

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 36/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480005208.7

[43] 公开日 2006年3月29日

[11] 公开号 CN 1753681A

[22] 申请日 2004.2.24

[21] 申请号 200480005208.7

[30] 优先权

[32] 2003.2.26 [33] US [31] 60/450,922

[86] 国际申请 PCT/US2004/005353 2004.2.24

[87] 国际公布 WO2004/075844 英 2004.9.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.26

[71] 申请人 尤尼根制药公司

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 布鲁斯·P·伯内特 贾琦

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 10 页 说明书 41 页 附图 15 页

[54] 发明名称

用于预防及治疗由糖诱导的疾病和病症的组合物

[57] 摘要

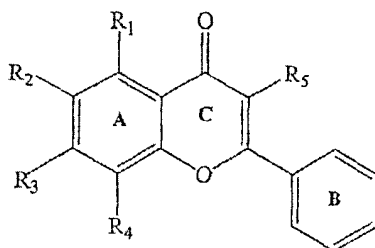
本发明提供抑制由果糖和葡萄糖引起的脂肪生成导致的糖诱导的体重增加的新方法。抑制糖诱导的体重增加的方法包括向需要的主体给药含有合成和/或分离自一种或多种植物、优选为黄芩及金合欢属植物的无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物的组合物。本发明还包括预防和治疗由高糖摄入导致的疾病和病症的新方法。预防和治疗这些由糖诱导的疾病和病症的方法包括向需要的主体给药治疗有效量的含有合成和/或分离自一种或多种植物、优选黄芩及金合欢属植物的无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物及药理学可接受的载体的组合物。

1. 一种抑制糖诱导的体重增加的方法，其包括向有此需要的主体给药包含有效量的含有至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物的组合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中在所述组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自 99.9: 0.1 无取代 B 环类黄酮: 黄烷到 0.1: 99.9 无取代 B 环类黄酮: 黄烷的范围。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中组合物中无取代 B 环类黄酮: 黄烷的比例为约 80: 20。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

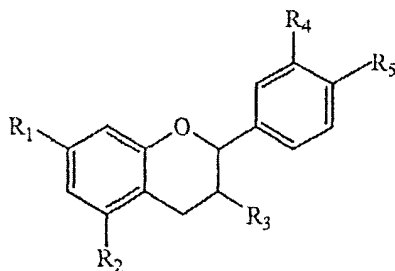
R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药理学可接受的抗衡阴离子组中，其包括羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子和碳酸根。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述黄烷选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，独立地选自以下组中的所述取代基的酯：没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药理学可接受的抗衡阴离子组中，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷为通过有机合成或自植物中分离得到的。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷分离自选自以下组的植物部位：茎、茎皮、干、主干树皮、嫩枝、块

茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。

8. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下科的植物中：番荔枝科、菊科、紫葳科、使君子科、菊科、大戟科、唇形科、樟科、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下属的植物中：假鹰爪属、*Achyrocline*、木蝴蝶属、*Buchenavia*、香青属、山芫荽属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、*Baccharis*、乌柏属、黄芩属、*Molsa*、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

10. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述黄烷分离自选自以下组的植物物种中：儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holosericea* 和马占相思。

11. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮分离自黄芩属植物中的一种或多种植物，而所述黄烷分离自金合欢属植物中的一种或多种植物。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其中该组合物以 0.01 到 200mg/kg 体重

的日剂量给药。

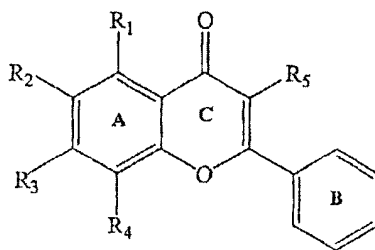
13.如权利要求 1 所述的方法，其中给药途径选自以下组中：口服、局部、栓剂、静脉内、以及皮内、胃内、肌肉内、腹膜内和静脉内给药。

14.一种预防和治疗糖诱导的疾病和病症的方法，其包括向有此需要的主体给药有效量的含有至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物的组合物。

15.如权利要求 14 所述的方法，其中所述组合物中的无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自 99.9: 0.1 无取代 B 环类黄酮：黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮：黄烷的范围。

16.如权利要求 15 所述的方法，其中所述组合物中的无取代 B 环类黄酮与黄烷的比约为 80: 20。

17.如权利要求 14 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们

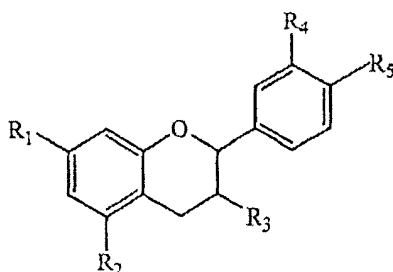
的化学衍生物；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，其包括羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根。

18.如权利要求 14 所述的方法，其中所述黄烷选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，独立地选自以下组中的所述取代基的酯：没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根。

19.如权利要求 14 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷为通过有机合成或自植物中分离得到的。

20.如权利要求 19 所述的方法,其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷分离自选自以下组的植物部位:茎、茎皮、干、主干树皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。

21.如权利要求 19 所述的方法,其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下科的植物中:番荔枝科、菊科、紫葳科、使君子科、菊科、大戟科、唇形科、樟科、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。

22.如权利要求 19 所述的方法,其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下属的植物中:假鹰爪属、*Achyrocline*、木蝴蝶属、*Buchenavia*、香青属、山芫荽属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、*Baccharis*、乌柏属、黄芩属、*Molsa*、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

23.如权利要求 19 所述的方法,其中所述黄烷分离自选自以下组的植物物种中:儿茶、*Acacia concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*Acacia speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holosericea* 和马占相思。

24.如权利要求 19 所述的方法,其中所述无取代 B 环类黄酮分离自黄芩属植物中的一种或多种植物,而所述黄烷分离自金合欢属植物中的一

种或多种植物。

25.如权利要求 14 所述的方法，其中所述组合物以选自 0.01 到 200mg/kg 体重的日剂量给药。

26.如权利要求 14 所述的方法，其中给药途径选自以下组中：口服、局部、栓剂、静脉内、以及皮内、胃内、肌肉内、腹膜内和静脉内给药。

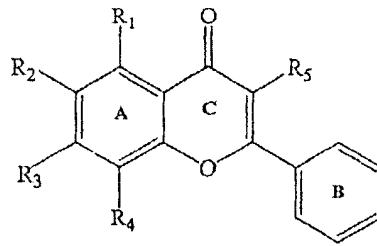
27.如权利要求 14 所述的方法，其中糖诱导的疾病或病症选自以下组中：由肥胖症和糖尿病及高血压引起的高脂血症、高胆固醇、动脉硬化、动脉粥样硬化、X 染色体综合征及全身性炎症。

28.一种抑制糖诱导的肥胖症的方法，所述方法包括向有此需要的主体给药有效量的含有至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物的组合物。

29.如权利要求 28 所述的方法，其中在所述组合物中的无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自 99.9：0.1 无取代 B 环类黄酮：黄烷到 0.1：99.9 无取代 B 环类黄酮：黄烷的范围。

30.如权利要求 29 所述的方法，其中组合物中无取代 B 环类黄酮：黄烷的比例为约 80：20。

31.如权利要求 28 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

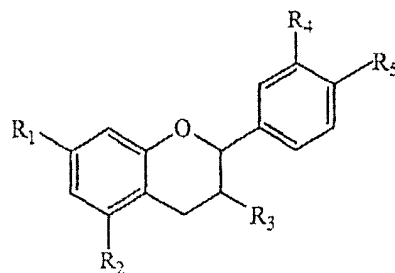
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中： $-H$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3^+X^-$ ，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；

其中

R 是具有1-10个碳原子的烷基；以及

X 选自药理学可接受的抗衡阴离子组中，其包括羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根。

32.如权利要求28所述的方法，其中所述黄烷选自具有下列结构的化合物的组中：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中： $-H$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-SCH_3$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NRH$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3^+X^-$ ，独立地选自以下组中的所述取代基的酯：没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的

化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药理学可接受的抗衡阴离子组中，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根。

33.如权利要求 28 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷为通过有机合成或自植物中分离得到的。

34.如权利要求 33 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷分离自选自以下组的植物部位：茎、茎皮、干、主干树皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。

35.如权利要求 33 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下科的植物中：番荔枝科、菊科、紫葳科、使君子科、菊科、大戟科、唇形科、樟科、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。

36.如权利要求 33 所述的方法，其中所述无取代 B 环类黄酮分离自选自以下属的植物中：假鹰爪属、*Achyrocline*、木蝴蝶属、*Buchenavia*、香青属、山茱萸属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、*Baccharis*、乌柏属、黄芩属、*Molsa*、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

37.如权利要求 33 所述的方法,其中所述黄烷分离自选自以下组的植物物种中:儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holoserecia* 和马占相思。

38.如权利要求 33 所述的方法,其中所述无取代 B 环类黄酮分离自黄芩属植物中的一种或多种植物,而所述黄烷分离自金合欢属植物中的一种或多种植物。

39.如权利要求 28 所述的方法,其中该组合物以选自 0.01 到 200mg/kg 体重的日剂量给药。

40.如权利要求 28 所述的方法,其中给药途径选自以下组中:口服、局部、栓剂、静脉内、以及皮内、胃内、肌肉内、腹膜内和静脉内给药。

41.一种抑制果糖-1-磷酸醛缩酶的方法,所述方法包括向有此需要的主体给药有效量的含有至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物的组合物。

42.一种使转录因子 NF κ B 基因组地减少并从而降低 TNF α 和 IL-6 水平的方法,所述方法包括向有此需要的主体给药有效量的含有至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物的组合物。

用于预防及治疗由糖诱导的疾病和病症的组合物

技术领域

本发明总体而言涉及经配制用于预防及治疗由高糖摄取引起的疾病和病症的组合物。更具体而言，本发明涉及含有两种特定类型的化合物——无取代的 B 环类黄酮和黄烷——相混合得到的混合物的新型组合物，其用于预防及治疗体重增加和肥胖症以及其他由高糖摄取引起的疾病和病症。该疾病和病症包括但不限于由肥胖症和糖尿病引起的高脂血症、高胆固醇、动脉硬化、动脉粥样硬化、X 染色体综合征（代谢综合征）、高血压及全身炎症。

背景技术

能量由从“食物”中生成的 ATP 产生。更具体而言，当食物被消耗时被分解为其组成部分，主要由简单及复合糖、脂肪、蛋白质和不能被消化的纤维如纤维素组成。然后，这些糖、脂肪和蛋白质被进一步分解成其基本单位：糖被分解为单糖、蛋白质被分解为氨基酸而脂肪被分解为脂肪酸和甘油。接着身体应用这些基本单位产生其生长、维持以及生成能量所需的物质。糖、蛋白质及脂肪都可经代谢以提供 ATP 形式的能量，然而，糖是身体通过糖酵解及三羧酸循环生成 ATP 的主要底物。

根据分子的大小，糖类被分为为简单糖或复合糖。简单糖是小分子化合物，特别是如葡萄糖、果糖、半乳糖及蔗糖的单糖和二糖。复合糖或多糖由简单糖的长链构成。最重要的多糖为淀粉、糖原及纤维素，它们都是仅葡萄糖分子连接方式相异的葡萄糖聚合物。糖原是动物的能量库（energy reservoir），淀粉是植物的能量库，而纤维素是植物的主要结

构成分。尽管大多数形式的淀粉都是可消化的，但人类却缺乏消化纤维素必需的酶，因此淀粉成为我们的食物性纤维（dietary fiber）。

人类食用的糖中超过半数传统地来自如面包和谷类的淀粉来源中。淀粉是直链淀粉和支链淀粉的混合物。直链淀粉是由以 α -1, 4 键共价地结合的葡萄糖分子组成的线型多糖。支链淀粉是由以约每三十个 α -1, 4 键一个 α -1, 6 键共价地结合的葡萄糖分子组成的支链多糖。淀粉可被由唾液腺和胰脏分泌的 α -淀粉酶迅速水解。水解时，直链淀粉被分解成小的直链的寡糖，如麦芽糖（ α -1, 4 键合的两个葡萄糖分子）和麦芽三糖（ α -1, 4 键合的三个葡萄糖分子）。支链淀粉分解成小的直链寡糖以及支链寡糖 α -糊精（若干以 α -1, 4 键及 α -1, 6 键连接的葡萄糖分子）。这些糖由麦芽糖酶和 β -淀粉酶进一步分解成葡萄糖单体。

