h时收集5份尿。使用LC-MS/MS分析,在尿中没有检出ET或EA。但是,在所有受试者中,从32h开始至56h

(全局用消费的食品),在所述样品中检测出微生物代谢物:与葡糖醛酸缀合的3,8-二羟基-6H-二苯并[b,d]吡喃-6-酮(尿石素B)。根据得到的结果,独立于消费的ET而排泄尿石素B衍生物。在消费的ET中的一个共同的单体部分是EA(m/z-在301),这指示,属于ET分子的该亚基是产生尿石素B衍生物的关键分子。在消费石榴汁的人类中,观察到鞣花鞣质向鞣花酸和尿石素的类似代谢转化(Cerda,Espin等人.2004;Cerda,Periago等人.2005)。

[0171] 在鞣花鞣质的代谢和生物利用度中的主要因素之一是它们的微生物转化,以提供一系列尿石素衍生物(图2)。在它们中,最佳表征和已知的是尿石素A和B,但是具有3个和4个羟基的中间体也在小肠中产生,吸收,并在与甲醚和葡萄糖醛酸苷缀合以后排泄在胆汁中(Espín等人,2007)。动物实验表明,这些代谢物开始在小肠中形成,这指示,厌氧性细菌可能负责该作用。该代谢沿着胃肠道继续,从尿石素D和C开始,以尿石素A和B的产生结束。人志愿者对这些代谢物的产生的差异表明,它们可能由存在于肠中的特定微生物的活动来产生。

[0172] 在胃肠道中和在其它组织中(主要在肝脏中),EA和鞣花鞣质微生物代谢物进一步被I期(羟基化)和II期(甲基化、葡糖醛酸化和硫酸化)酶代谢,以产生更可溶性的代谢物,所述代谢物可以分布在组织中,然后排泄在尿中。

[0173] 因而,UB可以被羟基化以产生UA,并且UA可以进一步被羟基化以产生三羟基衍生物。

[0174] II期产物也产生,并在不同的组织中和在尿中检测出甲醚(COMT的产物)以及不同的葡萄糖醛酸苷缀合物。与葡萄糖醛酸苷缀合物相比,鞣花鞣质代谢物的硫酸酯缀合物在动物和人类中更少。这些缀合物首先在肠细胞中产生,并在肝脏中进一步代谢,然后排泄进尿或胆汁中。

[0175] 总之,鞣花鞣质通常不在肠中吸收。相反,它们在肠中释放出EA,所述EA仅在胃和小肠中被较差地吸收。EA主要被肠腔中的未知细菌代谢,以产生尿石素。微生物代谢开始于小肠中,并且产生的第一种代谢物保留4个苯酚羟基(尿石素D,4个羟基),并且它们沿着肠道被进一步代谢以除去羟基单位,从而在结肠的远端部分中产生尿石素C(3个羟基)、尿石素A(2个羟基)和B(1个羟基)(图2)。被吸收的代谢物缀合有葡糖醛酸(1或2个单位)和/或甲醚(当存在邻-二羟基基团时)。尿石素A和B缀合物是在血浆和尿中检测到的主要代谢物,尽管一些三羟基衍生物(羟基-UA)或EA-二甲基醚葡萄糖醛酸苷还已经以更小的量检测到。四羟基-尿石素、三羟基-尿石素和EA衍生物通常没有在周围血浆中检测到,但是它们在小肠中被吸收,并且它们被运输至肝脏,在此处它们被进一步代谢,并与胆汁一起排泄至小肠,从而建立肠肝循环,使得尿石素在血浆和尿中具有相对较长的寿命。

[0176] 除了天然食物来源以外,在最近的20年中已经出现了许多关于单宁(特别是鞣花鞣质)的生物合成、分离和生物活性的论文(例如,Xie等人,1995,Yoshida等人,1982,1984,1985,1986,1989,1990a/b,1991a-d,1992a/b,1995,Nonaka等人,1980,1984,1989a-c,1990,Tanaka等人,1986a/b,1990,1992a/b,2001,Hatano等人,1988,1989,1990a-c,1991,1995,Lin等人,1990,Nishizawa等人,1982,1983,Haddock等人,1982a/b,Kashiwada等人,1992a/b,1993,Kadota等人,1990,Okuda等人,1982a-e,1983a/b,El-Mekkawy等人,Chemistry and Biology of Ellagitannins 1541995,Tsai等人,1992,Han等人,1995,Chen等人,1995,Morimoto等人,1986a/b,Saijo等人,1989)。通过从天然来源分离来获取纯

的鞣花鞣质可能是麻烦的，且仅产生相对小量的纯的天然产物。参见，例如，Okuda等人，(1982)Chem Pharm Bull.30:4230-4233;Okuda等人.(1982)Chem Pharm Bull.30:234-4236。因此，值得注意的是，已知许多鞣花鞣质的全合成方法。参见，例如，Khanbabaee,K.,Strategies for the synthesis of ellagitannins，见:Chemistry and Biology of Ellagitannins,Ed.S.Quideau,World Scientific Publishing,Singapore,2009,第152-202页，包括其中引用的参考文献。

[0177] 使用不同的体外测定，已经确定了富含鞣花鞣质的食物提取物的抗氧化活性，并且已经广泛地报道了草莓(Meyers等人，2003，Aaby等人，2005，2007)、悬钩子(Liu等人，2002，Beekwilder等人，2005)、云莓(Kähkönen等人，2001)和其它悬钩子属浆果(Wada和Ou，2002)、石榴(Gil等人，2000)和胡桃(Anderson等人，2001)和它们的鞣花鞣质的高活性。与其它基于植物的食物相比，这些食物也名列前茅。

[0178] 关于富含鞣花鞣质的食物的消费对体内抗氧化状态的影响不甚了解。在老年妇女中，在消费240g草莓以后的4-小时时段内，血清的总抗氧化能力增加了约10％(Cao等人，1998)。单次施用的标准化的石榴提取物(Mertens-Talcott等人，2006)和长期消费的石榴汁(Rosenblat等人，2006)也会在人志愿者中改善几个抗氧化参数。但是，连续3周每天消费胡桃对患有代谢综合征的受试者的抗氧化状态没有影响(Davis等人，2007)。

[0179] 癌细胞生长依赖于增殖和细胞凋亡之间的平衡。失调的细胞增殖和细胞凋亡的抑制是癌症的起始和进展中的关键步骤。有大量证据表明，富含鞣花鞣质的食物的提取物会如下减少体外癌细胞的生长:抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡性细胞死亡，和调节细胞周期动力学和信号转导途径。

[0180] 用癌细胞系进行的体外研究已经表明，草莓(Meyers等人，2003，Olsson等人，2004，Ramos等人，2005，Wang等人，2005，Wu等人，2007)、悬钩子(Liu等人，2002，Olsson等人，2004，Wu等人，2007)、云莓(Wu等人，2007)和玫瑰果(Olsson等人，2004)会在人结肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌或宫颈癌细胞中抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和造成细胞周期停滞。在这些研究中，没有评估鞣花鞣质对浆果提取物的活性的贡献。但是，一项新近的研究(Ross等人，2007)提出，悬钩子的抗增殖活性主要与鞣花鞣质有关。

[0181] 还已经报道，石榴汁和它的鞣花鞣质会在结肠癌细胞系中抑制增殖、诱导细胞凋亡和抑制炎症细胞信号传递(Seeram等人，2005，Adams等人，2006，Larrosa等人，2006)。同样地，在圆叶葡萄皮中的多酚会抑制结肠癌细胞的生长和诱导细胞凋亡(Yi等人，2005)。分离自红圆叶葡萄且富含鞣花酸、鞣花酸糖苷和鞣花鞣质的级分会在结肠癌细胞中诱导细胞凋亡、减少细胞数目和造成细胞周期动力学的改变(Mertens-Talcott等人，2006)。

[0182] 石榴汁对体外前列腺癌细胞是有效的，但是对正常的前列腺上皮细胞是无效的。用石榴果实提取物处理高度侵袭性的人前列腺癌细胞会导致细胞生长和生存力的抑制和细胞凋亡的诱导(Malik等人，2005，Malik和Mukhtar，2006)。

[0183] 根据本发明，现在已经发现，鞣花鞣质和它们的代谢物(包括鞣花酸和尤其是尿石素)会意外地表现出对线粒体的保护性和恢复性作用。不希望受限于任何特定机制，据信，不同类型的应激会导致对线粒体的应激损伤，由此减少它们的执行总体细胞功能必需的众多功能的能力。本发明的方法可用于治疗与线粒体应激损伤有关的病症，所述损伤可以以许多方式中的任一种呈现，包括、但不限于，线粒体疾病。

[0184] 线粒体是细胞的“能量中心”。这些双膜细胞器通过氧化磷酸化而在产生绝大部分细胞能量(ATP)中起关键作用。线粒体也是其它关键代谢功能所必需的,所述代谢功能例如脂肪酸β-氧化、氨基酸的分解代谢、生酮作用、以及具有重要信号传递功能的活性氧(ROS)的产生和钙体内稳态的控制。

[0185] 线粒体基质含有脂肪酸β-氧化的酶促机制,其在该过程中从酰基链产生乙酰辅酶A和下述形式的还原当量:还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和还原的黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH2)。乙酰辅酶A给三羧酸(TCA)循环(也被称作柠檬酸循环或克雷布斯循环)供给燃料,该TCA循环还产生NADH和FADH2。这些产物给电子传递链(ETC)贡献电子,从而导致跨线粒体内膜的质子梯度的产生。通过线粒体ATP合酶对该梯度的耗散会产生ATP形式的能量。

[0186] ETC是由4个大多亚基复合物(复合物I至IV)组成,其将TCA循环产生的电子运输至最终的受体分子氧(O_2),从而在复合物IV处形成H_2O。电子的运输伴有大量自由能的释放,大部分自由能用于质子(H^+)从基质向膜间隙的易位(质子动力势);剩余的自由能作为热被消散。随着H^+通过线粒体ATP合酶流回基质中,由ETC产生的H^+电化学梯度中含有的能量然后与ATP产生相偶联。因而,氧化磷酸化源自电子传递、质子梯度的产生以及随后与线粒体ATP合酶偶联的质子流。

[0187] ROS还可以活化解偶联蛋白(UCP),所述UCP在不产生ATP的情况下消散质子梯度。UCP被视作该过程的天然调节剂,通过减轻大质子梯度的形成而对ROS产生做出响应并控制ROS产生。另外,UCP和呼吸解偶联涉入众多重要的生理学和病理学过程,诸如适应性产热、脂肪酸氧化的调节、在炎症中的参与、ROS形成的预防、葡萄糖体内稳态、体重调节和老化。

[0188] 柠檬酸合酶是线粒体TCA循环的初始酶。该酶催化乙酰辅酶A(乙酰基CoA)和草酰乙酸之间的反应,以形成柠檬酸。该酶的活性反映了线粒体生源和线粒体氧化磷酸化,因为它的活性与线粒体密度(每个细胞的线粒体数目)和线粒体呼吸活性成比例地增加。结果,柠檬酸合酶测量可以总体上评估线粒体功能状态,较高的活性指示增加的氧化磷酸化和ATP合成,较低的活性指示相反方面。

[0189] 为了更好地理解导致线粒体功能改善的根本分子机制,可以进行涵盖氧化磷酸化、线粒体链复合物、TCA循环、解偶联蛋白、转录因子、辅因子和ROS清除蛋白的关键线粒体基因(编码线粒体和基因组DNA)的描绘(profile)。

[0190] 在生物学和医学中的常规教导是,线粒体功能仅仅作为细胞的“能量工厂”。但是,超过95%(2900/3000)的编码线粒体蛋白的基因涉入与它们所在的分化细胞的专门职责有关的其它功能。这些职责在从胚胎至成年的发育过程中演化,并且随着组织生长而成熟和适应出生后环境。这些其它的、与ATP无关的功能紧密地涉入被细胞用于构建、分解、和再循环它的分子结构单元的重要代谢途径中的大部分。在没有线粒体的情况下,细胞甚至不能产生它们的生长和发挥功能所需的RNA和DNA。RNA和DNA的结构单元是嘌呤和嘧啶。线粒体含有嘧啶生物合成(二氢乳清酸脱氢酶)和制备血红蛋白所需的血红素合成(d-氨基乙酰丙酸合成酶)的限速酶。在肝脏中,线粒体被专门化为将尿素循环中的氨解毒。胆固醇代谢、雌激素和睾酮合成、神经递质代谢、以及自由基产生和解毒也需要线粒体。线粒体执行所有这些功能,另外氧化在饮食中摄入的脂肪、蛋白和碳水化合物。

[0191] 线粒体疾病是线粒体DNA或核DNA中的遗传突变或自发突变的结果,所述突变导致

通常存在于线粒体中的蛋白或RNA分子的功能改变。但是，线粒体功能问题可能仅仅影响某些组织，这归因于尚未充分理解的在发育和生长过程中发生的因素。甚至当考虑线粒体蛋白的组织特异性的异形体时，也难以解释临床上观察到的线粒体疾病综合征中受累器官系统的多变模式。

[0192] 线粒体疾病源自线粒体(存在于身体的除了红血细胞以外的每个细胞中的专门化隔室)的失效。线粒体负责产生身体维持生命和支持生长所需的能量中的超过90％。当它们失效时，在细胞内产生越来越少的能量。随后发生细胞损伤和甚至细胞死亡。如果该过程在身体中到处重复，整个系统开始失效，并且在其中发生该现象的人的生命会严重受损。线粒体疾病主要影响儿童，但是正在更多的认识到成年发作。

[0193] 线粒体疾病似乎会造成对脑、心脏、肝、骨骼肌、肾和内分泌和呼吸系统的细胞的大部分损伤。

[0194] 线粒体疾病的许多征状是非特异性的。所述征状也可能表现出阵发病程，并且周期性恶化。在关于线粒体医学的综述文章中，在线粒体疾病的不同表现中已经提及了偏头痛、以及肌痛、胃肠征状、耳鸣、抑郁、慢性疲劳和糖尿病的阵发状况(Chinnery和Turnbull(1997)QJM90:657-67;Finsterer(2004)EurJNeurol.11:163-86)。在患有线粒体疾病的患者中，临床征候学通常发生在与生理应激源有关的更高能量需求时，诸如疾病、禁食、超量锻炼、和极端环境温度。此外，心理应激源也经常会触发征候学，据推测是由于更高的脑能量需求，患者不能使其与足够的ATP产生相匹配。

[0195] 取决于受影响的细胞，征状可能包括：运动控制的丧失、肌无力和疼痛、胃肠障碍和吞咽困难、发育不全、心脏病、肝病、糖尿病、呼吸系并发症、癫痫发作、视力/听力问题、乳酸性酸中毒、发育迟滞和感染易感性。

[0196] 线粒体疾病包括、但不限于，阿耳珀病；Barth综合征；β-氧化缺陷；肉碱缺乏病；肉碱-酰基-肉碱缺乏病；慢性进行性外侧眼肌麻痹综合征；辅酶Q10缺乏；复合物I缺乏；复合物II缺乏；复合物III缺乏；复合物IV缺乏；复合物V缺乏；CPT I缺乏；CPT II缺乏；肌酸缺乏综合征；细胞色素c氧化酶缺乏；戊二酸尿症II型；卡恩斯-塞尔综合征；乳酸性酸中毒；LCHAD(长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏)；Leber氏遗传性视神经病；利氏病；致命性婴儿心肌病；勒夫特病；MAD(中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏)；线粒体细胞病；线粒体DNA耗竭；线粒体脑肌病、乳酸性酸中毒和中风样征状；线粒体脑病；线粒体肌病；线粒体隐性遗传共济失调综合征；肌营养不良、肌阵挛型癫痫伴破碎红纤维病；肌神经源性胃肠脑病；神经病、共济失调、色素性视网膜炎和上睑下垂；皮尔逊综合征；POLG突变；丙酮酸羧化酶缺乏；丙酮酸脱氢酶缺乏；SCHAD(短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏)；和极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏。

[0197] 本发明的一个方面是，包含有效量的石榴提取物的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0198] 本文中使用的“食物产品”表示从天然食物制备的产品。食物产品的非限制性例子包括果汁、葡萄酒、浓缩物、果酱、果冻、蜜饯、酱和提取物。本文中使用的“营养补剂”表示适合消费或其它施用(主要为了它的促进健康性能而不是它的热焓)的产品。

[0199] 本文中使用的术语“代谢综合征”表示一组医学病症，当它们一起发生时，会增加

发展心血管疾病和糖尿病的风险。它影响1/5的美国人，并且患病率随着年龄而增加。一些研究已经表明，在美国的患病率估计为人口的25％。根据国际糖尿病基金会(International Diabetes Foundation)一致全球定义(2006)，代谢综合征是向心性肥胖+下述任意2项：

[0200] ●甘油三酯升高：>150mg/dL(1.7mmol/L)，或该脂质异常的特助治疗；

[0201] ●HDL胆固醇下降：在男性中<40mg/dL(1.03mmol/L)，在女性中<50mg/dL(1.29mmol/L)，或该脂质异常的特助治疗；

[0202] ●血压升高：心脏收缩血压>130或心脏舒张血压>85mm Hg，或以前诊断出的高血压的治疗；和

[0203] ●空腹血糖升高：(FPG)>100mg/dL(5.6mmol/L)，或以前诊断出的II型糖尿病。

[0204] 本发明的一个方面是，包含有效量的鞣花鞣质的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0205] 在某些实施方案中，根据本发明的该方面和其它方面，鞣花鞣质选自：2-O-没食子酰基-石榴皮鞣质、Casuarictin、栗木鞣花素和Vecalagin、栗木素、木麻黄鞣亭、木麻黄鞣质、木麻黄鞣宁、诃黎勒酸、云实鞣酸、鞣料云实精、棣木鞣质E、表石榴素A、紫薇花素B、gemin D、石榴皮亭A、石榴皮亭B、大丁香素、印车前明碱、Lambertianin C、长梗马兜铃素、石榴素A、石榴素B、石榴素C、石榴素C、石榴素D、石榴叶鞣质、安石榴苷、石榴皮鞣质、石榴皮葡萄糖酸、roburin A、roburin B、roburin C、roburin D、roburin E、Rubusuaviin C、地榆素H-4、地榆素H-5、地榆素H-6、地榆素H-10、旌节花素、小木麻黄素、新唢呐素I、Tellimigrandin II、诃子鞣质、榄仁黄素A、榄仁黄素B、Tergallagin和富贵草碱/gallagyldilacton。当然，本发明也预见到其它鞣花鞣质。

[0206] 本发明的一个方面是，包含有效量的安石榴苷的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0207] 本发明的一个方面是，包含有效量的鞣花酸的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0208] 本发明的一个方面是，包含有效量的尿石素的药物，其用于治疗或预防选自下述的病症：肥胖、代谢速率下降、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、高脂血症、神经变性疾病、认知障碍、心境障碍、应激和焦虑障碍；用于体重控制；或用于增加肌肉性能或智力性能。

[0209] 在某些实施方案中，根据本发明的该方面和其它方面，所述尿石素是尿石素A。在某些实施方案中，根据本发明的该方面和其它方面，所述尿石素是尿石素B。在某些实施方案中，根据本发明的该方面和其它方面，所述尿石素是尿石素C。在某些实施方案中，根据本发明的该方面和其它方面，所述尿石素是尿石素D。

[0210] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是肥胖。

[0211] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是代谢速率下降。

[0212] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是代谢综合征。

[0213] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是糖尿病。

[0214] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是心血管疾病。

[0215] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是高脂血症。

[0216] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是神经变性疾病。

[0217] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是认知障碍。

[0218] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是心境障碍。

[0219] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是应激。

[0220] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述病症是焦虑障碍。

[0221] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于体重控制。

[0222] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于增加肌肉性能。

[0223] 在前述的每个方面，在一个实施方案中，所述药物是用于增加智力性能。

[0224] 本发明的一个方面是，增加或维持线粒体功能的方法。所述方法包括下述步骤：使细胞与有效量的尿石素或其前体接触，以增加线粒体的功能。

[0225] 本发明的一个方面是，治疗、预防、或控制与线粒体功能改变或线粒体密度下降有关的线粒体相关疾病或病症的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗与线粒体功能改变或线粒体密度下降有关的疾病或病症。

[0226] 本发明的一个方面是，增加代谢速率的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以增加代谢速率。如本文别处所述，尿石素的前体可以包括、但不限于，鞣花鞣质、安石榴苷和鞣花酸。

[0227] 本发明的一个方面是，预防或治疗代谢综合征的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗代谢综合征。

[0228] 本发明的一个方面是，预防或治疗肥胖的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗肥胖。

[0229] 本发明的一个方面是，预防或治疗心血管疾病的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以预防或治疗心血管疾病。

[0230] 本发明的一个方面是，治疗高脂血症的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以治疗高脂血症。在一个实施方案中，所述高脂血症是高甘油三酯血症。在一个实施方案中，所述高脂血症是游离脂肪酸升高。

[0231] 本发明的一个方面是，治疗代谢障碍的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗代谢障碍。在一个实施方案中，所述代谢障碍是糖尿病。在一个实施方案中，所述代谢障碍是肥胖。

[0232] 老化

[0233] 对于诸如阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森病(PD)和肌萎缩性侧索硬化(ALS)等神经变性疾病而言，最大的风险因素是老化。已经认为，线粒体通过线粒体DNA(mtDNA)突变的积累和活性氧(ROS)的净产生而促进老化。尽管大多数线粒体蛋白由核基因组编码，但是线粒体含有它们自身的DNA的多个拷贝。人mtDNA是16,569个碱基对的环状分子，其使用它自身的遗传密码编码呼吸链的13种多肽组分以及支持线粒体内蛋白合成所必需的rRNA和tRNA。

已知mtDNA中的遗传突变会造成多种疾病，其中的大多数疾病会影响脑和肌肉——具有高能量需求的组织。已经假定，在老化过程中产生的体细胞mtDNA突变会促成与老化和老化相关的神经变性一起发生的生理衰退。非常确定的是，mtDNA随着老化而积累突变，特别是大规模缺失和点突变。在mtDNA控制区中，在特定位点处的点突变可以在某些组织中积累至高水平：T414G(在培养的成纤维细胞中)，A189G和T408A(在肌肉中)，和C150T(在白血细胞中)。但是，这些控制区“热点”尚未在脑中观察到。在单个核苷酸处的点突变似乎以低水平在脑中发生，尽管总体水平可能较高。使用聚合酶链式反应(PCR)-克隆-测序策略，发现了在得自老年受试者的脑mtDNA的2个蛋白编码区中的点突变的平均水平为约2个突变/10kb。非编码区(其可能处于更低的选择压力下)可能积累2-4次之多。这些缺失和点突变随着老化的积累，与线粒体功能的下降相关。例如，已经发现了脑细胞色素氧化酶活性和细胞色素氧化酶基因(CO1)中增加的点突变水平之间的负相关。

[0234] ROS的净产生是认为线粒体会促进老化的另一个重要机制。线粒体含有多个能够产生ROS的电子载体以及抗氧化防御的广泛网络。线粒体损伤(包括其自身的氧化损伤)可以造成ROS产生和去除之间的失衡，从而导致ROS净产生。下述观察结果支持了线粒体ROS净产生对老化的重要性：增强线粒体抗氧化防御可以增加寿命。在果蝇属中，线粒体抗氧化物酶锰超氧化物歧化酶(MnSOD)和蛋氨酸亚砜还原酶的过表达会延长寿命。该策略在短命果蝇属菌株中是很成功的，但是在已经长寿的菌株中没有作用。但是，最近已经证实，在实验中靶向线粒体的过氧化氢酶的过表达会增加已经长寿的小鼠品系的寿命。

[0235] 已经观察到在老化过程中的认知减退发生在老化动物中，并且被认为是作为老化神经元的突触生理学的变化的结果而发生。认为这些变化会导致脑中神经元信号传递的综合功能的总体全面丧失(Bishop,Lu等人.2010)，并增加对氧化性应激和炎症的长期效应的易感性(Joseph,Shukitt-Hale等人.2005)。认为在正常老化过程中发生的细胞损失的主要原因是，由无效的和部分解偶联的氧化途径产生的自由基引起的氧化性应激。实际上，已经证实，在不同物种(漂亮新小杆线虫、黑腹果蝇、小鼠、大鼠、黑猩猩和人类)之间共有的老化特质已经成为线粒体功能降低的证据。该解释得到了下述观察结果的进一步验证：线粒体功能的显著损害会缩短漂亮新小杆线虫(Rea,Ventura等人.2007)和小鼠(Trifunovic,Wredenberg等人.2004;Kujoth,Hiona等人.2005)的寿命。通过过氧化氢酶在小鼠中的过表达来改善线粒体功能，会导致寿命延长(Schriner,Linford等人.2005)。

[0236] 随着老化和线粒体功能下降，脑中的神经元变得对年龄依赖性的病理学、以及细胞死亡更易感。这会导致神经元之间的连接的损失、以及神经元功能受损(神经递质损失，点火缺失)。有更多的证据表明，神经元如下对未修复的DNA损伤做出应答：通过表现遗传的机制而使基因表达沉默，从而导致细胞功能的进一步抑制。另外，老化神经元细胞在所有物种中都表现出在应激反应途径中涉及的基因的增强表达。

[0237] 在老化神经元细胞的体外培养物中观察到这些变化的许多标志物，所述培养物表现出减少的神经突生长晕和突起形成。该减少可以被神经元生长因子逆转(Rozovsky,Wei等人.2005)。

[0238] 神经变性障碍

[0239] 神经变性疾病是一组混杂的以解剖学上或生理学上相关的神经元系统的逐渐进展的选择性丧失为特征的障碍。原型例子包括阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森病(PD)、肌萎缩

性侧索硬化(ALS)和亨廷顿病(HD)。

[0240] 神经变性的早期阶段具有许多与在老化中观察到的减退相同的标志物。有趣的是,注意到,诸如阿尔茨海默氏病等疾病表现出随着年龄而增加的分辨率,超过50%的85岁以上的成年人表现出该疾病(Hebert,Scherr等人.2003)。如以上所讨论的,减退的线粒体功能似乎是老化的一种标志。神经元功能的这种减退可能对具有大量生物能需求的神经元群体产生显著影响,一组这样的神经元是在阿尔茨海默氏病中退化的大锥体神经元(Bishop,Lu等人.2010)。由受损的线粒体功能引起的这些类型的神经元的减退,可能是神经变性疾病发作的根源。可以在体外建立神经变性障碍对神经元存活的影响的模型。当将N2神经元细胞与A-β(Aβ)肽(它被认为是阿尔茨海默氏病的致病因子)一起温育时,存在对神经突生长晕的显著影响,该影响可被抗氧化剂逆转。Manczak等人.(2010)JAlzheimers Dis.20Suppl 2:S609-31。

[0241] 在神经变性中的细胞死亡的最常见形式是通过固有的线粒体细胞凋亡途径。该途径通过调节细胞色素c从线粒体膜间隙的释放而控制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9的活化。ROS(线粒体呼吸链活性的正常副产物)的浓度部分地由诸如锰超氧化物歧化酶(SOD2)和谷胱甘肽过氧化物酶等线粒体抗氧化剂来介导。ROS(氧化性应激)的过度产生是所有神经变性障碍的重要特征。除了ROS的产生以外,线粒体也与生命维持功能有关,所述生命维持功能包括:钙体内稳态、线粒体分裂和融合、线粒体膜的脂质浓度和线粒体通透性转变(MPT)。导致神经变性的线粒体疾病可能至少在某种水平上包括所有这些功能(DiMauro和Schon,2008)。

[0242] 有证据表明,线粒体功能障碍和氧化性应激在神经变性疾病发病机制中起原因作用,所述神经变性疾病包括4种最众所周知的疾病:阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病和肌萎缩性侧索硬化(也被称作Lou Gehrig氏病)。

[0243] 阿尔茨海默氏病(AD)在临床上的特征在于进行性认知减退,在病理学上的特征在于主要由淀粉样蛋白-β肽(Aβ)和神经原纤维缠结(其主要由过度磷酸化的tau构成)组成的老年斑的存在。约5-10%的病例是家族性的,以早发的常染色体显性的方式发生。已知3种蛋白与这样的家族性病例有关:淀粉样蛋白前体蛋白(APP)(其被β-和γ-分泌酶顺序地切割以产生Aβ)和早老素1和2(PS1和PS2)(其中的一种或另一种是每个γ-分泌酶复合物的组分)。大量文献支持了线粒体功能障碍和氧化损伤在AD的发病机制中的作用。氧化性损伤在AD脑中较早发生,早于显著斑块病理学的发作。氧化损伤在转基因APP小鼠中也早于Aβ沉积,其中与线粒体代谢和细胞凋亡有关的基因的增量调节甚至更早地发生,并且与发生氧化损伤的神经元共同局部化。

[0244] 最近已经揭示了连接氧化性应激和AD病理学的几个途径。氧化性应激可能可能活化改变APP或tau加工的信号传递途径。例如,氧化性应激会通过活化c-Jun氨基-端激酶和p38促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)而增加β-分泌酶的表达,并通过活化糖原合酶激酶3而增加异常的tau磷酸化。氧化剂诱导的关键性分子的灭活也可能是重要的。在蛋白质组学研究中,发现脯氨酰异构酶PIN1对氧化性损伤特别敏感。PIN1会催化影响APP和tau加工的蛋白构象变化。Pin1的敲除会在小鼠中增加淀粉样蛋白形成APP加工和细胞内Aβ水平。Pin1-敲除的小鼠也表现出tau过度磷酸化、运动和行为缺陷、以及神经元变性。氧化诱导的PIN1和类似敏感的蛋白的损伤因而在促进神经变性过程中是重要的。

[0245] 线粒体也在帕金森病(PD)中起重要作用,所述PD在临床上的特征在于进行性僵直、运动徐缓和震颤,在病理学上的特征在于色素沉着神经元在黑质中的缺失和路易小体(关于α-突触核蛋白和泛素免疫染色的特征性胞质包涵体)的存在。

[0246] 线粒体首先涉入PD,因为MPTP(1-甲基4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)(其代谢物MPP+会抑制线粒体电子传递链的复合物I)会在化合致幻药滥用者中造成帕金森综合征。该模型已经在实验动物中精制,其中鱼藤酮(另一种复合物-I抑制剂)或MPTP的慢性输注会在临床上导致帕金森病表型,并在病理学上导致黑质变性(其具有对α-突触核蛋白和泛素的胞质包涵体免疫反应)。在这些复合物-I抑制模型中的毒性机制可能涉及氧化性应激。当在患有特发性PD的患者的黑质中和在患有症状发生前的PD的患者中发现复合物-I缺乏和谷胱甘肽耗竭时,复合物-I抑制和氧化性应激被证实与天然存在的PD有关。

[0247] 许多与PD有关的基因也在疾病发病机制中涉及线粒体。到目前为止,已经将mtDNA和至少9个命名的核基因中的突变或多态性鉴别为造成PD或影响PD风险:α-突触核蛋白、parkin、泛素羧基端水解酶L1、DJ-1、磷酸酶和张力蛋白同系物(PTEN)诱导的激酶1(PINK1)、富含亮氨酸的重复单位激酶2(LRRK2)、核受体NURR1、HTRA2和tau。在核基因中,α-突触核蛋白、parkin、DJ-1、PINK1、LRRK2和HTRA2直接地或间接地涉入线粒体。在少数情况下,遗传的mtDNA突变会导致帕金森综合征,通常作为更大的综合征的一个特征。在一个家族中,Leber氏视神经萎缩G11778A突变与l-DOPA响应性的帕金森综合征有关,不确定地与痴呆、张力失常、眼肌麻痹和共济失调共同发生。值得注意的是,该突变是在复合物I的一个亚基中。核编码的mtDNA聚合酶-γ(POLG)基因中的突变会损害mtDNA复制,并导致多个mtDNA缺失,通常造成慢性进行性外侧眼肌麻痹和肌病。在这样的家族中,POLG突变也与帕金森综合征共分离。

[0248] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)在临床上的特征在于,肌肉组织的进行性虚弱、萎缩和痉挛状态,这反映了皮质、脑干和脊髓中的上和下运动神经元的变性。大约90%的病例是散发的(SALS),10%是家族性的(FALS)。约20%的家族性病例由Cu/Zn-超氧化物歧化酶(SOD1)中的突变造成。在SALS和FALS中,得自脊髓、神经和肌肉的尸体检查和活组织检查样品表现出线粒体结构、数目和局部化的异常。还已经在肌肉和脊髓中检测出呼吸链复合物的活性的缺陷。

[0249] 亨廷顿病(HD)在临床上的特征在于,舞蹈动作、精神病学障碍和痴呆,在病理学上的特征在于长突出物神经元在皮质和纹状体中的缺失。HD以常染色体显性的方式遗传,并且归因于CAG三核苷酸重复在亨廷顿(HTT)基因中的扩增,这会导致在对应蛋白中扩大的聚谷氨酰胺段。CAG(Q)重复的正常数目小于36;大于40的重复数目与人类疾病有关。多种证据证实了线粒体功能障碍在HD中的涉入。核磁共振光谱法揭示了皮质和基底神经节中增加的乳酸盐。生化研究表明电子传递链的复合物II和III的活性在人HD脑中的下降。在得自突变型Htt-敲入小鼠胚胎的纹状体细胞中,线粒体呼吸和ATP产生显著受损。

[0250] 本发明的一个方面是,治疗神经变性疾病、年龄相关的神经元死亡或功能障碍的方法。本文中使用的“神经变性疾病”或等效的“神经变性障碍”表示,与中枢神经系统中的功能性神经元的进行性损失有关的任何病症。在一个实施方案中,所述神经变性疾病与年龄相关的细胞死亡有关。示例性的神经变性疾病包括、但不限于,阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化(也被称作ALS和Lou Gehrig氏病)、以及艾滋病痴呆复合

征、肾上腺脑白质营养不良、亚历山大病、阿耳珀病、共济失调性毛细血管扩张、巴藤病、牛海绵状脑病(BSE)、卡纳万病、皮质基底变性、克雅病、痴呆伴列维小体、家族致命性失眠症、额颞叶退化、肯尼迪氏病、克拉伯病、莱姆病、马查多-约瑟夫病、多发性硬化、多系统萎缩、神经棘红细胞增多症、尼曼-匹克病、皮克病、原发性侧索硬化、进行性核上麻痹、雷夫叙姆病、Sandhoff病、弥散性脱髓鞘硬化、脊髓小脑性共济失调、亚急性脊髓混合变性、脊髓痨、泰-萨克斯病、中毒性脑病、传播性海绵状脑病和刺猬摇摆综合征。

[0251] 在一个实施方案中,所述方法用于治疗年龄相关的神经元死亡或功能障碍。这样的方法涉及不可归因于特定神经变性疾病(例如,阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病和帕金森病)的神经变性。

[0252] 在一个实施方案中,神经变性疾病选自:阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病和帕金森病。

[0253] 在一个实施方案中,神经变性疾病是阿尔茨海默氏病。

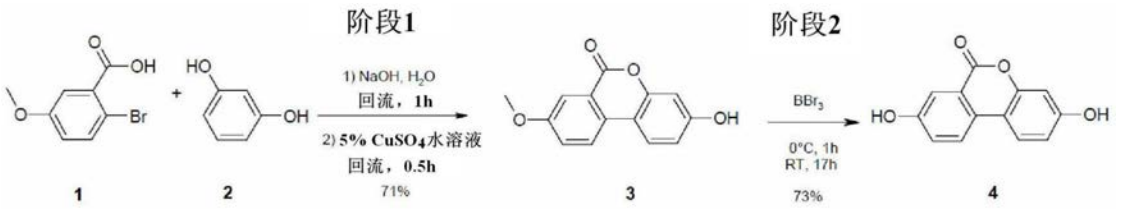
[0254] 所述方法包括下述步骤:给需要治疗神经变性疾病的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,由此治疗神经变性疾病。

[0255] 根据本发明的该方法和其它方法,本文中使用的"尿石素"表示尿石素A、尿石素B、尿石素C和尿石素D中的任一种或组合(参见,例如,图1和图2)。在一个实施方案中,尿石素是尿石素A、尿石素B、尿石素C、尿石素D,或者尿石素A、尿石素B、尿石素C和尿石素D的任意组合。在一个实施方案中,尿石素是尿石素A、尿石素B,或尿石素A和尿石素B的组合。在一个实施方案中,尿石素是尿石素A。在一个实施方案中,尿石素作为分离的尿石素来提供,例如,分离自天然来源,或通过全合成来制备。可以从头合成分离的尿石素。参见,例如,Ghosal的美国专利申请公开号2008/0031862,其整个内容通过引用并入本文。

[0256] 在一个实施方案中,如下在2阶段合成中合成了尿石素A(3,8-二羟基二苯并-α-吡喃酮)。阶段1是在有碱存在下发生的铜催化的反应(Hurtley反应),其中使起始原料2-溴-5-甲氧基苯甲酸和间苯二酚一起反应,以产生二氢-二苯并吡喃酮支架。在阶段2中,用BBr_3将苯并吡喃酮脱甲基化,产生3,8-二羟基二苯并-α-吡喃酮(尿石素A)。

[0257] 将2-溴-5-甲氧基苯甲酸1(27.6g)、间苯二酚2(26.3g)和氢氧化钠(10.5g)在水(120mL)中的混合物在回流下加热1小时。然后加入5%的硫酸铜水溶液(3.88g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$在50mL水中),并将该混合物回流另外30分钟。使混合物冷却至室温,并在布氏漏斗上过滤固体。用冷水(50mL)洗涤残余物,得到淡红色固体(38.0g),将其在热MeOH(200mL)中研磨。将混悬液在4℃放置过夜。过滤得到的浅红色沉淀物,并用冷MeOH(75mL)洗涤,得到作为淡褐色固体的标题化合物3。^1H NMR是根据3的结构。

[0258] 在0℃,向3(10.0g;41mmol;1.0当量)在无水二氯甲烷(100mL)中的混悬液中,加入1M的三溴化硼在无水二氯甲烷中的溶液(11.93mL纯的BBr_3在110mL无水二氯甲烷中)。将该混合物在0℃放置1小时,然后使其温热至室温。将该溶液在该温度搅拌17小时。过滤黄色沉淀物,并用冷水(50mL)洗涤,得到黄色固体,将其在乙酸(400mL)中加热至回流保持3小时。快速地过滤热溶液,并用乙酸(50mL)洗涤沉淀物,然后用乙醚(100mL)洗涤,得到作为黄色固体的标题化合物4。通过^1H和^{13}C-NMR确定结构和纯度。

[0259] 

[0260] 在一个实施方案中，本文中使用的“尿石素”是或可以包括葡糖醛酸化的、甲基化的或硫酸化的尿石素。

[0261] 根据本发明的该方法和其它方法，本文中使用的“尿石素前体”表示鞣花鞣质或鞣花鞣质代谢物，包括、但不限于鞣花酸(EA)。在一个实施方案中，尿石素前体是安石榴苷(PA)。在一个实施方案中，尿石素前体是石榴皮鞣质(PB)。参见，例如，图1。在一个实施方案中，尿石素前体是鞣花酸(EA)。在一个实施方案中，尿石素前体作为分离的尿石素前体来提供，例如，分离自天然食物来源，或通过全合成来制备。分离的尿石素前体通常从天然来源纯化或从头合成；一些尿石素前体(包括EA)可商购得自供应商，诸如Sigma Aldrich。

[0262] 也根据本发明的该方法和其它方法，尿石素的前体也包括含有鞣花鞣质和鞣花酸的天然食物，尤其是富含鞣花鞣质、鞣花酸、或鞣花鞣质和鞣花酸二者的天然食物。这样的食物包括某些浆果、葡萄、石榴、玫瑰果和坚果。在一个实施方案中，所述天然食物是石榴。