我们膳食中消耗的其它糖是简单糖，如单糖葡萄糖及果糖和二糖蔗糖。葡萄糖在多数天然食物中以低水平存在，而果糖主要自加工食品、甜味剂以及在较小程度上可自水果和某些蔬菜中获得。果糖可由右旋葡萄糖的酶促异构化而合成（Bhosale 等，(1996) *Microbiol. Rev.* 60:280-300）。另一众所周知的甜味剂蔗糖由葡萄糖 C1 和果糖 C2 间的 α -1, 2 键连接的葡萄糖和果糖组成。蔗糖由肠粘膜内的蔗糖酶水解得到葡萄糖和果糖（Dahlqvist (1972) *Acta Med. Scand. Suppl.* 542:13-18）。

胰岛素是由胰脏 β 细胞分泌的激素，其使身体能够应用葡萄糖产生能量。激素胰岛素关键的代谢作用之一是通过促进葡萄糖被摄入至脂肪和肌肉细胞而控制血糖水平。简而言之，当葡萄糖被胰岛素刺激进入细胞时，聚集在特别是肌肉及脂肪细胞的细胞表面的 GLUT4 葡萄糖转运蛋白被增量调节（Furtado 等，(2002) *Biochem. Cell. Biol.* 80:569-578）。然后细胞表面水平升高的 GLUT4 促进葡萄糖更多地从循环被摄入并储存在脂肪和细胞组织内。参考图 1 可见，葡萄糖一经摄取立刻由酶——己糖激酶 D，还称为葡糖激酶——转化成葡萄糖-6-磷酸，即将来自 ATP 的磷酸基添加至葡萄糖的 C₆ 上，从而产生 ADP 和葡萄糖-6-磷酸。然后葡

葡萄糖-6-磷酸转化成果糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸在果糖磷酸激酶的作用下转化成果糖-1, 6-二磷酸，即再由另一 ATP 分子将一个磷酰基添加至 C₁ 上。然后，醛缩酶 B（醛缩酶）将果糖-1, 6-二磷酸转化成二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸，甘油醛-3-磷酸为适宜最后转化成丙酮酸的底物，然后丙酮酸在进入三羧酸循环时被转化成乙酰辅酶 A。其他甘油醛-3-磷酸是通过丙糖磷酸异构酶由二羟丙酮磷酸生成。因此，在糖酵解的过程中，每分子葡萄糖初始消耗两个 ATP，而之后在该过程中生成两个 ATP 以及一分子的 NADH，该分子 NADH 最终转化成三个 ATP 分子的净产物。

当血液里存在的葡萄糖量超过目前能量需求时，其可作为糖原储藏于肝脏和肌肉里，或者其主要在肝脏中转化为甘油三酯并转移至脂肪组织中储藏。脂肪生成包括脂肪酸合成及随后的甘油三酯合成的过程。相反地，当血液葡萄糖水平变低，该过程被逆转并由乙酰辅酶 A 和丙酮酸生成葡萄糖。葡糖异生是指由乙酰辅酶 A 和丙酮酸生成葡萄糖的过程，其本质上为糖酵解的逆过程。与脂肪生成相似，葡糖异生主要发生在肝脏中，且葡糖异生是葡萄糖赖以生成及分泌至血流以供机体细胞所用的方法。

果糖是蔗糖的成分，并是最近二十年来添加至经加工食物的主要的甜味剂和防腐剂（Hanover 和 White (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (Supp.): 724S-732S; Park 和 Yeltley (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (Supp.): 737S-747S），其还可用作身体能量的主要来源，但是其经不同的机制进入糖酵解途径。与葡萄糖不同，果糖无需胰岛素并被直接分流进入糖酵解途径。（Elliott 等，(2002) *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 911-922）。当果糖进入血流时，其大部分（约 70%）由肝脏经门静脉吸收。（Toppings 和 Mayes (1971) *Nutr. Metab.* 13:331-338; Mayes (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58(Supp.): 754S-765S）。果糖主要在肝脏内经果糖-1-磷酸途径进行转化。参考图 1 可见，该途径第一个步骤是果糖在果糖激酶作用下磷酸化为果糖-1-磷酸，即将 ATP 上的一个磷酰基添加至果糖的 C₁ 上，从而生成 ADP 和果糖-1-

磷酸。(Hers (1952) *Biochim. Biophys. Acta* 8:416-423)。然后果糖-1-磷酸被转化成甘油醛和二羟丙酮磷酸。该醛醇断裂由特异性的果糖-1-磷酸醛缩酶催化。接着要求供给第二个 ATP 分子使甘油醛转化成甘油醛-3-磷酸以进入糖酵解途径。此外，二羟丙酮磷酸通过丙糖磷酸异构酶的作用转化成甘油醛-3-磷酸以进入糖酵解途径。该过程需要两个 ATP 分子。果糖能通过肝脏得以选择性、快速的摄入和利用是因为肝脏细胞内存在其它多数组织(即脂肪和肌肉)中缺乏的果糖激酶。(Van den Berghe (1986): *Metabolic Effects of Dietary Carbohydrates. Progress in Biochemical Pharmacology* (McDonal & Vrana, eds), 21:1-32, Karger, Basel, Switzerland; Hallfrisch (1987): *Metabolic Effects of Dietary fructose* (Reiser & Hallfrisch, eds), pp.25-40, CRC Press, Boca Raton, FL)。

或者，果糖可被己糖激酶磷酸化成果糖-6-磷酸，这主要发生在肾脏、脂肪组织和骨骼肌中。估计所摄入果糖的约 20% 由肾脏立即转化，而约 10% 被脂肪组织和骨骼肌快速吸收。(Froesch 和 Ginsberg (1962) *J. Biol. Chem.* 237:3317-3324; Bergstrom 和 Hultman (1967) *Acta Med. Scand.* 182:93-107)。肾脏、脂肪组织和骨骼肌内的多数果糖经果糖-6-磷酸代谢。因此在任何给定时间，血流内循环的果糖浓度非常低。(Macdonald 和 Turner (1968) *Lancet* 1:841-843; Crossley 和 Macdonald (1970) *Nutr. Metab.* 12:171-178)。果糖的肠吸收少于葡萄糖或蔗糖的肠吸收，然而葡萄糖激发肠粘膜强烈的果糖吸收反应。(Truswell 等, (1988) *Am. J. Clin. Nutr.* 48:1424-1430)。高果糖水平似乎并不引起循环中的葡萄糖水平的任何明显增加。(Schwarz 等, 1992; Tounian 等, (1994) *Am. J. Physiol.* 267:E710)。

由脂肪消耗导致的卡路里在过去三十年里稳步降低 (Kennedy 等, (1999) *J. Am. Coll. Nutr.* 18:207-212)，而膳食淀粉或复合糖的摄取仍然相当稳定。然而，与这些趋势相反，食品和饮料工业对添加糖 (added sugar) 的应用已经大量增加。加上从家庭外获得的糖中得到的卡路里数量增加，现代、工业化的膳食中主要的卡路里来自糖类和复合糖来源。

(Krebs-Smith(2001)J. Nutr. 131:527S-535S; Nielsen 等,(2002) Prev. Med. 35:107-113)。

甘蔗和制糖甜菜甜味剂的使用在过去三十年中已经降低约 40%。
(Kanter (1998) “A dietary assessment of the US Food Supply: Comparing per capita food consumption with food guide pyramid serving recommendations, ”from the Food and Rural Economics Division, Economics Research service, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Economic Report no.772)。换句话说,高果糖玉米甜味剂的应用增加了约 300%。从葡萄糖转变到果糖作为西方世界主要甜味剂的首要原因可能是因为经济。果糖比蔗糖和葡萄糖都甜并且其生产还更易更廉价。过去二十年中,果糖玉米甜味剂已经成为美国膳食中主要的食品添加剂,软饮料和果汁饮料占添加果糖的 43-44%。(Kanter (1998) “A dietary assessment of the US Food Supply: Comparing per capita food consumption with food guide pyramid serving recommendations,” from the Food and Rural Economics Division, Economics Research Service, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Economic Report no.772)。总的糖消耗仍在上升,这完全是因为向加工食物中添加了高果糖玉米糖浆。(Krebs-Smith (2001) J. Nutr. 131:527S-535S)。

添加糖、特别是果糖对健康的影响在其于食品加工中的应用变得无处不在前并未认识到。最近二十年中果糖的应用与肥胖症和糖尿病的显著增加同时发生。(Flegal 等, (1998) Int. J. Obes. 22:39-47)。如以下的详细讨论,研究已经揭示,糖、特别是果糖消耗增加的慢性、长期的影响对糖的利用、嘌呤的代谢、过早老化和脂类代谢可能极为有害。此外,所导致的肥胖症随着促炎细胞因子 (pro-inflammatory cytokine) 如肿瘤坏死因子 (TNF α)、白细胞介素-6 (IL-6) 及 C-反应性蛋白 (CRP) 的生成在机体中产生持续的炎症作用。

TNF α 及 IL-6 的生成受转录因子 NF κ B 的调节。NF κ B 在调节全身性

炎症 (systemic inflammation) 及其与糖诱导的肥胖症的关系以及接下来疾病的发生中起重要的作用 (Lebovitz (2003) *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 134:18-27)。NF κ B 的活化是由若干包括生长因子、淋巴因子、细胞因子、UV 射线、药理学物质及膳食的生物学过程激活的应激反应的一部分。

(Spencer 等, (1997) *Int. Immunol.* 9:1581-1588)。在钝化形式时, NF κ B 主要包含在细胞质中, 与 I κ B 族抑制蛋白结合。如糖摄入增加的膳食变化能激活 NF κ B 并导致 I κ B 的磷酸化, 由此释放允许分子移至核内的 NF κ B。在核内, NF κ B 与各种基因的共有序列 (5'GGGACTTTCC-3') 结合而激活它们的转录。在糖诱导肥胖症导致的全身性炎症中, 这引起 TNF α 及 IL-6 表达的增加。这些促炎蛋白的增加随而导致 CRP 的增加。

据报道, 持续大量使用果糖作为能量来源会扰乱糖代谢而导致许多组织对淀粉和葡萄糖的利用减少。(Bender 和 Thadini (1970) *Nutr. Metab.* 12:22-39; Tuovinen 和 Bender (1975) *Nutr. Metab.* 19:161-172)。具体而言, 果糖的持续消耗导致肝脏中己糖激酶的减量调节以及葡萄糖-6-磷酸激酶的增量调节 (见图 1; Freedland 和 Harper (1957) *J. Biol. Chem.* 228:743-751)。该适应反应导致葡萄糖向肝糖原的转化减少。(Vrana 等 (1978) *Nutr. Metab.* 22:262-268; Vrana 等, (1978) *Nutr. Metab.* 22:313-320)。在胰脏中, 由于 β 细胞内的果糖转运蛋白 GLUT5 蛋白的浓度低, 因此果糖不会增量调节胰岛素的生成。(Grant 等, (1980) *Diabetologia* 19:114-117; Curry (1989) *Pancreas* 4:2-9; Sato 等, (1996) *Tissue Cell* 28: 637-643)。这导致血糖随时间提高及对胰岛素不敏感 (insulin insensitivity), 即 II 型糖尿病的主要原因。肝脏可通过适应酶反应应用果糖产生糖原, 但是比葡萄糖可转化成糖原的水平低得多。(Freedland 和 Harper (1957) *J. Biol. Chem.* 228:743-751)。此外, 对蔗糖或果糖增加及长期的消耗导致肝脏合成脂肪酸的能力增强, 从而因葡萄糖不能经糖酵解转化而导致肝糖原储备下降。(Vrana 等, (1978) *Metablism* 27:885-888)。该膳食还削弱脂肪和肌肉组织使用葡萄糖产生能量的能力(Bender 和

Thadini (1970) *Nutr. Metab.* 12:22-39; Kelsay 等, (1977) *Am. J. Clin. Nutr.* 30:2016-2022)。

当果糖用作能量来源时,糖酵解的中间体水平升高,但是生成这些中间体的消耗非常高。(Hers (1952) *Biochim. Biophys. Acta* 8:416-423)。如上所述,当果糖被食用时,其大多数进入肝脏并被转化成果糖-1-磷酸。因此,消耗大量基本作为葡萄糖替代物的果糖的个体通过果糖激酶作用以果糖-1-磷酸的形式结合(sequestering)身体其他部位的磷酸根离子(图 1; Woods 等(1970) *Biochem. J.* 119:501-510)。因为没有备用的磷酸根离子,所以 ADP 的氧化磷酸化作用受抑制而导致肝脏中 ATP 的短缺。甘油醛通过丙糖激酶向甘油醛-3-磷酸的转化为提供糖酵解的底物而进一步耗尽磷酸储备(phosphate pool)。当磷酸储备变得足够低时,生成大量可由 AMP 脱氨酶及 5'-核苷酸酶代谢的 AMP。(Mayes (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (Suppl): 754S-765S)。AMP 的代谢导致肌苷水平上升,并最终引起大量尿酸形成及导致患高尿酸血症的可能。

高尿酸血症在其中向正常的及患有遗传性果糖不耐受的儿童给予果糖的研究中引起人们注意。(Perheentup 和 Raivio (1967) *Lancet* 2:528-31)。当向糖尿病人及那些患痛风的人给予果糖时也能检测到高尿酸血症发生率升高。(Hallfrisch (1987): *Metabolic Effects of Dietary Fructose* (Reiser & Hallfrisch, eds), pp. 25-40, CRC Press, Boca Raton, FL)。甚至当健康受试者以果糖形式消耗他们能量需求的约 18% 时,许多人显示出高尿酸血症体征,表明普通个体对体内减少的磷酸根离子及 ATP 浓度敏感。(Hallfrisch (1987): *Metabolic Effects of Dietary Fructose* (Reiser & Hallfrisch, eds), pp. 25-40, CRC Press, Boca Raton, FL)。

特别是年轻男性(14-18 岁)最容易患高尿酸血症。据 1977-1978 美国农业部全国食品消费调查(1977-1978 U.S. Department of Agriculture Nationwide Food Consumption Survey)显示,这个年龄组的男性每日消耗约 100g 主要源自汽水的果糖。此后尤其是在美国,果糖还被引入一般

食品供应。仅两罐汽水就含约 50g 的果糖。据估计，最近二十年来青少年果糖的平均消耗显著增长，从约 64g 每日升高到 150g 每日。(Kanter (1998)“A dietary assessment of the US Food Supply: Comparing per capita food consumption with food guide pyramid serving recommendations,” from the Food and Rural Economics Division, Economics Research Service,U.S. Department of Agriculture, Agricultural Economic Report no.772; Elliott 等 (2002) *Am. J. Clin. Nutr.* 76:911-922)。因此，整代的男性目前正遭受体内可利用的磷酸储库及 ATP 降低的经历。一般而言，除了患高尿酸血症的风险增加外，其还对若干体内过程具有显著的作用，并事实上可致使蛋白及尿酸合成受抑制而导致儿童发育不良、衰老时疾病发生率增加以及早衰。(Maenpaa 等 (1968) *Science* 161:1253-1254; Bode 等 (1973) *Eur. J. Clin. Invest.* 3:436-441)。

消耗大量蔗糖和/或果糖的一项特殊的影响是果糖促进糖化或如核酸、蛋白及脂蛋白类大分子与糖的非酶促交联(“美拉反应”(Maillard Reaction))。糖化由 Monnier 首先发表，他提出体内的衰老过程可能受美拉反应的促进。(Monnier (1989)“Toward a Malliear reaction theory of aging: the Malliard reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition,”(Baynes, JW & Monnier VM, eds.), pp.1-22, Alan R. Liss, New York, NY)。在美拉反应中，如葡萄糖和果糖的糖类首先与蛋白质或核酸的 N-末端氨基形成不稳定的席夫碱(Schiff's base)，然后经历重排形成更稳定的化合物。随着时间的过去，结合至糖化的蛋白/氨基酸的糖部分受到化学修饰变成称为高级糖化终产物(AGE)的分子结构。AGE 可干扰其连接的蛋白的正常功能。此外，在活性氧(ROS)存在下，AGE 可与相邻蛋白链共价交联。因此，蛋白质通过共价键的形成完全连接至其他大分子上，形成然后必须由身体清除的大的、复合物。

理论上，醛糖和酮糖都可参与美拉反应(Yaylayan 和 Huyghues (1994) *Crit. Rev. Food Sci.* 34:321-369)，然而已发现葡萄糖的反应性比果

糖的低得多 (Bunn 和 Higgins (1981) *Science* 213:222-4; McPherson 等 (1988) *Biochemistry* 27:1901-1907)。所有具有游离氨基的分子都可在体内经历美拉反应。然而通常, 赖氨酸的 ϵ -氨基是糖化的主要反应物。其他氨基酸如精氨酸、组氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸和苏氨酸也参与蛋白质和其他大分子间的美拉反应 (Monnier (1989) "Toward a Malliear reaction theory of aging: the Malliard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition," (Baynes, JW & Monnier VM, eds.), pp. 1-22, Alan R. Liss, New York, NY, 1989)。

糖尿病患者若其膳食中使用果糖作为葡萄糖的替代物, 则对糖化作用的影响尤其敏感。如上所述, 果糖通常在血液中以低浓度存在, 但在糖尿病患者角膜晶体和神经中发现的果糖浓度较葡萄糖的相当或更高。

(Jedziniak 等 (1981) *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20:314-326; Mayhew 等 (1983) *Diabetologia* 24:13-15)。此高浓度的果糖导致晶状体内蛋白间的糖化而致盲。(McPherson 等 (1988) *Biochemistry* 27:1901-1907)。随着过去二十年间对果糖消耗的增加 (Park 和 Yeltley (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (supp): 737S-747S), 因此失明是与糖尿病相关的最普遍的微血管并发症并不令人惊讶。(Jochmann 和 Hammes(2002) *Z. Arztl. Fortbild. Qualitatssich.* 96:167-174)。

在所有与高果糖摄入相关的问题中, 没有可与果糖对脂质堆积、脂肪生成及体重增加的作用相当的。发展中国家流行低脂、高糖的膳食, 原因是对心血管疾病中脂肪及胆固醇的危害性的透彻认识、对果糖作为糖尿病患者甜味剂替代物的认可及未意识到果糖消耗的危险。(Gerrits 和 Tsalikian (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58(Supp.): 796S-799S; Sonko 等 (1993) *Acta Physiol. Scand.* 147:99-108)。这导致果糖消耗极大增加, 并由以下讨论的原因与过去二十年间体重升高和肥胖症的增加相关。

当简单糖、特别是果糖被摄入至超过当前能量需求程度时, 脂肪生成发生。(Kazumi 等 (1997) *Endocrinol. J.* 44(2):239-245; Noguchi 和

Tanaka (1995) *Obes. Res.* 3 (Supp.2): 195S-198S)。如上所述, 脂肪生成包括脂肪酸合成及其后甘油三酯合成的过程。由于高等动物储藏多糖的能力有限, 当如葡萄糖和果糖的简单糖被摄入至超过当前能量需求及储藏能力时, 它们被转化成三酰甘油并储藏在脂肪或脂肪组织内。要理解此处描述的组合物如何影响脂肪生成, 必须首先理解脂质在体内形成的途径。图 1 说明果糖和葡萄糖在酰基甘油、乙酰-辅酶 A 及最终的极低密度的脂质 (very low density lipid) (VLDL) 形成中的相互作用。从糖生成脂肪有两条主要途径。第一, 过量的葡萄糖通过乙酰辅酶 A 积累向脂肪生成以及脂肪再次生成 (De novo lipogenesis) 转移。参考图 1, 过量的乙酰辅酶 A 被乙酰辅酶 A 羧化酶转化成丙二酰辅酶 A, 然后转化成酰基辅酶 A。酰基辅酶 A 通过酯化反应进入脂肪生成并且其后在甘油-2-磷酸酰基转移酶作用下转化成酰基甘油。然后酰基甘油与胆固醇被转化为极低密度脂质 (VLDL)。胰岛素对这个过程具有促进脂肪再次生成的积极作用。(Park 等 (1997) *J. Lipid Res.* 38:2529-2536)。

第二, 过量的果糖通过超过能量需求的二羟丙酮磷酸的积累向脂肪生成转移, 其中二羟丙酮磷酸被转化为甘油-3-磷酸 (见图 1)。甘油-3-磷酸经甘油-3-磷酸酰基转移酶的酯化产生酰基甘油, 其与胆固醇合并生成 VLDL。由于经糖酵解途径加工果糖的能量消耗高, 经 VLDL 生成的脂肪生成代表身体的能量节省。糖原自葡萄糖的沉积 (2.5mol ATP/摩尔葡萄糖) 也比自果糖 (3.5mol ATP/摩尔果糖) 更有效率。(Tapp 和 Jequier (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 58:766S)。然而, 如上所述, 果糖代谢对糖酵解和糖原沉积具有消极的作用, 即抑制关键的糖酵解酶的基因及蛋白表达、从肝脏中移除磷酸从而减少 ATP 的产生、并最终减少果糖诱导的肥胖症中的总代谢输出 (general metabolic output)。

若干研究已经证明果糖比葡萄糖更易生成脂肪。持续喂食大量果糖的大鼠显示出其 VLDL 甘油三酯在血液中的浓度上升。(Herman 等 (1970) *Fed. Proc.* 29:1302-1307; Steiner 等 (1984) *Am. J. Physiol.* 246:E187-E192;

Kazumi 等 (1986) *Am. J. Physiol.* 250:E325-E330)。当果糖被摄入时, 立即形成高水平血浆甘油三酯并提高甘油和脂肪酸形成的速度。(Reiser (1987) "Lipogenesis and blood lipids," Metabolic effects of dietary fructose, (Reiser S & Hallfrisch J, eds.), pp. 83-111, CRC Press, Boca Raton, FL; Hallfrisch (1990) *FASEB J.* 4:2652-2660)。长期消耗果糖还会提高 mRNA 或涉及脂肪酸生成的酶如脂肪酸合酶 (Bruckdorfer 等 (1972) *Biochem. J.* 129:439-446) 及甘油-3-磷酸脱氢酶 (Borrebach 等, (1976) *Circ. Res.* 38:1-21; Declercq 等 (1982) *Biochem. J.* 204:247-256)。相反地, 长期的果糖膳食会降低许多关键的糖酵解酶的活性, 包括 ATP 柠檬酸裂合酶 (Moser 和 Berdamier (1974) *J. Nutr.* 104:687-94; Shafir 等 (1975) *Isr. J. Med. Sci.* 11:1150-1154; Winder 等 (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:1150-1154)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (Bruckdorfer 等 (1972) *Biochem. J.* 129:439-446; Winder 等 (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:1150-1154; Waterman 等, (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150:220-225)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、NADP 苹果酸脱氢酶以及丙酮酸激酶。然而淀粉的吸收会增强这些酶的活性。(Vrana 和 Fabry (1983) *World Res. Nutr. Diet* 42:56-101)。具体而言, 甘油-3-磷酸脱氢酶的引入通过将二羟丙酮磷酸转化为甘油-3-磷酸而导致肝脏内 VLDL 的含量增加 (参考图 1)。