[0263] 另外，尿石素的前体包括从这类天然食物制备的经过加工的食物和饮料。所述经过加工的食物可以呈任何形式，包括、例如，果酱、果冻、蜜饯、酱、糊状食品、果汁、葡萄酒、提取物、浓缩物等。在一个实施方案中，所述经过加工的食物是石榴汁。

[0264] 在一个实施方案中，尿石素前体作为提取物来提供，例如，水果提取物。

[0265] 在一个实施方案中，尿石素前体作为浓缩物来提供，例如，水果浓缩物或果汁浓缩物。

[0266] 本发明的方法可以单独使用，或者与已知可用于治疗神经变性疾病的任意方法或化合物联合使用。例如，在一个实施方案中，本发明的方法可以与下述的任意一种或多种相组合：乙酰胆碱酯酶抑制剂，诸如多奈哌齐(donezepil)(Aricept®)、加兰他敏(Razadyne®)和利斯的明(Exelon®)，和N-甲基D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂，诸如美金刚(Namenda®)。

[0267] 本发明的一个方面是，改善认知功能的方法。本文中使用的“认知功能”表示与符号运算有关的任何心理过程，例如，知觉、记忆、注意力、言语理解、言语产生、阅读理解、意像建立、学习和推理。在一个实施方案中，“认知功能”表示知觉、记忆、注意力和推理中的任意一种或多种。在一个实施方案中，“认知功能”表示记忆。

[0268] 所述方法包括下述步骤：给需要改善认知的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，由此改善认知功能。

[0269] 用测量认知功能的方法是众所周知的，可以包括，例如，认知功能的任意方面的单独或组合试验。一个这样的试验是Prudhoe认知功能试验(Prudhoe Cognitive Function Test)。Margallo-Lana等人.(2003)J IntellectDisability Res.47:488-492。另一个这样的试验是小型心理状态检验(Mini Mental State Exam,MMSE)，其用于评估时间和空间取向、定位(registration)、注意力和计算、回忆、语言使用和理解力、复诵和复杂命令。

Folstein等人.(1975)J Psych Res.12:189-198。可用于测量认知功能的其它试验包括阿尔茨海默病评估量表-认知子量表(Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive,ADAS-Cog)(Rosen等人.(1984)Am J Psychiatry.141(11):1356-64)和剑桥神经心理学试验自动化组合(Cambridge Neuropsychological Test自动化的Battery,CANTAB)(Robbins等人.(1994)Dementia.5(5):266-81)。这样的试验可以用于以客观方式评估认知功能,使得可以测量和对比认知功能的变化,例如响应于根据本发明的方法的治疗。

[0270] 本发明的方法可以单独使用,或者与已知会改善认知功能的任意方法或化合物联合使用。例如,在一个实施方案中,本发明的方法与咖啡因或烟碱或二者的使用相组合。

[0271] 在一个实施方案中,所述受试者不具有认知障碍。例如,所述方法可以用于增强具有正常认知功能的受试者的认知功能。

[0272] 本发明的一个方面是,治疗认知障碍的方法。本文中使用的认知障碍表示损害认知功能的任何状况。在一个实施方案中,"认知障碍"表示谵妄、痴呆、学习障碍、注意力缺陷障碍(ADD)和注意力缺陷伴多动障碍(ADHD)中的任意一种或多种。在一个实施方案中,所述认知障碍是学习障碍。在一个实施方案中,所述认知障碍是注意力缺陷障碍(ADD)。在一个实施方案中,所述认知障碍是注意力缺陷伴多动障碍(ADHD)。

[0273] 所述方法包括下述步骤:给需要治疗认知障碍的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗认知障碍。

[0274] 本发明的方法可以单独使用,或者与已知可用于治疗认知障碍的任意方法或化合物联合使用。例如,在一个实施方案中,本发明的方法与刺激剂的使用相组合,所述刺激剂例如哌甲酯(例如,Ritalin®)、右苯丙胺(Dexedrine®)、混合的苯丙胺盐(Adderall®)、右旋甲基苯丙胺(dextromethamphetamine)(Desoxyn®)和lisdexamphetamine(Vyvanase®)。

[0275] 本发明的一个方面是,治疗或预防应激诱发的或应激有关的认知功能障碍的方法。本文中使用的"应激诱发的或应激有关的认知功能障碍"表示由应激诱发的或与应激有关的认知功能障碍。所述方法包括下述步骤:给需要治疗或预防应激诱发的或应激有关的认知功能障碍的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗或预防应激诱发的或应激有关的认知功能障碍。

[0276] 心境障碍

[0277] 脑组织的代谢(包括维持跨膜电势、信号转导和突触重塑)需要高水平的能量。精神病学征状和障碍(尤其是抑郁症)的增加,可能存在于患有线粒体疾病的患者中。

[0278] 通过多种不同技术测量的线粒体结构和功能已经被证实在具有心境障碍(包括重性抑郁)的患者中以及在其它情感谱群障碍中是异常的。

[0279] 2项研究揭示,增加了数倍的发展抑郁症的可能性可以与mtDNA一起母系遗传,这有力地证明,mtDNA序列变体可能诱导线粒体功能障碍,后者可以造成个体易于发展抑郁症(Boles等人,2005;Burnett等人,2005)。

[0280] 已经在几项研究中探究了线粒体功能障碍和单相抑郁之间的关联。在得自具有疑似或确诊重性抑郁的受试者(其中大部分受试者(可能)经过药物治疗)的尸检脑的研究中,

没有检测到共同的5kb mtDNA缺失的增加(Kato等人,1997;Sabunciyan等人,2007;Shao等人,2008,Stine等人,1993)。在额皮质、前额皮质和第三视觉皮质中发现了与线粒体功能关联的翻译产物的改变(Karry等人,2004;Whatley等人,1996)。已经报道了4种位于线粒体的蛋白在前扣带回皮质中的改变(Beasley等人,2006)。还已经在重性抑郁中报道了6/13的mtDNA编码的转录物在额皮质组织(布劳德曼区(BA)9和46)中(Shao等人,2008)中的基因表达减少和nDNA编码的线粒体mRNA和蛋白在小脑中的基因表达减少(Ben-Shachar和Karry,2008)。在一项新近的研究中,在半数的严重抑郁障碍病例中发现电子传递链复合物I亚基(NDUFS7)和复合物I活性在尸检前额皮质中的水平低于正常对照或在正常对照的最低范围处(Andreazza等人,2010)。在2项后来的研究中,作者不能检测到药物治疗对结果的任何影响。

[0281] 在得自患者(其具有伴随的身体征状的重度单相抑郁,对其进行寿命诊断)的肌肉中发现了呼吸链酶比例和ATP产生速率的下降以及小mtDNA缺失的患病率增加(但是共同的5kb mtDNA缺失没有增加)。药物治疗似乎不会影响结果(Gardner等人,2003b)。下述发现提示了临床关联性:基本上每个具有非常高的肉体主诉程度的抑郁受试者在活组织检查的肌肉中表现出低ATP产生速率(Gardner和Boles,2008a)。

[0282] 本发明的一个方面是,治疗心境障碍(也被称作情感障碍)的方法。本文中使用的“心境障碍”表示心境状态的紊乱,诸如在美国精神病学协会(American Psychiatric Association)公布的Diagnostic andStatistical Manual of Mental Disorders中所述。心境障碍包括、但不限于:重性抑郁、产后抑郁、心境恶劣和双相型障碍。在一个实施方案中,所述心境障碍是重性抑郁。

[0283] 所述方法包括下述步骤:给需要治疗心境障碍的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体,以治疗心境障碍。

[0284] 本发明的方法可以单独使用,或者与已知可用于治疗心境障碍的任意方法或化合物联合使用。例如,在一个实施方案中,本发明的方法与抗抑郁药的使用相组合。抗抑郁药是本领域众所周知的,且包括选择性5-羟色胺重摄取抑制剂(SSRI)、5-羟色胺-去甲肾上腺素重摄取抑制剂(SNRI)、去甲肾上腺素能和特定血清素能的抗抑郁药、去甲肾上腺素重摄取抑制剂、去甲肾上腺素-多巴胺重摄取抑制剂、选择性5-羟色胺重摄取抑制剂、去甲肾上腺素-多巴胺去抑制剂、三环抗抑郁药和单胺氧化酶抑制剂。

[0285] 本发明的一个方面是,治疗或预防应激诱发的或应激有关的心境障碍的方法。本文中使用的“应激诱发的或应激有关的心境障碍”表示由应激诱发的或与应激有关的心境状态的紊乱。这样的心境障碍有时被称作反应性心境障碍,并且可与其它心境障碍(例如,所谓的器质性心境障碍)区分开。所述方法包括下述步骤:给需要治疗或预防应激诱发的或应激有关的心境障碍的受试者施用有效量的尿石素或其前体,以治疗或预防应激诱发的或应激有关的心境障碍。

[0286] 本发明的一个方面是,治疗焦虑障碍的方法。本文中使用的“焦虑障碍”表示恐惧和焦虑的功能障碍状态,例如,与应激情境或应激情境的预期不成比例的恐惧和焦虑。在一个实施方案中,焦虑障碍是广泛性焦虑障碍、惊恐障碍、惊恐障碍伴广场恐怖、广场恐怖、社交焦虑障碍、强制性障碍和创伤后应激障碍中的任一种或组合。在一个实施方案中,焦虑障碍是广泛性焦虑障碍、强制性障碍、惊恐障碍、创伤后应激障碍和社交焦虑障碍中的任一种

或组合。在一个实施方案中，焦虑障碍是广泛性应激障碍。在一个实施方案中，焦虑障碍是创伤后应激障碍。在一个实施方案中，焦虑障碍是应激诱发的焦虑障碍。

[0287] 所述方法包括下述步骤：给需要治疗焦虑障碍治疗的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以治疗焦虑障碍。

[0288] 本发明的方法可以单独使用，或者与已知可用于治疗焦虑障碍的任意方法或化合物联合使用。例如，在一个实施方案中，本发明的方法与下述药物的使用相组合：心理疗法、苯二氮杂环庚三烯类、丁螺环酮(Buspar®)或β-阻滞剂中的任一种或组合。苯二氮杂环庚三烯类是本领域众所周知的，且包括、但不限于，氯硝西泮(Klonopin®)、劳拉西泮(Ativan®)和阿普唑仑(Xanax®)。可以与本发明的方法联合使用的其它药物包括丙米嗪(Tofranil®)和文拉法辛(Effexor®)。

[0289] 本发明的一个方面是，治疗或预防应激诱发的或应激有关的焦虑障碍的方法。本文中使用的“应激诱发的或应激有关的焦虑障碍”表示由应激诱发的或与应激有关的恐惧和焦虑的功能障碍状态。这样的焦虑障碍有时被称作反应性焦虑障碍，且可与其它焦虑障碍(例如，所谓的器质性焦虑障碍)区分开。所述方法包括下述步骤：给需要治疗或预防应激诱发的或应激有关的焦虑障碍的受试者施用有效量的尿石素或其前体，以治疗或预防应激诱发的或应激有关的焦虑障碍。

[0290] 本发明的一个方面是，促进神经突生长晕的方法。在一个实施方案中，所述方法是体外方法。在一个实施方案中，所述方法是体内方法。本文中使用的“神经突”表示从神经元的细胞体的任何突出物。在一个实施方案中，这样的突出物是轴突。在一个实施方案中，这样的突出物是树突。当描述未成熟的或发育中的神经元(特别是培养的细胞的神经元)时，经常使用该术语，因为难以在分化结束之前将轴突与树突区分开。神经突经常填充有微管束，其生长受神经生长因子(NGF)、以及tau蛋白、微管相关蛋白1(MAP1)和微管相关蛋白2(MAP2)刺激。神经细胞粘附分子N-CAM同时与另一种N-CAM和成纤维细胞生长因子受体结合，以刺激该受体的酪氨酸激酶活性，从而诱导神经突的生长。

[0291] 可以在形态学上或功能上测量神经突生长晕。形态学测量通常需要显微镜检查来测量神经突的长度和/或数目。

[0292] 本文中使用的“促进”表示增强或诱导。在一个实施方案中，“促进”是指诱导。例如，在阴性对照样品中的神经突生长晕可能是可忽略的，而在实验样品或处理样品中的神经突生长晕可能是不可忽略的。在一个实施方案中，“促进”是指增强。例如，在阴性对照样品中的神经突生长晕可能是不可忽略的，而在实验样品或处理样品中的神经突生长晕可能在统计上显著地大于阴性对照。当然，本文中使用的“促进”可以包括增强和诱导。

[0293] 在一个实施方案中，所述方法包括下述步骤：使神经细胞与有效量的尿石素或其前体接触，以促进神经突生长晕。

[0294] 在一个实施方案中，所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以促进神经突生长晕。

[0295] 本发明的方法可以单独使用，或者与已知可用于促进神经突生长晕的任意方法或化合物联合使用。例如，在一个实施方案中，本发明的方法可以与下述的任意一种或多种相

组合:NGF、tau蛋白、MAP1、MAP2、N-CAM,或者诱导NGF、tau蛋白、MAP1、MAP2、N-CAM或成纤维细胞生长因子受体中的任意一种或多种的表达的试剂。

[0296] 使用体外神经元细胞针对神经保护活性来筛选化合物

[0297] 在老化和神经变性的过程中,认知功能的进行性衰退主要是由于维持神经元通信的实体的损失。这些实体主要由神经元细胞体、神经突和将它们与靶细胞连接的突触触点组成。神经元表现出非常复杂的形态学。最复杂的神经元细胞类型(诸如伸出长达1米的轴突突起的运动神经元,或产生超过150,000个突触触点的黑质多巴胺能神经元)经常在正常老化或疾病中是最脆弱的。为了维持这样复杂的体系结构和有效地传递电信号和神经化学信号,神经元高度依赖于能量供给。因此,轴突运输、突触活动和离子梯度的维持高度依赖于线粒体功能。为了实现这些高要求的细胞功能,神经元随着时间而难以维持线粒体活性和确保氧化性应激的微妙平衡。这样的失衡经常被视作神经元功能障碍或过早变性的原因。

[0298] 因此,预见到,会促进神经元存活、或神经元突起和突触触点(其构成神经元复杂体系结构)的形成的任何治疗都会积极地影响神经元功能。化合物对神经元功能的影响的测量通常依赖于动物行为结果的冗长监测,这不适合生物活性的中或高通量筛选。基于神经母细胞瘤细胞系或原代神经元培养物的体外模型代表了用于评估化合物对重要形态学参数的影响的公认替代物,所述形态学参数会反映哺乳动物脑中的神经元维持它们的正常功能的能力。诸如突起的数目、它们的长度或复杂性等指标会揭示化合物对细胞内信号传递的关键步骤的影响。尽管应当牢记,这样的参数仅仅间接地反映了高等脑功能的性能,但是它们会提供有价值的化合物效力估测,所述效力可以转换成在正常或患病状况中改善的认知或运动功能。

[0299] 代谢障碍

[0300] 在关键代谢组织(肝、肌肉、脂肪组织、胰腺)中的线粒体功能涉入代谢疾病的发病机制。在每种这样的组织中,线粒体氧化活性必须适当地完全氧化营养物负荷,特别是脂肪酸。完全氧化的失效可以导致脂质中间体、不完全脂肪酸氧化产物和ROS的积累。这些细胞事件共同地促进脂肪积累、胰岛素抗性、改变的胰岛素分泌、低级炎症和氧化性应激,它们都是II型糖尿病和肥胖的组分。

[0301] 在人类的几项研究中已经确立了线粒体活性在代谢疾病的发病机制中的重要性。例如,骨骼肌中的胰岛素抗性已经与线粒体氧化磷酸化的缺陷相关联,其中与对照受试者相比,在II型糖尿病患者的胰岛素抗性后代中观察到线粒体活性下降了30%。Petersen KF,等人.(2004)New Engl J Med.350:664-71。还已经观察到,与健康的瘦受试者相比,肥胖患者表现出线粒体活性的20%下降以及线粒体大小的35%下降。Petersen KF,等人.(2003)Science 300:1140-2。最后,年龄相关的线粒体功能减退会在老年人中促进胰岛素抗性。因此,已经报道了在老年人中的线粒体氧化和磷酸化活性与年轻受试者相比下降了40%。这些观察结果将线粒体功能紊乱与代谢障碍、特别是“糖尿病肥胖(diabesity)”相关联(Kelley DE,等人.(2002)Diabetes 51:2944-50)。

[0302] 线粒体氧化活性(也被称作氧化磷酸化)可以视为作为代谢疾病风险的基础的关键决定因素。线粒体活性的减小可以由遗传因素(例如,家族史、种族划分)、表现遗传的机制、发育暴露、进食行为和老化来介导。

[0303] 当持续的燃料过量(例如,来自进食过量或受损的脂肪贮存)超过能量需求和/或氧化能力、和/或适当的补偿机制不足(例如,由于线粒体因为活性不足或故障而不能适应更高的细胞氧化需求)时,存在增加的代谢障碍风险。形成的脂质积累和氧化性应激可以改变转录应答和损伤线粒体,从而进一步降低氧化磷酸化能力,造成燃料过量的有害作用,从而升高代谢障碍的风险。

[0304] 完全氧化脂肪酸的充分性依赖于下述两项之间的平衡:(i)净线粒体氧化活性(取决于产生能量来满足细胞需求的需要,例如,收缩和离子运输),和(ii)燃料可用性(取决于食物摄入、体脂肪率和脂肪贮存容量)。当氧化活性等于或超过燃料负荷时,达到平衡。

[0305] 在正常体内平衡条件下,可以改变氧化活性和细胞燃料可用性,以确保线粒体功能对于周围代谢环境而言是适当的。例如,通过锻炼可以增加细胞对能量的需求,并且通过重量减轻和/或食物摄入减少可以减少燃料可用性。在该背景下,氧化能力和/或活性、燃料负荷、或调节线粒体活性(急性应答)的能力的个体间差异、增加线粒体能力(慢性应答)、或消退氧化性应激,会决定代谢平衡的调定点。这样的差异可变得突出,特别是在促进肥胖的(obesogenic)环境(其特征在于促进增加的食物摄入总量、不健康食物摄入、和身体不活动的环境)中。因此,具有高氧化能力或适应性应答的个体会对大燃料负荷具有高耐受性。相反,具有降低的氧化能力和/或次优的适应应答的个体不会耐受中等的高燃料负荷,从而导致脂质积累、不完全氧化、ROS产生和胰岛素抗性。

[0306] 不足的补偿会随着时间而导致慢性胰岛素抗性和代谢障碍。增加氧化能力(例如,锻炼)或减少燃料负荷(重量减轻)的补偿机制,可以解决氧化能力不足。但是,对于大多数超重/肥胖和II型糖尿病或前驱糖尿病的受试者而言,这些生活方式变化经常显得不足够或不可实现。

[0307] 线粒体对于骨骼肌功能而言是特别重要的,因为间歇性收缩对该组织提出了高氧化需求。线粒体在确保足够水平的、肌肉肌原纤维节的收缩所需的ATP中起关键作用。肌原纤维节对ATP的这种高水平需求可能已经促进了肌肉中的不同的肌膜下和肌原纤维节相关的线粒体群体。此外,肌细胞必须维持代谢弹性,即随着周围激素和能量条件而变化地快速调节底物氧化的能力。例如,健康的肌肉组织主要在禁食状态氧化脂质,如通过低呼吸商(RQ)所证实的,随后在进食状态过程中转换成碳水化合物氧化(增加的RQ)。燃料(特别是脂质)的可用性和在线粒体内氧化它们的能力,对于持续锻炼而言也是关键性的。因而,线粒体功能容量可能直接地影响肌肉代谢功能,并且因为它对总体质量的较大贡献,可能对全身代谢具有显著影响。这种可能性得到了下述发现的支持:在具有高代谢和对重量增加的抗性(路夫特综合征)的个体中,骨骼肌中的线粒体含量增加。

[0308] 胰岛素抗性和糖尿病

[0309] 骨骼肌是人类中最大的胰岛素敏感的器官,占胰岛素刺激的葡萄糖消耗的超过80%。因而,在该组织中的胰岛素抗性对全身葡萄糖体内稳态聚重大影响。实际上,已经在得自胰岛素抗性的、但是血糖正常的受试者(处于糖尿病发展高风险)的肌肉中观察到多种代谢缺陷,包括:(i)减少的胰岛素刺激的糖原合成;(ii)胰岛素信号转导的改变;和(iii)增加的肌肉脂质积累。尽管目前仍然不清楚这些缺陷中的任一种是否在胰岛素抗性中起原因作用,但是肌细胞内的脂质过量与胰岛素抗性的严重程度强烈相关(甚至在纠正肥胖程度以后),并且已经在多种纤维类型的肌肉中观察到。此外,脂质过量已经在实验中与胰岛

素抗性的诱导和胰岛素信号转导的改变相关联。因而，受损的线粒体功能促进胰岛素抗性的一种可能的机制是，经由改变的脂肪酸代谢。增加的组织脂质负荷(象肥胖一样)和/或持续的不活动可能导致脂肪酰辅酶A(CoA)、二酰甘油、神经酰胺、不完全氧化的产物和ROS的积累，它们都已经在实验中与减少的胰岛素信号传递和作用相关联。可能将受损的线粒体氧化功能与胰岛素抗性相联系的其它机制包括：(i)减少的用于需要能量的功能(诸如胰岛素刺激的葡萄糖摄取)的ATP合成；(ii)钙体内稳态(锻炼诱导的葡萄糖摄取所必需的)的异常；和(iii)在锻炼过程中减少的ATP产生，这可能随时间促成减少的有氧代谢能力、肌肉疲劳和减少的自愿锻炼——进一步促进不活动刺激的胰岛素抗性的缺陷循环。

[0310] 线粒体能力对于胰腺β(β)-细胞调节的胰岛素分泌的关键功能而言是重要的。快速的(第一阶段)和更延长的(第二阶段)胰岛素分泌依赖于葡萄糖代谢和线粒体氧化能力；葡萄糖氧化会增加ATP/ADP比，从而抑制质膜K-ATP通道并允许电压-门控钙通道打开。增加的细胞质钙然后触发质膜停靠的胰岛素颗粒的胞吐作用(第一阶段)。随后颗粒向质膜的募集(第二阶段)似乎依赖于由回补产生的线粒体代谢物。ROS的短暂的受控的产生也需要线粒体代谢，所述ROS是触发颗粒胞吐作用的线粒体信号传递途径所需的。

[0311] 线粒体糖尿病仅仅在老化后发展，平均发病年龄在35-40岁之间(对于母系遗传的糖尿病伴耳聋(MIDD))和48岁(对于14577T/C，即母系遗传的II型糖尿病中的线粒体DNA错义突变)。这与诸如青年发病的成年型糖尿病2(MODY2)等综合征中的糖尿病幼童时期发病形成反差，在所述MODY2中，葡糖激酶(糖酵解的第一步)中的突变会导致减弱的葡萄糖刺激的ATP产生和胰岛素分泌。这些数据提示，线粒体糖尿病更可能源自β-细胞功能的逐渐衰退，而不是源自ATP产生不足引起的急性功能缺损。

[0312] 在糖尿病的发病机制所涉及的组织(肝、肌肉、脂肪组织和胰腺β-细胞)中的线粒体功能对于细胞代谢的多个方面而言是关键性的。在每种这样的组织中，线粒体氧化活性必须适当地完全氧化营养物负荷，特别是脂肪酸。完全氧化的失效可以导致脂质中间体、不完全脂肪酸氧化产物和ROS的积累，从而诱导胰岛素抗性(肌肉、肝、脂肪)和改变的分泌(β-细胞)。

[0313] 线粒体活性的轻度缺乏、和/或不能响应于细胞能量需求而增加活性和能力，可以解释在具有糖尿病家族史的个体中观察到的减少的锻炼能力。该表型会随着时间而促进减少的自愿锻炼，并增加线粒体活性和脂肪酸负荷之间失衡的可能性。其次，由营养过剩、肥胖和不活动引起的能量代谢的长期失衡可以直接促成细胞和线粒体ROS产生的增加。过量的ROS又可以诱导胰岛素抗性和线粒体功能障碍。例如，有糖尿病倾向的C57BL6小鼠的高脂肪高蔗糖饮食会造成线粒体改变、以及伴随的增强的ROS产生和受损的胰岛素敏感性。类似地，体外肌细胞向饱和脂肪酸的暴露或小鼠的高脂肪进食会导致线粒体结构和胰岛素抗性的改变，所述改变可被抗氧化剂逆转。因而，氧化性应激可以诱导线粒体功能障碍和伴随的胰岛素抗性——可能是目的在于限制进一步氧化性损伤的适应应答。重要的是，氧化性应激的消除可以逆转胰岛素抗性。

[0314] 肌肉性能

[0315] 在其它实施方案中，本发明提供了通过施用治疗有效量的、增强或活化线粒体的提取物、制剂或化合物来增强肌肉性能的方法。例如，含有鞣花鞣质或鞣花酸的提取物、或者含有鞣花鞣质、鞣花酸或尿石素的组合物会起活化线粒体的作用，并且可以用于改善身

体耐力(例如,执行诸如锻炼、体力劳动、体育活动等身体任务的能力)、抑制或延缓身体疲劳、增加血氧水平、增加健康个体的能量、增强工作能力和耐力、减少肌肉疲劳、减少应激、增强心脏和心血管功能、改善性能力、增加肌肉ATP水平、和/或减少血液中的乳酸。在某些实施方案中,所述方法包括:施用会增加线粒体活性、增加线粒体生源和/或增加线粒体质量的量的含有鞣花鞣质或鞣花酸的天然提取物、或者含有鞣花鞣质、鞣花酸或尿石素的组合物。

[0316] 竞技能力表示运动员在参与体育活动时其肌肉的表现能力。通过肌肉收缩强度的增加、肌肉收缩振幅的增加、或刺激和收缩之间的肌肉反应时间的缩短,测量增强的竞技能力、强度、速度和耐力。运动员是指这样的个体:其在任意水平参与体育,且其力图在他们的表现中达到提高的强度、速度或耐力水平,例如,健身者、骑脚踏车者、长距离跑步者和短距离跑步者。增强的竞技能力表现为克服肌肉疲劳的能力、在更长的时间段内维持活动且具有更有效的练习的能力。

[0317] 预见到,本发明的组合物和方法也可有效地治疗肌肉相关的病理学状况,包括:肌病,神经肌肉疾病,诸如杜兴肌营养不良,急性少肌症,例如,肌肉萎缩和/或与烧伤有关的恶病质,卧床休息,肢体固定,或重大的胸部、腹部和/或矫形外科外科手术。

[0318] 慢性应激

[0319] 还已经报道,慢性应激对认知性能、更精确地对学习和记忆过程具有显著影响(Sandi 2004;Sandi和Pinelo-Nava 2007)。几个因素是慢性应激对认知功能产生影响的决定因素。应激的水平在决定应激是促进认知功能还是有害时是重要的。有人认为,响应于应激情境,身体会诱导应激激素,所述激素会对学习、记忆和可塑性产生倒U效应。Baldi等人.(2005)N在线arity Biol ToxicolMed.3(1)9-21;Joels(2006)Trends Pharmacol Sci.27(5):244-50。因而,应激的水平对认知功能具有重大影响,高水平的应激会导致高水平的应激激素和下降的性能。

[0320] 还已经证实,应激的持续时间(慢性相对于急性)起重要作用,对认知功能、以及脑结构和功能具有不同的影响(Sandi和Loscertales 1999;Pinnock和Herbert 2001)。并且,应激会作用于记忆形成过程,产生不同的结果,急性应激会促进巩固(记忆储存),并抑制提取(记忆回忆)(Roozendaal 2003)。另外,应激的预测性也对在认知性能方面观察到的影响的严重程度起作用(Maier和Watkins 2005)。

[0321] 另外,发生慢性应激的背景、以及个体固有的应激反应的个体差异和性别,在决定慢性应激的最终认知影响中起重要作用(Bowman,Beck等人.2003;Shors 2004;Joels,Pu等人.2006)。慢性应激的影响的生物学基础尚未明确。但是,一个经常观察到的特征是,糖皮质激素在介导(促进和损害)应激对不同记忆过程和阶段的作用中的关键作用。尽管糖皮质激素的作用机制仍然有待阐明,已经在体外证实会损害由神经生长因子(NGF)诱导的神经元生长晕。Unsicker等人.(1978)Proc Natl Acad Sci USA.75:3498-502。此外,由诸如NGF等因子诱导的神经元结构和神经突生长晕与它们的神经保护活性强烈相关,这再次提示神经元结构对于认知而言是重要的。

[0322] 应激和结构重塑

[0323] 最初,海马是接受密集注意力的脑区域,因为许多报道指出了慢性应激在海马依赖性的记忆任务中的损害作用。但是,集中的工作现在正在提供证据表明遍布脑的慢性应

激的更整体的影响，还已经报道了前额皮质和杏仁核的重大变化。在杏仁核中发生的树突分支和突触发生的变化，是参与应激诱发的心境改变的似乎合理的候选原因。并且，认为在海马和前额皮质水平发生的变化在应激诱发的心境改变中起关键作用。

[0324] 海马.海马在记忆过程中的重要作用是众所周知的。海马依赖性的任务通常会受急性和慢性应激操作影响。在人类中，神经成像研究已经报道了与应激有关的海马萎缩以及糖皮质激素相关的认知和神经精神病学改变，包括抑郁症。

[0325] 在啮齿类动物中，突出的和重复多次的效应是，来自CA3锥体神经元的顶树突中的树突萎缩。这种减少的树突分支已经与下述现象相关联：(i)兴奋性的谷氨酸能突触的突触密度的下降；(ii)被称作树突瘤的复杂树突棘的体积的皱缩，所述树突瘤位于近端顶树突和CA3锥体细胞的胞体上，并且其充当苔藓纤维突触输入的突触后靶标；和(iii)突触囊泡和线粒体在输入的苔藓纤维末端中的重排。反过来，还已经报道了海马CA1区的突触重塑(以突触特征变化的方式)的证据。

[0326] 前额皮质.前额皮质(PFC)，和更具体地它的内侧部(mPFC)，在高级认知过程(包括执行功能、工作记忆、注意力)中以及在认知和情感相关信息的整合中起关键作用。应当指出，mPFC含有高水平的糖皮质激素受体，且涉入应激诱发的下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)活性的调节。如上面所指出的，临床证据突出了mPFC作为在多种神经精神病学障碍(包括抑郁症)中发生显著改变的区域。

[0327] 得自啮齿动物研究的大量证据表明了应激诱发的PFC中的树突皱缩。具体地，描述了重大神经元重塑发生在mPFC的层II/III中，作为向慢性应激的重复暴露或重复糖皮质激素治疗的后果。描述的在该区域中的重大变化是：(i)树突萎缩，包括来自锥体神经元的顶树突的总长度和数目的下降；和(ii)顶树突棘密度的下降(在锥体神经元的顶树突上的所有轴-棘突触中的大约1/3丧失)。

[0328] 抗抑郁效果.使用非典型的(改进的三环)抗抑郁药噻奈普汀的治疗被证实会逆转慢性应激在大鼠的CA3锥体神经元中诱导的树突萎缩。此外，还报道了抗抑郁药会促进轴突和树突出芽。这些发现提示，抗抑郁药可以对神经元重塑具有重大影响，从而提供了在从抑郁症康复的过程中要重新构造的有关回路的基础。

[0329] 生命早期应激

[0330] 本发明的一个方面是，治疗生命早期应激的心境效应的方法。所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的尿石素或其前体，以治疗生命早期应激对心境、抑郁症、焦虑和冒险行为的影响。

[0331] 已经报道，生命早期应激对认知性能具有显著的有害作用，所述认知性能包括心理学参数，诸如增加的抑郁症、焦虑和异常冒险行为的比例或易感性。Heim C,Nemeroff CB.(2001)Biol Psychiatry 49:1023-1039。已经报道了注意缺陷/多动症(ADHD)、创伤后应激障碍(PTSD)和重性抑郁在已经经历生命早期应激的个体中的高比例。Famularo R等人.(1992)JAm Acad ChildAdolesc Psychiatry 31:863-867;Pelcovitz D等人.(1994)J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 33:305-312。认为生命早期应激对下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴具有影响。Ladd CO等人.(2000)Prog Brain Res 122:81-103。认为控制HPA轴对应激的应答性的关键效应物是中枢促皮质素释放因子(CRF)。

[0332] CRF是一种遍布于CNS中的41氨基酸肽。这包括下丘脑室旁核(PVN)的内侧小细胞

部的细胞体，所述PVN是HPA轴的重要组分。在应激后，CRF从正中隆起神经末梢释放进下丘脑-垂体门静脉循环，并被运输至垂体前叶，在此处它结合CRF受体(CRF1和CRF2)。与CRF1受体结合的CRF会产生表现为应激、抑郁症和焦虑的效应。与CRF2受体结合的CRF会刺激促肾上腺皮质激素(ACTH)的产生和释放，所述ACTH又会刺激在应激反应中涉及的糖皮质激素的产生。

[0333] 在由母体分离造成的生命早期应激模型中，观察到一致的长期升高的CRF mRNA水平。Plotsky PM等人.(2005)Neuropsychopharmacology 30:2192-2204。已经证实，这样的CRF增加在杏仁核水平在增加焦虑反应中起作用。有人认为，CRF神经环路的持久致敏会引起在暴露于生命早期应激的小鼠中观察到的异常升高的焦虑、抑郁症和冒险行为。

[0334] 使用抗抑郁药来改善由生命早期应激引起的心理障碍的当前策略

[0335] 许多研究已经证实，抗抑郁药会在啮齿类动物和灵长类动物(包括人类)中降低HPA轴的CRF活性。Banki CM等人.(1992)J Affect Disord 25:39-45;Brady LS等人.(1992)Brain Res 572:117-125;Brady LS等人.(1991)J Clin Invest 87:831-837;De Bellis MD等人.(1993)Am JPsychiatry 150:656-657;Veith RC等人.(1993)Psychiatry Res 46:1-8。几类抗抑郁药物似乎会造成一个或多个CRF神经系统的活性的下降。这些包括选择性的5-HT重摄取抑制剂(SSRI)，其已经被证实可有效地治疗几种已经与生命早期应激相关联的精神疾病(例如，抑郁症和PTSD)。Hidalgo RB等人.(2000)JPsychopharmacol 14:70-76。值得注意的是，在随机化的安慰剂对照试验中，已经经历生命早期应激并罹患PTSD的受试者对氟西汀有应答。van der Kolk BA等人.(1994)J Clin Psychiatry 55:517-522。此外，SSRI(包括氟西汀和帕罗西汀)在儿童和青少年的早发性抑郁症的治疗中表现出与安慰剂相比显著的效力。Martin A等人.(2000)ChildAdolesc Psychiatr Clin NAm 9:135-157。还已经发现，三环抗抑郁药会在暴露于母体分离的成年灵长类动物中逆转增加的HPA轴对应激的反应性。Suomi SJ.(1991)Ciba Found Symp 156:171-183。几种可利用的药物(包括SSRI)似乎在暴露于生命早期应激的儿童和成年人的治疗中可能是有益的。Fisher PA等人.(2000)J Am Acad ChildAdolesc Psychiatry 39:1356-1364。

[0336] 其它适应症

[0337] 本发明也可用于治疗多种其它疾病和病症中的任一种，在所述其它疾病和病症中：有缺陷的或减少的线粒体活性参与所述疾病或病症的病理生理学，或者增加的线粒体功能会产生所希望的有益效果。作为一个例子，本发明另外包括可以用于治疗与减少的精子能动性有关的男性不育的方法和化合物。Nakada等人.(2006)Proc Natl Acad Sci USA.103:15148-53。作为另一个例子，本发明另外包括可以用于治疗黄斑变性和某些其它年龄相关的和遗传的眼病的方法和化合物。Khandhadia等人.(2010)Expert Rev Mol Med.12:e34;Jarrett等人.(2010)Ophthalmic Res.44:179-90。另一个例子是，治疗听力损失的方法，所述听力损失包括、但不限于年龄相关的听力损失。在这些和其它适应症中的每一种中，所述方法包括：给需要这种治疗的受试者施用有效量的如在本文中公开的尿石素或其前体，以治疗所述适应症。

[0338] 制剂和临床应用

[0339] 本文中使用的“受试者”表示活的脊椎动物。在一个实施方案中，受试者是哺乳动物。在一个实施方案中，受试者是人。

[0340] 如本文中使用的，与受试者的疾病、障碍或病症结合使用的术语“治疗”是指，使受试者的疾病、障碍或病症的至少一种临床或客观表现减少可检测的量。在一个实施方案中，与受试者的疾病、障碍或病症结合使用的术语“治疗”是指治愈受试者的疾病、障碍或病症。

[0341] 尿石素或其前体可以单独地或者与其它试剂一起以多种方式施用给受试者(例如，哺乳动物)。例如，可以口服地或胃肠外地施用尿石素或其前体。胃肠外地包括、但不限于，静脉内地、肌肉内地、腹膜内地、皮下地、关节内地、滑膜内地、眼内地、鞘内地、局部地或通过吸入。这样，尿石素或其前体的给药形式可以呈多种形式，包括天然食物、经过加工的食物、天然果汁、浓缩物和提取物、可注射的溶液、微胶囊、纳米胶囊剂、脂质体、硬膏剂、吸入形式、鼻喷雾剂、滴鼻剂、滴眼剂、舌下片剂和持续释放制剂。

[0342] 本发明的化合物可以以分离形式提供。本文中使用的术语“分离的”是指，基本上除去否则可能与目标化合物一起发现的(例如，如在自然界中发现的)其它化合物或组分。在一个实施方案中，当化合物被基本上完全除去否则可能与目标化合物一起发现的其它化合物或组分时，所述化合物是分离的。在一个实施方案中，当化合物是纯的时，它是分离的。

[0343] 本发明的化合物可以掺入用于治疗给药的多种制剂中。更具体地，本发明的化合物通过与适当的药学上可接受的载体或稀释剂相组合可以配制成药物组合物，并且可以配制成固体、半固体、液体或气态形式的制剂，诸如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒、软膏剂、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球和气雾剂。这样，化合物的施用可以以不同的方式来实现，包括口服、含服、直肠、胃肠外、腹膜内、真皮内、透皮和气管内给药。活性剂在给药后可以是全身性的，或者可以通过使用局部给药、壁内给药或使用植入物(其作用是将活性剂量保留在植入部位处)而局部化。

[0344] 在药物剂型中，所述化合物可以以它们的药学上可接受的盐的形式施用。它们也可以与其它药学活性化合物适当组合地使用。下述方法和赋形剂仅仅是示例性的，并且绝不是限制性的。

[0345] 就口服制剂而言，所述化合物可以单独使用，或者与下述适当的添加剂联合使用以制备片剂、散剂、颗粒或胶囊剂：例如，常规添加剂，诸如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉；粘合剂，诸如结晶性的纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；崩解剂，诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或钠羧甲纤维素；润滑剂，诸如滑石粉或硬脂酸镁；和如果需要的话，稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和矫味剂。

[0346] 可以如下将所述化合物配制成注射制剂：将它们在水性或非水性溶剂中溶解、混悬或乳化，所述溶剂例如植物油或其它类似的油、合成的脂肪族酸甘油酯、高级脂肪族酸的酯或丙二醇；和如果需要的话，使用常规的添加剂诸如增溶剂、等张剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0347] 所述化合物可以用于通过吸入来施用的气雾剂制剂中。本发明的化合物可配制到加压的可接受的推进剂中，所述推进剂例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。

[0348] 此外，所述化合物可通过与多种基质(如乳化基质或水溶性基质)混合而制成栓剂。本发明的化合物可通过栓剂经直肠施用。栓剂可包括在体温融化、但在室温固化的媒介物，如可可脂、碳蜡及聚乙二醇。

[0349] 可提供用于口服或直肠给药的单位剂型，如糖浆剂、酏剂和混悬液，其中每个剂量单位(例如一茶匙、一汤匙、一个片剂或一粒栓剂)含有预定量的组合物，所述组合物含有一

种或多种本发明的化合物。类似地，用于注射或静脉内给药的单位剂型可包含在组合物中的本发明的化合物，所述组合物作为在无菌水、生理盐水或其它药学上可接受的载体中的溶液，其中每个剂量单位(例如，mL或L)含有预定量的组合物，所述组合物含有一种或多种本发明的化合物。

[0350] 用于持续释放制剂的植入物是本领域众所周知。用可生物降解的或不可生物降解的聚合物将植入物配制为微球、板等。例如，乳酸和/或羟乙酸的聚合物会形成被宿主良好耐受的可侵蚀的聚合物。可以将含有抑制性化合物的植入物放在目标部位附近，使得局部活性剂浓度相对于身体的其它部位增加。

[0351] 本文使用的术语“单位剂型”是指，适合作为用于人及动物受试者的单元剂量的物理上离散的单位，每个单位含有预定量的本发明化合物，其计算为与药学上可接受的稀释剂、携带者或媒介物联合足可产生希望的作用的量。本发明的新颖单位剂型的规范取决于应用的具体化合物及欲达到的效果和在宿主中与每种化合物相关的药物动力学。

[0352] 药学上可接受的赋形剂(如媒介物、佐剂、载体或稀释剂)是公众易于获得的。此外，药学上可接受的辅料(如pH调节剂及缓冲剂、张度调节剂、稳定剂、湿润剂等)是公众易于获得的。

[0353] 就临床应用而言，尿石素或尿石素前体以治疗有效量施用。本文中使用的“有效量”表示足以实现期望的生物学效应的量。本文中使用的“治疗有效量”表示在单次剂量或多次剂量中足以实现期望的治疗效果的量。技术人员可以基于体外研究、临床前研究、或临床研究、或它们的任意组合来确定治疗有效量。

[0354] 定量给药通常是每天至每周。在一个实施方案中，定量给药是至少每周1次。例如，受试者可以接受每周1次、每周2次、每周3次或隔日1次的给药。在一个实施方案中，定量给药是至少每天1次。例如，受试者可以接受每天1次或多次给药。

[0355] 就临床应用而言，通常以在约0.2-150毫克(mg)尿石素/千克(kg)受试者体重范围内的量施用尿石素。在一个实施方案中，以等于或相当于2-120mg尿石素/kg受试者体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以等于或相当于4-90mg尿石素/kg受试者体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以等于或相当于8-30mg尿石素/kg受试者体重的剂量施用所述尿石素或其前体。在要施用尿石素前体而不是尿石素的情况下，以与上述量的尿石素相当的量施用。

[0356] 任何给定的剂量可以作为单次剂量或作为分份剂量来施用。

[0357] 在一个实施方案中，以足以达到至少0.001微摩尔(μM)的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.01μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.1μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少1μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少5μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少10μM的峰值血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。

[0358] 在一个实施方案中，以足以达到至少0.001微摩尔(μM)的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.01μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少0.1μM的持续血清水平的

剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少1μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少5μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。在一个实施方案中，以足以达到至少10μM的持续血清水平的剂量施用所述尿石素或其前体。使用任意合适的方法，例如，高压液相色谱法(HPLC)或HPLC-MS，可以测量持续血清水平。

[0359] 在一个实施方案中，所述尿石素或其前体作为石榴汁来施用，所述石榴汁的量为25mL至5L，或鞣花鞣质、鞣花酸、尿石素或它们的任意组合的等效剂量。表4显示了不同水平的石榴汁对不同石榴化合物的消费。该范围涵盖了不同品种的石榴之间的化合物浓度差异。为了计算鞣花酸当量，假定每摩尔安石榴苷的代谢会导致1摩尔鞣花酸的释放，并且该转化以100％效率发生。通过假定存在的所有鞣花酸(包括源自安石榴苷的鞣花酸)以100％效率转化成尿石素，确定尿石素水平。不考虑除了安石榴苷和鞣花酸以外的其它鞣花酸来源。

[0360] 表4.