已经证明长期喂食果糖 (Christophe 和 Mayer (1968) *Am. J. Physiol.* 197:55-59) 或蔗糖膳食 (Fabry 等(1968) *Nutr. Dieta* 10:81-90; Tepperman 和 Tepperman (1970) *Fed. Proc.* 29:1284-1293) 的大鼠肝脏内脂肪生成增加。喂食高果糖膳食的大鼠还显示脂质含量增加, 以及与喂食标准淀粉或补充葡萄糖的膳食的大鼠相比器官重量大幅增加。(Wapnir 和 Devas (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 61:105-110)。喂食高果糖膳食的动物的肾脏受影响的程度较低。心脏与睾丸重量不受影响。在这些研究中, 向高果糖膳食中添加高脂肪对肾脏总重量的增加很少, 表明果糖诱导的脂肪生成是脂肪的生成的主要途径。(Wapnir 和 Devas (1995) *Am. J. Clin. Nutr.*

61:105-110)。

迄今为止进行的大多数研究都是在能够严格控制膳食的大鼠上完成。然而，大量的证据表明果糖消耗的增加正在向人类发威。若干试验表明果糖对男性及女性体重增加有确定的作用。举例而言，当其中有四位患糖尿病的14位中年男性每日额外补充50—60g果糖或大致的两罐用高果糖玉米糖浆增甜的汽水的等价物至其膳食中时，他们都显示出净体重增加。(Anderson等(1989) *Diabetes Care* 12:337-344)。在另一项研究中，对消耗他们能量需求约28%的人造甜味剂或蔗糖(50%果糖)的过重个体进行比较，食用蔗糖补充剂的个体在10周期间显示出体重、脂肪质量及血压增加。(Astrup等(2002) *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (Suppl): 405S(摘要))。此外，Raben等指出，给予淀粉的个体在14天期间体重减轻，而给予蔗糖(50%果糖)的个体重量无变化。(Raben等(1997) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21:846-859)。这些观测结果与由Schwarz等完成的试验相一致，显示果糖诱导的脂肪生成在瘦弱或肥胖的受试者上都有增加。(Schwarz等(1995) *J. Clin. Invest.* 96:2735-2743)。

某些促炎标记与体重增加和肥胖症相关。这些中有TNF α 、IL-6和CRP。TNF α 由脂肪细胞表达及分泌，并且显示与肥胖症和BMI直接相关，但不一定与胰岛素不敏感及高胰岛素血症直接相关。(Hotamisligil等(1993) *Science* 259:87-91; Ronnema等(2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2728-2732; Berberoglu(2001) *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14:543-547)。

体重指数(BMI)是基于身高和体重对体脂的度量方法。BMI被应用为总体肥胖的度量方法，并是涉及发展成慢性疾病(如心脏病、癌症或糖尿病)的潜在可能的许多因素之一。其它评估个体发展成慢性疾病的风险的重要因素包括膳食、身体活动度(physical activity)、腰围、血压、血糖水平、胆固醇水平和家族病史。BMI如下计算：

$$\text{BMI} = \left(\frac{\text{以磅计的体重 (lbs)}}{(\text{以英寸计的身高 (in)})^2} \right) \times 703$$

个体若其 BMI 介于 25–29.9kg/m² 间会被认为是过重, 若其 BMI ≥ 30kg/m² 则被认为是肥胖。认为 BMI ≤ 25 的个体体重正常。

身体有三种类型的肥胖——皮下、内脏及器官。(Cinti (2000) *Eat Weight Disord.* 5:132-142)。肝脏(器官)肥胖已经证明与果糖消耗高度相关(Wapnir 和 Devas (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 61:105-110)。另一方面, 内脏肥胖与摄入各种脂肪和糖、包括果糖/蔗糖来源相关。(Tarui 等 (1991) *Int. J. Obes.* 2(Suppl):1-8; Keno 等 (1991) *Int. J. Obes.* 15:205-211)。内脏肥胖量越高, 身体产生的 TNF α 的量越高。(Tsigos 等 (1999) *Metabolism* 48:1332-5; Vgontzas 等 (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1151-1158)。据发现, 高蔗糖/果糖膳食会增加内脏肥胖。

TNF α 诱导脂肪组织分泌 IL-6, 其导致糖皮质激素 (glucocorticoid) 诱导的脂解, 从而释放更高浓度的可用作脂肪再次合成的附加池的循环中的未酯化脂肪酸 (Patton 等 (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8313-8317; Fried 等 (1998) *Endocrinol. Metab.* 83:847-850)。在喂食高果糖的 LDL-受体缺乏小鼠中, 动脉粥样硬化的损伤包含高水平的 TNF α , 其诱导转录因子促进能引起更大的损伤形成的蛋白质的基因表达 (Goetze 等 (2001) *Atherosclerosis* 159:93-101)。

急性相 (acute phase) 代表其中 IL-6 诱导如 CRP 及纤维蛋白原的特定炎性蛋白的基因和蛋白表达的损伤或发炎的状态 (Heinrich 等 (1990) *Biochem. J.* 265:621-636)。无其它的细胞因子可于急性相执行这项功能。虽然已知增加的 BMI 和血清纤维蛋白原浓度间密切相关 (Krobot 等 (1991) *Arterioscler. Thromb.* 12:780-788), 但在发现腹部脂肪细胞产生及分泌 IL-6 之前仍未得知增加的 BMI 与 IL-6 有明确联系 (Mohamed-Ali 等 (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:4196-4200)。因此, 机体内的 IL-6 水平、BMI 与内脏肥胖直接相关。

IL-6 生成的副作用可能甚至比上述那些更具破坏性。从内脏脂肪细胞分泌的 IL-6 主要由门静脉吸收，由此主要作用于肝细胞。与 TNF α 相似，IL-6 也促进肝脏内的脂解作用，但是其特别地增加纤维蛋白原基因的表达，导致血液纤维蛋白原浓度升高及心血管疾病发病率增加 (McCarty (1999) *Medical Hypotheses* 52:465-477)。

与其基因表达活性有关的是 IL-6 对循环中的 CRP 水平升高的作用。IL-6 调节 CRP 的经肝合成 (Heinrich 等 (1990) *Biochem. J.* 265:621-636; Bataille 和 Klein (1992) *Arthritis Rheum.* 35: 982 -983)。因为增加的 BMI 与 TNF α 及 IL-6 的浓度相关，研究人员曾寻找与 CRP 的相关性。据发现，CRP 血清浓度和 BMI 间直接相关。(Visser 等 (1999) *JAMA* 282:2131-2135)。实际上，BMI 与 CRP 浓度间几乎成线性关系。

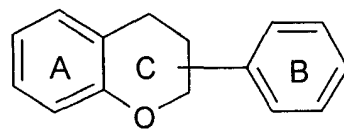
与 TNF 和 IL-6 相比，发现内脏肥胖和 CRP 浓度间存在更强的相关性，(Forouhi 等 (2001) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25:1327-1331) 以致其可为在急性相心血管疾病期间的肱动脉内皮功能的主要预测因素 (predictor) (Brooks 等 (2001) *Am. J. Cardiol.* 88:1264-9)。过度摄入果糖和蔗糖无疑会导致 CRP 增加，这是因为 TNF α 分泌增加诱导 IL-6 水平升高，其随后诱导 CRP 的表达。初始由肝脏内果糖诱导脂肪生成的增量调节导致的细胞因子级联作用 (cytokine cascade) 是造成肥胖症、心血管疾病、糖尿病以及许多其他疾病中基本蛋白决定因素 (protein determinants) 的原因。(McCarty (1999) *Medical Hypotheses* 52:465-477)。减少果糖和糖诱导的增重对预防这些基于炎症的疾病至关重要。

“淀粉阻断剂”是来源于植物的化合物，其能部分抑制 α -淀粉酶作用，因此导致淀粉作为葡萄糖来源未经充分利用就通过消化道。具体而言，已发现 phaseolamin——一种分离自四季豆的提取物——能通过抑制 α -淀粉酶而有效阻断糖的分解。(Marshall 和 Lauda (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 8030-8037)。许多分离自各种植物资源的“淀粉阻断剂”目前可商购获得。全面检索影响糖诱导增重的植物及植物提取物的文献仅得到一个结果。

Bofu-tsusho-san (BOF), 一种中药, 能抑制肝脏内的甘油三酯合成及增强脂肪细胞的脂解。(Morimoto 等 (2001) *Nippon Yakurigaku Zasshi* 117:77-86)。然而, 对该提取物的分析揭示其含有能抑制脂肪细胞内磷酸二酯酶 (PDE) 活性的麻黄碱和 d-伪麻黄碱, 据此可解释其抑制增重的作用。(Yoshida 等 (1995) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 19:717-722)。
Mu Huang, 另一知名的用以减重的植物提取物也含有麻黄碱类物质麻黄。(Boozer 等 (2002) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26: 593-604; Boozer 等 (2001) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25:316-324)。虽然若干短期的临床研究已经表明 Mu Huang 与咖啡因及瓜拉那的组合是安全的, 但新近的报告认为含有麻黄的减重制剂具有严重的心脏副作用。

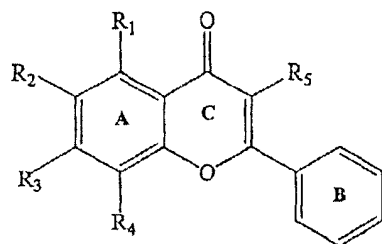
此处描述的组合物不含有影响淀粉分解的 α -淀粉酶抑制剂及影响糖代谢和增重的麻黄、麻黄碱或伪麻黄碱。这种提取物通过降低果糖的利用、减少与肥胖有关的促炎细胞因子而减少因高糖膳食而导致的体重增加, 并有助于减轻体重。

黄酮或生物类黄酮为广泛分布的天然产物, 据报道其具有抗菌、抗炎、抗过敏、抗诱变剂、抗病毒、抗肿瘤、抗血栓形成 (anti-thrombic) 及血管舒张活性。这组化合物一般的结构单元包括两个位于 3-碳环两侧的苯环, 如下结构通式所示:



连接至这通用的三环结构的羟基、糖、氧及甲基的各种组合产生多种类型的黄酮, 其包括黄烷醇、黄酮、黄烷-3-醇 (儿茶素)、花色素苷 (anthocyanins) 和异黄酮。

无取代 B 环黄酮及黄酮醇是一类特殊的类黄酮, 其芳香 B 环上无取代基, 由如下通式所示:



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

虽然类黄酮是分布广泛的天然产物，但是无取代 B 环类黄酮相对稀少。在 9396 种合成或从天然来源分离的类黄酮中，已知仅有 231 种无取代 B 环类黄酮 (The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall/CRC, 5:1 版 2001 年 6 月)。据报道，无取代 B 环类黄酮具有种种生物活性。例如，高良姜精 (3,5,7-三羟基黄酮) 起抗氧化剂和自由基清除剂的作用，并且据信是一种有前景的抗遗传毒性和癌症化学预防剂的选择物 (Heo 等 (2001) *Mutat. Res.* 488:135-150)。其为酪氨酸酶单酚酶抑制剂 (Kubo 等 (2000) *Bioorg. Med. Chem.* 8:1749-1755)、兔心脏羧基还原酶抑制剂 (Imamura 等 (2000) *J. Biochem.* 127:653-658)，具有抗菌活性 (Afolayan 和 Meyer (1997) *Ethnopharmacol.* 57:177-181) 和抗病毒活性 (Meyer 等 (1997) *J. Ethnopharmacol.* 56:165-169)。贝加因及高良姜精以及另外两种无取代 B 环类黄酮对人乳腺癌细胞具有抗增殖活性 (So 等 (1997) *Cancer Lett.* 112(2):127-133)。

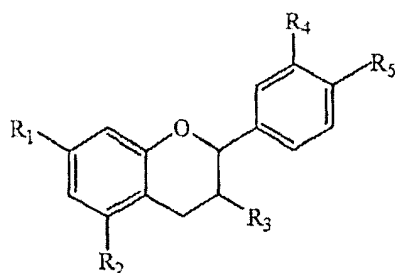
通常基于类黄酮的有效性随机测定其活性。偶尔地，特定生物活性强调需要 B 环上的取代，如与 p-糖蛋白高的亲和力结合 (Boumendjel 等 (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(1):75-77)、强心作用 (Itoigawa 等 (1999) *J. Ethnopharmacol.* 65(3):267-272)、抗亚油酸过氧化氢诱导毒性的对内皮细胞的保护作用 (Kaneko 和 Baba (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(2):323-328)、COX-1 抑制活性 (Wang (2000) *Phytomedicine* 7:15-19) 以及前列腺素内过氧化物合酶活性 (Kalkbrenner 等 (1992) *Pharmacology* 44(1):1-12) 需要 B 环上被取代。仅有为数不多的出版物提到无取代 B 环类黄酮中未取代的 B 环的重要性。一个实例为抑制 NAD(P)H 醌受体氧化还原酶的 2-苯基黄酮作为潜在的抗凝血剂的应用 (Chen 等 (2001) *Biochem Pharmacol.* 61(11):1417-1427)。

中国药用植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis*) 含有大量的无取代 B 环类黄酮，包括贝加因、贝加灵、沃贡宁和 baicalenoside。传统上，该植物用于治疗许多病症，包括清热、泻火、湿温和暑热病；高烧引起的烦渴；痈、溃疡和其他化脓的皮肤感染；上呼吸道感染如急性扁桃体炎、咽喉炎和猩红热；病毒性肝炎；肾炎；盆腔炎 (pelvitis)；痢疾；呕血和鼻出血。该植物传统上还用于预防流产 (见 *Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine*, 上海科技出版社, 上海, 中国, 1998)。临床上，黄芩现用于治疗的病症包括小儿肺炎、小儿细菌性腹泻、病毒性肝炎、急性胆囊炎、高血压、由伤口和外科手术引起的局部急性发炎、支气管哮喘和上呼吸道感染 (*Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine*, 上海科技出版社, 上海, 中国, 1998)。黄芩的根治疗支气管哮喘的药理学效能据报道与无取代 B 环类黄酮的存在以及其抑制作用有关，它们可以抑制嗜酸性细胞的与嗜酸性细胞趋化因子相关的补充 (Nakajima 等 (2001) *Planta Med.* 67(2):132-135)。

迄今为止，许多天然存在的无取代 B 环类黄酮得以商品化用于各种

用途。例如，黄芩提取物的脂质体剂型用于护肤（美国专利 5,643,598; 5,443,983）。由于对致癌基因具有抑制作用，贝加灵被用于预防癌症（美国专利 6,290,995）。贝加灵和其他化合物被用作抗病毒、抗菌和免疫调节剂（美国专利 6,083,921）并作为天然的抗氧化剂（波兰专利公开 9,849,256）。柯因由于其降低焦虑性质得以应用（美国专利 5,756,538）。抗炎类黄酮用于控制和治疗肛门直肠和结肠疾病（美国专利 5,858,371）以及抑制脂氧合酶（美国专利 6,217,875）。这些化合物与葡糖胺胶原以及其他成分一起制成剂型用于修复和维护结缔组织（Bath, 美国专利 6,333,304）。类黄酮酯可构成美容组合物的活性成分（美国专利 6,235,294）。于 2002 年 3 月 1 日提交，序列号为 10/091,362，名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 Inhibitors”（无取代 B 环类黄酮作为有效的 COX-2 抑制剂的鉴定）的美国申请公开了通过向需要的主体给药含有无取代 B 环类黄酮的组合物或含有无取代 B 环类黄酮混合物的组合物来抑制环氧合酶 COX-2 的方法。这是首篇将无取代 B 环类黄酮与 COX-2 的抑制活性相联系的报告。本文引入该申请的整体作为参考。

黄烷包括下式结构通式表示的化合物：



其中

R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，所述取代基的酯包

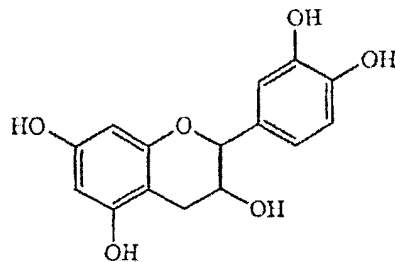
括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子，包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

儿茶素是一种黄烷，主要发现于绿茶中，其具有下列结构：



儿茶素

儿茶素既单独又与其他在茶中发现的类黄酮一同起作用，并且其既具有抗病毒又具有抗氧化活性。据证实，儿茶素对病毒性肝炎的治疗有效。其还显示可预防对心脏、肾、肺、脾的氧化损伤。儿茶素还可抑制胃癌细胞的生长。

儿茶素及其源自各种植物来源特别是绿茶叶子的衍生物被用于治疗 HPV 感染的尖锐湿疣 (Cheng, 美国专利 5,795,911) 以及治疗由乳头状瘤病毒引起的增生 (Cheng, 美国专利 5,968,973 和 6,197,808)。儿茶素及其衍生物还被局部用以抑制哺乳动物组织如皮肤癌、牛皮癣、蜘蛛血管 (spider vein) 或下出射光瞳 (under eye circle) 等血管生成 (Anderson, 美国专利 6,248,341)、用于对抗 UVB 诱导的小鼠肿瘤发生 (Agarwal 等 (1993) Photochem. Photobiol. 58:695-700)、用于在基因表达和酶活性水平抑制氧化氮合酶 (Chan, 美国专利 5,922,756)、以及用作生发剂 (Takahashi,

美国专利 6,126,940)。基于儿茶素的组合物还被与其他提取物和维生素一同配制以治疗痤疮(Murad, 美国专利 5,962,517)、硬化消化器组织(Shi, 美国专利 5,470,589)和用于在治疗雄激素紊乱相关的疾病及癌症中抑制 5 α -还原酶活性(Liao, 美国专利 5,605,929)。绿茶提取物与其他 7 种植物提取物配制以通过抑制 COX-2 酶消炎,而没有确定任何具体有效成分(Mewmark, 美国专利 6,264,995)。

据证实,与抑制刺激脂解的活性相反,黄烷、五羟黄酮及非瑟酮激发脂肪组织中的 PDE 活性。(Kuppusamy 和 Das (1994) *Biochem. Pharmacol.* 47:521-529)。五羟黄酮及非瑟酮以剂量依赖性方式刺激 PDE 的活性,无论有无肾上腺素存在,都导致环 AMP 在细胞内蓄积。此外,添加已知的脂解剂茶碱并不能增强其作用,而添加特异性 β -肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素可抑制其作用,这暗示五羟黄酮及非瑟酮通过结合 β -肾上腺素受体与肾上腺素协同作用。儿茶素也可刺激 PDE 活性,但在肾上腺素存在时不能刺激 PDE 活性,这暗示其与 β -肾上腺素受体弱结合。(Kuppusamy 和 Das(1992) *Biochem. Pharmacol.* 44 :1307-1315)。而且,在对小鼠为期一个月的研究中,绿茶儿茶素引起肝脏内酰基辅酶 A 氧化酶、中链酰基辅酶 A 脱氢酶以及 β -氧化活性的增加,由此增加脂质的分解代谢。(Murae 等 (2002) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26 :1459 -1464)。

儿茶素对果糖诱导的肥胖症的作用还未知。也同样没有证据表明贝加因、贝加灵或沃贡宁影响果糖的代谢。然而含有两种草药组合物的提取物的确能改变果糖的代谢,如下详细说明。

金合欢是豆科树木和灌木属。金合欢属包括多于 1000 种属于豆科及含羞草亚科的物种。金合欢分布于全世界,如中、南美洲的热带和亚热带地区,非洲、亚洲部分地区以及具有最多特有品种的澳洲。金合欢主要生于森林经常为空旷多刺灌木状态的干燥干旱地区。金合欢属主要根

据叶子形态学分为三个亚属——金合欢 (*Acacia*)、*Aculiferum* 和 *Heterophyllum*。然而，根据成熟树木叶子的特征，金合欢可分为两种“常见”组群——典型的二回羽状叶品种和叶状柄品种。叶状柄是扩展为叶状结构没有小叶的改良的叶柄，其为对旱生植物条件的适应。

金合欢有重大的经济意义，其提供了鞣质、树胶、木材、燃料和饲料的原料。鞣质主要从树皮中分离得到，被广泛用于鞣制皮革和碎革。一些金合欢树皮还用于当地酊剂的调味。如藤金合欢的一些本地品种也产出皂苷，其为任意的植物多糖，当与水一同混合并搅拌时，形成象肥皂的泡沫。皂苷用于洗涤剂、发泡剂和乳化剂。金合欢属一些物种的花气味芬芳因此用于生产香水。例如，金合欢香水从 *A. ferrugenea* 中得到。许多金合欢的心材用于制造农业工具，还是木柴的来源。金合欢树胶广泛用于药物和甜点，并用作纺织工业中的定型和修整材料。紫胶虫可在数个品种上生长，包括阿拉伯胶金合欢和儿茶。一些品种被用于荒地造林，包括阿拉伯胶金合欢，其可抵挡洪水泛滥，并且一些同种地区已成为鸟类避难所。

迄今为止，约从各种金合欢品种中分离出 330 种化合物。类黄酮为一类水溶性植物颜料，其为从金合欢中分离出的主要类型的化合物。已鉴定有大约 180 种不同的类黄酮，其中 110 种为黄烷。萜类是从金合欢属物种中分离出的第二大类化合物，已鉴定 48 种化合物。从金合欢中分离出的其他类型化合物包括生物碱 (28)、氨基酸/肽 (20)、鞣质 (16)、糖类 (15)、含氧杂环 (15) 和脂肪族化合物 (10) (Buckingham, The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall CRC, 5:2 版, Dec. 2001)。

所有金合欢品种中具有中等到高浓度的酚类化合物，特别是黄烷 (Abdulrazak 等 (2000) Journal Of Animal Sciences. 13:935-940)。在历史上，金合欢属的大多数植物和提取物被用作收敛药治疗胃肠道紊乱、腹泻、消化不良以及止血 (Vautrin (1996) Universite Bourgogne (France))

European abstract 58-01C:177; Saleem 等 (1998) Hamdard Midicus. 41:63-67)。A. Arabica Willd.的树皮和荚中含有大量的鞣质，因此被用作收敛药和祛痰药 (Nadkarni (1996) India Materia Medica, Bombay Popular Prakashan, pp. 9-17)。据报道，从来自索马里的 A. tortilis 的树皮中分离出的二芳基丙醇衍生物具有松弛平滑肌作用 (Hagos 等 (1987) Planta Medica. 53:27-31, 1987)。还有报道指出分离自胜利金合欢的萜类糖苷对二甲基苯并葱诱导的鼠皮致癌作用具有抑制作用 (Hanausek 等 (2000) Proceedings American Association for Cancer Research Annual Meeting 41:663) 且诱导细胞凋亡 (Haridas 等 (2000) 3 Proceedings American Association for Cancer Research Annual Meeting. 41:600)。据报道阿拉伯胶金合欢的植物提取物具有致痉、血管收缩和抗高血压作用 (Amos 等 (1999) Phytotherapy Research 13:683-685; Gilani 等 (1999) Phytotherapy Research 13:665-669)，以及抗血小板凝集作用 (Shah 等 (1997) General Pharmacology. 29:251-255)。报道指出阿拉伯胶金合欢具有抗炎活性。据推测，类黄酮、多糖和有机酸为可能的活性成分 (Dafallah 和 Al-Mustafa (1996) American Journal of Chinese Medicine. 24:263-269)。于 2002 年 3 月 22 日提交，序列号为 10/104,477，名为“Isolation of a Dual Cox-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia”(从金合欢分离双重 Cox-2 及 5-脂肪氧合酶抑制剂) 的美国申请被本文全文引入作为参考，其公开通过给药含有从金合欢属植物分离的黄烷或黄烷的混合物的组合物的同时双重抑制环加氧酶 COX-2 及 5-脂肪氧合酶 (5-LO) 的方法。

发明内容

本发明包括能有效抑制糖诱导的增重和糖诱导的肥胖症的方法。抑制糖诱导增重及抑制糖诱导肥胖症的方法包括向有此需要的主体给药含有合成和/或从一种植物或多种植物分离的无取代 B 环类黄酮及黄烷混