[0361]

果汁当量 (mL)	安石榴苷 (mg/d)	鞣花酸 (mg/d)	鞣花酸当量(1:1) (mg/d)	总尿石素(1:1) (mg/d)
25	10-65	3-30	20-35	15-25
50	20-130	6-60	40-70	30-50

[0362]

75	30-195	9-90	60-105	45-75
100	40-260	12-120	80-140	60-100
150	60-390	18-180	120-210	90-150
200	80-510	24-240	160-280	120-200
250	100-650	30-300	200-350	150-250
500	200-1300	60-600	400-700	300-500
750	300-1950	90-900	600-1050	450-750
1000	400-1600	120-1200	800-1400	600-1000
2000	800-3200	240-2400	1600-2800	1200-2000
3000	1200-4800	360-3600	2400-4200	1800-3000
4000	1600-6400	480-4800	3200-5600	2400-4000
5000	2000-13000	600-6000	4000-7000	3000-5000

[0363] 在一个实施方案中，所述受试者不为除了根据本发明的方法治疗病症以外的任何目的而服用尿石素或其前体。在一个实施方案中，所述受试者不为治疗动脉粥样硬化、血栓形成、癌症、不希望的血管生成、感染或炎症而服用尿石素或其前体。

[0364] 实施例

[0365] 现在一般地描述本发明，通过参考下述内容会更容易地理解本发明，下述内容仅仅为了举例说明本发明的某些方面和实施方案的目的而提供，无意限制本发明。

[0366] 实施例1

[0367] 从石榴化合物制备功能性提取物

[0368] 在所述的标准的基于聚合物吸附的柱中，使用基于多酚吸附的提取操作，制备在

本申请中描述的含有特定分子的石榴提取物。为了制备源自石榴汁的提取物31008和1108，使用标准的制汁和制造工艺，将石榴制汁，并在高分子色谱树脂上吸附为纯汁。将树脂Amberlite XAD-16(Rohm&Haas)填充进半制备型柱中，并装载提取的汁。用水洗涤所述柱以除去糖直至完成(白利糖度低于0.1％)。用100％乙醇洗脱多酚。在真空下蒸发剩余的乙醇，以制备每升中包含4.5g总多酚的浓缩提取物，这使用用于总多酚含量的Folin测定进行测定。以与提取物31008和1108类似的方式制备提取物1011，但是随后使用喷雾干燥器将该液体提取物喷雾干燥，以制备最终的粉末提取物。使用HPLC-MS来鉴别化合物，发现提取物31008、1108和1011含有分子安石榴苷、石榴皮鞣质、新唛呐素和长梗马兜铃素。

[0369] 如下制备源自石榴外壳的提取物71109：手工地使外壳与石榴假种皮果肉分离，随后用手工水果榨汁机榨汁。为了提取最大量的多酚，将榨过的石榴部分的饼/渣连贯地浸入水中保持几分钟(5分钟)，以便增加提取效率。将提取的石榴溶液离心澄清，然后吸附到高分子色谱Amberlite XAD-16树脂(Rohm&Haas)(其填充在半制备型柱中)上，并装载从石榴外壳提取的水。用水洗涤所述柱以除去糖直至完成(白利糖度低于0.1％)。用100％乙醇洗脱多酚。在真空下蒸发剩余的乙醇，以制备每升中包含17.1g总多酚的浓缩提取物，这使用用于总多酚含量的Folin测定进行测定。此技术是本领域已知方法的改进，所述已知方法如用于从各种植物和浆果纯化多酚的几种已公开方法所述。Tuck,K.L.和P.J.Hayball(2002)“Major phenolic compounds in olive oil:metabolism and health effects.”J Nutr Biochem 13(11):636-644;和Schieber,A.,P.Hilt,等人.(2003)“A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace.”Innovative FoodSci.Emerging Technol.4:99-107。

[0370] 为了制备提取物61109，使用离心分配色谱法对石榴的水性提取物进行分级分离。将分离级分低压冻干，以制备高度富含安石榴苷(>90％)的提取物61109。

[0371] 安石榴苷的纯化

[0372] 提取物的制备

[0373] 将石榴提取物溶解在16mL有机/水相混合物(1:1)中，并在特氟隆滤器(0.45μm)上过滤。

[0374] 使用离心分配色谱法从提取物分离安石榴苷

[0375] 使用离心分配色谱法CPC，从石榴提取物分离安石榴苷。CPC仪器是由Kromaton Technologies(Angers,法国)提供的FCPC®1000仪器，其配有1000mL容量的转子。用4-路二元高压步进泵泵入溶剂。经由配备20mL样品环的高压注射阀(Rheodyne)，将样品引入CPC柱中。用配备制备型流动池的二极管阵列检测(DAD)检测器，监测流出物。通过级分收集器来收集级分。所述分离步骤在室温进行。

[0376] 为了完成提取，首先将固定相以没有旋转的上升模式引入柱中，然后穿过固定相泵入流动相，直到达到平衡阶段。然后，将旋转速度从0增加至1000rpm，并以20mL/min的流速将流动相泵入柱中。在注射10g石榴提取物以后，每分钟收集20mL级分。通过在λ＝260nm的在线UV吸光度测量，监测流出的有机相的含量。

[0377] 使用洗脱-推出操作从柱回收所有化合物：在100min的经典洗脱以后，用固定相替代用作流性液体的流动相，直到包含的所有体积(1000mL)被推出柱。具有94-97％色谱纯度的、含有安石榴苷(A和B异构体的混合物)的级分在洗脱的51-63分钟之间得到，具有85-

88％的色谱纯度的第二级分在64-79min之间得到。

[0378] 为了确定纯化水平，通过HPLC-DAD在260nm检测波长处检查纯化的样品。将样品上Prosontil C18,5μm,250x 4mm柱。使用的溶剂是H_2O mQ+9.1％TFA/乙腈+0.1％TFA，流速为1mL/min。

[0379] 实施例2

[0380] 促进原型骨骼肌细胞系(C2C12肌管)中的线粒体基因表达增强的化合物的体外筛选测定

[0381] 骨骼肌在代谢体内稳态的调节中起关键作用，因为它们参与代谢功能诸如能量消耗和胰岛素敏感性的维持。这些功能与线粒体活性紧密相关，并且线粒体功能的损害在有缺陷的代谢体内稳态和代谢障碍(诸如II型糖尿病、肥胖和血脂异常)的发展中起原因作用。在分化的C2C12细胞(肌管)中的与线粒体活性有关的基因的基因表达谱，是适用于评估化合物对线粒体活性的影响的模型，其中评价众多反映线粒体活性的途径，例如，线粒体生源、糖酵解、脂肪酸β-氧化、电子传递链(ETC)、线粒体动力学。

[0382] 为了评估化合物对线粒体基因表达的影响，通过剥夺血清4天，使C2C12成肌细胞分化成肌管(Cantó等人.(2009)Nature.458:1056-60)。以1、10或50μM的终浓度，与鞣花酸或尿石素A(都溶解在DMSO中，终浓度0.1％)一起温育肌管48小时。使用DMSO作为对照(终浓度0.1％)。在处理结束时，用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞，并立即根据生产商的说明书(Trizol Reagent,Invitrogen)通过加入1mL Trizol试剂来提取mRNA。提取后，根据生产商的说明书，通过反转录来制备cDNA。

[0383] 通过实时定量PCR(Watanabe等人.(2004)J Clin Invest.113:1408-18)，使用下述引物集合(Fwd:正向引物;Rev:反向引物)，评估控制线粒体功能的基因(PGC-1α、Tfam、PFKFB3、CPT1b、MCAD、LCAD、Ndufa2、Cyt c和Mfn2)的表达水平：

[0384] PGC-1α:(Fwd)AAGTGTGGAACTCTCTGGAACTG(SEQ ID NO:1)

[0385] (Rev)GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG(SEQ ID NO:2)

[0386] Tfam:(Fwd)AAGTGTTTTTCCAGCATGGG(SEQ ID NO:3)

[0387] (Rev)GGCTGCAATTTTCCTAACCA(SEQ ID NO:4)

[0388] PFKFB3:(Fwd)TCATGGAATAGAGCGCC(SEQ ID NO:5)

[0389] (Rev)GTGTGCTCACCGATTCTACA(SEQ ID NO:6)

[0390] CPT1b:(Fwd)CCCATGTGCTCCTACCAGAT(SEQ ID NO:7)

[0391] (Rev)CCTTGAAGAAGCGACCTTTG(SEQ ID NO:8)

[0392] MCAD:(Fwd)GATCGCAATGGGTGCTTTTGATAGAA(SEQ ID NO:9)

[0393] (Rev)AGCTGATTGGCAATGTCTCCAGCAAA(SEQ ID NO:10)

[0394] LCAD:(Fwd)GTAGCTTATGAATGTGTGCAACTC(SEQ ID NO:11)

[0395] (Rev)GTCTTGCGATCAGCTCTTTCATTA(SEQ ID NO:12)

[0396] Ndufa2:(Fwd)GCACACATTTCCCCACACTG(SEQ ID NO:13)

[0397] (Rev)CCCAACCTGCCCATTCTGAT(SEQ ID NO:14)

[0398] Cyt c:(Fwd)TCCATCAGGGTATCCTCTCC(SEQ ID NO:15)

[0399] (Rev)GGAGGCAAGCATAAGACTGG(SEQ ID NO:16)

[0400] Mfn2:(Fwd)ACGTCAAAGGGTACCTGTCCA(SEQ ID NO:17)

[0401] (Rev)CAATCCCAGATGGCAGAACTT(SEQ ID NO:18)

[0402] PGC-1α(PPARγ-co调节剂1α)和Tfam(线粒体转录因子A)是线粒体功能(即线粒体生源和线粒体磷酸化氧化(mOXPHOS))的主要调节剂。它们的表达水平的增加会揭示线粒体活性的总体增强。在线粒体的关键功能中涉及的其它靶基因的评估,允许鉴别增强的途径。PFKFB3(6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3)是糖酵解(即,使用葡萄糖来产生能量)的关键酶。在好氧条件下(即,当存在氧供给时),经由糖酵解从葡萄糖产生的丙酮酸被线粒体用来通过克雷布斯循环产生能量(ATP)。CPT1b(肉碱O-棕榈酰转移酶1b)、MCAD(中链酰基CoA脱氢酶)和LCAD(长链酰基CoA脱氢酶)在线粒体脂肪酸摄入和β-氧化(从脂肪酸产生能量的2个关键步骤)中起关键作用。Ndufa2(NADH脱氢酶[泛醌]1α亚复合物亚基2)和Cyt c(细胞色素c)分别是线粒体电子传递链的复合物I和IV的亚基。这些蛋白在线粒体呼吸链和能量产生(来自克雷布斯循环产生的还原当量)中具有重要作用。Mfn2(线粒体融合蛋白2)参与线粒体动力学和融合过程。在增加的线粒体重塑和/或线粒体生源(每个细胞的线粒体数目增加)的背景下,它的表达增加。

[0403] 图3所示的数据清楚地指示,鞣花酸和尿石素A会通过调节在几个线粒体代谢途径中涉及的众多基因的表达以剂量依赖性的方式增加线粒体活性。

[0404] 实施例3

[0405] 促进原型骨骼肌细胞系(C2C12肌管)中的线粒体活性增强的化合物的体外筛选测定

[0406] 柠檬酸合酶是三羧酸(TCA)循环的初始酶和进入TCA循环的限速步骤。TCA循环会产生NADH2和FADH2,它们然后被用于给产生质子(能量)梯度的电子传递链提供动力,所述质子梯度将用于产生ATP。这样,柠檬酸合酶是线粒体数目和线粒体活性的唯一标志物。通过测量化合物或制剂对柠檬酸合酶酶活性的影响,可能评估化合物的刺激线粒体活性(即,OXPHOS和ATP产生)的能力。

[0407] 柠檬酸合酶会促进乙酰辅酶A(乙酰基CoA)和草酰乙酸之间的反应以形成柠檬酸。乙酰基CoA将2个碳贡献给草酰乙酸的4个碳,形成具有6个碳的柠檬酸。乙酰基CoA的硫代酸酯的水解会导致具有巯基基团的CoA(CoA-SH)的形成。通过CoA-SH的巯基与混合物中的DTNB之间的反应(形成5-硫代-2-硝基苯甲酸(TNB)),测量柠檬酸合酶的活性。通过测量在412nm的吸光度(柠檬酸合酶测定试剂盒,目录号CS0720,Sigma Aldrich),通过分光光度计法观察该黄色产物(TNB)。

[0408] 通过剥夺血清4天,使C2C12成肌细胞分化成肌管(Cantó等人.(2009)Nature.458:1056-60)。与终浓度为1或10μM的安石榴苷一起,或与终浓度为1、10或50μM的鞣花酸或尿石素(都溶解在DMSO中,终浓度0.1%)一起,温育肌管48小时。使用DMSO作为对照(终浓度0.1%)。在处理结束时,用PBS洗涤细胞3次,并根据生产商的说明书(柠檬酸合酶测定试剂盒,目录号CS0720,Sigma Aldrich)测定柠檬酸合酶活性。

[0409] 如图4所示,安石榴苷、鞣花酸和尿石素会以剂量依赖性的方式增加柠檬酸合酶活性,从而证实了线粒体活性和/或线粒体密度(每个细胞的线粒体数目)的总体增加。这些结果证实了通过线粒体基因的基因表达谱得到的结果(实施例1),从而表明处理过的分化的C2C12中的线粒体活性和线粒体生源的增强。

[0410] 统计学:单因素方差分析,*$p<0.05$。

[0411] 实施例4

[0412] 促进原型骨骼肌细胞系(C2C12肌管)中的AMP-活化的蛋白激酶(AMPK)活性的化合物的体外筛选测定

[0413] AMPK充当调节几个细胞内系统的代谢主开关,包括系统包括细胞的葡萄糖摄入、脂肪酸的β-氧化和葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)的生源和线粒体。AMPK的能量感知能力可以促进它的检测在休息和锻炼(肌肉刺激)期间发生的AMP:ATP比例的波动并做出反应的能力。作为一个例子,在一场锻炼期间,AMPK活性增加(AMPK的磷酸化,P-AMPK),同时肌细胞发生由细胞对ATP的极端需求引起的代谢应激。在活化(AMPK磷酸化,P-AMPK)后,AMPK如下增加细胞能量水平:抑制消耗能量的合成代谢途径(脂肪酸合成、蛋白合成等),和刺激产生能量的分解代谢途径(脂肪酸氧化、葡萄糖运输等)。结果,AMPK活化会导致线粒体功能的增强,包括增加的OXPHOS和线粒体生源。

[0414] 通过剥夺血清4天,使C2C12成肌细胞分化成肌管(Cantó等人.(2009)Nature.458:1056-60)。与充当阳性对照的白藜芦醇(RSV)一起,或者与终浓度为50μM的鞣花酸(EA)或尿石素A(UL)(都溶解在DMSO中,终浓度0.1%)一起,将肌管温育1小时。DMSO用作对照(DMSO的终浓度:0.1%)。在处理结束时,用PBS洗涤细胞3次,并通过蛋白质印迹评估AMP-活化的蛋白激酶(AMPK)。在化合物处理以后,在含有磷酸酶抑制剂的缓冲液中裂解C2C12细胞,并使用标准的Bradford测定来确定蛋白浓度。

[0415] 将25μg蛋白的等效物用于在10%SDS-PAGE凝胶上分离,随后通过标准蛋白质印迹法操作进行转移。将针对AMPK(细胞信号传递)和磷酸化的AMPK(P-AMPK,细胞信号传递)的抗体用于检测。

[0416] 如图5所示,磷酸化形式和因而活化形式的AMPK(即,P-AMPK)的蛋白质印迹分析指示,与对照处理的细胞相比,在用鞣花酸或尿石素处理过的细胞中,AMPK的磷酸化(P-AMPK)的水平和因此AMP-活化的蛋白激酶(AMPK)的活化的水平确实增加。该数据指示,鞣花酸和尿石素A都是AMPK活化剂。这进一步支持了下述观察结果:鞣花酸和尿石素会诱导线粒体功能的增加。

[0417] 实施例5

[0418] 促进PC-12细胞中的神经突生长晕的化合物的筛选测定

[0419] 已经证实,神经元培养物中的神经突生长晕和每个细胞的平均突起的数目与神经元功能相对应。已经证实,慢性应激会导致树突长度和分支数目的下降,该效应可在除去应激后逆转。此外,已经证实,该可逆性会随着老化受到抑制(Bloss,Janssen等人.2010)。还有其它证据表明,学习和新奇的感觉经验与神经棘形成的增加和伸长突起的消除有关。因此,突触的结构可塑性在学习和记忆中起重要作用(Yang,Pan等人.2009)。实际上,诸如神经生长因子(NGF)等化合物诱导的神经突生长晕的水平和突起的数目与它们的神经保护能力强相关。随着老化,该突触可塑性变得受损,并存在增加的神经棘损失和降低的突触密度(Dumitriu,Hao等人.2010)。神经变性疾病还对神经突生长晕有影响。A-β(Aβ)肽(其在阿尔茨海默氏病中起重要作用)会抑制小鼠神经母细胞瘤细胞中的神经突生长晕。因此,通过测定对体外神经突生长晕的影响,可以鉴别对处于慢性应激下的神经元、发生老化的神经元、和存在于神经变性疾病中的神经元具有神经保护作用的化合物和制剂。

[0420] 在去甲肾上腺素能大鼠嗜铬细胞瘤细胞系的细胞(PC-12细胞)上,试验了不同的

鞣花鞣质和它们的代谢物安石榴苷(PA)、石榴皮鞣质(PB)、新唢呐素(TL)、鞣花酸(EA)和尿石素(UA)对体外神经突生长晕的作用，所述PC-12细胞已经被证实会响应于神经生长因子(NGF)而分化(Greene和Tischler 1976)。已经证实，在这些分化的PC-12细胞中的神经突生长晕会被双丁酰环AMP(dbcAMP)强烈促进(Gunning,Landreth等人.1981)，使用该化合物作为阳性对照。使用特异性的Janus N-端激酶(JNK)抑制剂SP600125作为阴性对照，所述SP600125已经被证实会降低不同的神经突生长晕参数(Xiao,Pradhan等人.2006)。在所述测定中试验的鞣花鞣质和它们的代谢物是合成的或者从供应商购得，所述供应商包括Funakoshi、Sigma和Chemos。将储备溶液等分，并在-20℃保存。

[0421] 在37℃、5％CO_2、在聚L-赖氨酸包被的培养瓶中，在完全培养基(RPMI 1640+10％热灭活的马血清+5％胎牛血清)中培养PC-12细胞(ATCC CRL-1721)。

[0422] 在铺板后24h，在补充了100ng/mL NGF(2.5S NGF,Invitrogen)的完全培养基中，在培养瓶中进行细胞分化。每3天更换补充了NGF的培养基，并在8天时段内诱导分化。

[0423] 在即将开始实验之前，将所有待测化合物制成50mM的在二甲基亚砜(DMSO)中的储备溶液。在所有实验组的培养基中的最终DMSO浓度是0.1％。

[0424] 对于神经突生长晕测量，用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤分化细胞，在脱离后收集，并在完全培养基中以5,000个细胞/孔的密度重新铺板(生物包被成像96孔板)，所述完全培养基补充了100ng/mL NGF、含有或不含10μM SP600125(阴性对照)、1mM dbcAMP(阳性对照)、或5x 10^{-7}M的试验化合物。在未分化的对照组中，在重新铺板后不添加NGF。

[0425] 在培养72h后，用PBS洗涤PC-12细胞，在1％低聚甲醛溶液中固定20分钟。用PBS洗涤3次后，用德克萨斯红马来酰亚胺(Texas Red Maleimide)探针进行免疫荧光标记，所述探针会与蛋白的半胱氨酸残基的巯基反应，从而允许整个细胞形态学(包括神经突)的显影。

[0426] 在自动化的共焦显微术中进行免疫荧光分析。在具有8X8视野剪辑画面的X20物镜下，用BD途径855系统获取图像。然后用Metamorph®软件的神经突模块，从获取的图像测量神经突生长晕。分析总和平均生长晕、每个细胞的突起的总数和平均数、和具有广大生长晕(定义为长于20μm的生长晕)的细胞的总数和百分比。

[0427] 如图6所示，所有化合物(除了PA和PB以外)都使孔中的PC-12细胞的数目增加了>30％，这表明浓度为0.5μM的这些化合物的营养效应(对于UA、EA和TL，相对于分化对照(ctrl)，$p<0.001$)。

[0428] 神经突生长晕的促进

[0429] 如图7和图8所示，所有试验化合物(PA、PB、TL、EA和UA)能够从分化的PC-12细胞诱导稳健的神经突生长晕。与所有试验化合物的分化对照相比，平均生长晕(图7)表现出>30％的增加。表现出显著生长晕(图8)的细胞的百分比明显大于分化细胞在所有试验化合物下观察到的结果

[0430] (就UA和PB而言$p<0.05$(26％增加)，就PA而言$p<0.01$(>26％增加)，就EA和TL而言$p<0.001$(>37％增加))。

[0431] 突起形成和分支的促进

[0432] 化合物PA、PB、UA、EA和TL在施用给分化的PC-12细胞时都诱导了突起数目的增加。化合物(UA,$p<0.05$(15.7％增加)；PA,$p<0.01$(26.3％增加)；EA和TL,$p<0.001$(>31％增加))

象dbcAMP(阳性对照)一样有效地或更有效地促进突起形成(图9)。

[0433] 与在分化的对照中观察到结果相比,神经突分支明显更高,大多数化合物诱导分支增加了2倍。

[0434] 实施例6

[0435] 促进原代多巴胺能的TH阳性的神经元中的神经突生长晕的化合物的筛选测定

[0436] 原代神经元由于它们的未转化状态而充当化合物对神经元可塑性和分化(诸如神经元生长晕以及树突和突起的形成)的标志物的影响的良好体外模型。检查了不同的鞣花鞣质代谢物安石榴苷(PA)、尿石素(UA)、鞣花酸(EA)和新唢呐素(TL)对该过程的影响。在测定中试验的化合物购自包括Funakoshi和Sigma在内的供应商,或者化学合成。将储备溶液等分,并在-20℃保存。

[0437] 从大鼠E14胚胎制备原代中脑培养物。小心地切细腹侧中脑,并离解。然后以100,000个细胞/孔(96-孔板)的密度,在含有10%热灭活的马血清的DMEM F12培养基中将细胞铺板,所述培养基含有或不含有JNK-特异性的抑制剂SP600125(10μM)(其充当阴性对照)或dbcAMP(1mM)(其充当阳性对照)或各自在0.1μM剂量的试验化合物。

[0438] 铺板后72h,从通过自动化共焦显微术(X4物镜,剪辑画面4X4)获取并覆盖整个孔表面的图像,测量对多巴胺能的酪氨酸羟化酶(TH)阳性的神经元的神经突生长晕的影响,并使用Metamorph®软件的神经突生长晕模块定量。由此得到神经突生长晕的几个代表性参数:分析总和平均生长晕、每个细胞的突起的总数和平均数、和具有广大生长晕(定义为长于20μm的生长晕)的细胞的总数和百分比。所有实验一式四份地进行。

[0439] 神经突生长晕的促进

[0440] 如图10-16所示,在上面的PC-12筛选测定中选择的化合物在0.1μM的浓度也能够在原代中脑神经元中诱导神经突生长晕。如通过图10所示的每个细胞的平均生长晕测得的,大多数化合物象dbcAMP一样有效地促进每个细胞的生长晕(>25%的生长晕增加)(UA、GA、EA、TL相对于对照,$p<0.001$)。所有试验化合物表现得象dbcAMP一样好或者优于dbcAMP(图11)。

[0441] 神经突突起和分支的增加

[0442] 所有试验化合物表现出每个细胞的平均突起的显著增加(>10%)(图12),以及最大突起长度的显著增加(>10%)(图13)。

[0443] 在有阳性对照(dbcAMP)存在下,原代细胞表现出分支的增加。但是,JNK抑制剂SP600125没有抑制原代细胞分支(象在PC12细胞中一样),但是能够促进分支,尽管没有达到与dbcAMP相同的水平(60%增加相对于用dbcAMP观察到的86%增加)。化合物UA、EA和TL能够促进分支达到与dbcAMP相同的水平(>111%的分支增加,图14)。

[0444] 每个细胞的树突数目和树突长度的增加

[0445] UA、EA和TL显著增加了树突数目,其水平高于dbcAMP,所有化合物表现出>18%的增加(图15)。

[0446] 鞣花酸、尿石素A和新唢呐素都导致>26%的树突长度增加,高于dbcAMP的观察结果(图16)。

[0447] 实施例7

[0448] 石榴提取物、安石榴苷、鞣花酸和尿石素A会减少饲喂高脂肪饮食的小鼠的重量增

加和脂肪量

[0449] 7周龄的雄性C57BL6/J小鼠购自Charles River Laboratory(L'Arbresle,法国),并在实验开始之前适应动物设备2周。将小鼠按每组5只圈养在标准的圈养条件下,使用12小时光照-黑暗循环,并自由接近食物和水。从9周龄开始,给小鼠饲喂高脂肪饮食(HFD)(60%kcal来自脂肪;D12492;Research Diets Inc.,New Brunswick,NJ,USA),持续14周。每周监测体重。

[0450] 给不同治疗组的小鼠施用:(i)与食物混合的尿石素A(食物混合物),以达到55mg/kg体重/天(mkd)的定量给药;(ii)与食物混合的鞣花酸(食物混合物),以达到75mkd的定量给药;(iii)安石榴苷(管饲法),以达到90mkd的定量给药;或(iv)石榴提取物(PE)(管饲法),以达到140mkd总多酚的定量给药。在这些实验中使用的典型石榴提取物具有下述组成:多酚,140mkd;安石榴苷,13.1mkd;和鞣花酸,13.2mkd。就通过管饲法治疗的动物而言,每天在上午8:00和10:00之间进行管饲法(7天/周);将化合物与盐水溶液(0.9%NaCl)混合,并以5mL/kg体重的终体积提供。给在高脂肪对照组中的小鼠饲喂与实验动物相同的饮食。给在对应的不同对照组中的小鼠施用单独的高脂肪饮食或高脂肪饮食+每天管饲媒介物(盐水)。给另一个小鼠对照组饲喂单独的标准食物饮食。

[0451] 在开始治疗以后5周(对于高脂肪饮食饲喂的小鼠)和在开始治疗以后2周(对于食物饮食饲喂的小鼠)通过EchoMRI(Echo Medical Systems,Houston,TX,USA)监测身体组成。将动物单个地放在塑料圆筒中,然后引入EchoMRI系统中保持约2min进行身体组成扫描(瘦体量和脂肪量)。

[0452] 结果显示在图17和18中。

[0453] 与饲喂标准食物饮食(CD)的对照小鼠相比,饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠发展成严重肥胖(图17A)。未治疗的高脂肪饲喂的小鼠的体重增加与治疗5周后通过EchoMRI测得的脂肪量的百分比的增加(图17B)和肌肉质量的百分比的下降(瘦体重)(图17C)有关。在饲喂高脂肪饮食的小鼠中,用尿石素A(通过食物混合物施用)治疗或用安石榴苷或石榴提取物(PE)(二者通过管饲法施用)治疗会预防肥胖的发生,与对照HFD饲喂的小鼠相比,治疗的HFD饲喂的小鼠的体重增加显著下降(图17A)。此外,与未治疗的HFD饲喂的小鼠相比,用尿石素A、安石榴苷或PE治疗的HFD饲喂的小鼠中的脂肪量显著下降(图17B)。

[0454] 饲喂标准食物饮食并用鞣花酸或尿石素A治疗的小鼠也表现出脂肪量的下降和伴随的肌肉(瘦体重)增加,这表明,这些治疗有利于重量控制和瘦或肌肉体格(图18B)。

[0455] 实施例8

[0456] 石榴提取物、安石榴苷、鞣花酸和尿石素A会增加正常和肥胖小鼠的肌肉质量

[0457] 如在实施例7中所述,将雄性C57BL6/J小鼠分组和治疗。

[0458] 在标准食物饮食饲喂的小鼠和HFD饲喂的小鼠中,用PE、安石榴苷、鞣花酸或尿石素A治疗导致瘦体重百分比的统计上显著的增加。饲喂高脂肪饮食并用尿石素A、安石榴苷或PE治疗的小鼠表现出脂肪量的减少和伴随的肌肉(瘦体重)的增加(图17B和17C)。饲喂食物饮食并用鞣花酸或尿石素A治疗的小鼠也表现出脂肪量的减少和伴随的肌肉(瘦体重)的增加,从而表明,这些治疗有利于重量控制和瘦或肌肉体格(图18A和18B)。由于瘦体重主要由肌肉质量表示,这些结果解释了用PE、安石榴苷、鞣花酸或尿石素A治疗如何导致正常和肥胖小鼠中的肌肉质量相对于总体质量的比例的增加。该效应在短至治疗2周后观察到。

[0459] 实施例9

[0460] 石榴提取物、安石榴苷、鞣花酸和尿石素A会增加正常和肥胖小鼠中的能量消耗

[0461] 如在实施例7中所述，将雄性C57BL6/J小鼠分组和治疗。但是，另外，在开始治疗后8周(对于HFD饲喂的小鼠)和开始治疗后2周(对于标准食物饮食饲喂的小鼠)，使用Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System(CLAMS;Columbus Instruments,Columbus,OH,USA)，通过间接量热法(氧耗量、二氧化碳生成量和换气比值)测量小鼠的基础能量消耗。首先，在上午11-12之间开始，让动物适应CLAMS笼子(室温22℃±1℃)22h。然后，在相同条件下进行测量至少20h。测量包括整个暗循环。在CLAMS中测量的参数如下：(i)氧耗量(VO_2,mL/kg/h)：VO_2与能量消耗直接相关；(ii)二氧化碳生成量(VCO_2,mL/kg/h)；和(iii)换气比值(RER)：VCO_2/VO_2:RER是能量底物利用的指标。在稳态，RER与呼吸商(RQ)相等。纯碳水化合物利用产生RER＝1，而纯脂肪燃烧产生RER＝0.7。混合饮食产生RER＝0.85。

[0462] 结果显示在图19和20中。

[0463] 氧耗量是线粒体活性和能量消耗的生理学标志物。用PE、安石榴苷、鞣花酸或尿石素A治疗会显著增加小鼠的氧耗量。鞣花酸和尿石素A会增加标准食物饲喂的小鼠的能量消耗(图19A和19B)。该效应在短至治疗2周后观察到。石榴提取物(PE)、安石榴苷和尿石素A治疗会增加HFD饲喂的小鼠的能量消耗(图20A和20B)。

[0464] 实施例10

[0465] 石榴提取物、安石榴苷、鞣花酸和尿石素A会增加正常和肥胖小鼠的脂肪酸作为能量底物的利用

[0466] 如在实施例9中所述，将雄性C57BL6/J小鼠分组和治疗。

[0467] 如上所述，除了氧耗量以外，间接量热法还监测二氧化碳生成量。二氧化碳生成量(VCO_2)和氧耗量(VO_2)之比被称作换气比值(RER)。RER是能量底物利用的优良指标。在稳态，RER与呼吸商(RQ)相等。碳水化合物作为能量底物的优先利用会产生接近1的RER，而脂肪作为能量底物的利用(脂肪燃烧)会产生更低的RER，当优先利用脂肪酸时，所述RER接近0.7。

[0468] 如图21和图22所示，PE、安石榴苷、鞣花酸和尿石素A治疗会显著降低食物饮食和HFD饲喂的小鼠的RER。该效应在用鞣花酸和尿石素A治疗的、食物饮食饲喂的小鼠中是突出的(图21)。这些结果支持了在消费PE、安石榴苷、鞣花酸或尿石素A(它们有利于具有减少的脂肪组成的更强壮的(瘦)体格)以后观察到的身体组成的变化。

[0469] 实施例11

[0470] 石榴提取物、安石榴苷和尿石素A会降低肥胖小鼠中的甘油三酯和游离脂肪酸的血浆水平

[0471] 如在实施例7中所述，将雄性C57BL6/J小鼠分组和治疗。另外，使用标准的自动化临床化学分析仪(Dimension Xpand,SIEMENS)，在开始治疗后14周，进行血浆生物化学。在血液收集之前，让动物禁食12h(从晚上8点至早上8点)。在异氟烷麻醉下，从麻醉的动物的腔静脉收集大约500μL血液。将血液收集进肝素化的试管中，并立即放在湿冰上。通过离心(1500x g,15min,4℃)制备血浆。然后将血浆样品转移进干净的1.5mL微管中，并在-80℃保存，直到在标准的自动化临床化学分析仪(Dimension Xpand,SIEMENS)上使用相应试剂盒进行生化测量。

[0472] 通过标准生物化学，测量对照和治疗的HFD饲喂的小鼠的血液中的甘油三酯和游

离脂肪酸的循环水平(图23)。PE、安石榴苷和尿石素A治疗导致甘油三酯和游离脂肪酸的血浆水平的统计上显著的改善。这些结果指示,PE、安石榴苷和尿石素A可有效地治疗肥胖小鼠的血脂异常,并且因此可以起改善心血管功能和预防心血管疾病的作用。

[0473] 实施例12

[0474] 安石榴苷、鞣花酸和尿石素A会改善肥胖小鼠的葡萄糖耐量

[0475] 如在实施例7中所述,将雄性C57BL6/J小鼠分组和治疗。另外,对于发展成葡萄糖耐受不良的HFD饲喂的小鼠,进行葡萄糖耐量试验(GTT)。通过口服葡萄糖耐量试验(oGTT),监测开始治疗以后10周的葡萄糖耐量试验。在oGTT之前,让动物禁食12h(从晚上8点至早上8点)。在oGTT当天,从侧尾静脉收集一小滴血液(<2μL),并用血糖仪(AccuCheck Aviva,Roche Diagnosis)监测糖血。然后,每只动物在时间0接受剂量为2g/kg体重的口服D-葡萄糖剂量。然后在口服葡萄糖负荷以后15、30、45、60、90、120和150min的时间监测糖血。

[0476] 象在人类中一样,给小鼠饲喂高脂肪饮食会导致肥胖和以严重葡萄糖耐受不良为特征的II型糖尿病的发作,正如在暴露于葡萄糖(2g/kg体重)以后立即跟踪糖血所评估的(葡萄糖耐量试验)(图24)。如图24所示,安石榴苷、鞣花酸和尿石素A治疗会改善HFD饲喂的小鼠的葡萄糖耐量。结果,这些治疗也可以也是用于治疗II型糖尿病的有效治疗方案。

[0477] 实施例13

[0478] 尿石素A会增加老龄漂亮新小杆线虫的线粒体功能

[0479] 在接种了大肠杆菌菌株OP50的线虫类生长培养基(NGM)琼脂平板上,在20℃培养漂亮新小杆线虫菌株。使用的菌株是由Caenorhabditis Genetics Center(明尼苏达州大学,University of Minnesota)提供的野生型Bristol N2。将尿石素A溶解在DMSO中。将动物暴露于化合物,所述动物得自接种了活OP50细菌的平板上的卵。用对应浓度的DMSO(0.1%)制备对照平板。