合物的组合物（本文还用商品名 DIAFIN™ 指代这种组合物）。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99.9:0.1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明优选的具体实施方案中，组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为 80:20。在优选的具体实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离，而黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

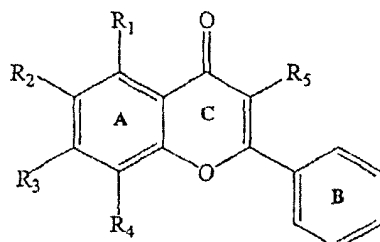
本发明还包括预防及治疗其他糖诱导的疾病和病症的方法。预防及治疗糖诱导疾病和病症的方法包括向有此需要的主体给药有效剂量的组合物，其包含合成的和/或从一种或多种植物分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接受的载体。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99.9:0.1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明优选的具体实施方案中，组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为 80:20。在优选的具体实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离，而黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

本发明还包括对果糖催化及糖酵解途径中的关键酶的特异性抑制，即抑制特定果糖-1-磷酸醛缩酶的方法。参考图 1，这能抑制醛缩酶将果糖-1-磷酸转化为甘油醛及二羟丙酮磷酸。该特异性抑制能防止二羟丙酮磷酸转化为甘油-3-磷酸，进而为酰基甘油，并最终导致 VLDL 的生成。

本发明还包括使诱导 TNF α 及 IL-6 生成的转录因子 NF κ B 的基因组源减少（genomic reduction）的方法。TNF α 及 IL-6 是肥胖症和其他炎性疾病的主要标记。该减少 NF κ B 并从而减少 TNF α 及 IL-6 的方法包括向有此需要的主体给药有效量的组合物，其包含合成的和/或从一种或多种植物分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例可在无取代类黄酮：黄烷 99.9:0.1 至无取代 B 环类黄酮：黄烷 0.1:99.9 的范围内。在本发明的一个优选的具体实施方案中，组合物中无取代 B 环类黄酮：黄烷的比例是 80：20。在一个优选的具体实施

方案中，该无取代 B 环类黄酮分离自一种或多种黄芩属植物，而黄烷分离自一种或多种金合欢属植物。

可根据本发明应用的无取代 B 环类黄酮——此处也称作无取代 B 环黄酮和无取代 B 环黄酮醇——包括以下结构通式所示的化合物：



其中

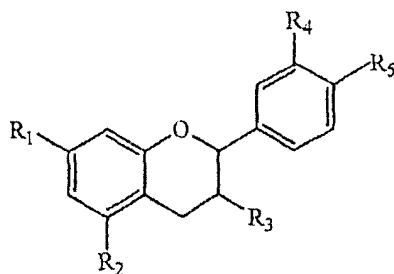
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

可根据以下发明应用的黄烷包括以下的结构通式所示的化合物：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，所述取代基的酯包

括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；其碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

本发明方法可用于治疗和预防许多与肥胖症相关的疾病和病症，包括但不限于由糖诱导的肥胖症及糖尿病以及高血压导致的高脂血症、高胆固醇、动脉硬化、动脉粥样硬化、X 染色体综合征（代谢综合症）及全身炎症。

本发明的无取代 B 环类黄酮可通过合成方法或从包括但不限于番荔枝科、菊科 (*Asteraceas*)、紫葳科、使君子科、菊科 (*Compositae*)、大戟科、唇形科、樟科、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科及蕨科的植物科分离获得。该无取代 B 环类黄酮可由高等植物属提取、浓缩和纯化，包括但不限于假鹰爪属、*Achyrocline*、木蝴蝶属、*Buchenavia*、香青属、山茺蓂属 (*Cotula*)、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、*Baccharis*、乌柏属、黄芩属、*Molsa*、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

本发明的黄烷可从选自金合欢属的一种或多种植物中获得。在一个优选的具体实施方案中该植物选自以下组中：儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holoserecia* 和马

占相思。

本发明组合物可以本领域普通技术人员所知的任何方法给药。给药方式包括但不限于肠内（口服）给药、非胃肠道给药（静脉、皮下和肌肉内）给药和局部施用。本发明治疗方法包括向需要的主体内服或外敷给药治疗有效量的合成和/或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物。

应理解，前述总体描述及以下的详细描述都仅是举例说明和解释的目的，而并非对如所要求保护的本发明的范围进行限制。

附图说明

图 1 所示为肝脏内果糖和葡萄糖在糖酵解及脂肪生成途径中的新陈代谢示意图。

图 2 图示了每日向如实施例 1 所述的喂食正常膳食、补充 65% 果糖的膳食或补充脂肪的膳食的 ICR 雌性小鼠给药无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物 3 周对果糖诱导的增重及脂肪诱导的增重的作用。维持正常膳食的小鼠作为对照。两个测试组或仅给予 65% 果糖或仅给予脂肪。该图说明无取代 B 环类黄酮及黄烷能预防由果糖消耗导致的增重过多。

图 3 图示了每日向如实施例 3 所述的喂食正常膳食（对照）、喂食补充 65% 果糖的膳食 8 周及喂食补充 65% 葡萄糖的膳食 8 周的 ICR 小鼠给药无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物对果糖相对葡萄糖诱导的增重的作用。每周称重并绘制每组平均体重图。每周计算每组的平均标准差（SEM）。

图 4 所示为在暴露于脂多糖以及不同浓度的无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物 1 小时后，无取代 B 环类黄酮及黄烷（80: 20）的混合物对外周血单核细胞（PBMC）中脂多糖（LPS）诱导的 TNF α 水平的作用。TNF α 水平用 pg/ml 表示。计算每个数据点的标准偏差。

图 5 所示为暴露于脂多糖以及不同浓度的无取代 B 环类黄酮及黄烷

混合物 6 小时后，无取代 B 环类黄酮及黄烷（80：20）的混合物对外周血单核细胞（PBMC）中脂多糖（LPS）诱导的 IL-6 水平的作用。IL-6 水平用 pg/ml 表示。计算每个数据点的标准偏差。

图 6 所示为无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物对 NF κ B 基因表达的相对抑制程度。在 0 到 100 μ g/mL 提取物存在情况下测量相对基因表达。

图 7 所示为无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物对 TNF α 基因表达的相对抑制程度。在 0 到 100 μ g/mL 提取物存在情况下测量相对基因表达。

图 8 所示为无取代 B 环类黄酮及黄烷对果糖-1-磷酸的特异性醛缩酶功能的作用，该酶能催化果糖-1-磷酸转化成甘油醛和二羟丙酮磷酸。在 10 分钟时间内显示出对该关键酶具有剂量特异性抑制作用。

图 9 所示为无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服 250mg 持续 90 天的 13 位个体体重减轻的作用。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。

图 10 所示为无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服 500mg 持续 90 天的 13 位个体体重减轻的作用。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。

图 11 所示为向 13 位个体口服给药安慰剂 90 天对体重减轻的效果。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。

图 12 所示为在第 30 天和 90 天时，无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服给药 250 及 500mg 相对于给药安慰剂的个体的体重指数（BMI）的作用。同样计算每组的 SEM 值。

图 13 所示为在第 0、30 及 90 天时，无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服给药 250 及 500mg 相对于给药安慰剂（基线）的个体血糖变化的作用。

图 14 所示为在实施例 8 所述条件下进行的无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物的高效液相色谱法（HPLC）的色谱图。使用所述条件下，无取代 B 环类黄酮在 11 至 14 分钟之间洗脱，黄烷在 3 至 5 分钟之间洗脱。

图 15 所示为在实施例 9 所述条件下进行的无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物的 HPLC 的色谱图。使用所述条件下，两种黄烷（儿茶素和表儿茶素）在 4.5 至 5.5 分钟之间洗脱，无取代 B 环类黄酮（贝加因和贝加灵）在 12 至 13.5 分钟之间洗脱。在实施例 9 所述条件下，该分离是基于无取代 B 环类黄酮与黄烷的摩尔吸附能力（absorbitivity）的差异。

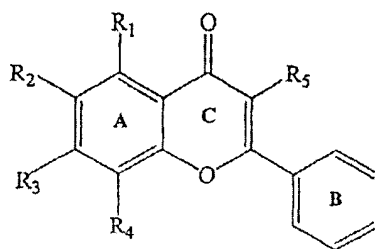
具体实施方式

本发明涉及包含两种特殊类型的化合物——无取代 B 环类黄酮及黄烷——相混合的混合物的新型组合物，其用于预防及治疗增重和肥胖症以及其他由高糖吸收导致的疾病和病症。该疾病和病症包括但不限于由肥胖症、糖尿病及高血压引起的高脂血症、高胆固醇、动脉硬化、动脉粥样硬化、X 染色体综合征（代谢综合症）及全身性炎症。

此处所使用的各种术语涉及本发明的多个方面。提供以下定义以帮助阐明本发明各组成部分。

应注意，术语“一个”（“a”或“an”）实体是指一个或多个该实体；例如一种类黄酮指一种或多种类黄酮。同样地，术语“一个”、“一个或多个”和“至少一个”在此处可互相替换。

此处所用的“无取代 B 环类黄酮”为一类特殊的类黄酮，如下列结构通式所示，其芳香 B 环无取代基：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖

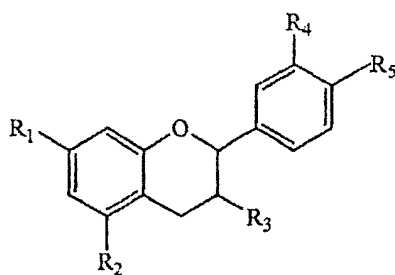
以及它们的化学衍生物；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

“黄烷”为一类特殊的类黄酮，其通常可由下列结构通式代表：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，取代基的酯，包括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯；碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；二聚、三聚以及其他多聚黄烷；

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子组中，包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

本文所用的“果糖诱导的脂肪生成”是指从果糖形成脂质的特异性途径，如图 1 所示，其通过中间体二羟丙酮磷酸的生成而发生，二羟丙酮磷酸随后被转变成甘油-3-磷酸并接下来被酯化成酰基甘油。

此处所用的“脂肪再次生成”是指从果糖形成脂质的特异性途径，其通过中间体丙酮酸的产生而发生，如图 1 所示，丙酮酸随后在羧化反

应中转变成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 转变成丙二酰辅酶 A，丙二酰辅酶 A 然后转化成其后酯化成酰基甘油的酰基辅酶 A。

此处所用的“糖诱导的脂肪生成”是指果糖诱导的及再次的脂肪生成两者。

本文所用的“糖”(sugar)同时指简单和复合糖(carbohydrate)，其包括但不限于单糖、二糖及多糖。单糖是简单糖，其包括但不限于葡萄糖、果糖和半乳糖。二糖是双糖或含有两分子简单糖的糖，如蔗糖。本文所用的糖还指从复合糖分解或降解而来的糖。复合糖或多糖是含有三个或更多分子简单糖的糖。复合糖包括淀粉和糖原。由复合糖降解生成的糖包括但不限于麦芽三糖、 α -糊精、麦芽糖及其他具有新陈代谢活性的二糖。

本文所用“治疗”包括治疗和/或预防。当使用时，治疗是指人类也指其他动物。

“药理学或治疗有效的剂量或量”指足以引发所需生物学结果的剂量水平。该结果可以是病征、症状或疾病的起因的缓解或任何其他所需的生物学系统的改变。

“安慰剂”指由非活性物质对该足以引发所需的可缓解病征、症状或疾病的起因的生物学结果的药理学或治疗有效的剂量或量的替代。

“主体”为向其给药本发明组合物的，为人或动物的生存的对象。

注意，本申请从头到尾提供各种引用。各个引用分别全部并入本文作为参考。

本发明包括有效抑制糖诱导的增重及糖诱导的肥胖症的方法。抑制糖诱导的增重及抑制糖诱导的肥胖症的方法包括向有此需要的主体给药含有合成和/或从一种或多种植物提取的无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99.9:0.1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施

方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80 和 10:90。在本发明优选的具体实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为 80:20。在优选的具体实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,而黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