[0480] 氧耗量的测量是线粒体活性的直接指标。如下评估尿石素A对老龄漂亮新小杆线虫(10天龄)中的线粒体活性的影响:用尿石素A处理10天成年期的漂亮新小杆线虫,在此时,使用Seahorse XF24设备(Seahorse Bioscience Inc.,North Billerica,MA)测量氧耗量。每种条件使用250个10天龄漂亮新小杆线虫。从含有M9培养基的NGM平板回收漂亮新小杆线虫,在2mL M9中洗涤3次,以消除残留的细菌,并再悬浮于500μL M9培养基中。将虫转移进24-孔标准Seahorse平板(#100777-004)(50个虫/孔),并测量氧耗量。首先以5分钟间隔(0min、5min、15min、20min、25min和30min)在30分钟内测量虫的基础氧耗量,每个间隔5份重复。将呼吸速率标准化为在实验结束后使用立体显微镜测得的每个孔的精确虫数目。在确定基础氧耗量以后,如下测量解偶联的氧耗量:在30分钟时间点,将羰基氰化物-对-(三氟甲氧基)苯基腙(FCCP)加入培养基中,以便评估最大氧耗量能力和最大线粒体能力。以5分钟间隔(35min、40min、45min、50min、55min和60min),测量解偶联的氧耗量,以允许随时间测量线粒体功能。FCCP是一种化学的解偶联剂,其会消除用完整线粒体观察的呼吸链和磷酸化系统之间的必然联系。该效应是由于所述分子的两亲性质,其溶解在线粒体磷脂双层中。这会急剧增加线粒体膜的离子渗透性,并造成显著的质子泄漏,从而导致氧耗量的增加(由于与质子泄漏平行的氧对泵入呼吸链中的电子的淬灭)。因为该氧耗量与ATP产生(氧化磷酸化)离解(解偶联),FCCP会增加氧耗量,同时减少线粒体的能量(ATP)产生。完全解偶联的线粒体(如用FCCP实现的)会表明它们的线粒体呼吸链的最大能力(最大氧耗量),而不

“减慢”氧化磷酸化和能量产生。

[0481] 在图25中描绘的结果表明，尿石素A会增加老龄漂亮新小杆线虫的最大线粒体能力，正如用尿石素A处理的虫与对照(DMSO)处理的虫相比解偶联呼吸增加的延长效应所示。对照未处理的虫表现出解偶联呼吸的短暂增加，其快速地恢复至基础氧耗量水平。尿石素A-处理的虫表现出更延长的氧耗量升高。通过对比解偶联阶段中的曲线下面积(AUC)和用作基线的平均偶联呼吸，显示线粒体活性的增加程度。观察到，与对照未处理的虫相比，在评价的30分钟时段内，尿石素A显著增加了老龄虫中的解偶联呼吸。

[0482] 实施例14

[0483] 尿石素A会增加漂亮新小杆线虫中的线粒体活性

[0484] 在线虫类生长培养基琼脂平板上在20℃培养漂亮新小杆线虫菌株，所述平板接种了HT115细菌，且含有50μM尿石素A或对应浓度的DMSO作为对照。将虫处理24小时。使用的菌株是SJ4103(zcIs14[myo-3:GFP(mit)])，它是表达定位于线粒体的绿色荧光蛋白(GFP)的稳定转基因系，所述GFP具有在特异性的体壁肌肉启动子myo-3控制下的、可切割的线粒体输入信号肽。根据以前描述的方案(Durieux等人，2011)，进行GFP表达和定量。用50μM尿石素A处理得自卵的虫，并在1天成年期后监测GFP。使用Victor X4多标记平板读数器(Perkin-Elmer Life Science)进行荧光测定。随机挑选80个虫(黑壁96-孔板的每个孔20个虫)，并对每个孔读出4次，取平均值。

[0485] 图26中的结果表明，用尿石素A处理虫会在漂亮新小杆线虫中诱导由肌肉特异性的myo-3启动子驱动的线粒体GFP-报告基因的表达。GFP表达的这种显著增加会提供由尿石素A引起的线粒体能力增加的明显证据。为了允许观察到的GFP信号的这种增加，在这些虫中的肌肉的线粒体必须增大或数量更多。

[0486] 实施例15

[0487] 石榴衍生的化合物对慢性应激引起的心境和认知的影响

[0488] 将7-周龄C57BL/6J野生型雄性小鼠暴露于长期的不可预见的应激持续4周的时段。在慢性应激时段之前、过程中和之后，进行几个行为实验，以确定对心境和认知的影响。如以前已经报道的，慢性应激会负面地影响心境和认知。将源自石榴的天然化合物施用给这些小鼠，以确定这些化合物在改善心境和认知的这种负面影响方面具有何种影响。

[0489] 在开始实验之前，让小鼠熟悉我们的动物设备9天。将所有小鼠按照每组3只圈养在标准的塑料笼中，将它们保持在12h光照/黑暗周期(上午7:00-下午7:00)下，随意接近食物和水。所有操作根据瑞士国家动物实验指南(Swiss National Institutional Guidelines on Animal Experimentation)进行，并得到瑞士兽医局动物实验委员会(Swiss Cantonal Veterinary Office Committee for Animal Experimentation)批准。

[0490] 动物的表征

[0491] 在适应动物设备后，以体重、在高架零迷宫(EZM)中的焦虑样行为、以及在开放场所和新奇物体测定中的行进和探究的方式，表征所有小鼠。这些实验的目的是，根据它们的焦虑和探究比率来匹配动物，以便建立根据这些特征等效的实验组和对照组。

[0492] 高架零迷宫

[0493] 在高架零迷宫(EZM)中测量焦虑。在暗淡和分散光条件下，在EZM(5.5-cm宽的环形跑道，直径为46cm，比地面高46cm)中观察小鼠5min。用13.5cm高的内壁和外壁保护2个相对

的90°扇区。因而，如下限定3个地带：包括4个在保护壁末端处的30°区段的中间地带，其被2个50°宽的封闭的/受保护的地带和2个70°宽的开放的/未保护的探究地带隔开。由于这些边界，只有当动物的所有4只爪子都进入开放扇区时，才可检测到进入。通过视频跟踪(Ethovision 3.0,Noldus,Wageningen,荷兰)自动地记录每只小鼠的轨迹。进入所有扇区的总数充当自发运动活性的指标，而进入次数的差异和在开放扇区中花费的时间用作焦虑指标。在实验之间，用4％乙醇/水清洁迷宫。

[0494] 开放场所和新奇物体

[0495] 在暗淡和分散光条件下，在白色四方盒(50x 50x 37cm)中评估向开放场所(OF)的行进和反应性。将小鼠放入场所的中央，并允许其自由移动10min。分析移动的总距离、进入中央的频率、在OF中央的时间和时间百分比。对场所的内部或“未保护的”区域的回避被解释为焦虑样行为。使用总距离的测量结果作为活动的指标。使用新奇物体(NO)试验来评估探究行为。在OF试验后立即进行NO试验。将小型金属物体(3x 1.5x 5cm)放入开放场所的中央，同时小鼠在内部。然后给小鼠5min自由地探究该新奇物体。分析在隔室的中央和周围花费的时间、进入中央的次数和延迟期、以及在中央和整个隔室中移动的总距离。小鼠在中央探究新奇物体所花费的时间和距离百分比视作“集中注意力的”探究活动的指标。

[0496] 用石榴衍生的提取物治疗

[0497] 在开始慢性应激方案之前3周，将小鼠分成4个不同的组。1组接受标准的小鼠食物饮食(对照)，而剩下的3组接受不同剂量的提取物1011，即源自石榴汁的提取物。低剂量与21mg/kg/d的没食子酸当量的多酚(GAE PPE)的提取物剂量相对应，中剂量与43mg/kg/d的GAE PPE的提取物剂量相对应，高剂量与86mg/kg/d的GAE PPE的提取物剂量相对应(参见表5)。

[0498] 表5.石榴粉提取物1011.

[0499]

提取物 1011	多酚	安石榴苷	石榴皮鞣质	鞣花酸
低剂量	21 mg/kg/d	2.1 mg/kg/d	5.2 mg/kg/d	2.0 mg/kg/d
中剂量	43 mg/kg/d	4.2 mg/kg/d	10.5 mg/kg/d	3.9 mg/kg/d
高剂量	86 mg/kg/d	8.5 mg/kg/d	21 mg/kg/d	7.8 mg/kg/d

[0500] 在开始慢性应激方案之前3周，开始饮食治疗，并持续至实验终止。

[0501] 用尿石素A(石榴衍生的代谢物)治疗

[0502] 在开始慢性应激方案之前3周，将小鼠分成2组。一组接受标准的小鼠食物饮食(对照)，而其它组接受含有尿石素A的饮食，以25mg/kg/d的剂量递送。

[0503] 慢性不可预见性应激

[0504] 不可预见性慢性应激方案包括：每天在不可预见的时刻将动物暴露于应激情境，持续4周(在上午8点至下午4点之间，并在28天中随机分布)。使用的应激刺激是下述任一种：6min尾巴悬吊；3x 0.4mA不可逃脱的足电击；4h暴露于混杂土的潮湿锯屑；2h暴露于高台；1h固定在塑料管中；30min暴露于16℃；2天颠倒的光照/黑暗周期；10min暴露于老龄的攻击性的同种动物；强光暴露(600lux)；2h挤满笼(6只小鼠)和8h的40°笼子倾斜。将所有动物称重，并定期(每3-5天)评价它们的皮毛的状态。在该实验中，将一组小鼠暴露于慢性应

激，将其它组动物保持原状，并用作对照。

[0505] 行为测定

[0506] 尾巴悬吊试验

[0507] 使用尾巴悬吊试验(TST)作为用于评估小鼠的抗抑郁样活性的模型。该试验基于下述事实：遭受从它们的尾巴悬吊的短期(6min.)不可避免应激的动物会形成不动姿势。用距离它的尾巴末端20mm的胶带将小鼠悬吊在金属杆上。地面和杆之间的距离为大约25cm。将不动定义为缺乏主动运动，且包括被动横荡。从录像带对研究时间(其包括不动、挣扎和攀爬)评分。

[0508] 如图27所示，慢性应激会导致在TST中的不动增加，这是增强的抑郁和无助感的指标。但是，用递增剂量的石榴提取物治疗的小鼠表现出该模式的反转，并且可动性和挣扎恢复至在未应激的小鼠中观察到的水平。因而，石榴提取物会预防在慢性应激的未治疗的小鼠中观察到的抑郁应答。

[0509] 背景识别

[0510] 背景恐惧训练是动物的记忆特定背景的能力的测量。在该测定中，将小鼠放入盒子中，然后接受2次间隔1个分钟的轻度电击。响应于所述点击，小鼠僵硬化。通过将小鼠在以后的时间点放回盒子中，试验小鼠的识别在其中接受电击的背景的能力。如果它们认出该背景，小鼠会因为预期接受电击而僵硬化。

[0511] 在正常小鼠中，认出在没有任何电击存在下的背景的能力，是背景记忆的测量。具有更好背景记忆的小鼠会更好地认出初始背景，因而具有更高的僵硬水平。

[0512] 该测定还可以用于测量应激的小鼠的焦虑。在应激的小鼠中，可以在初期电击引起的增加的僵硬反应时间中观察到增加的焦虑、以及背景记忆的更长的消失期。如下测量背景记忆的消失：在没有最初的不利刺激存在下，每天1次地将小鼠放入相同背景中，持续数天。小鼠会随着时间忘掉背景与不利刺激的关联，这通过僵硬的逐渐减少来证实。在焦虑的应激小鼠中，不利记忆的这种消失需要更长的时间。

[0513] 使用背景恐惧训练来试验石榴提取物对背景识别引起的小鼠中的焦虑诱导(即，学习的焦虑)的影响。训练和试验在啮齿动物训练室(20×20×28cm)中进行，将训练室放入有机玻璃盒中，并用20-W灯泡照明。训练室的侧壁由白色甲基丙烯酸酯构成，门和顶盖由有机玻璃构成。地面由20根钢条组成，穿过所述钢条可以从电击发生器递送不规则的电击。通风机提供68dB的背景噪音(整个系统：Panlab,S.L.,巴塞罗那,西班牙)。在应激组的慢性应激方案的第3周中，进行针对背景的恐惧训练。在恐惧训练当天，将小鼠从群居室运输至邻近的行为实验室，并放入训练室中。训练包括：将小鼠暴露于训练背景3min，随后在每分钟后递送足电击(2秒，0.4mA)共3次。在最后一次足电击后，将动物在该室中保留30秒。用0.5％乙酸彻底清洁恐惧训练室，然后将每只小鼠放入盒子中。为了确定慢性应激和不同剂量的石榴提取物对该背景记忆诱导的焦虑水平的影响，测量由该背景引起的焦虑诱导行为的水平。检查下述行为应答(已知是对焦虑水平敏感的)：僵硬百分比、后腿站立百分比和理毛行为百分比。在将小鼠重新暴露于训练背景8min以后48h，进行这些行为测量。在训练和试验期间以后，立即将动物返回它们的居住笼。记录动物的行为，并在以后由对动物处理不知情的观察人员用自制的行为观察软件进行评分。

[0514] 对僵硬(定义为没有除了心搏动和呼吸以外的运动)评分，并用作焦虑的指标。将

僵硬时间转换成僵硬水平百分比。石榴提取物表现出剂量依赖性的应答，在最高剂量时存在僵硬百分比的显著下降(图28)，从而指示对抗焦虑的保护。在后腿站立方面，观察到焦虑行为的类似减少，在石榴提取物施用后，对后腿站立行为具有显著的和剂量依赖性的保护(图29)。结束这些观察，是最高剂量的石榴提取物对焦虑诱导的理毛行为抑制的强烈抑制(图30)。这些结果证实，石榴提取物和化合物会减少小鼠中的经历诱导的焦虑。

[0515] 还观察了尿石素A(安石榴苷的一种代谢物)对慢性应激小鼠中的经历诱导的焦虑的这种减少。在该研究中，通过在上述背景恐惧测定中提供的不利背景的记忆的消失，测量焦虑的水平。在该研究中，每天1次地将已经使用背景恐惧范例进行训练的小鼠暴露于该背景，持续4天，但是在没有任何不利刺激存在下。通过在3分钟的观察期内的僵硬，测量认出背景的能力。已经证实，增加的焦虑水平会导致更长的不利背景记忆的消失期。如图31所示，已经经历慢性应激的小鼠表现出比正常小鼠更慢的消失期。但是，在用剂量为25mg/kg/d的尿石素A治疗后，已经经历慢性应激的小鼠表现出不利记忆消失的显著改善，从而证实了尿石素A象安石榴苷一样能够减少已经经历慢性应激的小鼠的焦虑。

[0516] 莫里斯水迷宫

[0517] 空间记忆和学习受慢性应激影响。莫里斯水迷宫仪器由大型白色圆形水池(140cm直径)组成，所述水池装有不透明有色水(25℃±1℃)和浸没在水表面以下1cm的平台(10x10cm^2)。所述水迷宫被含有几个突出的视觉记号的灰色幕帘(离水池周围25cm)包围。在试验之前，训练小鼠学习平台的位置。使用突出的视觉记号，小鼠学会定位平台。学习阶段开始于习惯化阶段，其中将小鼠引入房间、仪器和水，使它们进行2-min没有平台存在的自由游泳试验。使用固定至内顶板的摄像机收集数据，所述摄像机与视频跟踪系统(Ethovision 3.0,Noldus,Wageningen,荷兰)连接。

[0518] 在习惯化阶段(第0天)后，对小鼠进行不同的方案，以顺序地评估它们的空间学习能力(第1-3天)。空间学习阶段连续进行3天(第1-3天)，每天进行4个试验，在每个试验之间有6min的试验间隔(ITI)。

[0519] 每个试验开始于：在4个可能的位置(它们在试验和天之间随机地平衡)之一处，借助于杯子将小鼠面向水池壁引入迷宫中。在每个取样时间测量小鼠和平台之间的距离，每秒收集25个取样时间。然后针对60秒的时段求这些距离之和，得到每个试验的到平台的距离(cm)的测量结果。如果小鼠在60秒内没有找到平台，将它轻柔地导向平台。每只小鼠必须在平台上停留20秒，然后将它返回它的等候笼。

[0520] 该实施例的结果证实，慢性应激对学习和空间记忆具有显著的负面影响。在训练期内，与未应激的对照相比，到达平台的移动距离显著增加，这表明慢性应激会损害在学习中形成的正常记忆(图32)。用石榴提取物治疗小鼠能够保护免于慢性应激对学习和相关记忆的这些负面影响。在接受石榴提取物的小鼠中观察到剂量依赖性的效应，并且治疗过的慢性应激小鼠能够在与未应激的对照相同的水平表现(图33)。

[0521] 如图34所示，对于用尿石素A治疗的小鼠，观察到类似的效应。如序贯试验之间的高变异性所证实的，已经经历慢性应激方案的小鼠表现出不稳定的学习。以25mg/kg/d的剂量用尿石素A治疗的慢性应激小鼠表现出该变异性的稳定。这证实了下述事实：尿石素A(安石榴苷的一种下游代谢物)也能够保护免于慢性应激对认知(包括学习和记忆)的这些负面影响。

[0522] 总之,这些结果一起证实,石榴提取物和衍生的化合物(诸如尿石素A)能够起减少慢性应激对认知(包括记忆和学习)的负面影响的作用。另外,石榴提取物和衍生的化合物具有抗抑郁活性(如在尾巴悬吊试验中所看到的),并会减少由慢性应激造成的焦虑。结果也证实,石榴提取物会预防在慢性应激以后通常观察到的记忆和学习性能和空间识别的衰退。

[0523] 实施例16

[0524] 对老龄大鼠模型的记忆和认知的影响

[0525] 在老化过程中,对认知和记忆存在几种影响,它们可以在大鼠老化模型中重演。关于综述,参见Gallagher和Rapp(1977)Annu Rev Psychol.48:339-70。老龄大鼠模型已经被广泛地用于表征老化对记忆和认知的影响。在这里呈现的实验中,在有石榴提取物存在下,观察到改善的性能。

[0526] 老龄Sprague-Dawley大鼠(在19个月龄时开始)接受在它们的饮用水中的石榴提取物(1108),浓度为0.34mg/mL多酚(PPE)。使用Folin-Ciocalteu分光光度测量方法测量多酚含量,将酚含量表示为没食子酸当量。对照治疗由溶解在水中的1.36%蔗糖、0.12%D-葡萄糖和0.12%D-果糖组成。大鼠平均消费30mL/天的对照和1108治疗剂(参见表6),平均重量为660g/大鼠。对于接受1108提取物的动物,这导致15mg PPE/kg/d或1.1mg安石榴苷/kg/d的剂量。

[0527] 表6.石榴液体提取物.

[0528]

	提取物1108
递送的多酚剂量	15mg/kg/d
递送的安石榴苷剂量	1.11mg/kg/d

[0529] 2.5个月的治疗以后,使用社会识别任务(一项包括社会认知的标准试验)评价短期工作记忆。Thor和Halloway(1981)Animal Learning Behavior.9:561-5。在该任务中,将每只老龄大鼠与幼龄雄性Sprague-Dawley大鼠(<5周龄)一起放入它的居住笼中保持5分钟。30分钟后,用相同的幼龄大鼠重复完全相同的操作,以确定2只动物之间的第二次相互作用的程度。预见到在第二次相互作用中更少的接触,因为2只动物已经发生先前的相互作用。动物之间的接触的这种减少,是认知性能和记忆保留的量度。30分钟后,将新的幼龄大鼠与老龄大鼠一起放置5分钟,以便测量该老龄大鼠是否可以辨别2只不同的幼龄个体。在2只动物之间的每个接触阶段中,测量总接触时间,以评估社会相互作用的强度。

[0530] 结果显示在图35中。对照治疗的老龄动物没有表现出对熟悉对象的偏好,花费同样的时间来探究2个对象,该效应以前在老龄大鼠中已经证实,并且被认为会反映在老化过程中短暂次序记忆(temporal order memory)的减退。Hauser等人.(2009)Behav Neurosci.123:1339-45。但是,用提取物1108治疗的大鼠表现出在第二个暴露期中花费在相同幼龄大鼠上的时间的减少以及与新的幼龄大鼠的相互作用时间的增加。观察到的这种差异解释了提取物1108对记忆发展和保留的保护益处。

[0531] 实施例17

[0532] 对老龄大鼠模型的空间记忆的影响

[0533] 还已经报道,空间记忆会受老化影响,老化会导致性能的减退。Bergado等人.(2010年10月29日电子公开)Spatial and emotional memory in aged rats:a行为

analysis.Neuroscience。为了检查石榴提取物对老化过程中空间记忆减退的影响，如关于实施例16所述，用石榴提取物1108或在它们的饮用水中的对照物治疗老龄Sprague-Dawley大鼠(在19个月龄开始)。

[0534] 用提取物1108或等热量的对照物治疗老龄大鼠3个月，此后，如在实施例15中所述，使用莫里斯水迷宫任务评价它们的学习和记忆性能。

[0535] 通过它们对颠倒任务的表现(3个试验)，评价每只动物的学习能力。在该任务中，首先通过3个训练试验教会动物四分仪(WEST)的平台的位置。然后改变平台的位置，并将它放入相对的四分仪(EAST)中。动物接受3个新的训练期，以学习平台的新位置。测量确定平台的新位置的努力，这通过确定平台位置之前移动的距离来测量。结果显示在图36中。用提取物治疗的动物在颠倒试验中明显更有效地定位平台(单因素方差分析，$P<0.02$；对照N＝11；PJ:N＝13；提取物:N＝14)，从而证实了施用的提取物对于空间记忆的这方面的治疗益处。

[0536] 实施例18

[0537] 石榴衍生的化合物对阿尔茨海默氏病中的空间和工作记忆的影响

[0538] 已经证实，阿尔茨海默氏病(AD)对空间记忆具有有害作用，该作用也在该疾病的AD小鼠模型中观察到。为了确定石榴衍生的化合物对改善AD中的空间和工作记忆的影响，在2个空间记忆性能测定(Y型迷宫和莫里斯水迷宫)中试验了不同的石榴提取物和安石榴苷。

[0539] Y型迷宫

[0540] 在该研究中，使用了AD的5XFAD小鼠模型。阿尔茨海默氏病的5XFAD小鼠模型是基于导致淀粉样蛋白β肽(Aβ)在脑组织中产生的遗传修饰(突变的人APP和PS1基因的引入)。发现这些小鼠在早至7个月龄时在Y型迷宫中具有显著的认知性能减退。

[0541] 为了确定石榴衍生的化合物的效应，以60mg/kg/d的多酚的剂量(其包括大约5.6mg/kg/d的安石榴苷)，通过管饲法递送源自完整石榴的石榴提取物(PE)。从3个月龄开始，每周3次地给小鼠管饲，直到治疗结束。7个月龄后，针对PE对在Y型迷宫上的工作记忆的影响来试验小鼠。将小鼠放入Y型迷宫中15分钟，允许其探究2个臂，第3个臂被封闭。4小时后，再次将该动物放入迷宫中5分钟，这次将第3个臂打开，使得小鼠具有自由地探究所有3个臂的可能性。在新臂中的探究活动会评估动物根据空间记号认出该特定地带尚未被探究的能力。在下述情况下，将小鼠评分为在探究中做出正确改变:它们探究3个臂中的每一个，并且不仅仅探究存在的前2个。

[0542] 如图37所示，在用PE治疗的5XFAD小鼠中，观察到工作记忆性能(通过正确改变的数目来测量)的显著改善。

[0543] 莫里斯水迷宫

[0544] 在阿尔茨海默氏病的第二个转基因动物模型中，试验了石榴提取物31008、61109和71109，所述模型表达淀粉样蛋白突变体伦敦突变和prenisilin-1人突变。此模型中的动物在4个月之前形成斑块，并且在6个月之前产生记忆缺失。在7个月之后能够看到密集的斑块沉积。

[0545] 在一组实验中，经由它们的饮用水给4月龄APP-PS1转基因小鼠饲喂大约97mg总多酚/kg/天的固定剂量，其包括大约15mg/kg/d的安石榴苷的提取物31008，所述提取物源自

完整石榴。在一组实验中，经由饮用水，给4月龄APP-PS1转基因小鼠饲喂共计大约468mg/kg/天的提取物61109的固定剂量，其高度富集安石榴苷(>91％)。在一组实验中，经由饮用水，给4月龄APP-PS1转基因小鼠饲喂大约180mg总多酚/kg/天的提取物71109的固定剂量，所述提取物源自石榴外壳。饲喂3个月以后，在莫里斯水迷宫空间试验中试验小鼠(此时7个月龄)。

[0546] 在治疗的84-87天期间进行莫里斯水迷宫。水池(白色的圆形容器，直径为1m)包含20℃的水，所述水含有作为无臭、无毒的添加剂以隐藏逃逸平台(在水平面以下1cm)的二氧化钛。将每只小鼠的游泳情况记录到录像带上，并分析(Ethovision,Noldus information Technology,Wageningen,荷兰)。在训练之前，将每只小鼠置于平台的顶部15秒。对于定位航行试验而言，连续3天将小鼠训练成在三个试验的五个模块中定位隐藏的平台。每个试验由最长120秒的强迫游泳试验和随后的60秒休息组成。在五个连续训练模块中，测量每只小鼠定位平台所需的时间,以确定每只小鼠的学习曲线。

[0547] 在最后一次训练后24小时，每只动物经历除去平台的探测试验。允许小鼠搜索消失的平台60秒，并且测量在水池的每个象限中花费的搜索时间、以及穿越原始平台位置的次数。如图38所示，饲喂提取物31008的小鼠在探测试验中表现出提高的性能，正如通过穿越平台最初所在区域的频率的增加所证实的。饲喂提取物61109和71109的小鼠具有甚至更好的性能。

[0548] 在该实验中使用的提取物61109的组成显示在表7中。

[0549] 表7.

[0550]

	提取物61109
安石榴苷	91.3％(w/w)
递送的安石榴苷剂量	295mg/kg/d

[0551] 实施例19

[0552] 石榴衍生的化合物对生命早期应激引起的抑郁、焦虑和认知的影响

[0553] 评估了石榴衍生的化合物在与母体分离有关的生命早期应激模型中改善脑功能(包括认知、抑郁和焦虑)的能力。

[0554] 生命早期应激对以后的成年生活的认知性能具有显著影响，包括：(i)增加异常的决策和过度的冒险；(ii)对增加的抑郁和焦虑比率的易感性；和(iii)受损的学习和记忆。

[0555] 所有操作根据瑞士国家动物实验指南(Swiss National Institutional Guidelines on Animal Experimentation)进行，并得到瑞士兽医局动物实验委员会(Swiss Cantonal Veterinary Office Committee for Animal Experimentation)批准。

[0556] 由母体分离产生的生命早期应激

[0557] 在出生后第1天，选出幼崽，每个母亲6只幼崽。从出生后第1天至第14天，进行每天为期3小时的不可预见的母体分离(MS)。母体分离在随机的时间(从早上8点至下午2点)进行，以避免母亲对操作的习惯化。该方案包括：将幼崽从它们的母亲处移至另一个笼子在室温保持3小时时段，此后将幼崽返回它们的原始巢。将这些组在图中表示为生命早期应激。dam/幼崽的对照组保持原状，并在图中表示为正常。

[0558] 用分离自石榴的安石榴苷进行治疗

[0559] 在母体分离后1周，将小鼠分成2组。1个对照组接受标准的小鼠食物饮食(未治

疗)，而另一组接受混合进食物中的鞣花鞣质安石榴苷，并设计成以90mg/kg/天的剂量递送给小鼠。在母体分离处理终止后1周，开始饮食治疗。

[0560] 行为测定

[0561] 利用下述行为测定，检查生命早期应激对抑郁、焦虑和认知的影响，所述测定在母体分离方案结束后166天进行。将正常饲养的小鼠与母体分离的小鼠(生命早期应激)和用安石榴苷治疗的母体分离的小鼠进行对比。

[0562] 暗/亮盒试验

[0563] 在该测定中，将小鼠放入PVC盒子(Ligna，巴黎，法国)中，所述盒子被分成2个隔室：暗隔室(15x 20x 25cm，黑色PVC，上面盖住)和亮隔室(30x 20x 25cm，白色PVC，在200lux照明)，二者通过互连门(5x 5cm)相连。通过将动物放在暗隔室中开始实验，此后，用录像机记录在5分钟时段内小鼠在照亮区域中花费的时间的量、从暗区域向照亮区域迁移的次数、和从从暗区域向照亮区域逃逸的延迟期。

[0564] 在正常情况下，小鼠会回避盒子中的照亮区域。作为它们的生命早期应激的后果，母体分离的小鼠会在照亮的隔室中花费与它们的未母体分离的同胞仔相比异常长的时间(图39)。探究照亮区域所花费的时间的这种增加，反映了以异常的和过度的冒险为特征的受损决策行为。

[0565] 安石榴苷对母体分离的小鼠的治疗会将观察到的过度冒险行为逆转和正常化，并将决策过程恢复正常(图39)。

[0566] 高架0迷宫(EOM)

[0567] 测量异常冒险的另一个行为测定是高架0迷宫(EOM)。在该测定中，将由直径为41.5/46.5cm(内径/外径)的环组成的仪器分成4等份。所述环的彼此相对的2个部分被5cm高的壁包围。所述环的剩余的2个部分没有壁。该迷宫比地面高1m。小鼠的天然趋势是回避开放表面，并且在所述环的具有5cm壁的包围区域中花费与所述环的开放区域相比更多的时间。

[0568] 为了检查生命早期应激的影响，将小鼠放在迷宫的具有5cm壁的区域之一的入口处，其鼻子朝向封闭的臂，并允许其探究EOM 5min。在这期间，将动物行为录像。计算在每个臂(封闭相对于开放)中花费的时间，只有在动物的所有4个爪子都进入臂中时，才认为已经进入该臂中。

[0569] 在正常情况下，放入高架0迷宫中的小鼠会回避环的开放区域，并花费有限的时间来探究该区域。与它们的未应激的同胞仔相比，通过母体分离应激的小鼠花费异常长的时间在0-迷宫的开放部分中(图40)。还如在暗/亮盒子试验中观察到的，这会反映生命早期应激的小鼠的以异常的和过度的冒险为特征的受损决策行为。

[0570] 安石榴苷对母体分离的小鼠的治疗会将由生命早期应激引起的它们的异常过度冒险行为逆转和正常化(图40)。

[0571] 强迫游泳试验

[0572] Porsolt或强迫游泳试验通常用于试验抗抑郁药治疗(Porsolt等人，1977a；Porsolt等人，1977b)。对于该行为试验，将小鼠放入5L圆筒(11cm直径和25cm高度)中，该圆筒装有2/3满的23℃的水。如果存在明显的身体位移，认为动物在从事游泳和活动。在分析阶段中以最少的动作进行漂浮的动物被视作不动。使用录像机和在圆筒后面的镜子，记录

6-分钟试验时段内的动物行为。分别分析在游泳的前2分钟和最后4分钟中的小鼠游泳活动。增加的抑郁水平与增加的小鼠不动相关联，特别是在最后4分钟中。已经经历生命早期应激的动物表现出与它们的未应激的同胞仔相比显著增加的不动，这指示升高的抑郁水平(图41)。安石榴苷对生命早期应激的小鼠的治疗会逆转该异常行为(增加的不动)，并将游泳活动增加至在未应激的小鼠中观察到的水平。安石榴苷的这种行为效应证实了它作为抗抑制剂的活性(图41)。

[0573] 背景恐惧训练

[0574] 使用背景恐惧训练来确定鞣花鞣质安石榴苷对遭受生命早期应激的成年动物的焦虑易感性的影响。在恐惧训练室(Context A,W×L×H:30cm×24cm×26cm)(PanLab)中训练动物，所述训练室具有含不锈钢杆的网格地面，并连接至由Panlab开发的电击发生器。在训练过程中，将动物一次1只地放入该室中。在室内探究4分钟后，施加1次足电击(2秒和0.4mA)，在1分钟以后施加第2次足电击(2秒和0.4mA)。第2次足电击后30秒，将小鼠放回它的居住笼。在实验持续期间，每2秒监测动物行为。小鼠在室中保持不动的时段被视作“僵硬”，并对这些时段评分。记录在60秒时段内小鼠在第1次电击以后保持不动的时间，并表示为百分比。

[0575] 小鼠响应于足电击而保持不动和“僵硬”的行为，是它们的焦虑水平的量度。在该行为试验中，“僵硬”的持续时间越长，动物的焦虑水平越高。

[0576] 在第1次电击以后，观察到在试验组(正常的未应激的、生命早期应激、和生命早期应激+安石榴苷)之间的僵硬差异(图42)。生命早期应激会导致小鼠的焦虑增加，正如在足电击以后与它们的未应激的同胞仔相比增加的僵硬时间所证实的(图42)。安石榴苷治疗会将源自生命早期应激的这些升高的焦虑水平降低和正常化，正如足电击以后减少的僵硬时间所证实的(图42)。在早期应激模型中的这些观察结果证实了安石榴苷的抗焦虑作用。

[0577] 还在通过该测定诱导的背景记忆(即，将环境背景与电击相联系的记忆)的消除(即，消失)方面，观察到暴露于生命早期应激的动物经历的增加的焦虑。为了检查在背景恐惧训练(如上所述)过程中形成的焦虑的强度，在初次试验以后的12天中，每天将动物放入相同室和背景中保持3min(一天中的相同时间，但是这次没有电击)。在这些每天3-分钟时段中的每一个时段中，测量由动物对室(它们在其中接受初期电击)的简单识别诱发的僵硬行为。

[0578] 动物组(正常的未应激的、生命早期应激、和生命早期应激+安石榴苷)在随后的12天中表现出它们对电击背景回忆的减退的差异(图43)。在该图中，将僵硬的持续时间表示为在第1天保持不同的时间的百分比(例如，如果小鼠在第1天保持不动60秒且在第8天保持不动30秒，那么在第1天的不动百分比为100％，在第8天为50％)。

[0579] 正常的未应激的小鼠在12天时段中表现出可预测的背景回忆减退(图43)。生命早期应激的小鼠具有加强的背景回忆，这通过与它们的未应激的同胞仔相比更高的僵硬水平来说明(图43)。这显示了这些母体分离的小鼠中延长的升高的焦虑水平。用安石榴苷治疗生命早期应激的小鼠会对减少焦虑产生明显影响，正如通过背景回忆的消失所观察到的。治疗的生命早期应激的小鼠表现出与未治疗的生命早期应激的小鼠相比更快的消失，其特征在于在第8天和第12天之间减少的僵硬时间段(图43)。

[0580] 旋转杆

[0581] 为了测量石榴衍生的化合物对母体分离的负面认知影响的作用，使用旋转杆行为测定测试了对动作学习的影响。旋转杆仪器由2cm直径的杆组成。将小鼠放在以5rpm的初速度启动的旋转杆上。杆速度以8rpm/min的速度逐渐加速，直到达到45rpm的速度。以300秒的截止时间，测量跌落的延迟期。如图44所示，已经经历生命早期应激的小鼠遭受受损的动作学习。母体分离的小鼠比正常未应激小鼠更快地跌落旋转杆。安石榴苷治疗会将生命早期应激的动物的动作学习技能恢复至在正常未应激的同胞仔中观察到的行为水平。

[0582] 莫里斯水迷宫

[0583] 使用莫里斯水迷宫行为测定来评估母体分离的认知影响。在该测定中，通过小鼠的定位不透明水的水池中的隐藏平台的能力，测量认知学习。该仪器由装有22℃的水的水池(140cm直径)组成。小鼠通过游泳至置于水表面以下1cm的隐藏圆形平台(15cm直径)而逃出水。通过使用位于迷宫之外的看得见的记号，小鼠能够在后续试验中定位平台和回忆它的位置。在训练期中，每小时将小鼠放在2个(交替的)起始位置。如下执行莫里斯水迷宫任务：在T1的8个试验，在T2的6个试验，和在T3的4个试验(在第1、2和3天)。小鼠具有最多60秒来到达平台。通过视频跟踪系统，测量到达平台的逃逸延迟期。如在图45中观察到的，生命早期应激对认知学习具有显著影响，小鼠花费更长的时间段来学习隐藏的平台的位置，正如与正常未应激小鼠相比增加的逃逸延迟期所证实的。用安石榴苷治疗这些母体分离的小鼠会逆转生命早期应激的这种负面影响，从而将记住隐藏平台的位置的时间减少至在正常未应激小鼠中观察到的水平。这些结果证实了安石榴苷的逆转生命早期应激对学习和记忆形成的长期负面认知影响的能力。

[0584] 石榴衍生的化合物

[0585] 上述数据一起证实，源自鞣花鞣质的化合物能够逆转生命早期分离对抑郁、焦虑和认知的长期负面影响。

[0586] 实施例20

[0587] 石榴衍生的化合物对正常小鼠的记忆和认知的影响

[0588] 使用石榴衍生的化合物治疗

[0589] 在3个月龄开始，给小鼠饲喂：(i)标准对照饮食诸如AIN-93G；(ii)含有0.87mg/kg浓度的安石榴苷的饮食，从而递送90mg/kg/天的大约剂量(为期3个月)；或(iii)含有0.57mg/kg浓度的尿石素A的饮食，从而递送55mg/kg/天的大约剂量(为期2.5个月)。实际剂量随每个单独小鼠的食物消耗以及小鼠重量而轻微变化。在该阶段以后，测量认知的行为评估。

[0590] 用于测量石榴衍生的化合物对认知的影响的行为测定

[0591] 为了检查石榴衍生的化合物对记忆和认知的影响，使用背景恐惧训练测定，检查了小鼠的背景记忆的改善。如在实施例19中所述，在恐惧训练室中训练小鼠。

[0592] 在训练过程中，将动物一次1只地放入该室中。在室内探究4分钟后，施加1次足电击(2秒和0.4mA)，在1分钟以后施加第2次足电击(2秒和0.4mA)。第2次足电击后30秒，将小鼠放回它的居住笼。

[0593] 1天后，将经过训练的动物返回该室保持3分钟的时段。在这期间内，监测小鼠的运动。将保持不动或“僵硬”的时间量评分为观察的总时间(3分钟)的百分比。保持不动的时间是小鼠的回忆它们在其中受训的背景的记忆的强度的量度。使用石榴衍生的鞣花鞣质安石

榴苷和鞣花酸代谢物尿石素A的治疗会导致与未经治疗的对照组小鼠相比背景记忆的显著改善，正如通过它们在训练期以后24小时的背景记忆所确定的(图46)。

[0594] 为了确定这些石榴衍生的化合物对记忆保留的影响，在最初的背景恐惧训练以后第1、2、3、4和5天，针对它们的记忆回忆，研究了饲喂(i)对照饮食、(ii)安石榴苷(为期3个月)或(iii)尿石素A(为期2.5个月)的正常小鼠。

[0595] 在初次试验以后的5天中，每天将动物放入相同的室和背景中保持3min(一天中的相同时间，但是这次没有电击)。在这些每天3-分钟时段中的每一个时段中，测量由动物对室(它们在其中接受初期电击)的简单识别诱发的僵硬行为。在没有刺激存在下认出该环境的能力，是背景记忆的量度。

[0596] 随着每天的逝去，对照未治疗小鼠开始消失它们对该背景刺激的记忆，正如僵硬程度的下降所证实的(图47)。用安石榴苷或尿石素A治疗的小鼠表现出与对照未治疗小鼠相比改善的记忆保留。这通过记忆初始背景更长时间的能力来解释，该能力通过消失背景记忆的明显更长的时间段来证实(图47)。

[0597] 这些结果证实，用安石榴苷或尿石素A治疗会导致改善的认知，正如背景识别的显著增加和记忆保留的改善所证实的。

[0598] 实施例21

[0599] 石榴衍生的化合物对改善正常小鼠的肌肉性能的影响

[0600] 针对它们的改善肌肉性能的能力，评价了鞣花鞣质衍生的化合物安石榴苷和尿石素A。为了检查安石榴苷和尿石素A对改善肌肉性能的益处，使用2种行为测定检查了它们的作用：(i)旋转杆测定，其测量肌肉性能和运动技能，包括协调，和(ii)跑台耐力试验，其测量肌肉性能和耐力。

[0601] 用于测量石榴衍生的化合物对肌肉性能的影响的行为测定

[0602] 旋转杆测定

[0603] 在3个月龄开始，给小鼠饲喂标准对照饮食诸如AIN-93G或含有安石榴苷(以递送90mg/kg/天的剂量)的饮食，为期3个月。

[0604] 为了检查石榴衍生的化合物对肌肉性能和运动技能的影响，在旋转杆行为测定中试验了小鼠。旋转杆仪器由直径为2cm的杆组成，所述杆具有5个5cm宽的隔室。将小鼠放在以5rpm的初速度启动的旋转杆上。杆速度以8rpm/min的速度逐渐加速。以300秒的截止时间，测量跌落的延迟期。对小鼠进行4个试验。跌落的延迟期是小鼠的肌肉性能和运动技能的量度，更长的跌落的延迟期会反映更好的性能。试验了对照未治疗的和安石榴苷治疗的小鼠。与未治疗的小鼠相比，鞣花鞣质安石榴苷能够显著改善肌肉性能和运动技能。在序贯试验时段中，与未治疗的小鼠相比，安石榴苷治疗的小鼠能够在更高的速度和更长的时间保持在旋转杆上(图48)。

[0605] 耐力试验

[0606] 在开始研究之前，让正常的8-周龄小鼠适应2周。给小鼠饲喂标准的啮齿动物饮食(食物饮食)或含有与食物混合的尿石素A的饮食，以达到给小鼠递送55mg/kg/天的的定量给药。在治疗6周后，借助于耐力试验，试验小鼠的肌肉性能。

[0607] 使用被包围在有机玻璃室中的可变速度带式跑台(Panlab，巴塞罗那，西班牙)进行耐力试验，所述跑台具有由电击网格组成的刺激装置，所述电击网格连接至带的后部。让

小鼠在10cm/秒和0°斜度奔跑5min。然后每5min使速度增加2cm/秒，直到小鼠精疲力竭。记录在5min区间内奔跑的距离和得到的电击数。当小鼠在1min时段内受到大约20次电击时，认为它已经精疲力竭，并将其从实验中去除。试验了对照未治疗的和尿石素A治疗的小鼠，并对比它们的表现。

[0608] 在跑台上以更高的速度奔跑的能力，反映了改善的肌肉性能和耐力。小鼠会需求避免电击，尽管速度增加也会奔跑。在某个点，小鼠不能跟上跑台速度并被电击。在达到电击的阈值水平以后，从跑台取出小鼠。具有更好的肌肉性能和改善的耐力的小鼠能够跟得上增加的跑台速度，并且在特定速度会经历更少的电击。在该行为测定中，尿石素A治疗的小鼠以比未经治疗的对照组小鼠更高的速度奔跑，从而表明，尿石素A在该背景下会改善肌肉性能和耐力(图49)。

[0609] 这些结果证实，鞣花鞣质安石榴苷和它的代谢物尿石素A能够改善哺乳动物的肌肉性能和运动技能。

[0610] 等效方案

[0611] 本文已经概括地和一般地描述了本发明。本领域普通技术人员将容易地预见到用于实现这些功能和/或获得这些结果和/或本文所描述的一个或多个优点的多种其它装置和/或结构，并且每一个这样的变化和/或改变被认为在本发明的范围内。更一般而言，本领域技术人员会容易地明白，本文所描述的所有参数、尺寸、材料和构型意图是示例性的，而实际参数、尺寸、材料和/或构型将取决于具体应用或使用本发明教导的那些应用。本领域技术人员会认识到或仅仅使用例行实验就能够确定许多与本文所述的本发明的具体实施方案等效的方案。因此，应该理解，前述实施方案仅以实施例方式提出，并且在所附权利要求及其等效方案的范围内，本发明可以以除了明确描述和声明以外的方式实践。本发明涉及本文所描述的每个单独的特征、系统、制品、材料、套件(kit)和/或方法。此外，如果这样的特征、系统、制品、材料、套件和/或方法不相互矛盾，那么两个或多个这样的特征、系统、制品、材料、套件和/或方法的任意组合被包含在本发明的范围内。此外，落入一般公开范围内的每种较窄的物类和亚组也形成本发明的一部分。这包括总的发明说明书具有从种类中排除任何主题的附带条件或消极限制，而无论所排除的材料是否在本文中明确地述及。

[0612] 通过引用并入

[0613] 在本文中提及或引用的文章、专利和专利申请、和所有其它文件以及可以电子方式获得的信息的内容，特此通过引用整体并入，其程度如同明确地且单独地指出每篇单独的出版物通过引用并入。申请人保留向本申请中物理地并入来自任何这样的文章专利、专利申请或其它有形文件和电子文件的任何和所有材料和信息的权利。

[0614] 引用的参考文献

[0615] Bai,N.,K.He,等人(2008)."Active compounds from Lagerstroemia speciosa, insulin-like glucose uptake-stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells."J Agric Food Chem 56 (24):11668-74.

[0616] Bishop,N.A.,T.Lu,等人(2010)."Neural mechanisms of ageing and cognitive decline."Nature 464(7288):529-35.

[0617] Bloss,E.B.,W.G.Janssen,等人(2010)."Interactive effects of stress and

aging on structural plasticity in the prefrontal cortex."J Neurosci 30(19):6726-31.

[0618] Bowman,R.E.,K.D.Beck,等人(2003)."Chronic stress effects on memory:sex differences in performance and monoaminergic activity."Horm Behav 43(1):48-59.

[0619] Cerda,B.,J.C.Espin,等人(2004)."The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans."Eur J Nutr 43(4):205-20.

[0620] Cerda,B.,P.Periago,等人(2005)."Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds."J Agric Food Chem 53(14):5571-6.

[0621] De Souza Schmidt Goncalves,A.E.,F.M.Lajolo,等人"Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps."J Agric Food Chem 58(8):4666-74.

[0622] Del Pozo-Insfran,D.,C.H.Brenes,等人(2004)."Phytochemical composition and pigment stability of Acai(Euterpe oleracea Mart.)."J Agric Food Chem 52(6):1539-45.

[0623] Dumitriu,D.,J.Hao,等人(2010)."Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment."J Neurosci 30(22):7507-15.

[0624] Gasperotti,M.,D.Masuero,等人"Profiling and accurate quantification of Rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis."J Agric Food Chem 58(8):4602-16.

[0625] Gil,M.I.,F.A.Tomas-Barberan,等人(2000)."Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing."J Agric Food Chem 48(10):4581-9.

[0626] Greene,L.A.and A.S.Tischler(1976)."Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor."Proc Natl Acad Sci USA 73(7):2424-8.

[0627] Gunning,P.W.,G.E.Landreth,等人(1981)."Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells."J Cell Biol 89(2):240-5.

[0628] Harper,M.E.,K.Green,等人(2008)."The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity."Annu Rev Nutr 28:13-33.

[0629] Hebert,L.E.,P.A.Scherr,等人(2003)."Alzheimer disease in the US population:prevalence estimates using the 2000census."Arch Neurol 60(8):1119-22.

[0630] Joels,M.,Z.Pu,等人(2006)."Learning under stress:how does it work?"

Trends Cogn Sci 10(4):152-8.

[0631] Joseph,J.A.,B.Shukitt-Hale,等人(2005)."Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior:beneficial properties of fruit polyphenolic compounds."Am J Clin Nutr 81(1Suppl):313S-316S.

[0632] Kujoth,G.C.,A.Hiona,等人(2005)."Mitochondrial DNA mutations,oxidative stress,and apoptosis in mammalian aging."Science 309(5733):481-4.

[0633] Lee,J.H.,J.V.Johnson,等人(2005)."Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS."J Agric Food Chem 53(15):6003-10.

[0634] Maier,S.F.and L.R.Watkins(2005)."Stressor controllability and learned helplessness:the roles of the dorsal raphe nucleus,serotonin,and corticotropin-releasing factor."Neurosci Biobehav Rev 29(4-5):829-41.

[0635] Puech,J.L.,C.Mertz,等人(1999)."Evolution of castalagin and vescalagin in ethanol solutions.Identification of new derivatives."J Agric Food Chem 47(5):2060-6.

[0636] Pinnock,S.B.and J.Herbert(2001)."Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress."Eur J Neurosci 13(3):576-84.

[0637] Rea,S.L.,N.Ventura,等人(2007)."Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction,development,and life extension in Caenorhabditis elegans."PLoS Biol 5(10):e259.

[0638] Roozendaal,B.(2003)."Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval."Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(8):1213-23.

[0639] Rozovsky,I.,M.Wei,等人(2005)."Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP."Neurobiol Aging 26(5):705-15.

[0640] Sandi,C.(2004)."Stress,cognitive impairment and cell adhesion molecules."Nat Rev Neurosci 5(12):917-30.

[0641] Sandi,C.and M.Loscertales(1999)."Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs.chronic corticosterone treatments."Brain Res 828(1-2):127-34.

[0642] Sandi,C.and M.T.Pinelo-Nava(2007)."Stress and memory:behavioral effects and neurobiological mechanisms."Neural Plast 2007:78970.

[0643] Satomi,H.,K.Umemura,等人(1993)."Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of Punica granatum L."Biol Pharm Bull 16(8):787-90.

[0644] Schriner,S.E.,N.J.Linford,等人(2005)."Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria."Science 308(5730):1909-11.

[0645] Shors,T.J.(2004)."Learning during stressful times."Learn Mem 11(2):137-44.

[0646] Tanaka,K.,G.Nonaka,等人(1986)."Tannins and Related Compounds.XLI.1)Isolation and Charactherization of Novel Ellagitannins,Punicacorteins A,B,C,and Punigluconin from the brak of Punica granatum L."Chem.Pharm.Bull 34(2):656-663.

[0647] Tanaka,K.,G.Nonaka,等人(1986)."Tannins and Related Compounds.XLI.1)Isolation and Charactherization of Novel Ellagitannins,Punicacorteins A,B,C,and Punigluconin from the brak of Punica granatum L."Chem.Pharm.Bull 34(2):656-663.

[0648] Tanaka,K.,G.Nonaka,等人(1986)."Tannins and Related Compounds.XLI.1).Revision of the Structures of Punicalin and Punicalagin,and Isolation and Charactherization of 2-O-Galloylpunicalin from the Bark of Punica granatum L."Chem.Pharm.Bull 34(2):650-655.

[0649] Trifunovic,A.,A.Wredenberg,等人(2004)."Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase."Nature 429(6990):417-23.

[0650] Vrhovsek,U.,A.Palchetti,等人(2006)."Concentration and mean degree of polymerization of Rubus ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis."J Agric Food Chem 54(12):4469-75.Wang,C.H.,C.C.Wang,等人(2010)."Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity:implication of mitochondrial role in type 2 diabetes."Ann N Y Acad Sci 1201:157-65.

[0651] Xiao,J.,A.Pradhan,等人(2006)."Functional role of JNK in neuritogenesis of PC12-N1 cells."Neurosci Lett 392(3):231-4.

[0652] Yang,G.,F.Pan,等人(2009)."Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories."Nature 462(7275):920-4.

序列表

<110> Amazentis SA

<120> 用于改善线粒体功能以及治疗神经变性疾病和认知障碍的组合物和方法

<130> AZX-005.25

<150> US 61/426957
<151> 2010-12-23

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1
aagtgtggaa ctctctggaa ctg 23

[0001] <210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2
gggttatctt ggttggcttt atg 23

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 3
aagtgttttt ccagcatggg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4
ggctgcaatt ttcctaacca 20

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5
tcatggaata gagcgcc 17

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

[0002] <400> 6
gtgtgctcac cgattctaca 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7
cccatgtgct cctaccagat 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8
ccttgaagaa gcgacctttg 20

<210> 9

〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 9
gatcgcaatg ggtgcttttg atagaa 26

〈210〉 10
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 10
agctgattgg caatgtctcc agcaaa 26

〈210〉 11
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

[0003]

〈220〉
〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 11
gtagcttatg aatgtgtgca actc 24

〈210〉 12
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 12
gtcttgcgat cagctctttc atta 24

〈210〉 13
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 13

gcacacattt ccccacactg 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 14
cccaacctgc ccattctgat 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 15
tccatcaggg tatcctctcc 20

[0004]

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 16
ggaggcaagc ataagactgg 20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

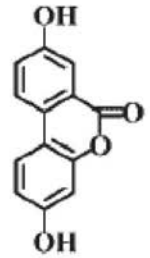
<400> 17
acgtcaaagg gtacctgtcc a 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

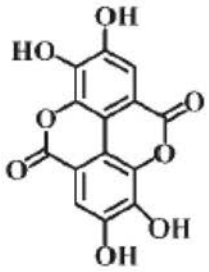
<220>
<223> 合成的寡核苷酸

[0005]

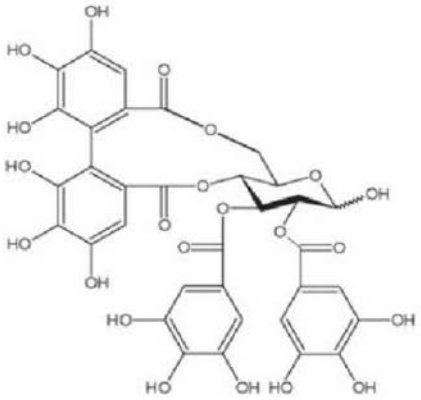
<400> 18
caatcccaga tggcagaact t 21



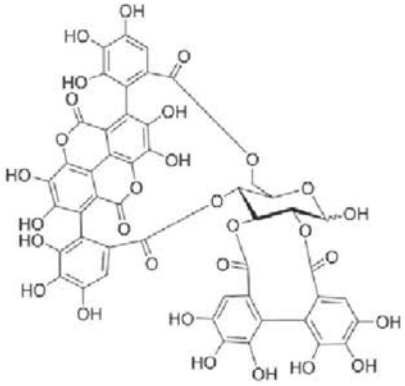
尿石素 A (UA)



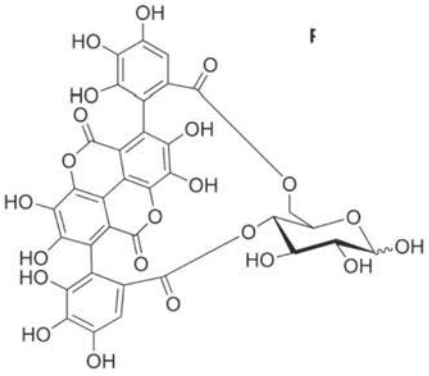
鞣花酸 (EA)



新唢呐素 (TL)



安石榴苷 (PA)



石榴皮鞣质 (PB)

图1

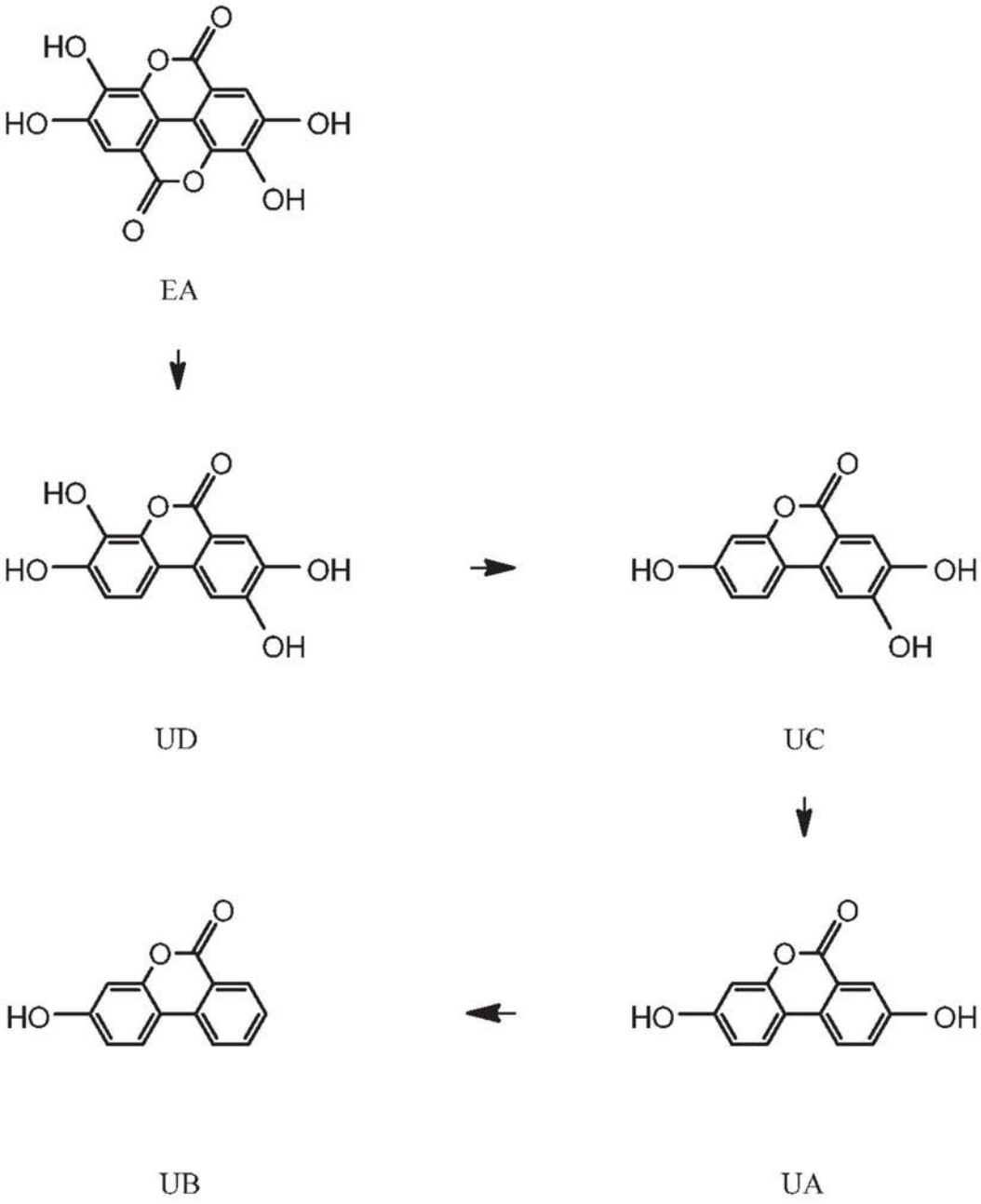


图2

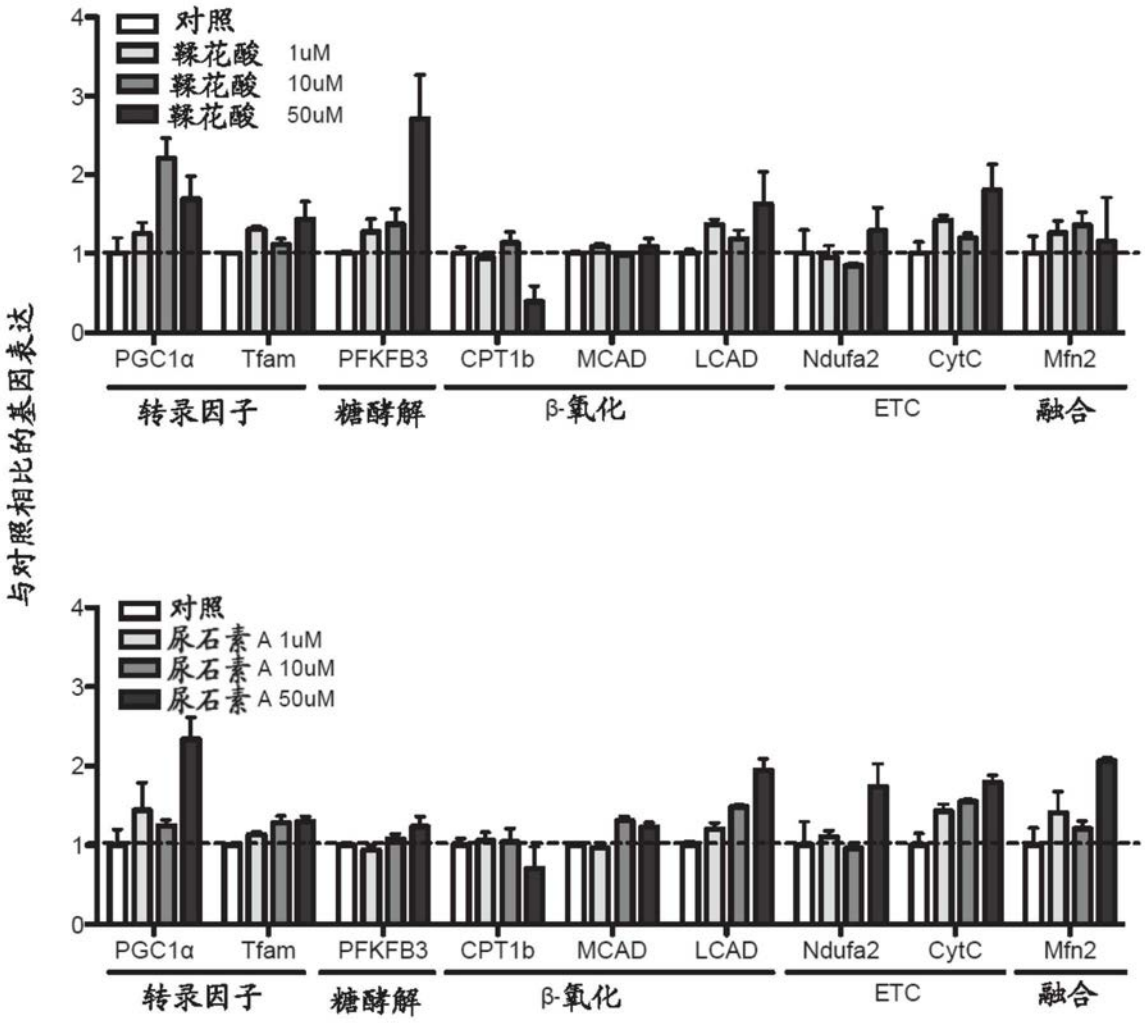

与对照相比的基因表达
对照
鞣花酸 1uM
鞣花酸 10uM
鞣花酸 50uM
PGC1α
Tfam
PFKFB3
CPT1b
MCAD
LCAD
Ndufa2
CytC
Mfn2
转录因子
糖酵解
β-氧化
ETC
融合
对照
尿石素 A 1uM
尿石素 A 10uM
尿石素 A 50uM
PGC1α
Tfam
PFKFB3
CPT1b
MCAD
LCAD
Ndufa2
CytC
Mfn2
转录因子
糖酵解
β-氧化
ETC
融合

图3

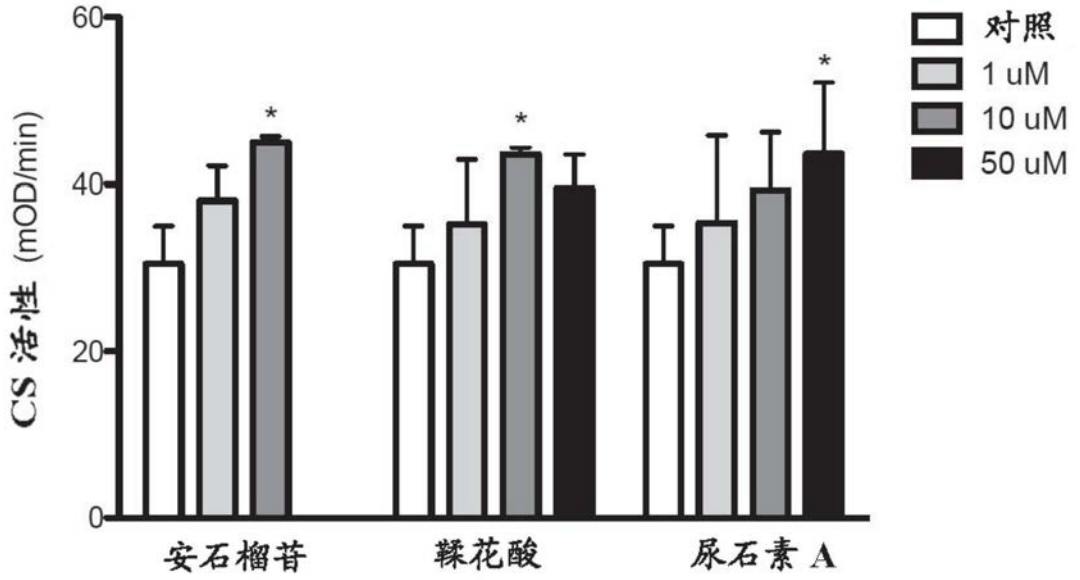


图4

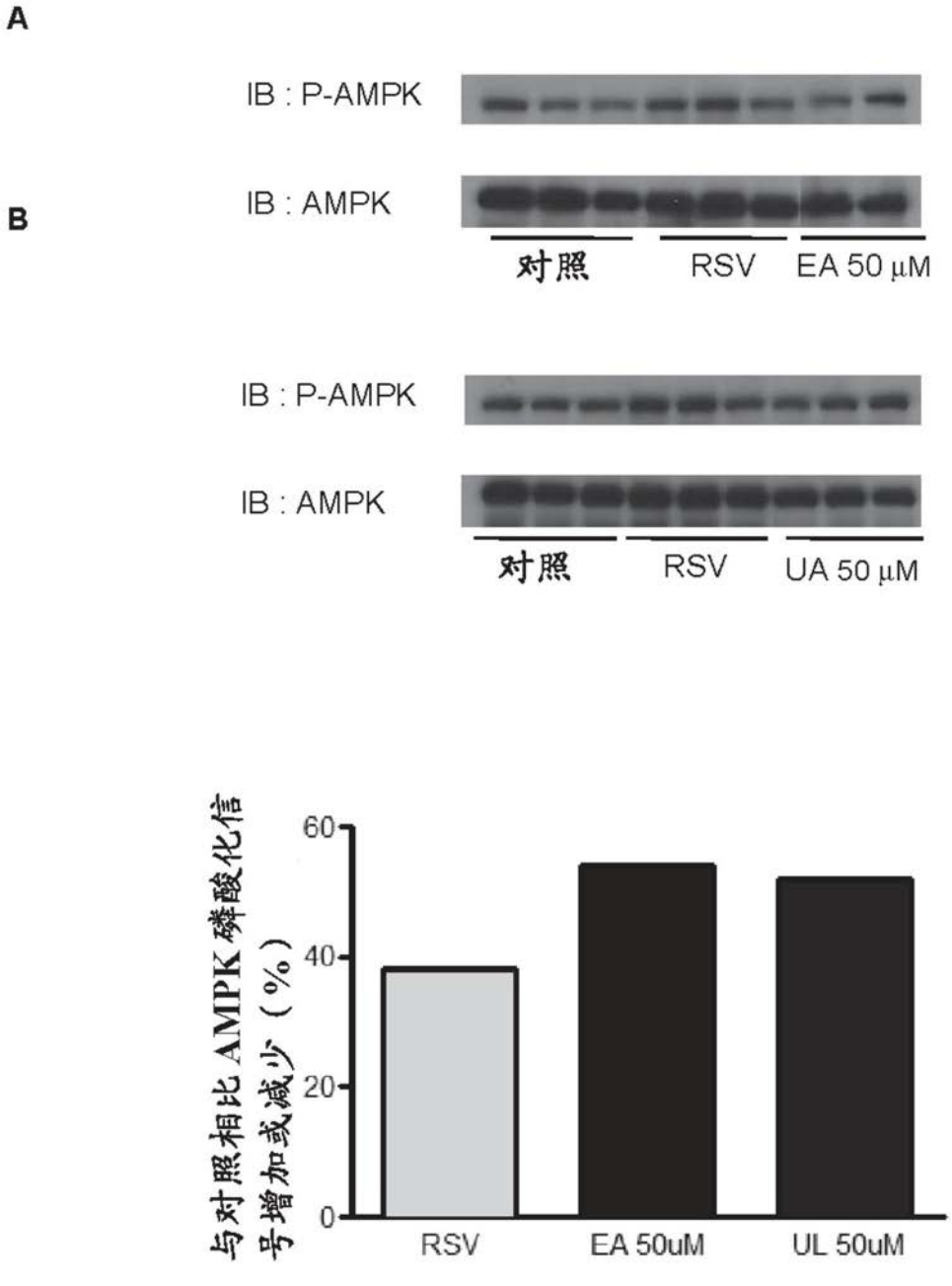
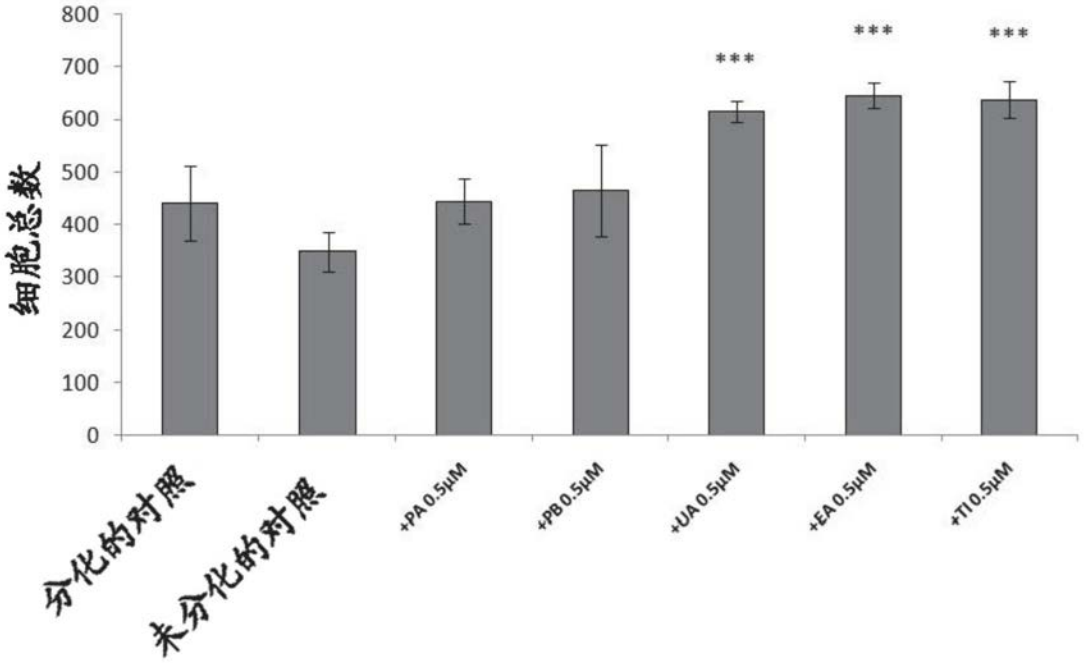
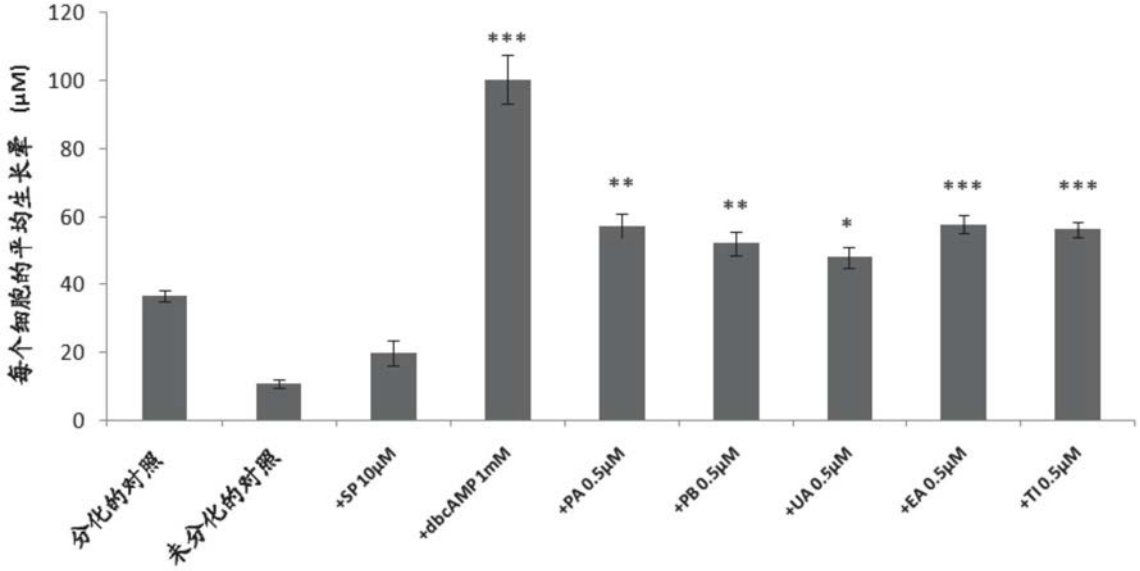

A
IB : P-AMPK
B
IB : AMPK
对照
RSV
EA 50 μM
IB : P-AMPK
IB : AMPK
对照
RSV
UA 50 μM
与对照相比 AMPK 磷酸化信号增加或减少（%）
60
40
20
0
RSV
EA 50uM
UL 50uM

图5



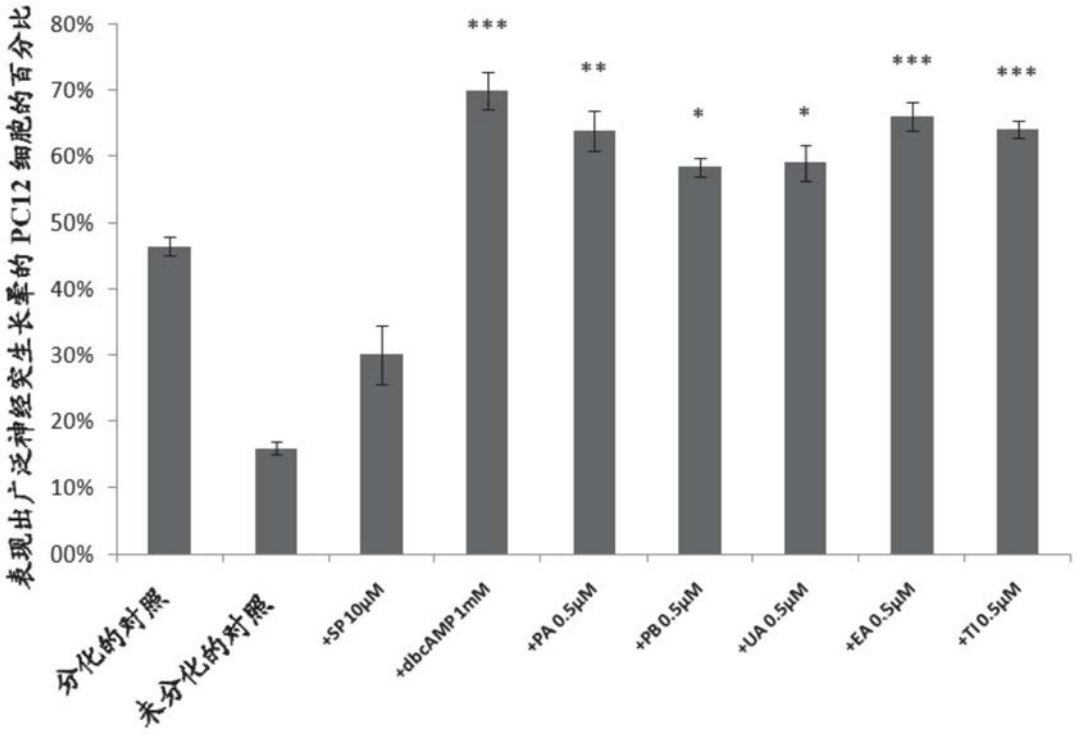
***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图6



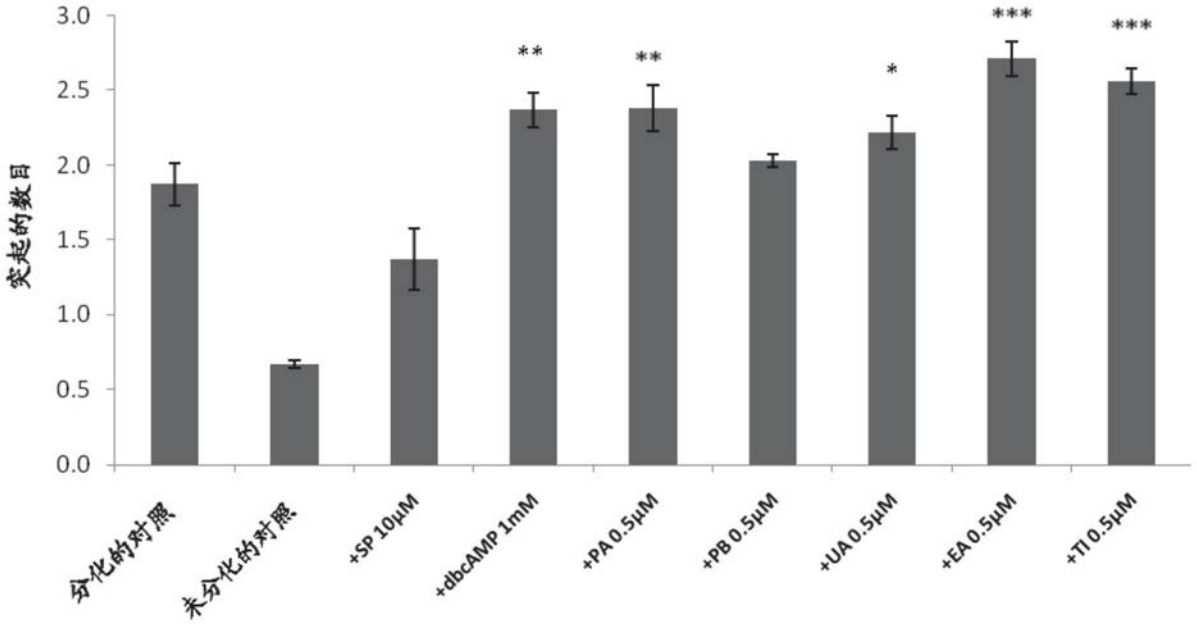
* p< 0.05, ** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图7



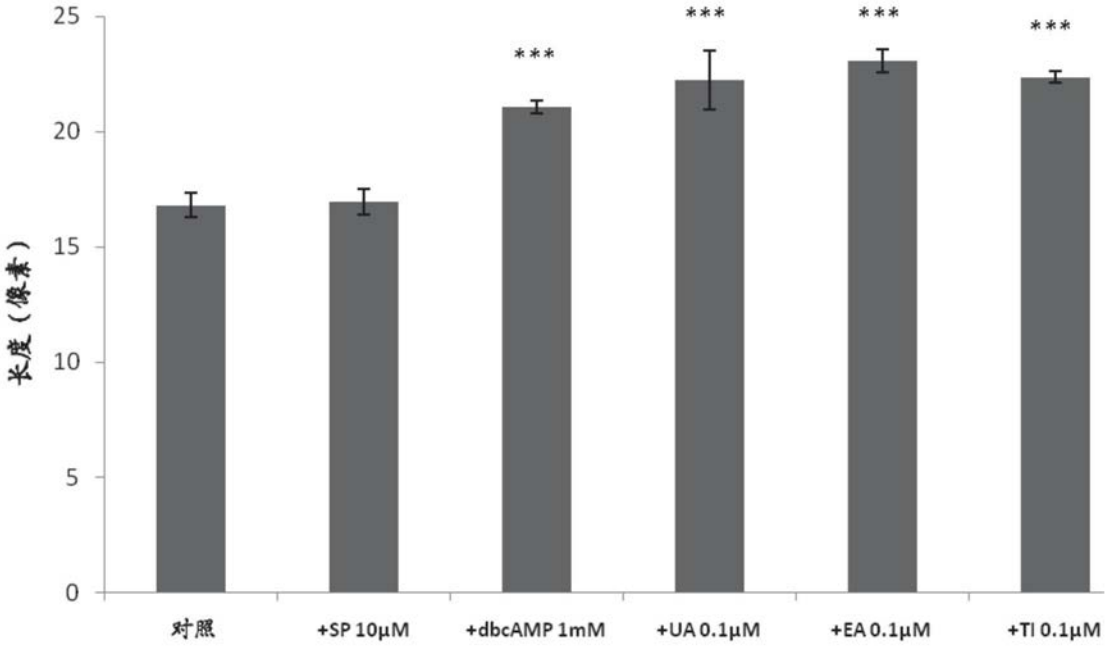
* p< 0.05, ** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图8