本发明还包括预防和治疗糖诱导的疾病和病症的方法。预防和治疗糖诱导的疾病和病症的方法包括向有此需要的主体给药有效量的含有合成和/或从一种或多种植物提取的无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物及药理学可接受载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99.9:0.1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80 和 10:90。在本发明优选的具体实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 80:20。在优选的具体实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,而黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

本发明还包括基因组地减少 NF κ B 并继而降低肥胖症和其它炎症疾病主要标记 TNF α 及 IL-6 水平的方法。基因组地减少 NF κ B 及继而降低 TNF α 及 IL-6 水平的方法包括向有此需要的主体给药有效量的含有合成和/或从一种或多种植物提取的无取代 B 环类黄酮及黄烷的混合物的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99.9:0.1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 0.1:99.9 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80 和 10:90。在本发明优选的具体实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 80:20。在优选的具体实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属

植物中分离，而黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

根据本发明可以应用的无取代 B 环类黄酮包括上述结构通式所示的化合物。本发明的无取代 B 环类黄酮可由合成方法获得，或从下列各科植物中提取，包括但不限于番荔枝科、菊科 (*Asteraceae*)、紫葳科、使君子科、菊科 (*Compositae*)、大戟科、唇形科、樟科 (*Lauranceae*)、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。该无取代 B 环类黄酮可由高等植物属提取、浓缩和纯化，包括但不限于假鹰爪属、*Achyrocline*、木蝴蝶属、*Buchenavia*、香青属、山茱萸属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、*Baccharis*、乌柏属、黄芩属、*Molsa*、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

所述类黄酮存在于植物的不同部位中，包括但不限于茎、茎皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。于 2002 年 3 月 1 日递交的名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 Inhibitors”（无取代 B 环类黄酮作为有效的 COX-2 抑制剂的鉴定）的第 10/091,362 号美国申请记载了分离和纯化无取代 B 环类黄酮的方法。此处全文并入作为参考。

根据本发明方法可以应用的黄烷包括上述结构通式所示的化合物。本发明的黄烷可由合成方法获得，或从选自金合欢属植物的一种或多种植物中提取。在一个优选的实施方案中该植物选自以下组中：儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holosericea* 和马占相思。

所述黄烷存在于植物的不同部位中，包括但不限于茎、茎皮、干、主干树皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖

器官、叶及其他气生部分。于 2002 年 3 月 22 日递交的名为“Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor form Acacia”（从金合欢分离双重 COX-2 和 5 脂氧合酶抑制剂）的第 10/104,477 号美国申请记载了分离和纯化黄烷的方法。此处全文并入作为参考。

本发明的方法可用以治疗和预防许多肥胖相关的疾病和病症，包括但不限于由肥胖症、糖尿病及高血压引起的高脂血症、高胆固醇、动脉硬化、动脉粥样硬化、X 染色体综合征（代谢综合症）及全身性炎症。

本发明组合物可以本领域普通技术人员所知的任何方法给药。给药方式包括但不限于肠内（口服）给药、非胃肠道给药（静脉、皮下和肌肉内）给药和局部施用。本发明的治疗方法包括向有此需要的主体内服或外敷给药治疗有效量的合成和/或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物。在优选的具体实施方案中，以选自 0.01 到 200 mg/kg 体重的剂量给药所述组合物。

本发明采取一系列体内重量测定以及体外生物化学、细胞及基因表达筛查相结合的策略，以鉴定由于通常与体内脂质及脂肪含量的增加、代谢酶的酶活性、对 mRNA 基因表达的作用及脂肪生成有关从而能特异性地抑制果糖代谢的活性植物提取物。测定无取代 B 环类黄酮及黄烷以经口管饲法给药时抑制果糖诱导的肥胖症的能力。

实施例 1 描述设计用以测定无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物对增重的作用的试验，该增重由 3 周的补充果糖或脂肪的膳食所导致。结果如图 2 所示。参考图 2 可见，给予脂肪以及提取物的动物与那些仅给予脂肪而无提取物的动物体重增加约相同的量。然而，给予果糖以及提取物的小鼠与喂食正常膳食的对照组体重增量相当。这结果说明含有无取代 B 环类黄酮（HPLC 测定 60-90%）及黄烷（HPLC 测定 10-60%）混合物的组合物能有效预防由果糖消耗导致的增重过多。而且不受理论的限制，认为该结果归因于在脂肪生成途径中果糖的利用的变化。

实施例 2 描述设计以说明无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物对增重的作用的试验，该增重是由 8 周的补充果糖及葡萄糖的膳食所导致。结果如图 3 所示。参考图 3 可见，给予葡萄糖以及提取物的大鼠与那些仅给予葡萄糖而无提取物的动物的体重增加约相同的量。然而，给予果糖以及提取物的大鼠体重增量显著低于仅给予果糖而无提取物的大鼠的体重增量。给予蔗糖或商业果糖糖浆的大鼠在这项试验条件下显示出中等的增重（数据未出示）。

实施例 3 说明无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物对 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌浓度的作用。结果如图 4 所示。参考图 4 可见，提取物在从 2 至 $100\ \mu\text{g/mL}$ 浓度的宽范围内能显著减少分泌至细胞培养上清液中的 $\text{TNF}\alpha$ 。因为 $\text{TNF}\alpha$ 是肥胖症的标记，因此提取物由于能降低在致炎的炎性细胞（primed inflammatory cell）中的该促炎细胞因子，因而具有重大影响。

实施例 4 说明无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物对 IL-6 分泌浓度的作用。结果如图 5 所示。参考图 5，可以看出提取物在从 2 至 $100\ \mu\text{g/mL}$ 浓度的宽范围内能显著减少分泌至细胞培养上清液中的 IL-6。因为 IL-6 是肥胖症的标记，因此提取物由于能降低该促炎细胞因子，因而对致炎的炎性细胞具有重大影响。

破坏转录因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 可导致 $\text{TNF}\alpha$ 及 IL-6 减少，是因为两种基因启动子都被 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 激活。为了检验该假设，如实施例 5 所述评价无取代 B 环及黄烷的混合物对基因表达转录因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的作用。结果如图 6 所示，图 6 图示了作为提取物浓度的函数的相对 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 基因表达。如在图 6 中可见，在提取物浓度最高时 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的表达减量调节 2.7 倍。 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的少许变化便能高程度地减量调节其它基因的基因表达。

图 7 说明无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物对 $\text{TNF}\alpha$ 基因表达的作用。如图所示， $\text{TNF}\alpha$ 的相对基因表达在实施例 5 所述的条件下几乎被减量调节 10 倍。该结果以及由蛋白分析所发现的细胞因子减少都暗示 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 可

被无取代 B 环类黄酮/黄烷提取物抑制。

在果糖及葡萄糖代谢途径中有两种受无取代 B 环类黄酮/黄烷提取物作用的关键酶：醛缩酶 A 和醛缩酶 B。参考图 1 可见，醛缩酶 B 催化果糖-1-磷酸转化成甘油醛及二羟丙酮磷酸，醛缩酶 A 催化果糖-1,6-二磷酸转化成甘油醛-3-磷酸及二羟丙酮磷酸。丙糖异构酶催化二羟丙酮磷酸转化成甘油醛-3-磷酸，而丙糖激酶消耗一分子 ATP 催化甘油醛转化成甘油醛-3-磷酸，由此连接果糖催化及糖酵解途径。醛缩酶 B 不可商购获得，因此如实施例 6 所述，应用还可催化果糖-1,6-二磷酸转化成甘油醛-3-磷酸及二羟丙酮磷酸的醛缩酶 A 测定提取物在体外对这些酶的潜在作用。结果如图 8 所示，为各种抑制剂浓度下反应混合物的吸光度对时间的图。该图说明当提取物浓度增加时产物形成减少。该结果提示提取物可直接在果糖-1-磷酸向甘油醛和二羟丙酮磷酸的转化中抑制醛缩酶。因此，尽管不受理论限制，认为果糖催化途径中醛缩酶的抑制有利于能降低其膳食补充有果糖和提取物的小鼠的体重增加的机制。

实施例 7 描述用以测试提取物对人类减重有效性的人类临床试验。结果如图 9—13 所示。图 9 描述无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服给药 250mg 持续 90 天的 13 位个体的减重的效果。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。参考图 9 可见，在每日 250mg 剂量下观察到 90 天后试验中留下的 14 位个体中的 13 位体重显著减轻。仅一位受试者（4 号受试者）的体重未减轻。第 0 天与第 90 天体重数据的偏差具有统计学显著性， $p < 0.001$ 。

图 10 说明无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服给药 500mg 持续 90 天的 13 位个体减重的效果。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。如图 10 所示，当剂量增加至 500mg 每日时，体重减轻显示不同的特征。具有高 BMI 的受试者相对那些 BMI 低的受试者倾向于减少更多的重量。在某些情况下出现分化（stratification），体重

较低的受试者或不减重或甚至增重（见受试者 3、15、43 和 47）。13 位受试者完成了该研究。该数据的统计学显著性为 $p < 0.011$ 。

图 11 描述向 13 位个体口服给药安慰剂 90 天的体重减轻效果。在每次测量时计算每个受试者的个体体重（开始及最后）。如在该图中可见，安慰剂组中 13 位完成该试验的受试者的体重变化非常小。

图 12 图示了无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对每日口服给药 250mg 和 500mg 的个体相对安慰剂在第 30 天和 90 天的 BMI 的作用。如在图 12 中可见，当以所有 3 组的平均 BMI 值绘图时，可以观察到显著性差异。每日 250mg 剂量对安慰剂的 $p < 0.075$ ，而每日 500mg 剂量的 $p < 0.005$ 。组间分析显示每日 250mg 剂量的 $p < 0.004$ ，每日 500mg 剂量的 $p < 0.051$ 。

图 13 图示了无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物相对于安慰剂在第 0、30 及 90 天时对每日口服给药 250 和 500mg 的个体的血糖变化的作用。因此，除了体重降低及 BMI 的有利变化，每日 250mg 和 500mg 剂量组的血糖水平下降，且后一组变化最大。然而接受安慰剂的那些的血糖水平在试验期间相对不变。禁食血清葡萄糖（fasting serum glucose）数据相对基线数据显示具有显著性差异，每日 500mg 剂量的 $p < 0.018$ ，每日 250mg 剂量的 $p < 0.014$ 。禁食血清葡萄糖数据相对基线数据显示具有显著性差异，每日 500mg 剂量的 $p < 0.018$ ，每日 250mg 剂量的 $p < 0.014$ 。

如实施例 8 及 9 所述，应用两种不同方法以 HPLC 分析进行无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物的纯度及质量鉴定。结果如图 14 及 15 所示。参考图 14 可见，HPLC 分析后测量得无取代 B 环类黄酮（主要是贝加因和贝加灵）的洗脱面积 $> 60\%$ 的总洗脱面积。应用如实施例 9 所述的方法，因为黄烷具有较低的总吸附能力，将约 3 倍多的提取物载入 HPLC 色谱柱并于等度条件下洗脱。参考图 15，HPLC 分析后测量得黄烷（儿茶素和表儿茶素）的洗脱面积 $> 10\%$ 的总洗脱面积。

用小鼠检验慢性和急性给药含高浓度的无取代 B 环类黄酮（HPLC 测定 $60\% - 90\%$ ）及黄烷（HPLC 测定 $10\% - 60\%$ ）的单独标准化的提

取物以及含无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物的结合的提取物的毒性。慢性给药治疗方案中，小鼠经管饲法以每日剂量 90mg/kg（相当于人类每日剂量 500mg）、450mg/kg（相当于每日剂量的 5 倍）及 900mg/kg（相当于每日剂量的 10 倍）喂食试验品。就体重增加、外观特征及行为而言，经治疗小鼠未显示出副作用。总体尸检结果显示无器官异常，胃及肝脏两者的组织学显示与未经治疗的对照小鼠相比无差异。测量电解质、血红蛋白、血液酶（blood enzymes）及肝脏酶（liver enzymes）的全血检查（full blood work）与未经治疗大鼠相比未显示任何异常。