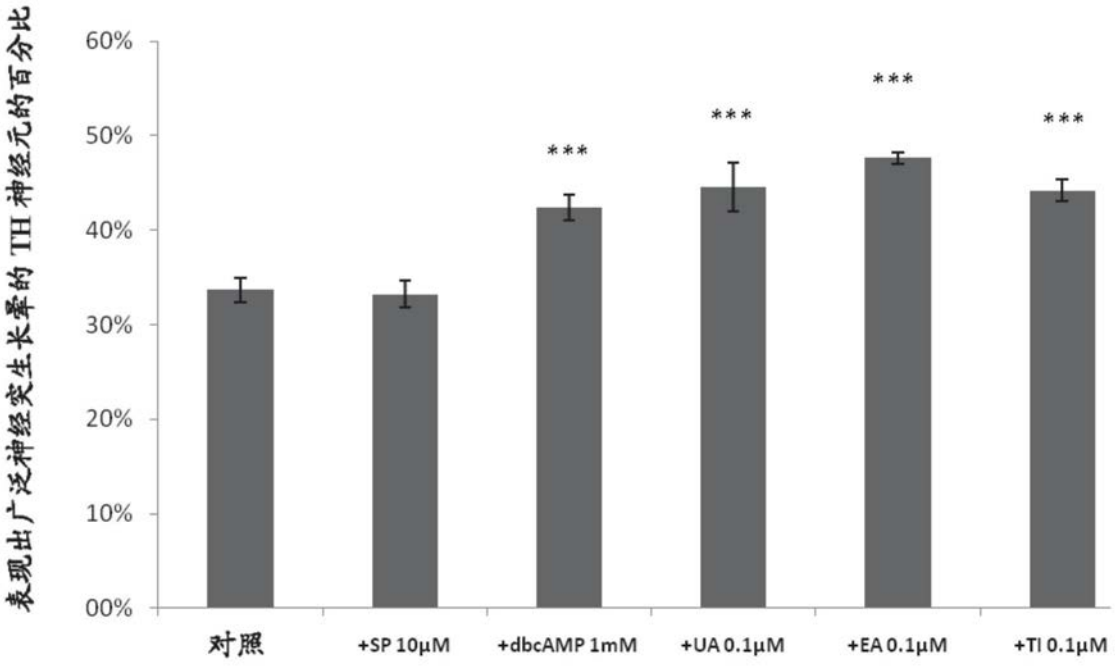
* p< 0.05, ** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图9



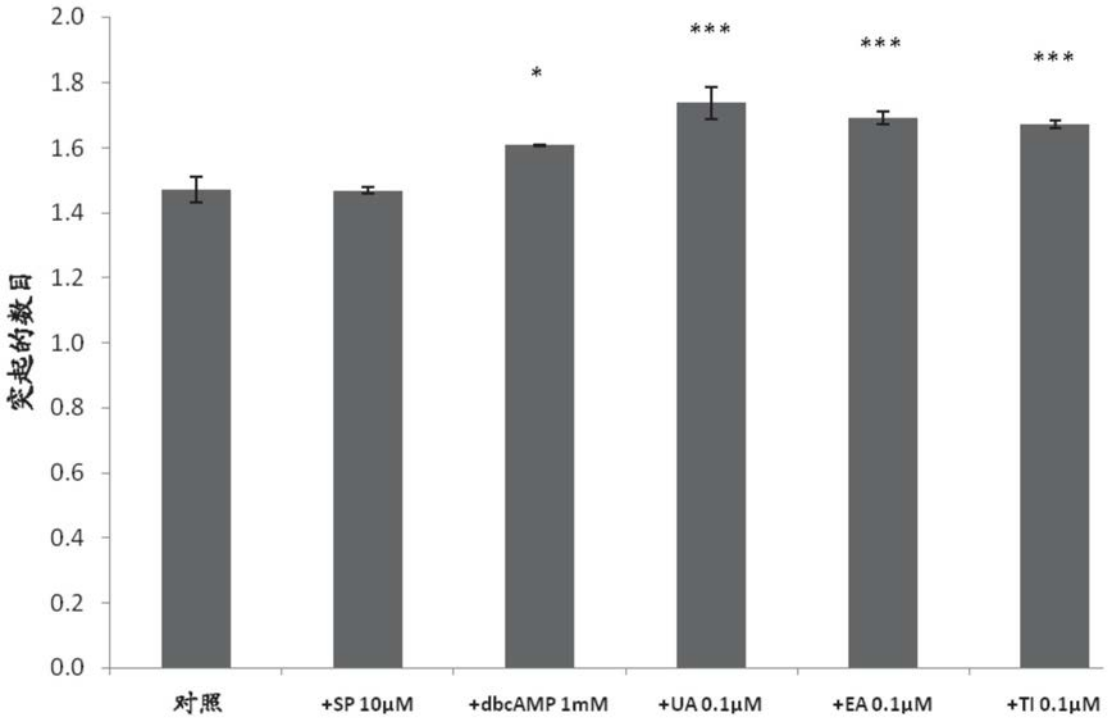
***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图10



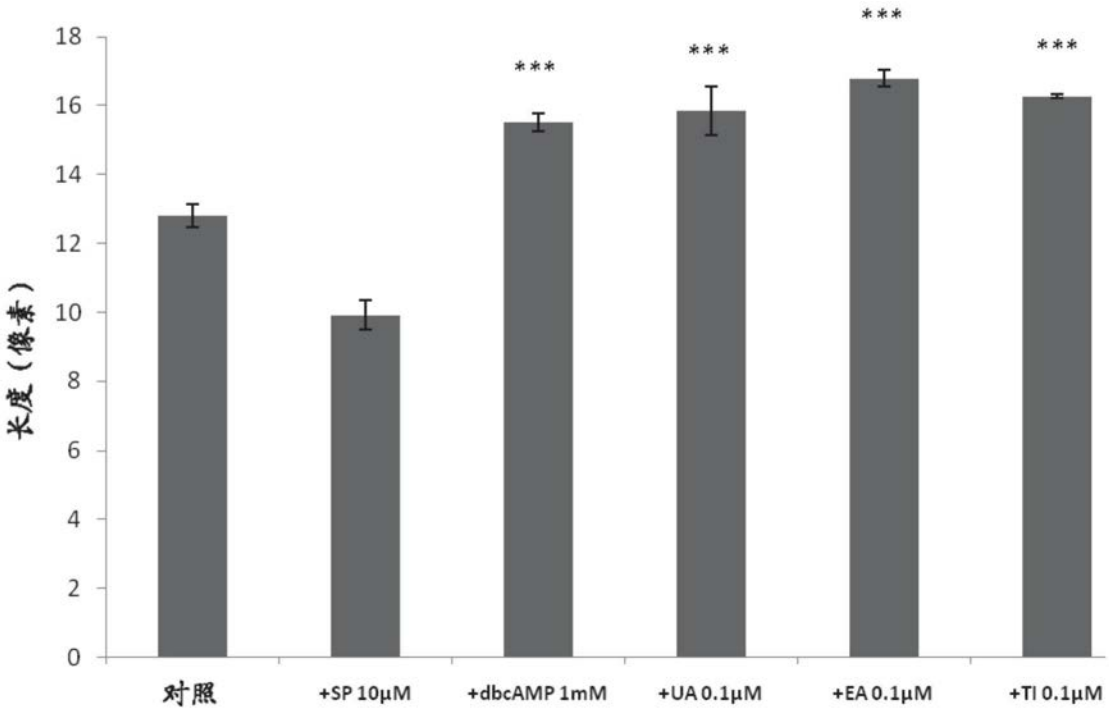
***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图11



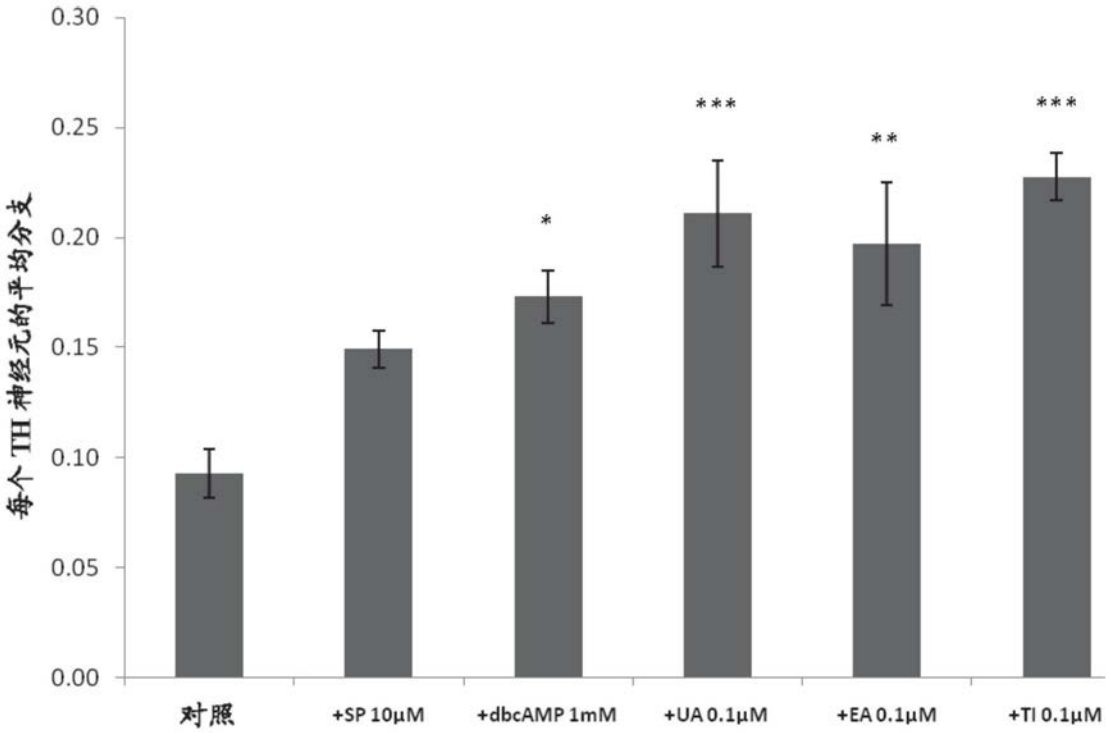
* p< 0.05, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图12



***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图13



* p< 0.05, ** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图14

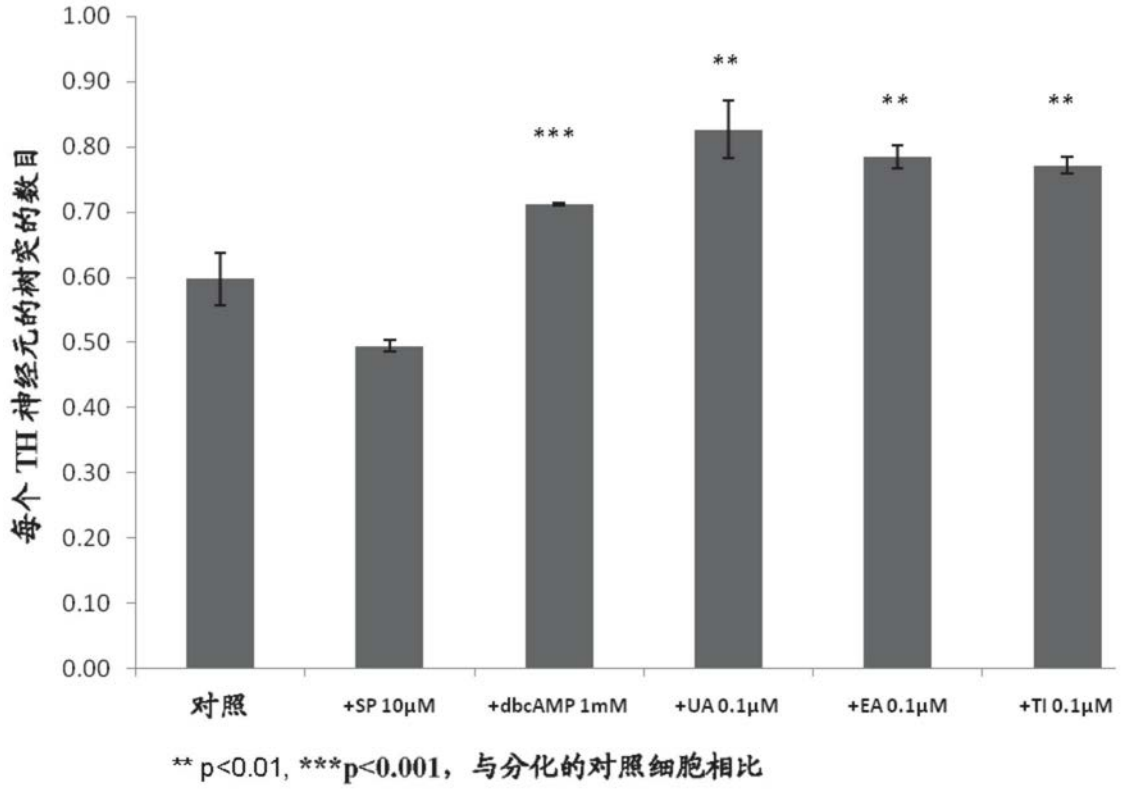

1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
每个 TH 神经元的树突的数目
***
**
**
**
对照
+SP 10μM
+dbcAMP 1mM
+UA 0.1μM
+EA 0.1μM
+TI 0.1μM
** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图15

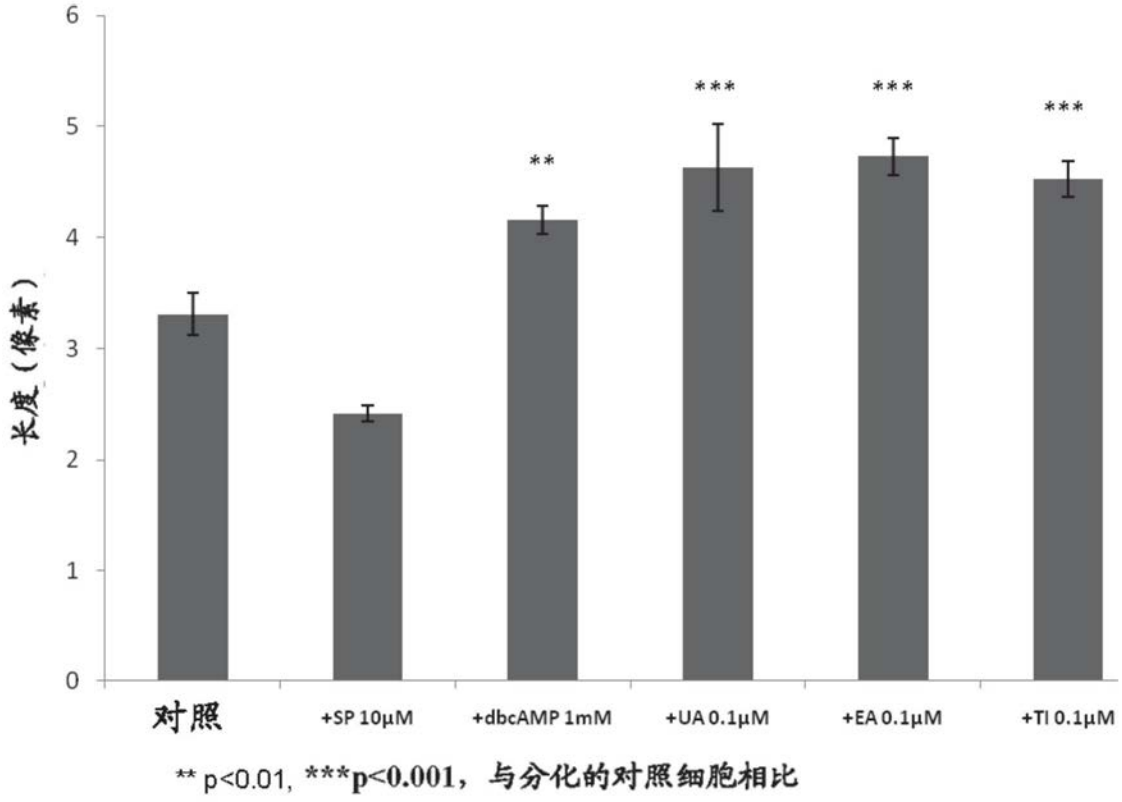
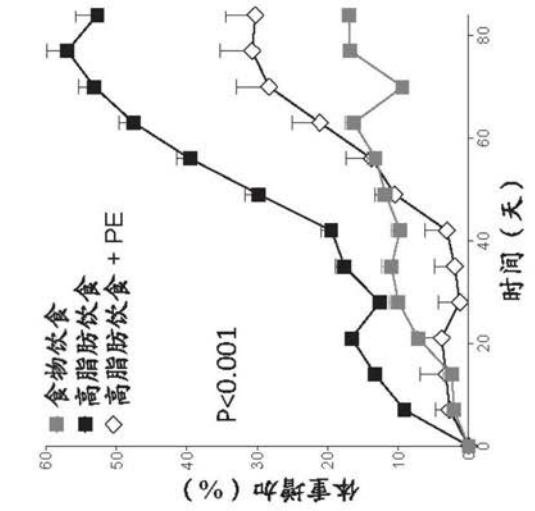
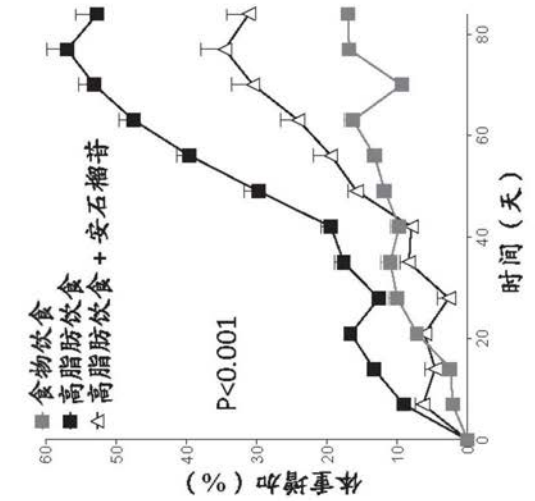

6
5
4
3
2
1
0
长度（像素）
**
***
***
***
对照
+SP 10μM
+dbcAMP 1mM
+UA 0.1μM
+EA 0.1μM
+TI 0.1μM
** p<0.01, ***p<0.001，与分化的对照细胞相比

图16


食物饮食
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + PE
P<0.001
体重增加（%）
时间（天）


食物饮食
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 安石榴苷
P<0.001
体重增加（%）
时间（天）

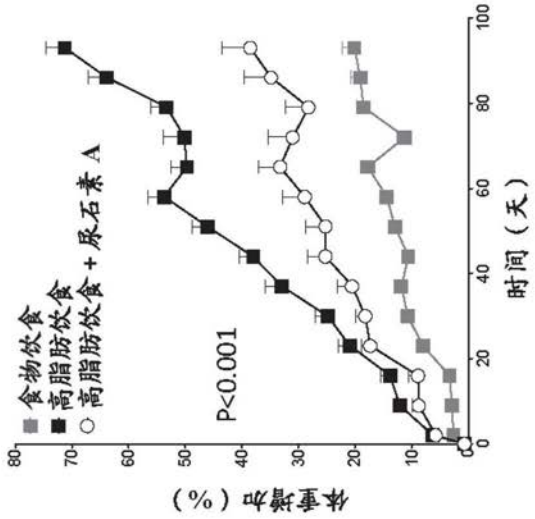

食物饮食
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
P<0.001
体重增加（%）
时间（天）

图17A

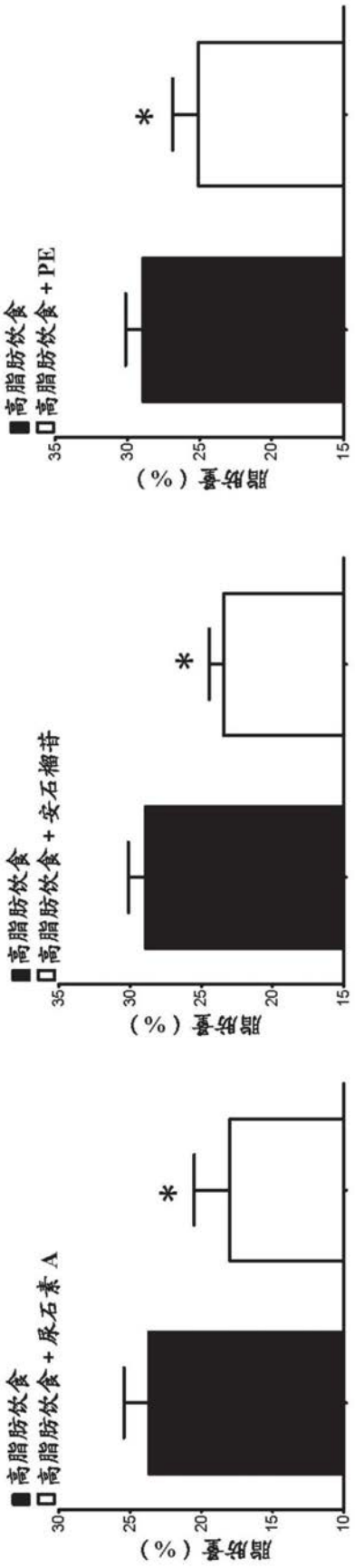

高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
脂肪酶（%）
35
30
25
20
15
10
*
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 安石榴苷
脂肪酶（%）
35
30
25
20
15
*
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + PE
脂肪酶（%）
35
30
25
20
15
*

图17B

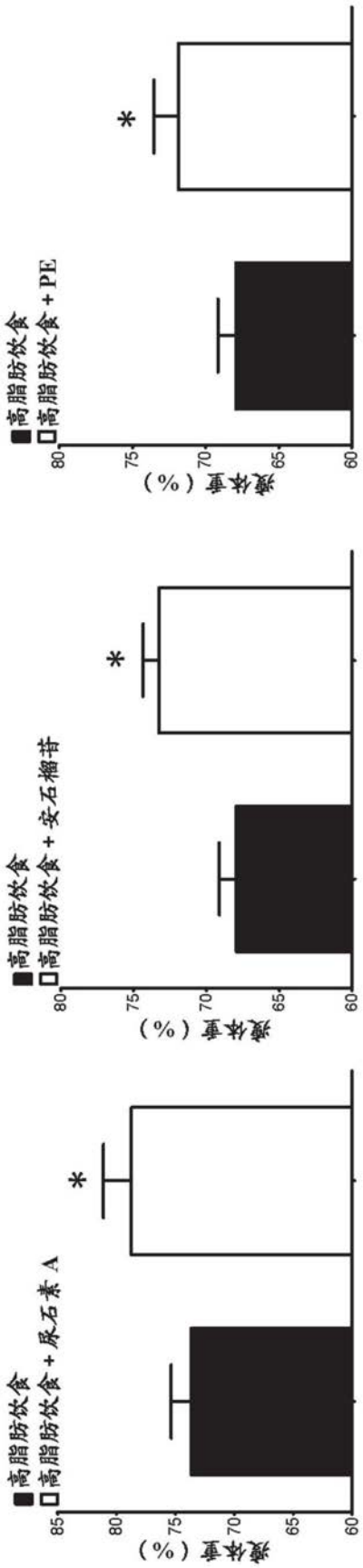

高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
瘦体重（%）
85
80
75
70
65
60
*
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 安石榴苷
瘦体重（%）
80
75
70
65
60
*
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + PE
瘦体重（%）
80
75
70
65
60
*

图17C

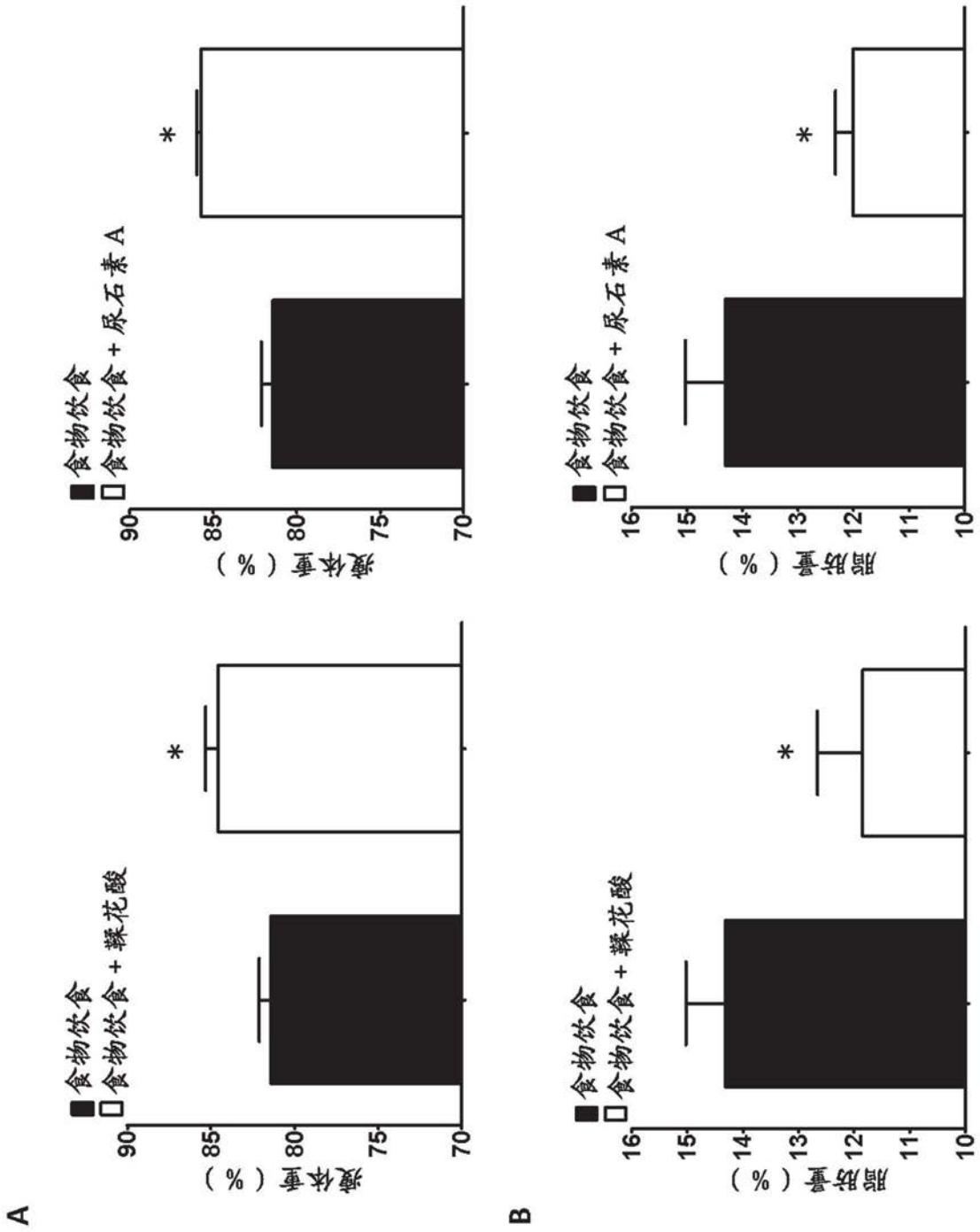

A
B
食物饮食
食物饮食 + 鞣花酸
食物饮食 + 尿石素 A
瘦体重（%）
脂肪量（%）
90
85
80
75
70
16
15
14
13
12
11
10
*

图18

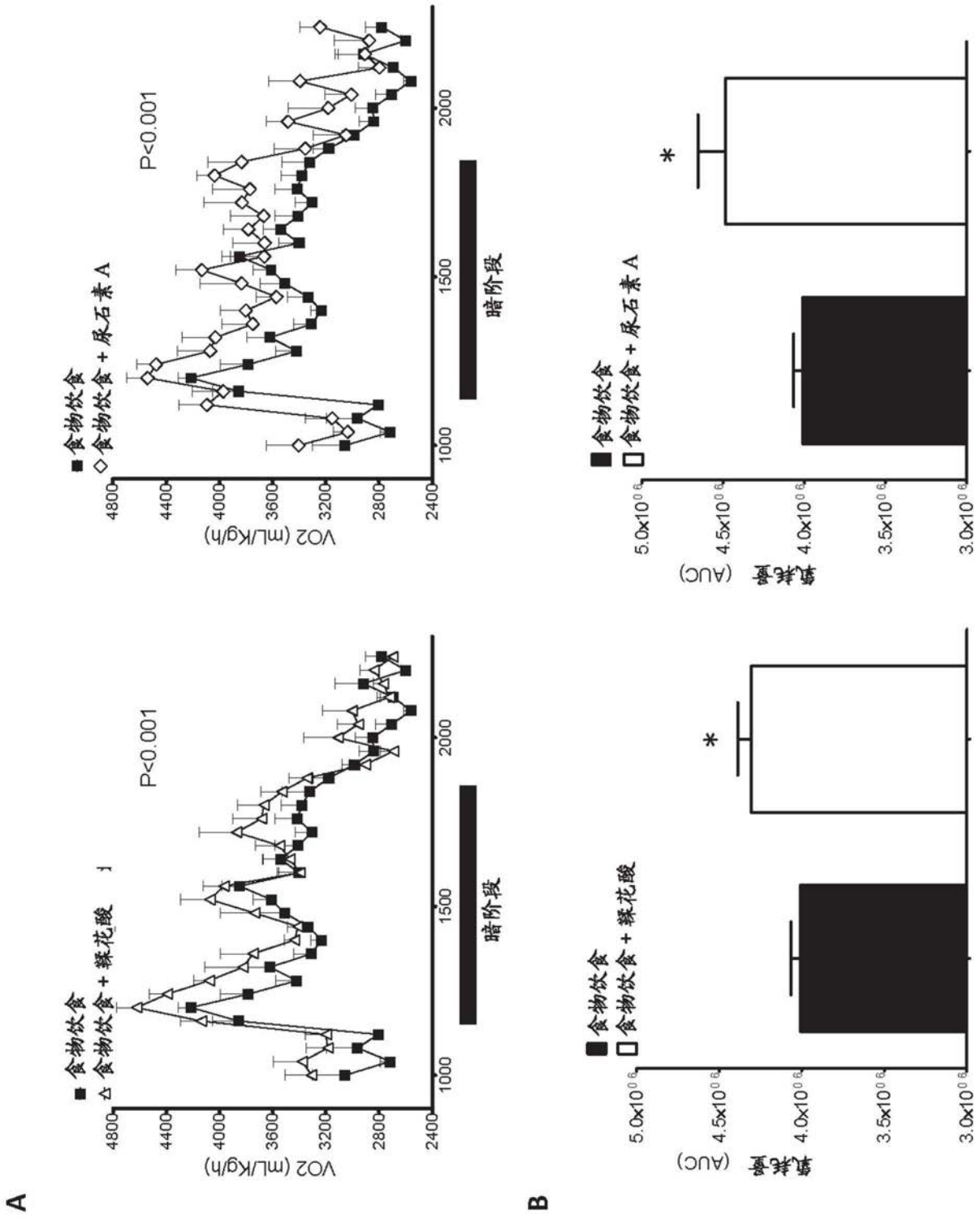

A
食物饮食
食物饮食 + 槲花酸
P<0.001
VO2 (mL/kg/h)
暗阶段
食物饮食
食物饮食 + 尿石素 A
P<0.001
VO2 (mL/kg/h)
暗阶段
B
食物饮食
食物饮食 + 槲花酸
*
累计耗氧 (AUC)
食物饮食
食物饮食 + 尿石素 A
*
累计耗氧 (AUC)

图19

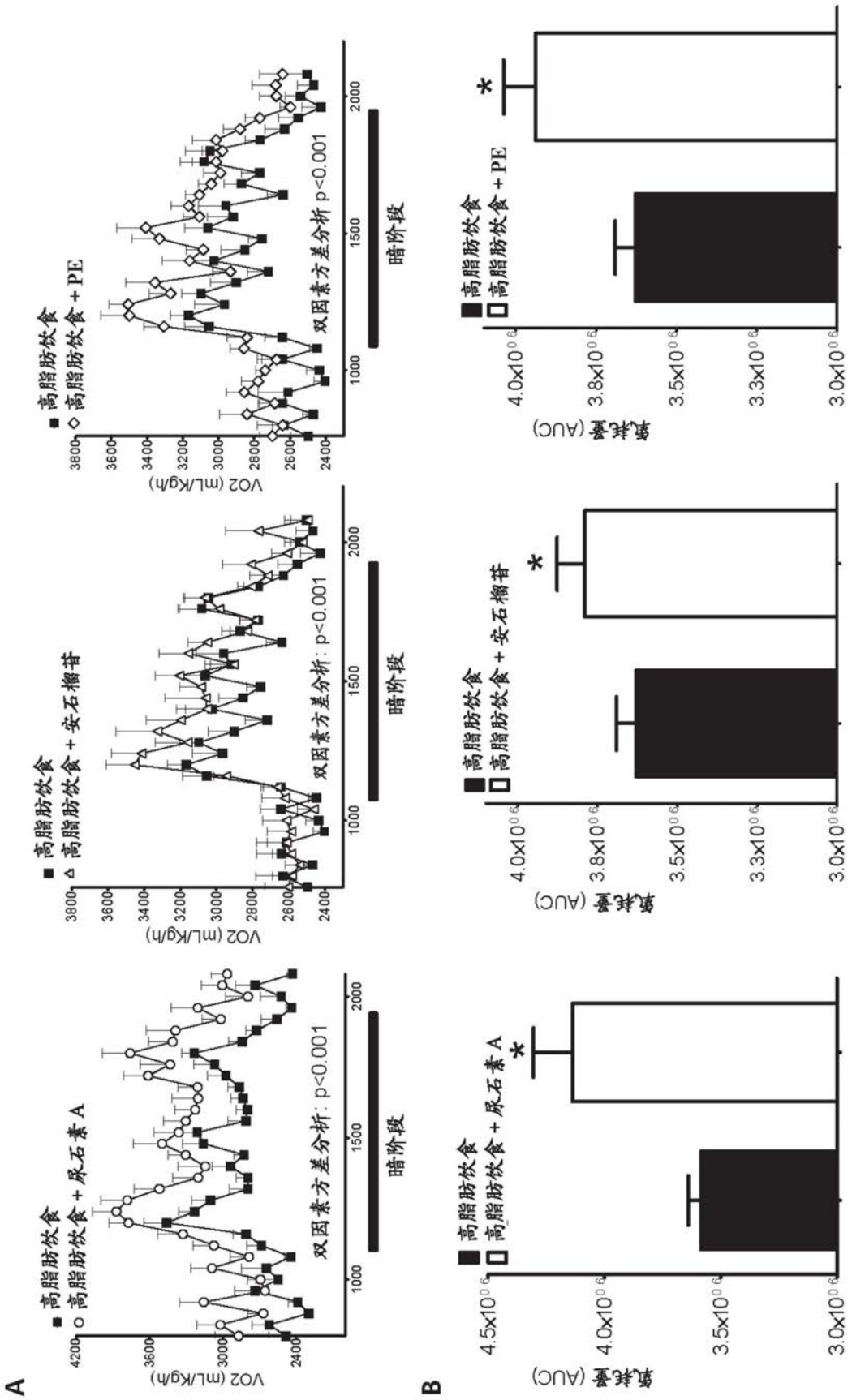

A
B
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
高脂肪饮食 + 安石榴苷
高脂肪饮食 + PE
VO2 (mL/Kg/h)
双因素方差分析: p<0.001
暗阶段
能耗量 (AUC)
*

图20

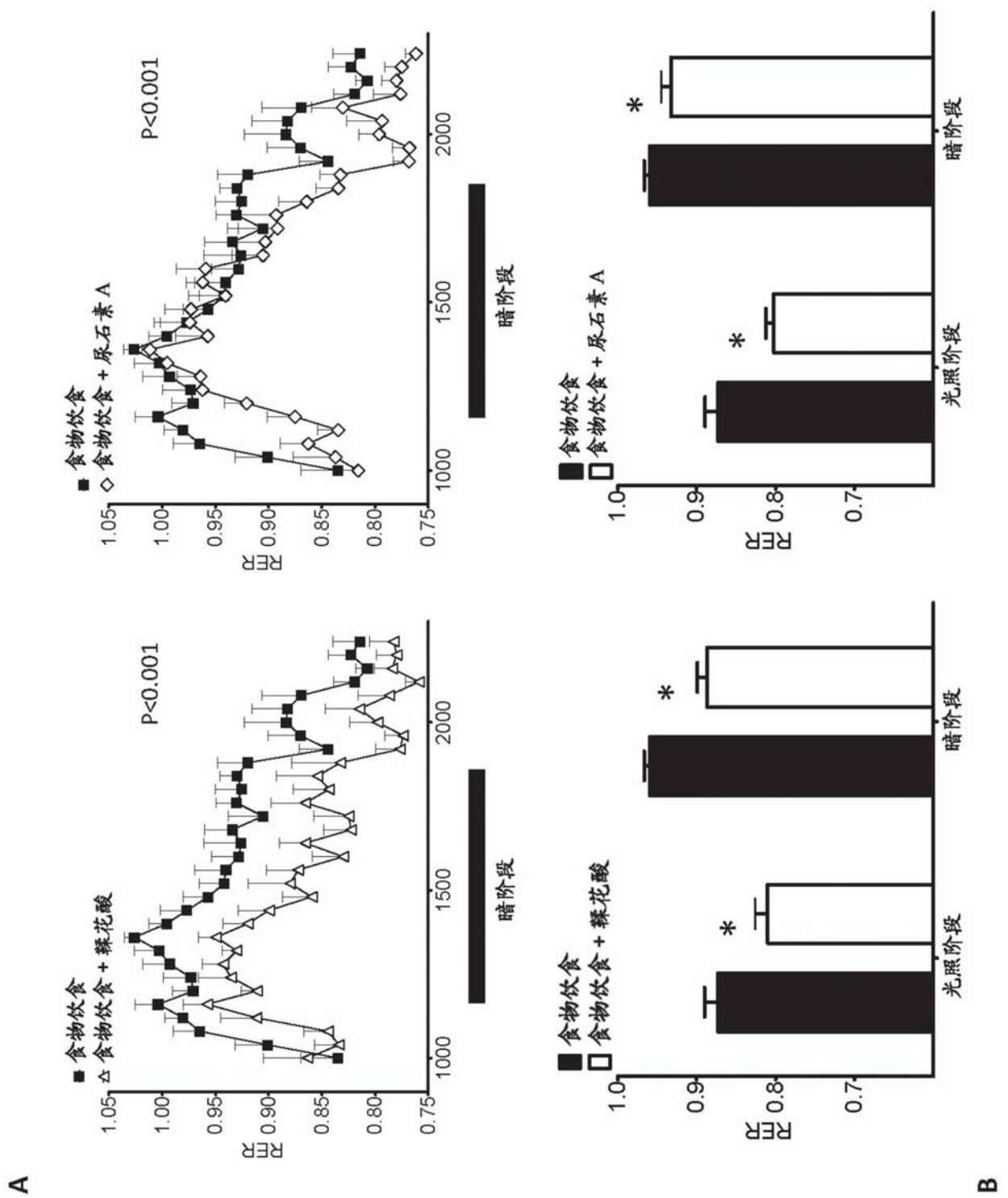


图21

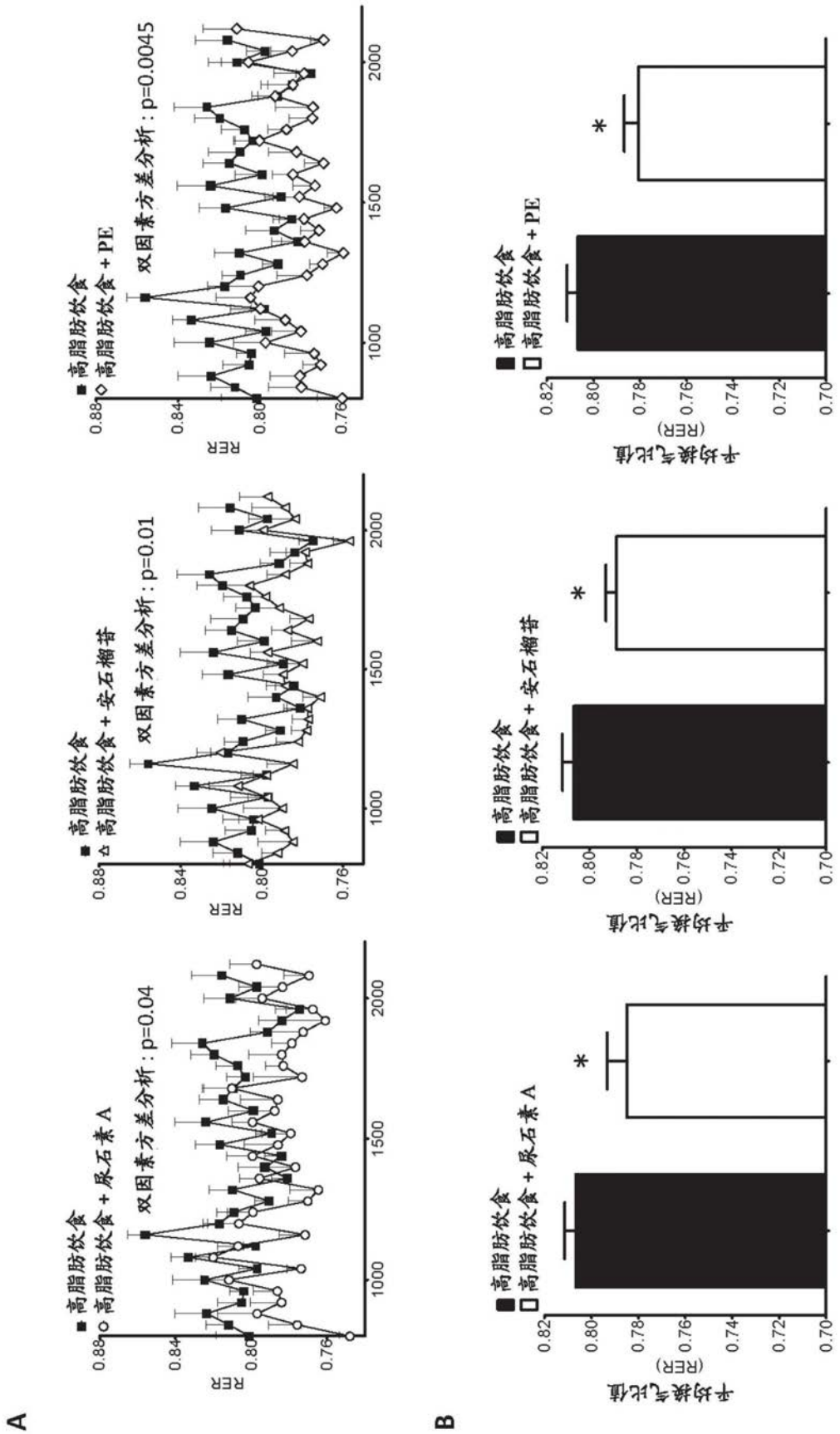

A
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
双因素方差分析 : p=0.04
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 安石榴苷
双因素方差分析 : p=0.01
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + PE
双因素方差分析 : p=0.0045
RER
0.88
0.84
0.80
0.76
1000
1500
2000
B
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 安石榴苷
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + PE
平均接气比值
(RER)
0.82
0.80
0.78
0.76
0.74
0.72
0.70
*

图22

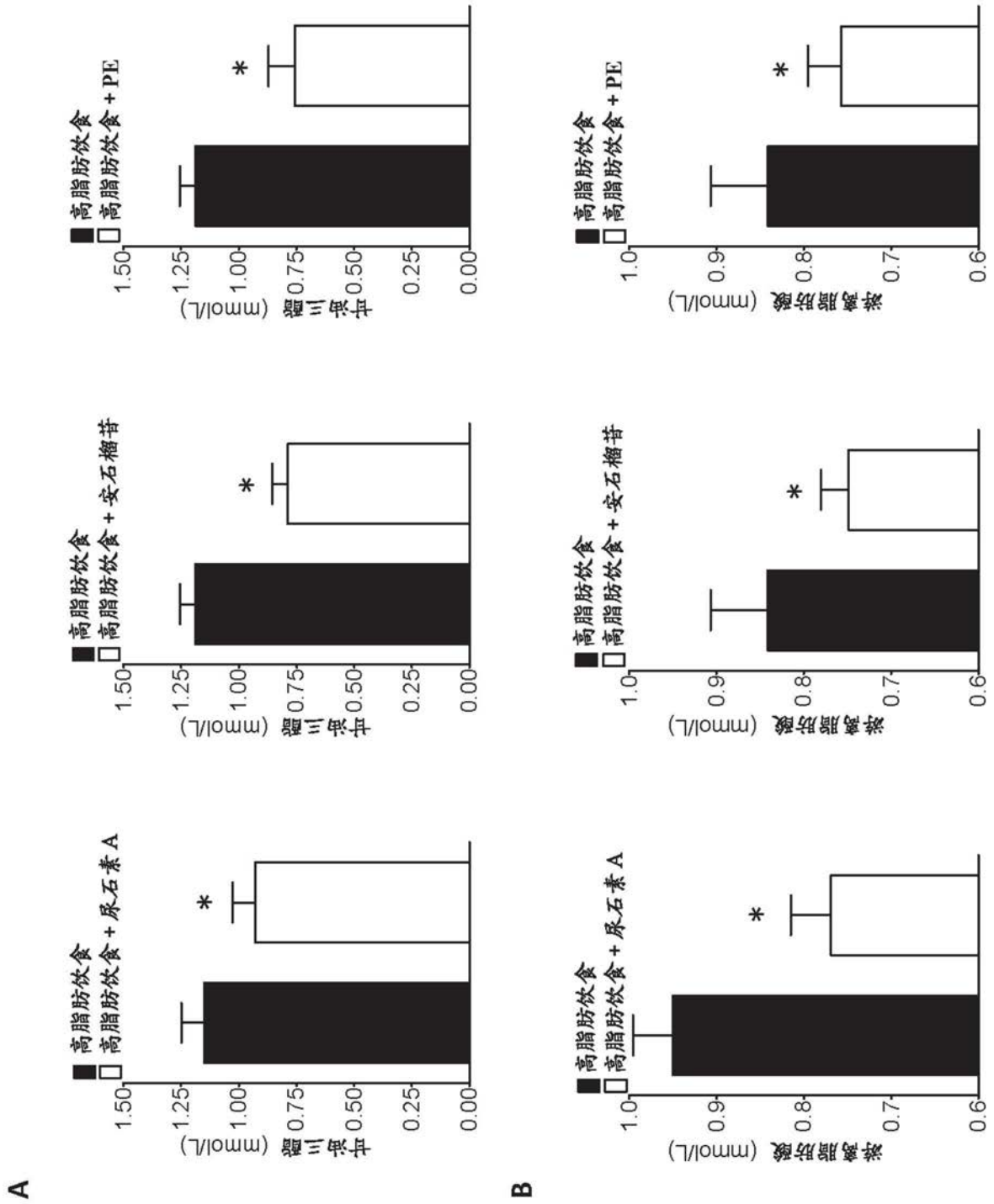

A
B
高脂肪饮食
高脂肪饮食 + 尿石素 A
高脂肪饮食 + 安石榴苷
高脂肪饮食 + PE
甘油三酯 (mmol/L)
游离脂肪酸 (mmol/L)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
*

图23

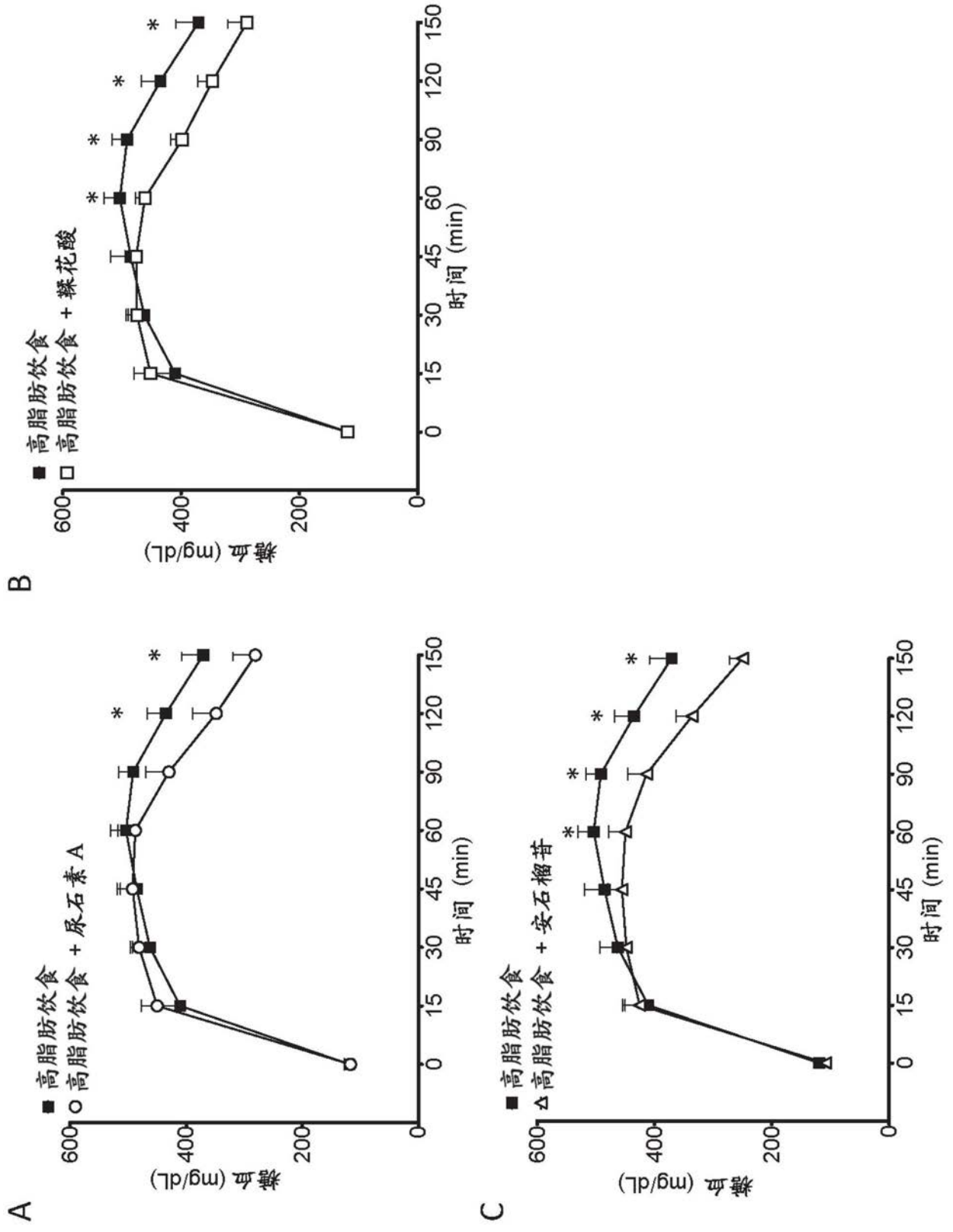

A
■ 高脂肪饮食
○ 高脂肪饮食 + 尿石素 A
糖负 (mg/dL)
600
400
200
0
0 15 30 45 60 90 120 150
时间 (min)
*
B
■ 高脂肪饮食
□ 高脂肪饮食 + 鞣花酸
糖负 (mg/dL)
600
400
200
0
0 15 30 45 60 90 120 150
时间 (min)
*
C
■ 高脂肪饮食
△ 高脂肪饮食 + 安石榴苷
糖负 (mg/dL)
600
400
200
0
0 15 30 45 60 90 120 150
时间 (min)
*

图24

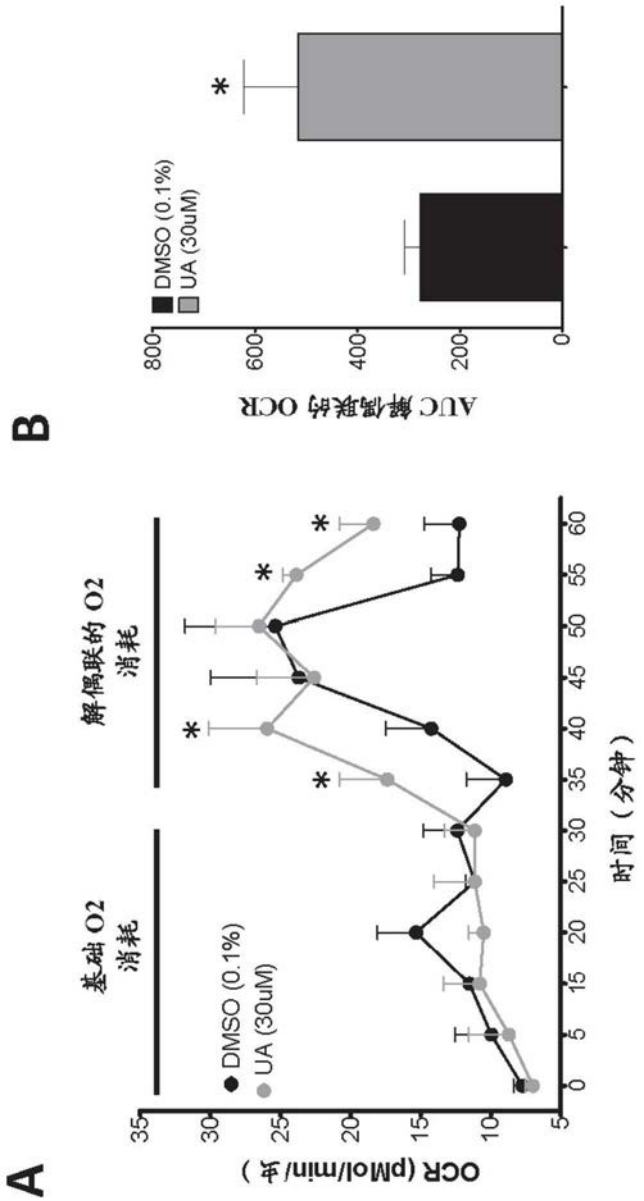

A
B
基础 O2 消耗
解偶联的 O2 消耗
DMSO (0.1%)
UA (30uM)
OCR (pMol/min/块)
时间（分钟）
AUC 解偶联的 OCR

图25

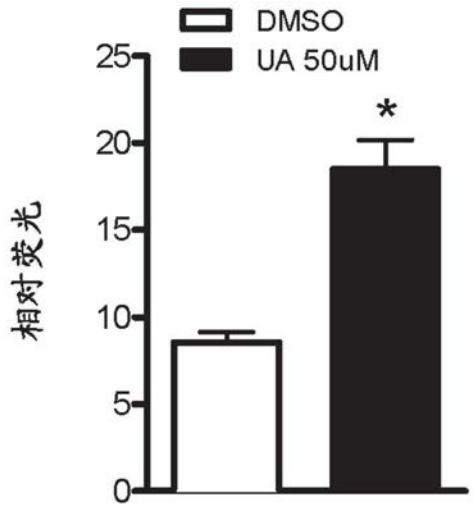

DMSO
UA 50uM
相对荧光
25
20
15
10
5
0
*

图26

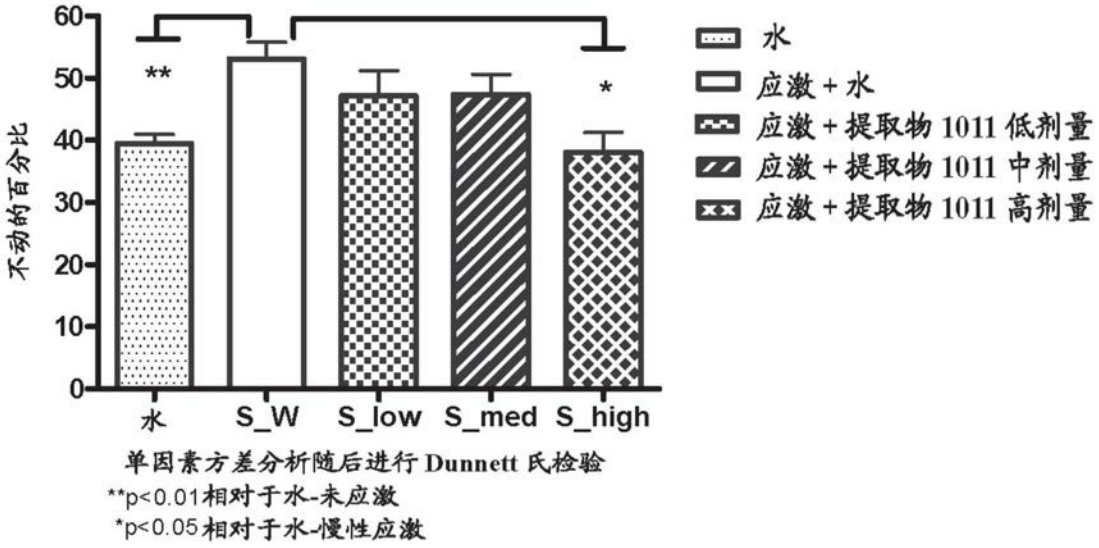

不动的百分比
60
50
40
30
20
10
0
**
*
水
S_W
S_low
S_med
S_high
水
应激+水
应激+提取物 1011 低剂量
应激+提取物 1011 中剂量
应激+提取物 1011 高剂量
单因素方差分析随后进行 Dunnett 氏检验
**p<0.01相对于水-未应激
*p<0.05相对于水-慢性应激

图27

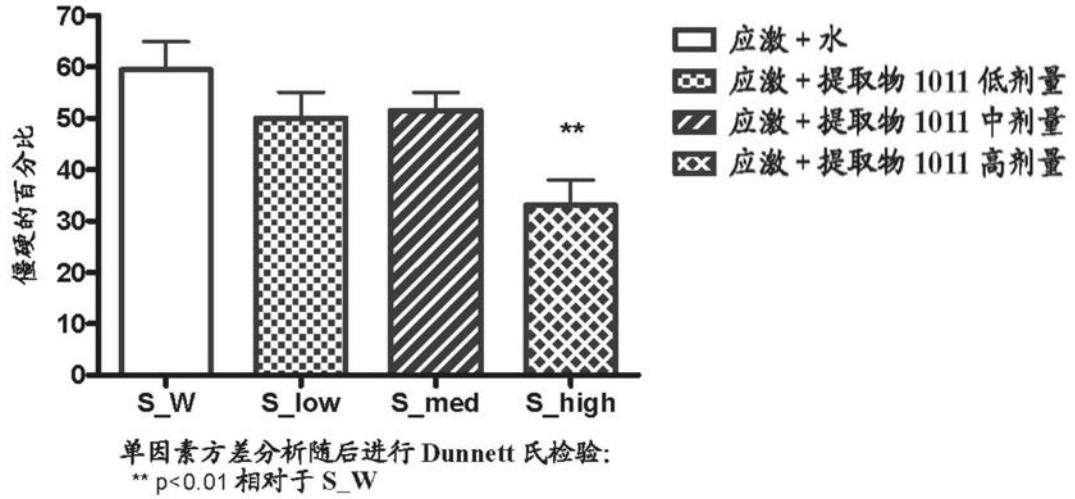

僵硬的百分比
70
60
50
40
30
20
10
0
S_W
S_low
S_med
S_high
**
应激 + 水
应激 + 提取物 1011 低剂量
应激 + 提取物 1011 中剂量
应激 + 提取物 1011 高剂量
单因素方差分析随后进行 Dunnett 氏检验:
** p<0.01 相对于 S_W

图28

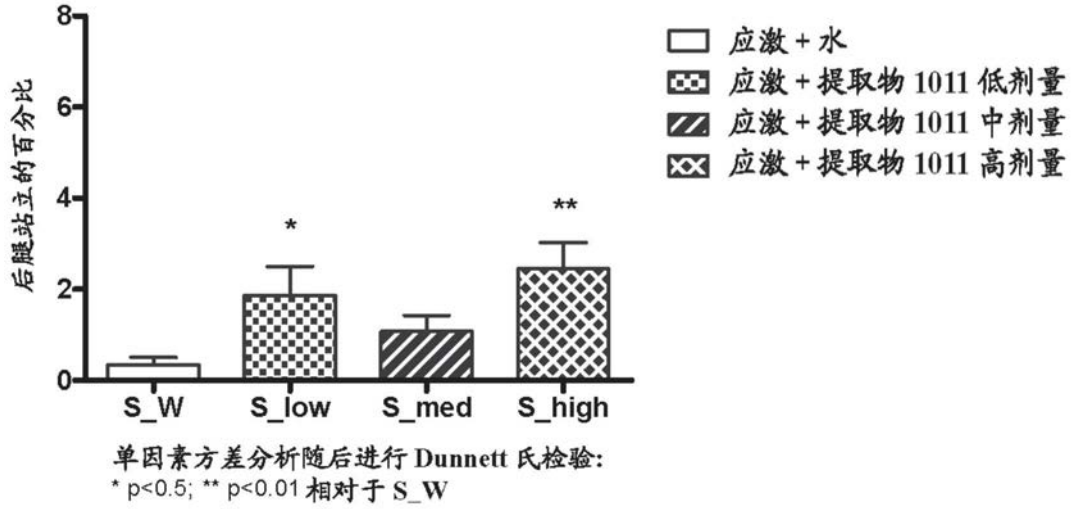

后腿站立的百分比
8
6
4
2
0
S_W
S_low
S_med
S_high
*
**
应激 + 水
应激 + 提取物 1011 低剂量
应激 + 提取物 1011 中剂量
应激 + 提取物 1011 高剂量
单因素方差分析随后进行 Dunnett 氏检验:
* p<0.5; ** p<0.01 相对于 S_W

图29

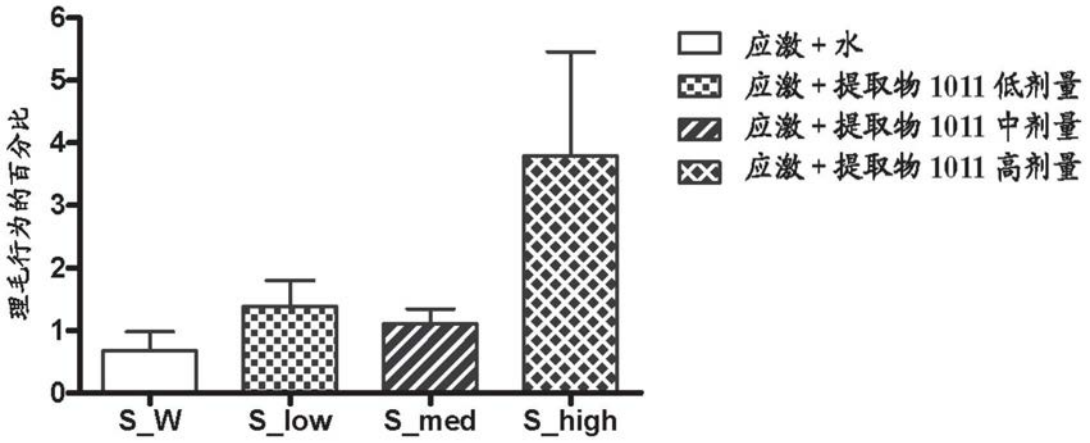

理毛行为的百分比
0
1
2
3
4
5
6
S_W
S_low
S_med
S_high
应激+水
应激+提取物1011低剂量
应激+提取物1011中剂量
应激+提取物1011高剂量

图30

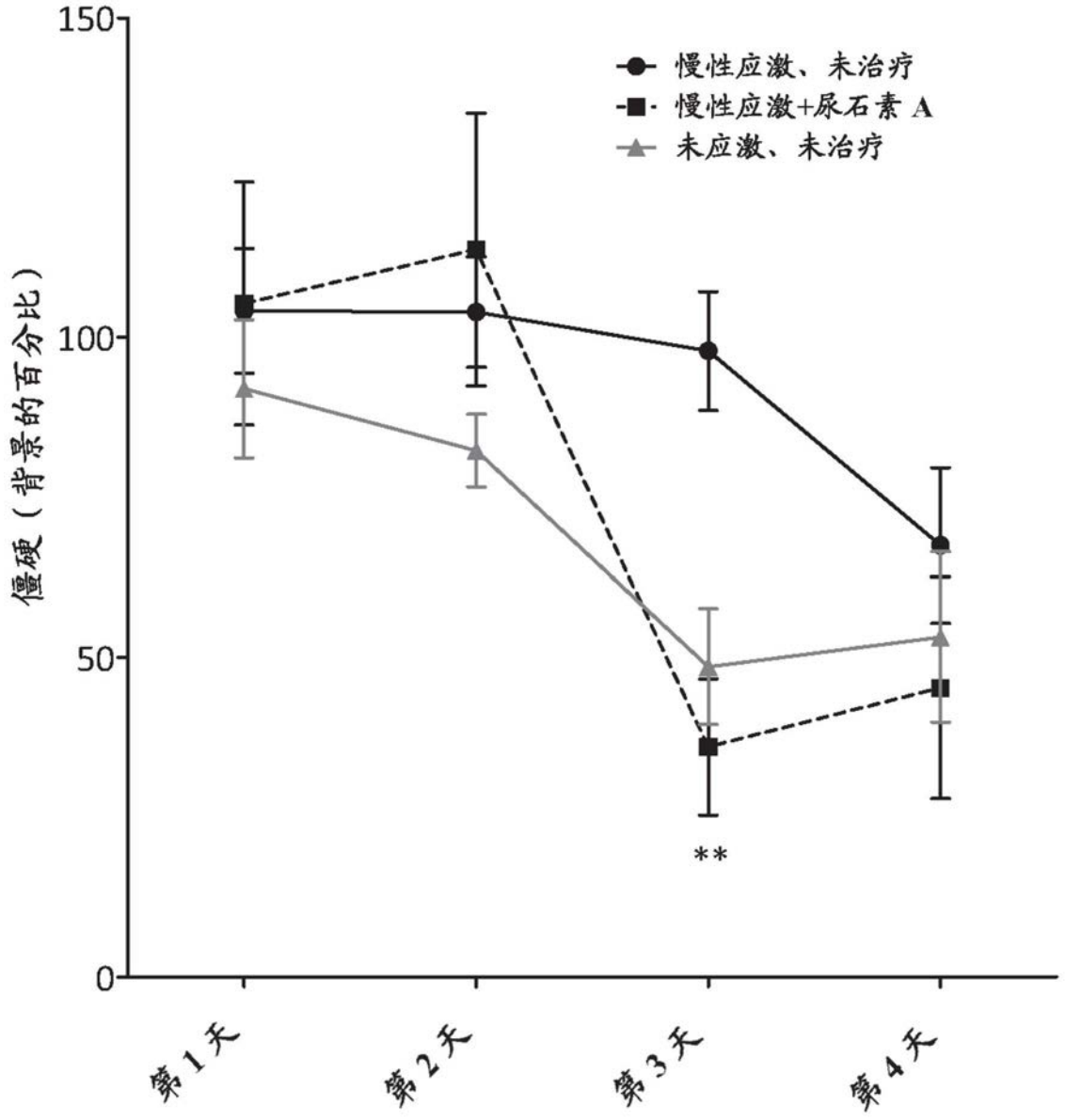

150
100
50
0
僵硬（背景的百分比）
慢性应激、未治疗
慢性应激+尿石素 A
未应激、未治疗
**
第1天
第2天
第3天
第4天

图31

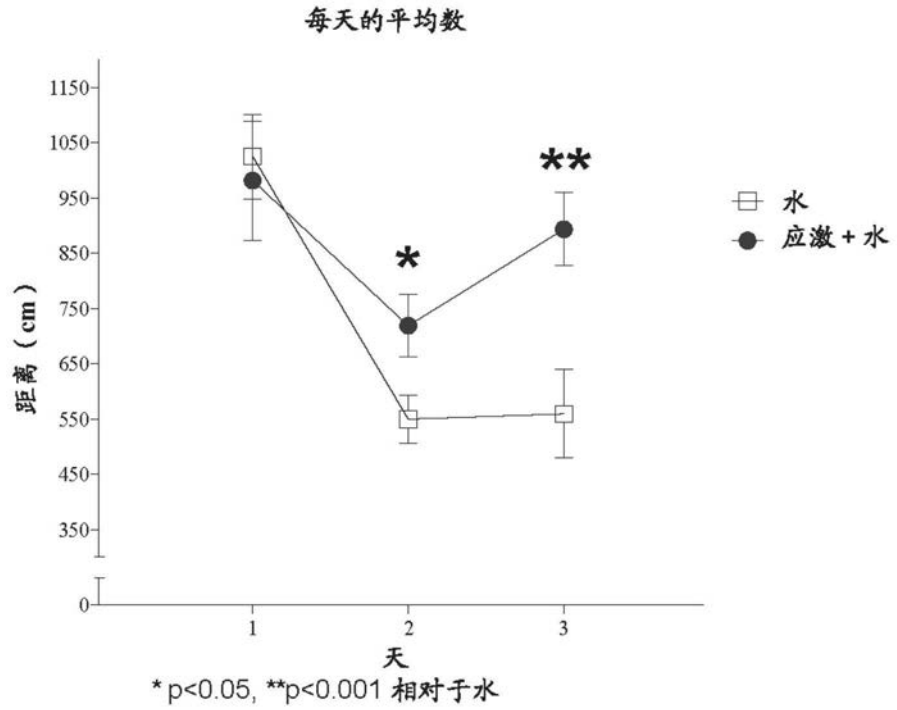

每天的平均数
1150
1050
950
850
750
650
550
450
350
0
距离（cm）
1
2
3
天
*
**
水
应激＋水
* p<0.05, **p<0.001 相对于水

图32

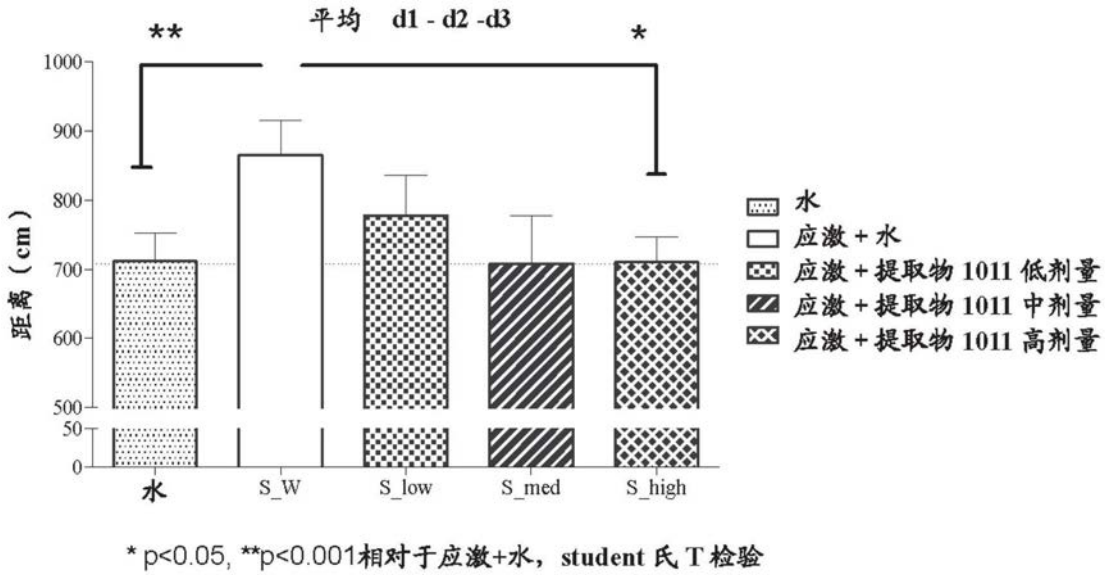

平均 d1 - d2 -d3
**
*
1000
900
800
700
600
500
50
0
距离（cm）
水
S_W
S_low
S_med
S_high
水
应激＋水
应激＋提取物 1011 低剂量
应激＋提取物 1011 中剂量
应激＋提取物 1011 高剂量
* p<0.05, **p<0.001相对于应激+水，student 氏 T 检验

图33

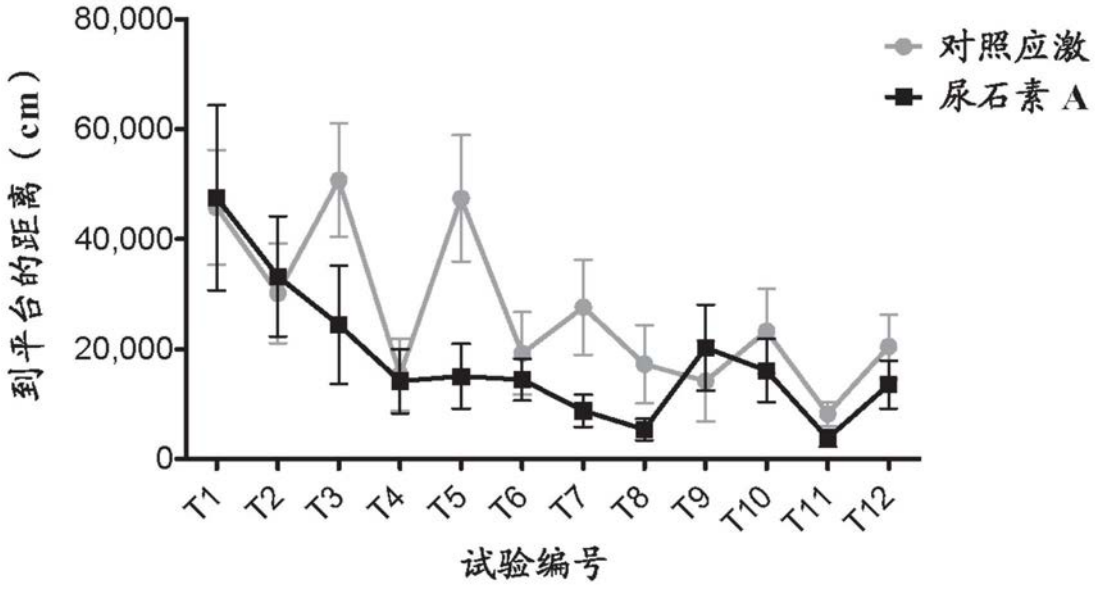

80,000
60,000
40,000
20,000
0
到平台的距离（cm）
对照应激
尿石素 A
T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
试验编号

图34

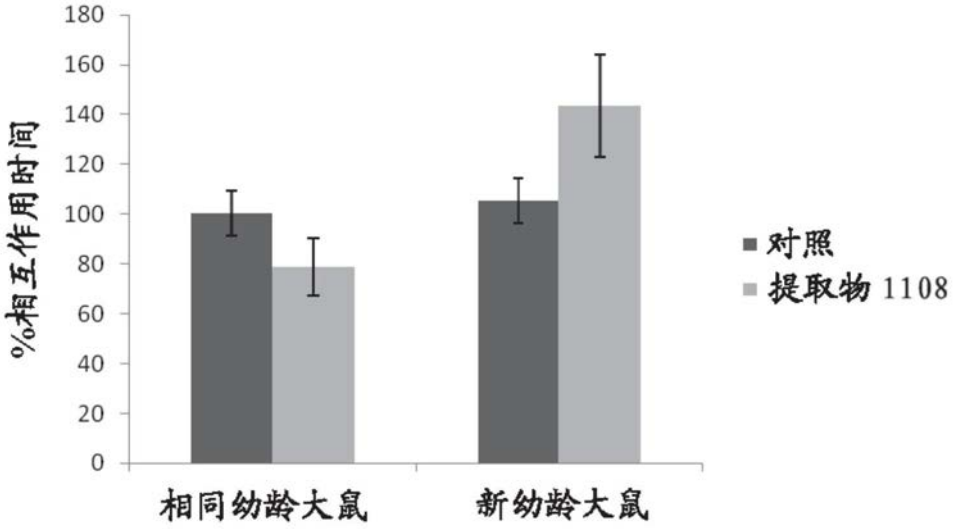

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
%相互作用时间
对照
提取物 1108
相同幼龄大鼠
新幼龄大鼠

图35

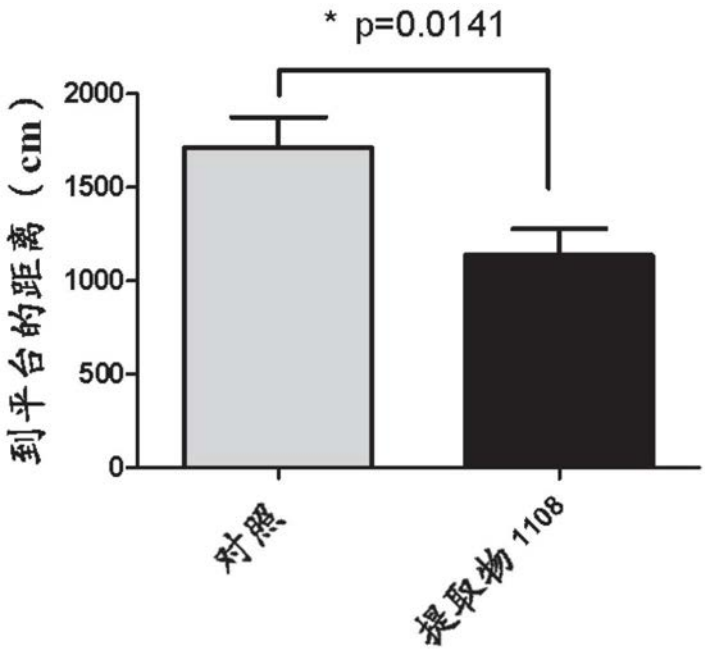


图36

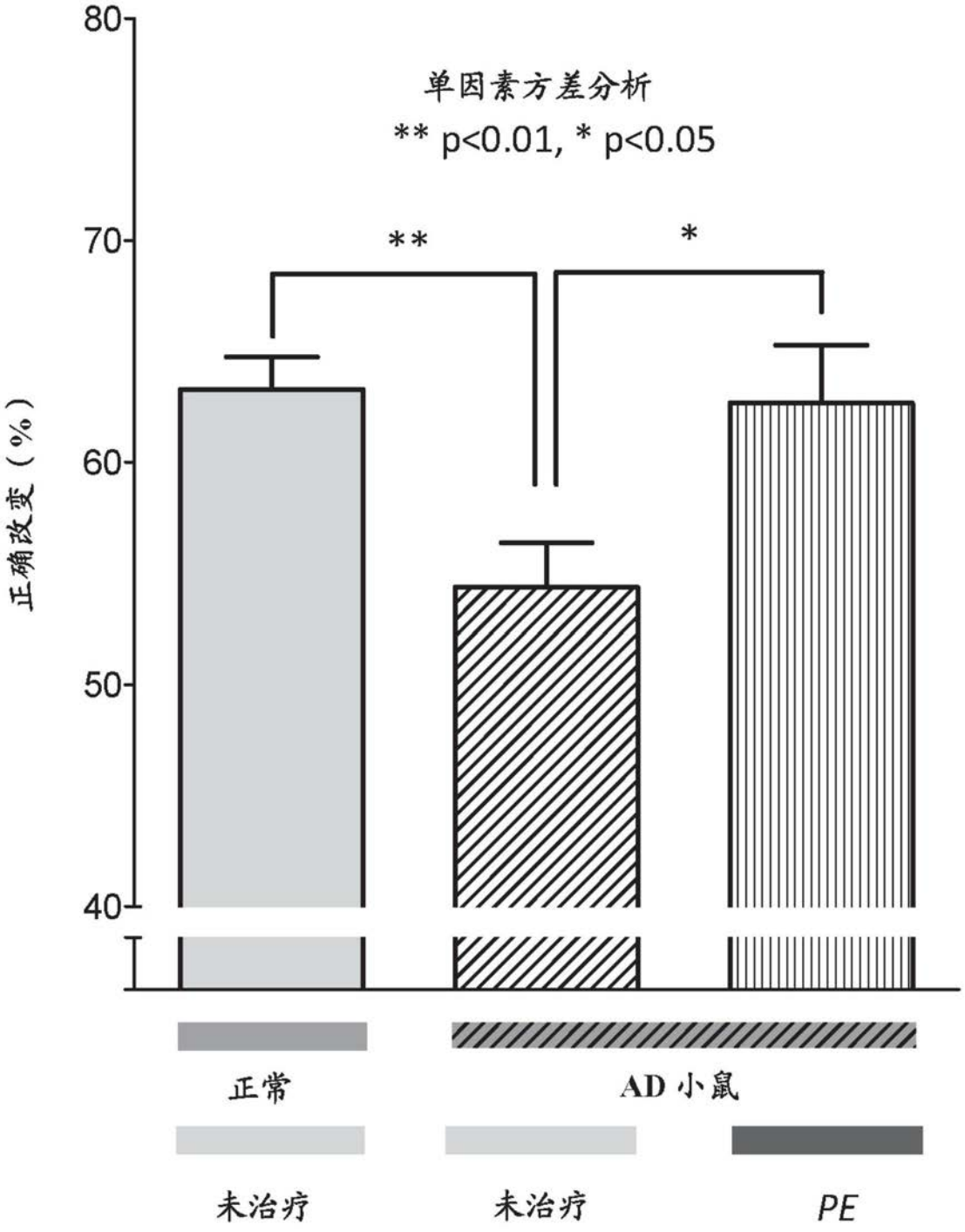


图37

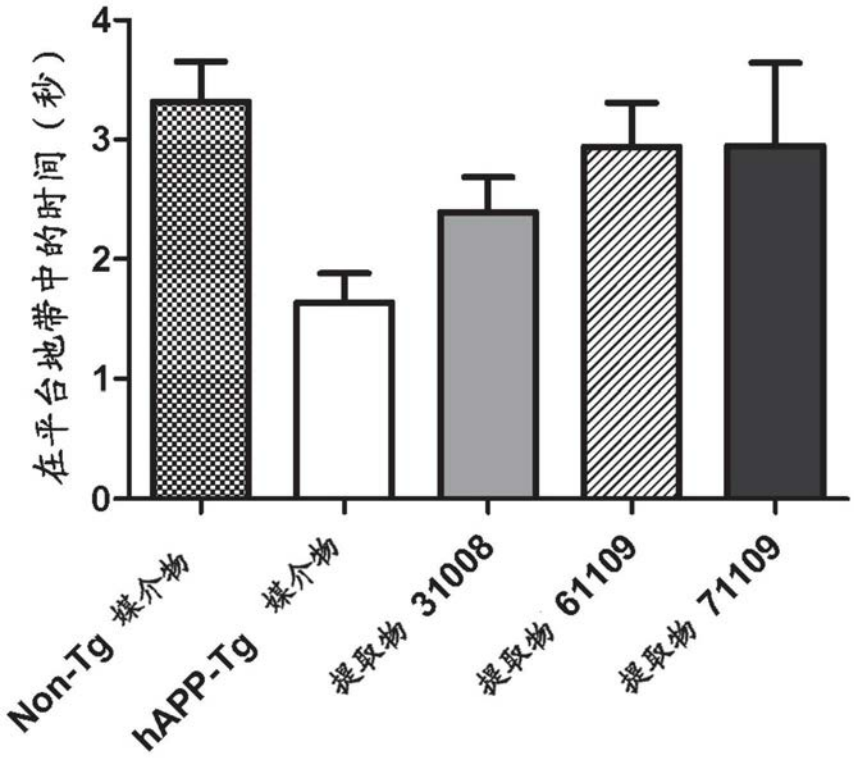

在平台地带中的时间（秒）
4
3
2
1
0
Non-Tg 媒介物
hAPP-Tg 媒介物
提取物 31008
提取物 61109
提取物 71109

图38

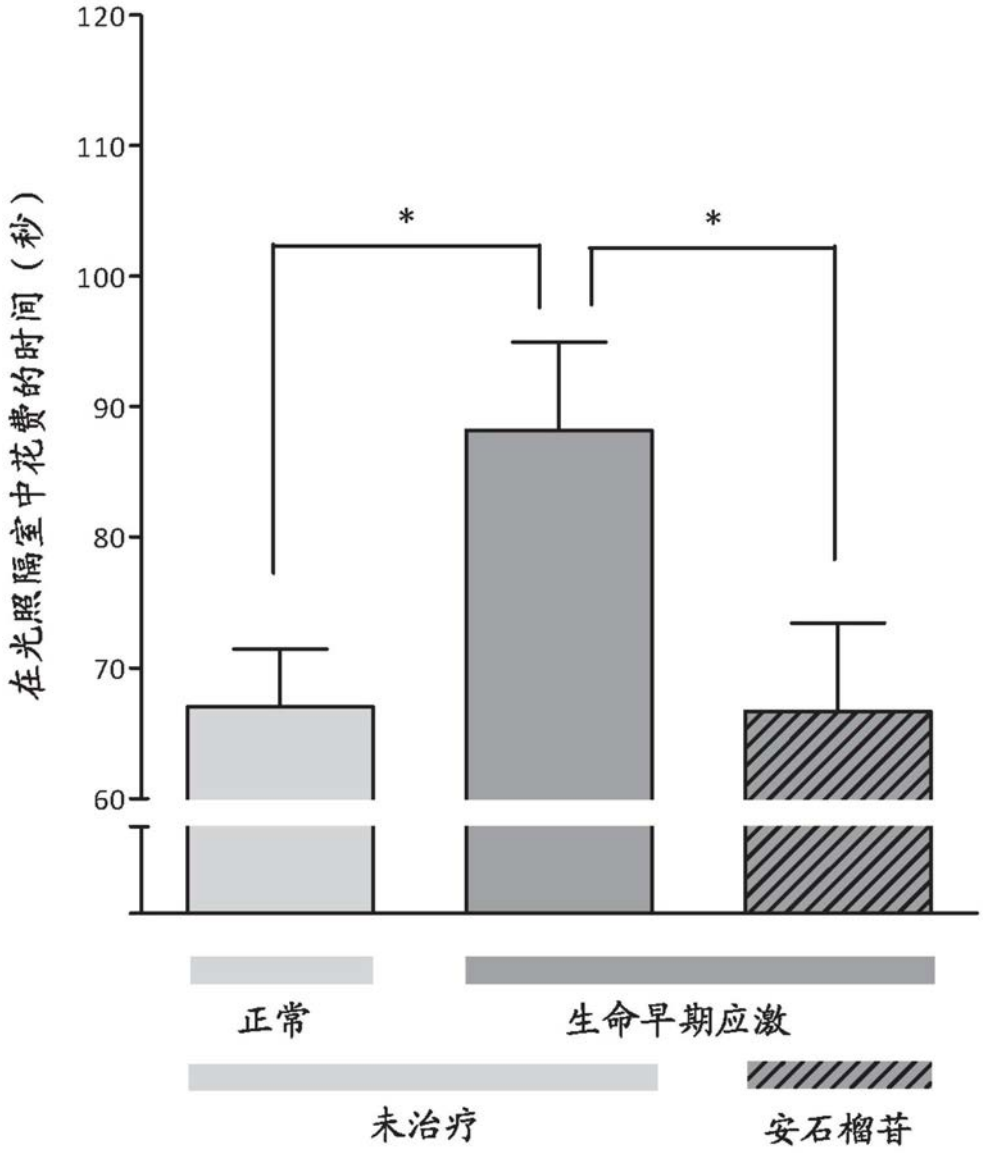


图39

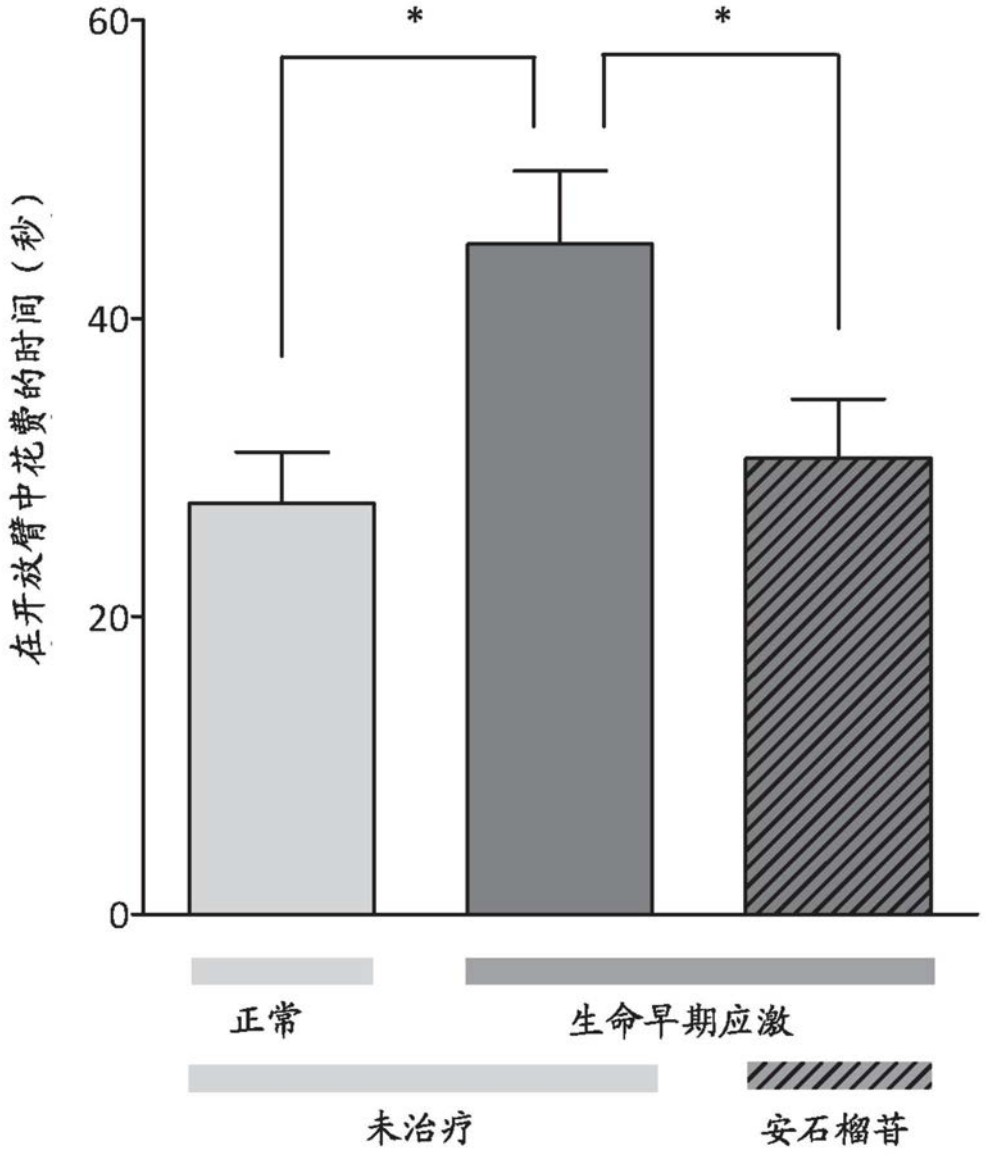


图40

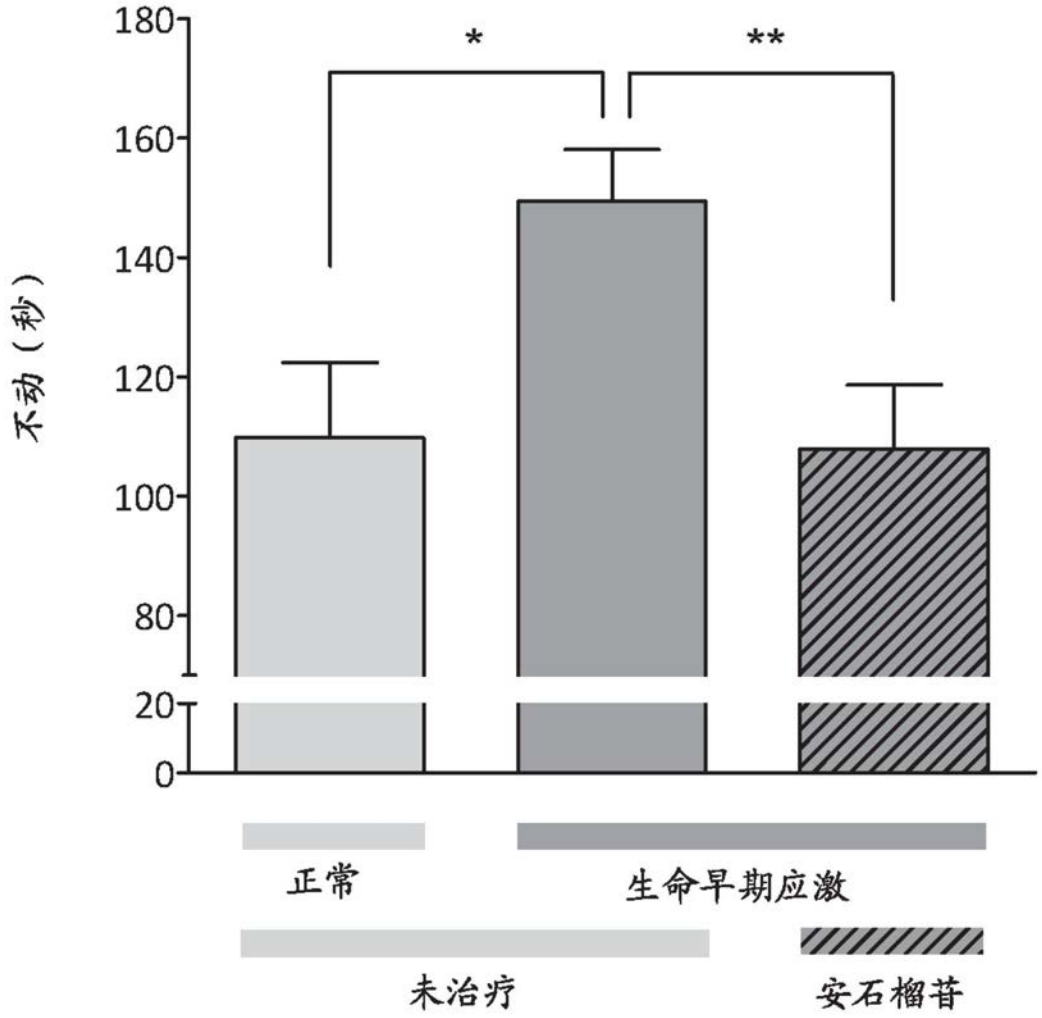


图41

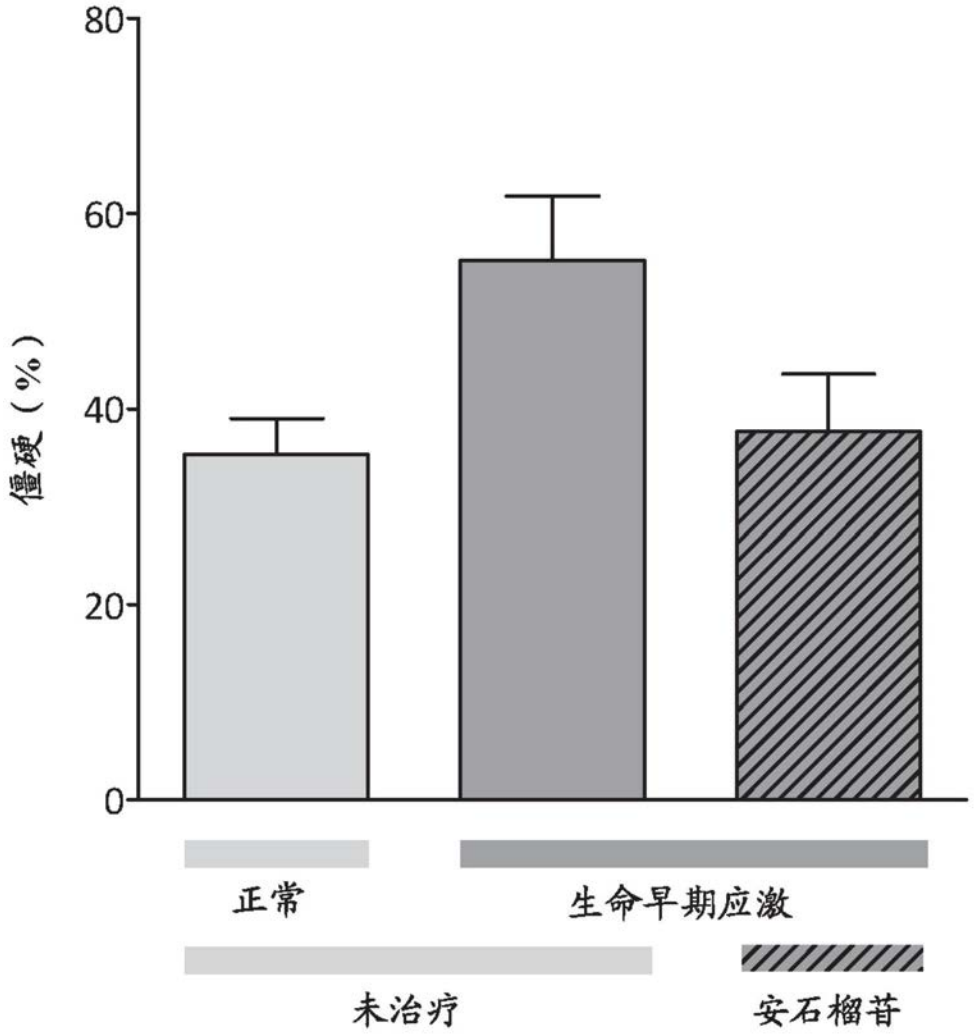


图42

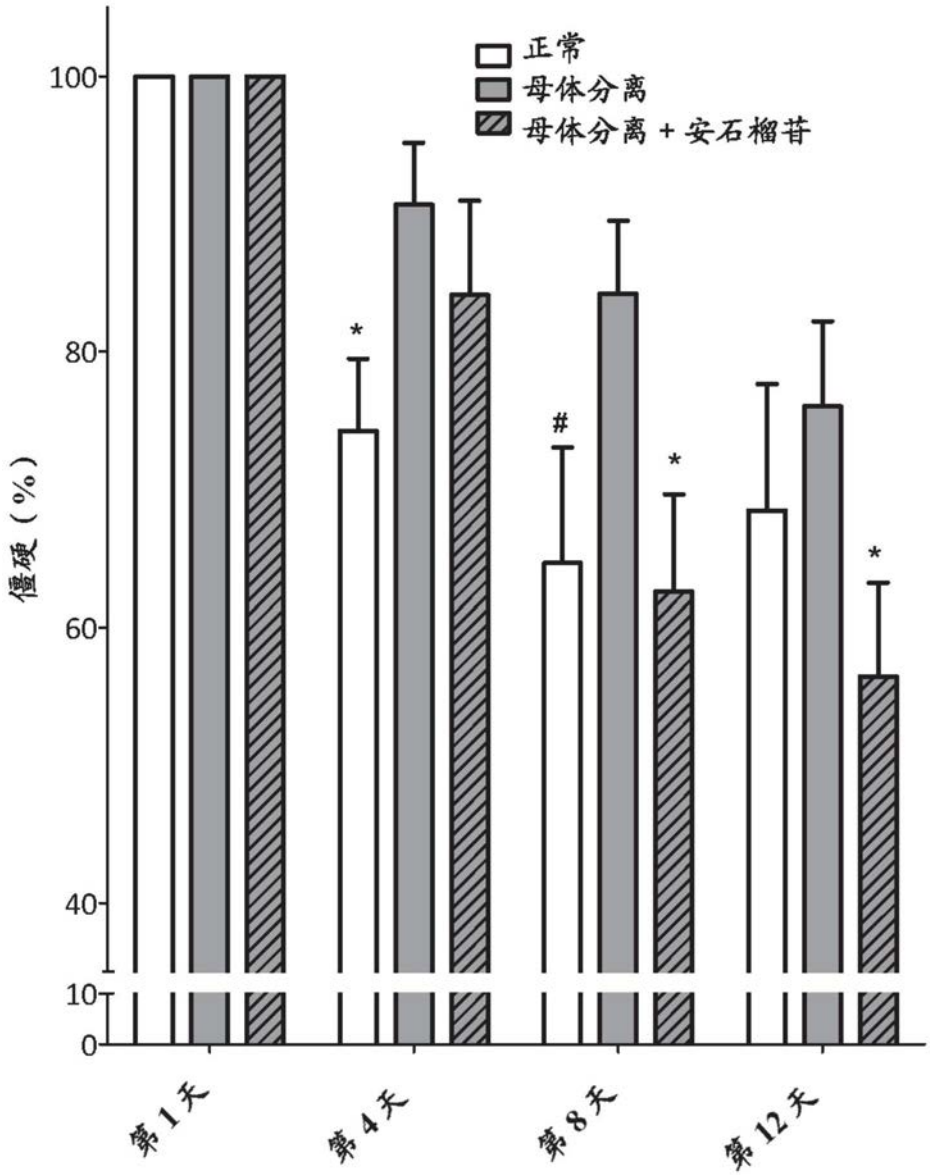


图43

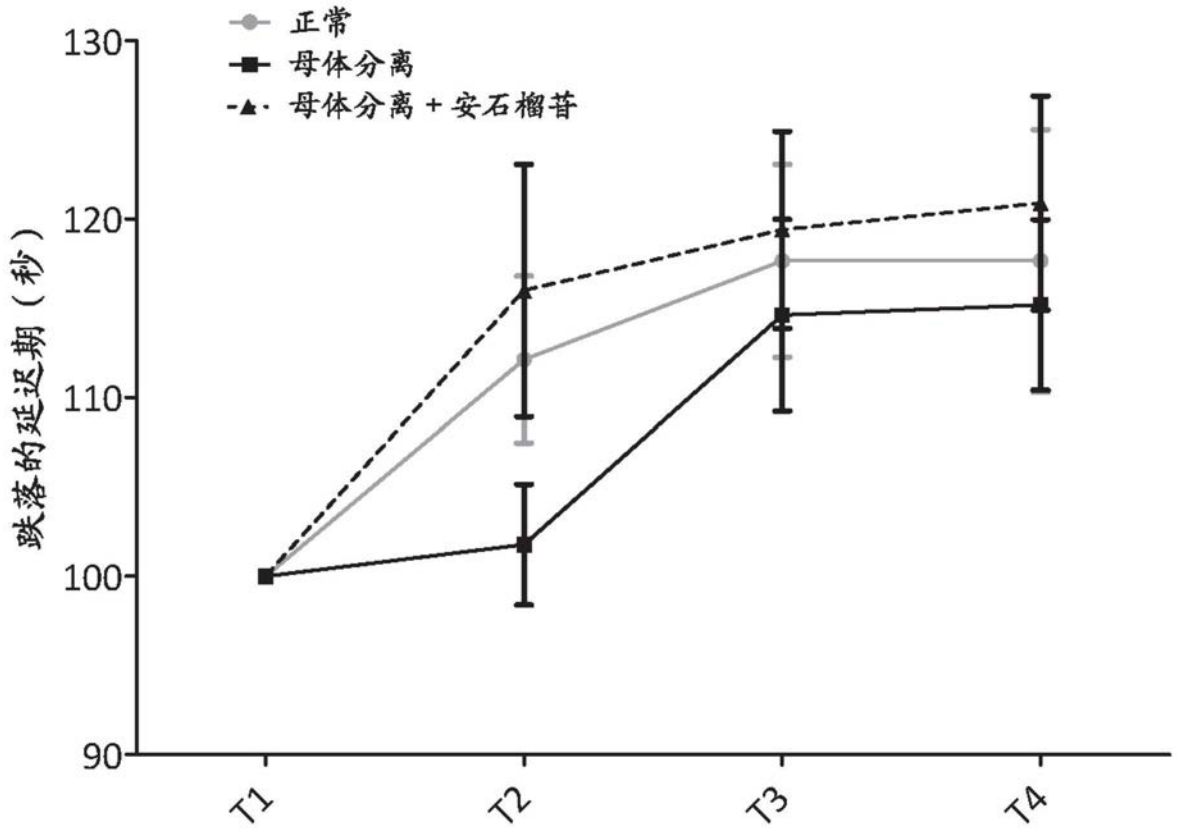


图44

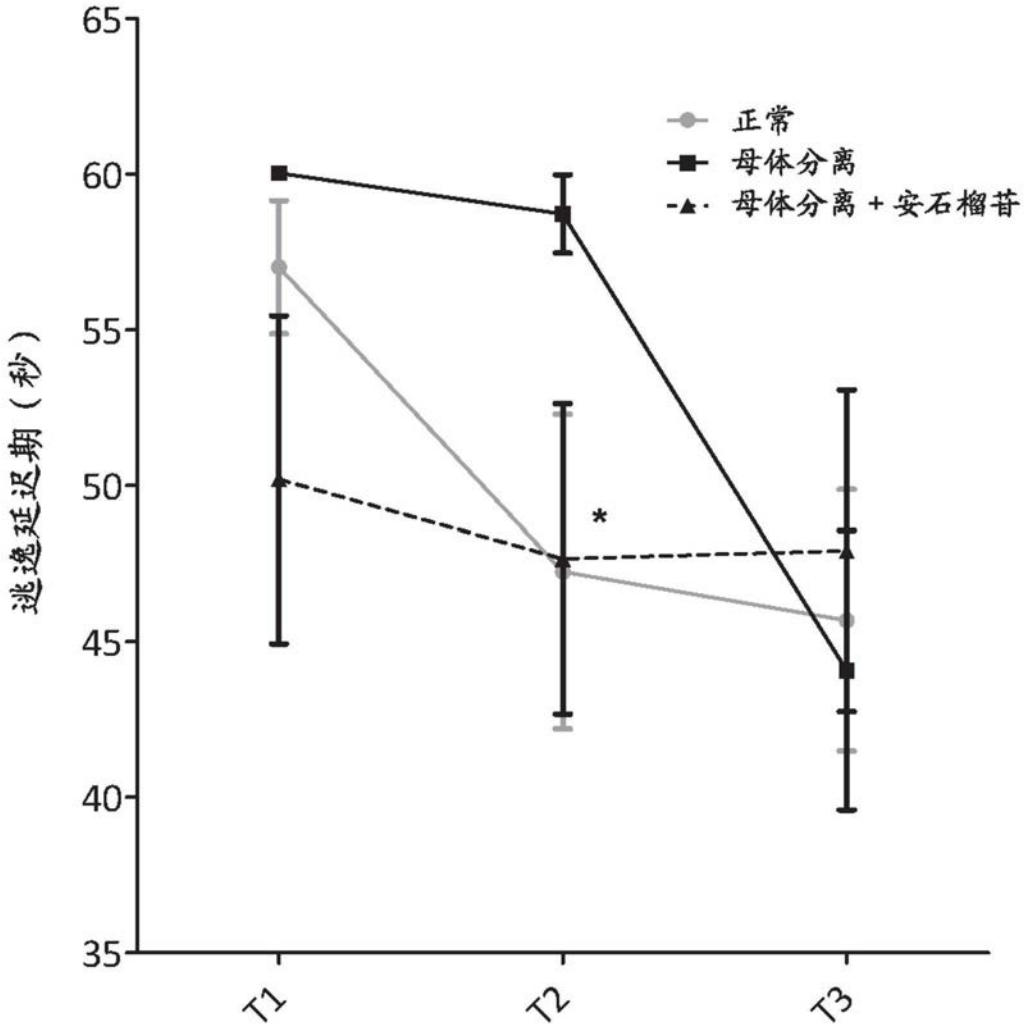


图45

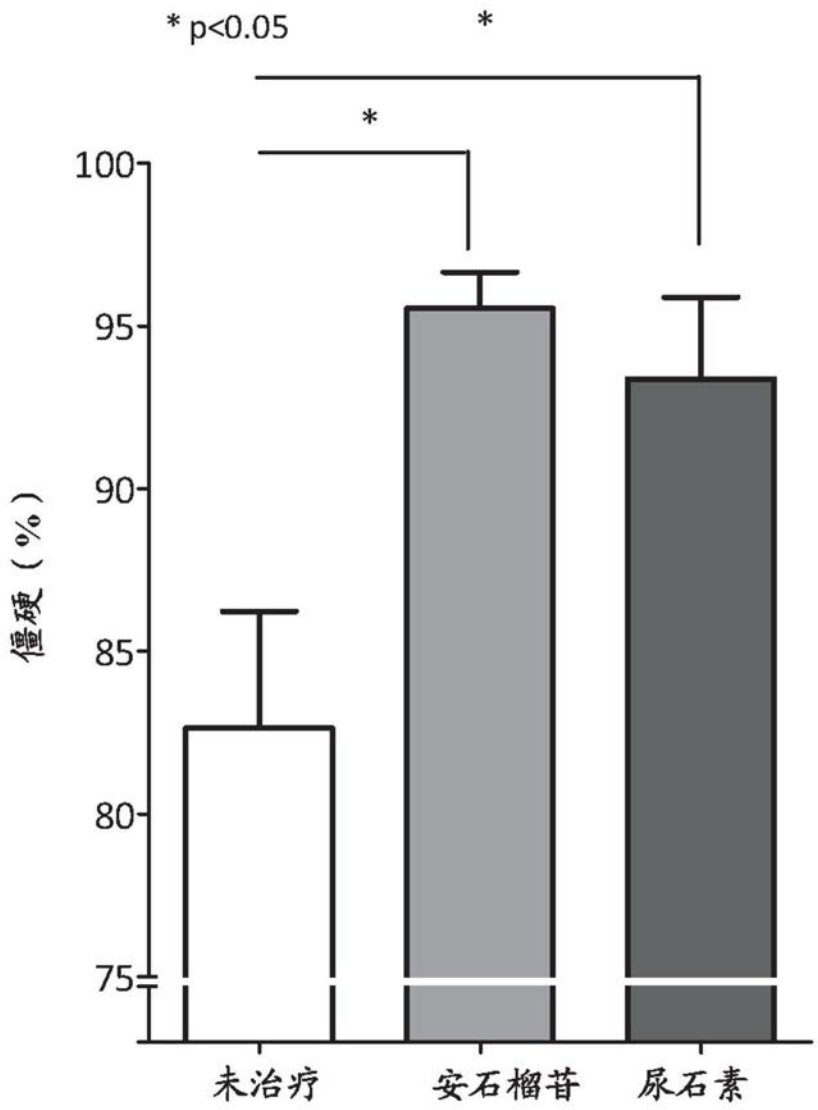


图46

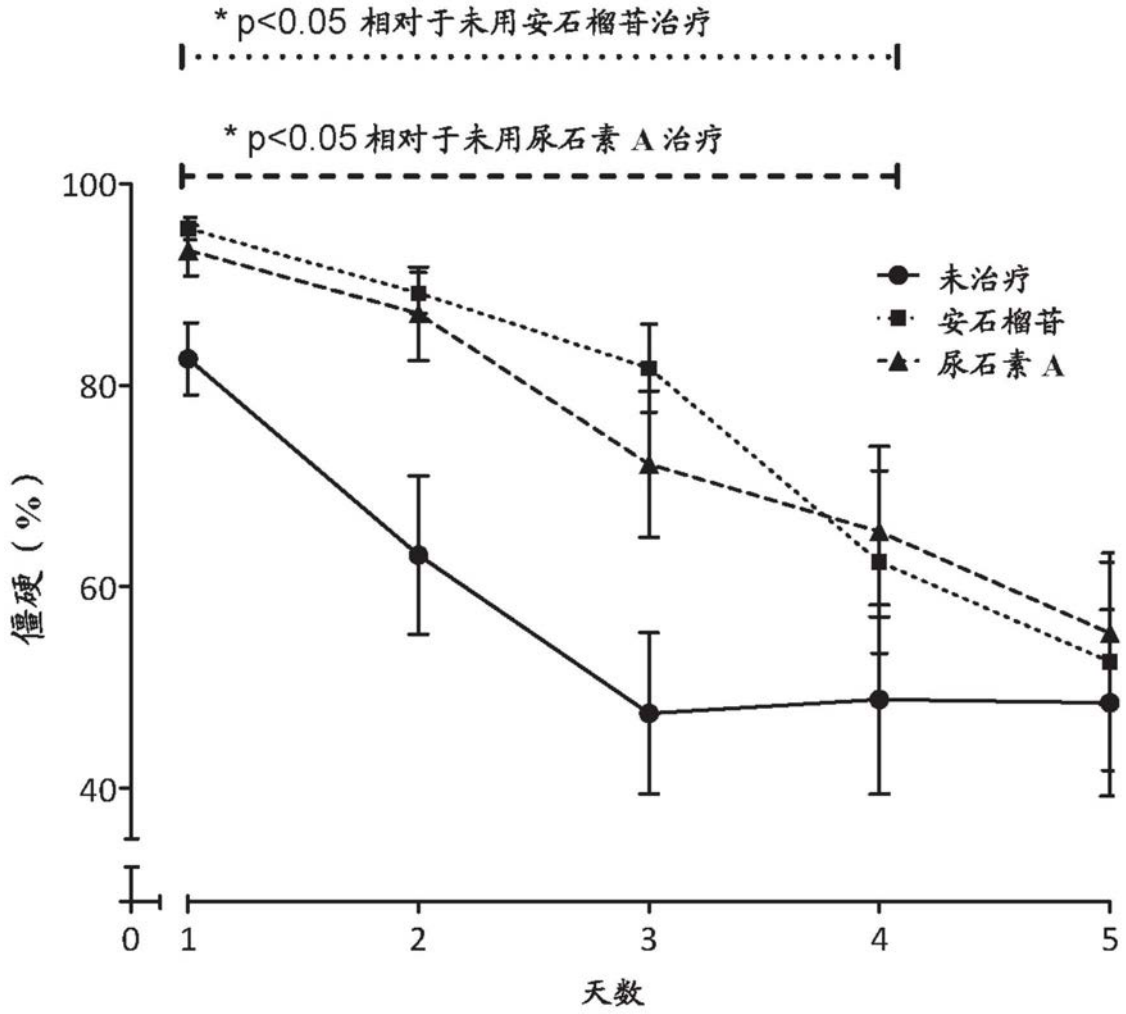

* p<0.05 相对于未用安石榴苷治疗
* p<0.05 相对于未用尿石素 A 治疗
100
80
60
40
僵硬（%）
0
1
2
3
4
5
天数
未治疗
安石榴苷
尿石素 A

图47

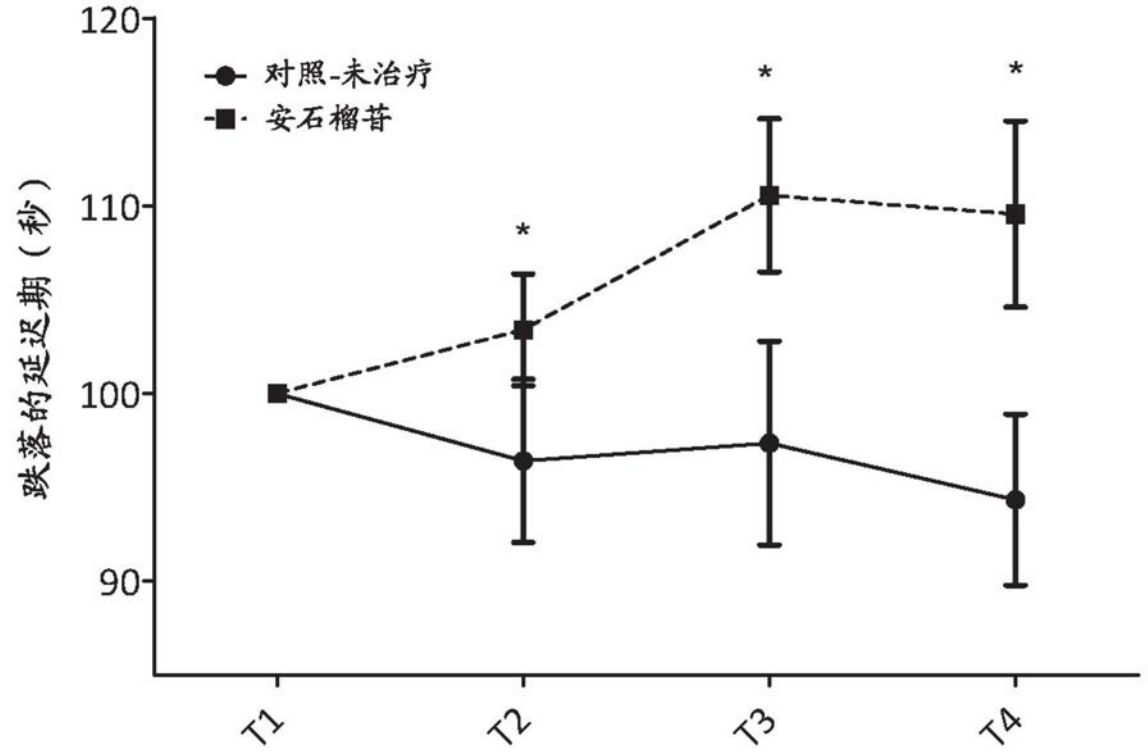

120
110
100
90
跌落的延迟期（秒）
对照-未治疗
安石榴苷
*
*
*
T1
T2
T3
T4

图48

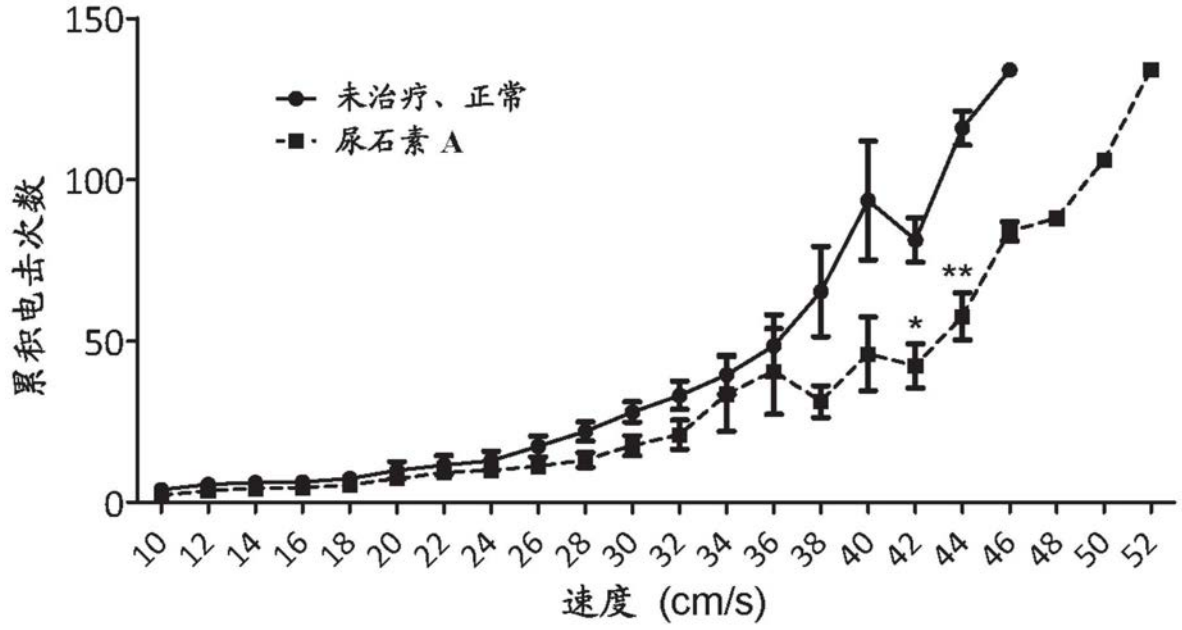

150
100
50
0
累积电击次数
未治疗、正常
尿石素 A
*
**
10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52
速度 (cm/s)

图49