急性给药试验方案中，给药 2 克/千克（相当于每日剂量的 20 倍）含高浓度无取代 B 环类黄酮（HPLC 测定 60%—90%）及黄烷（HPLC 测定 10%—60%）的单独标准化的提取物以及含无取代 B 环类黄酮及黄烷混合物的结合的提取物。经治疗大鼠的体重增加、外观、行为、总体尸检的器官外观、胃和肝脏的组织学或血液检查未出现异常。

基于无取代 B 环类黄酮及黄烷直接抑制糖诱导的肥胖症的能力，以及它们基因组地（genomically）减少 NF κ B——调节肥胖症的促炎细胞因子标记 TNF α 及 IL-6 的关键转录因子——的活性，本文所述的组合物能有效地抑制体重增加、糖基脂肪生成及全身性炎症。此外，无取代 B 环类黄酮及黄烷直接抑制能将果糖-1-磷酸转化成甘油醛和二羟丙酮磷酸的醛缩酶的能力将导致供给再次和果糖诱导的脂肪生成中用于合成脂肪的底物的数量减少。

下述实施例用于举例说明的目的，并非意图限制本发明的范围。

实施例

实施例 1 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对三周的补充果糖或脂肪的膳食导致的增重的作用

应用含有 80: 20 比例（无取代类黄酮：黄烷）的从黄芩分离得到的无取代 B 环类黄酮及从儿茶分离得到的黄烷的确定的植物提取物研究包

含无取代 B 环类黄酮及黄烷的组合物对体重增加的作用。该组合物如于 2003 年 4 月 30 日提交,序列号为 10/427,746,名为“Formulation With Dual Cox-2 And 5-Lipoxygenase Inhibitory Activity,”(具有双重 Cox-2 及 5-脂肪氧合酶抑制活性的制剂)的美国申请所述配制,该申请全文已于此处并入作为参考。

向六周龄 ICR 雌性小鼠(每试验组 10 只)(Harlan Laboratories)经管饲入 100mg/kg 治疗剂量的在水中的提取物。一组小鼠给予正常膳食并给予 65%的果糖溶液作为它们的饮用水,随意饮用。第二组小鼠给予补充脂肪的膳食并随意进食。两试验组分别给予 65%果糖至其水中(无提取物)或它们的膳食随意补充脂肪(无提取物)。结果如图 2 所示。

实施例 2 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对补充果糖或葡萄糖达八周的膳食导致的增重的作用

以大体与如实施例 1 所述相同的方式进行本试验,采用作为试验受试者的六周龄 ICR 雌性小鼠(每试验组 10 只)(Harlan Laboratories)以及如于 2003 年 4 月 30 日提交,序列号为 10/427,746,名为“Formulation With Dual Cox-2 And 5-Lipoxygenase Inhibitory Activity,”(具有双重 Cox-2 及 5-脂肪氧合酶抑制活性的制剂)的美国申请所述配制的无取代 B 环类黄酮:黄烷的 80:20 混合物,该申请已于此处全文并入作为参考。结果如图 3 所示。

参考图 3 可见,“对照”组喂食如卖主建议的平衡膳食。第二“对照”组也经管饲入给予 100mg/kg 的提取物。两试验组接受对照膳食加随意添至水里的 65%果糖。这些组中的其中一组每日经管饲入 100mg/kg 的提取物。最后两组试验组接受对照膳食加随意添至水里的 65%葡萄糖。这些组中的其中一组每日经管饲入 100mg/kg 的提取物。八周后,绘制平均体重图,平均标准偏差于图上显示。

实施例 3 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对 TNF α 浓度的作用

采用 Histopaque gradient (Sigma) 分离人类献血者的外周血单核细胞 (PBMC)。然后于各种浓度的 80: 20 无取代 B 环类黄酮: 黄烷提取物存在下在 1 小时的温育中诱导炎症之前, 将该细胞在用 10mg/mL 脂多糖 (LPS) 处理以于补充 1% 牛血清清蛋白的 RPMI 1640 中培养约 12 小时。结果如图 4 所示。

实施例 4 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对 IL-6 浓度的作用

采用 Histopaque gradient (Sigma) 分离人类献血者的外周血单核细胞 (PBMC)。然后在用 10 μ g/mL 脂多糖 (LPS) 处理以在各种浓度的 80: 20 无取代 B 环类黄酮: 黄烷提取物存在下于六小时的温育中诱导炎症之前, 将该细胞于补充 1% 牛血清清蛋白的 RPMI 1640 中培养约 12 小时。结果如图 5 所示。该提取物在从 2 至 100 μ g 宽浓度范围内能显著减少分泌至细胞培养上清液中的 IL-6。由于 IL-6 是肥胖症标记, 所以该提取物由于能减少在致炎的炎性细胞中的促炎细胞因子, 因而具有重大的影响。

实施例 5 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对转录因子 NF κ B 基因表达及 TNF α 基因表达的作用

用 1mg/mL LPS 诱导 PBMC 18 小时, 并与数量递增的无取代 B 环类黄酮: 黄烷提取物共同培养。然后 RNA 经分离 (Qiagen)、逆转录至 DNA, 并且采用 TaqMan 系统及定量 PCR (ABI) 中用于 NF κ B 及 TNF α 两者的预验证引物 (pre-Validated) 进行 PCR。在 0-100 μ g/mL 提取物存在下测量相对基因表达。结果如图 6 及 7 所示。

实施例 6 无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物对醛缩酶 A 的作用

在 25 $^{\circ}$ C 下, 将 1 单位/ μ L 的醛缩酶 A (Sigma) 加入 4mM 果糖-1-

磷酸在含有 100 μ M EDTA 及 3.5mM 硫酸胍且 pH 为 7.5 (Jagannathan 等 (1956) *Biochem. J.* 63:94-105) 以及提取物浓度范围为 0 到 65 μ g/mL 的缓冲液中的溶液内。反应由酶的加入引发, 并于 240nm 监测反应 10 分钟。结果如图 8 所示, 其为在多种抑制剂浓度下反应混合物吸光度对时间的作图。

实施例 7 无取代 B 环类黄酮及黄烷提取物对人类体重减轻的作用

在不同的三组中对每组 15 位受试者进行 90 天、经 IRB 审查的、双盲、安慰剂对照试验: 1) 安慰剂; 2) 每日 250mg (125mg 一日二次给药); 以及 3) 每日 500mg (250mg 一日二次给药)。受试者的年龄及性别相当。向受试者口服给药密封的丸药 (concealed pill) 形式的安慰剂或提取物, 并且于第 0、30、60 及 90 天测定他们的体重、BMI 及血糖水平。未向患者提供任何关于他们正在接受减肥产品或他们应该改变他们的饮食或活动习惯的建议。结果如图 9—13 所示。

实施例 8 以反相高效液相色谱法 (HPLC) 对无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物的定量 (方法 1)

将无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物 (20mL 1.13mg/mL 标准化的提取物) 在 80%: 20% 的甲醇: 四氢呋喃中的溶液装至 Phenomenex Luna C-18 色谱柱 (250 \times 4.6mm, 5mm 粒度), 在 35 $^{\circ}$ C 下, 以 1.0mL/min 流速、线性 80%A 到 20%A (A=0.1% (v/v) 磷酸; B=乙腈) 的梯度洗脱 19 分钟。如在图 14 中可见, 在这些条件下, 无取代 B 环类黄酮 (贝加因及贝加灵) 作为主峰在 11 至 14 分钟间洗脱, 而黄烷 (儿茶素及表儿茶素) 作为次要峰在约 3 至 5 分钟间洗脱。通过测量每条曲线下的面积及与已知标准品进行比较对无取代 B 环类黄酮及黄烷定量。

实施例 9 以反相等度 HPLC 对无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物的定量

(方法 2)

将无取代 B 环类黄酮与黄烷的混合物 (20mL 3.55mg/mL 标准化的提取物) 在 80%: 20% 的甲醇: 水中的溶液装至 Phenomenex Luna C-18 色谱柱 (250×4.6mm, 5mm 粒度), 在 35°C 下以 1.0mL/min 流速、80%A (A=0.1% (v/v) 磷酸; B=乙腈) 等度洗脱。如在图 15 中可见, 在这些条件下, 两种黄烷 (儿茶素及表儿茶素) 于 4.5 至 5.5 分钟间洗脱, 而无取代 B 环类黄酮 (贝加因及贝加灵) 作为主峰在 12 至 13.5 分钟间洗脱。黄烷峰的定量如实施例 8 所述进行。

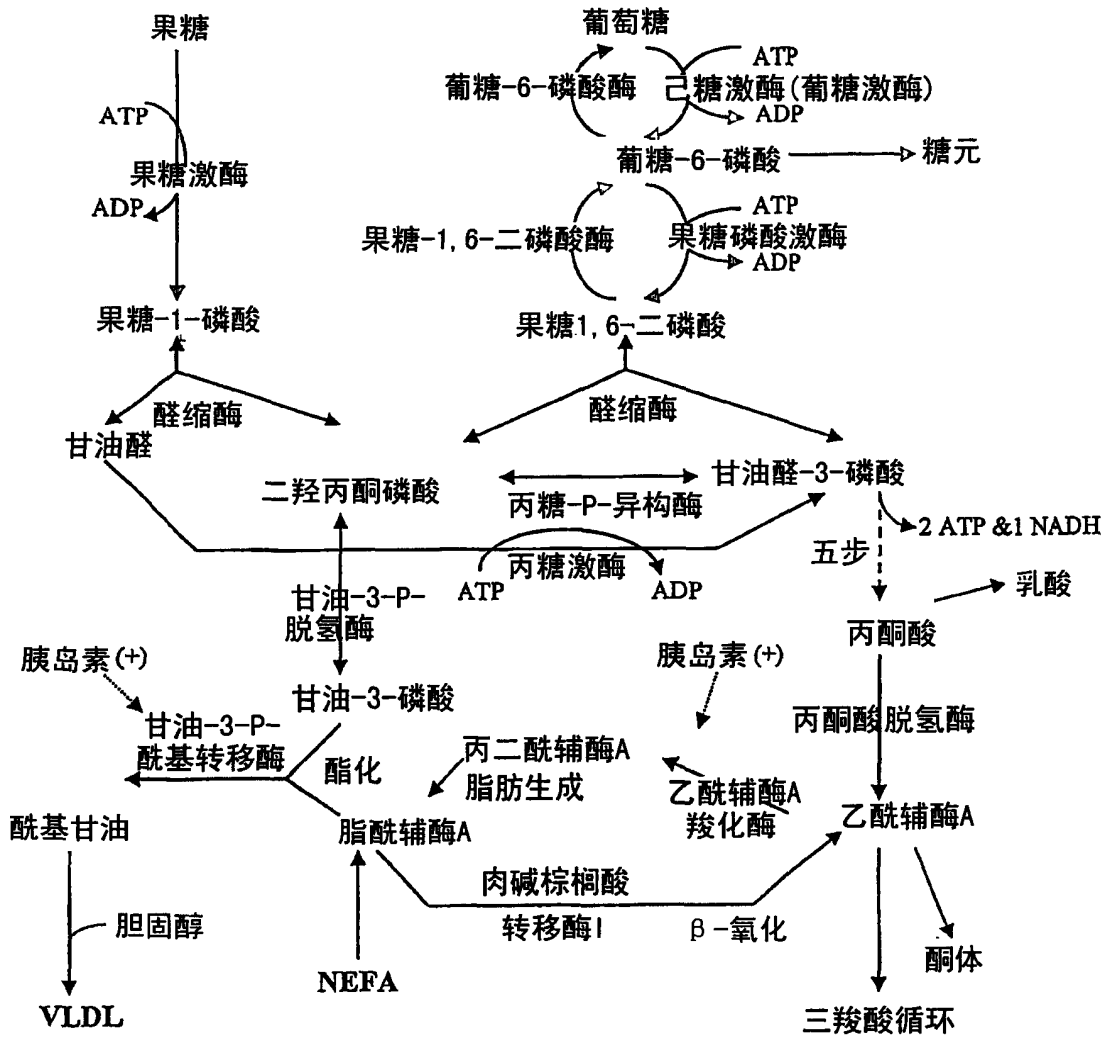


图1

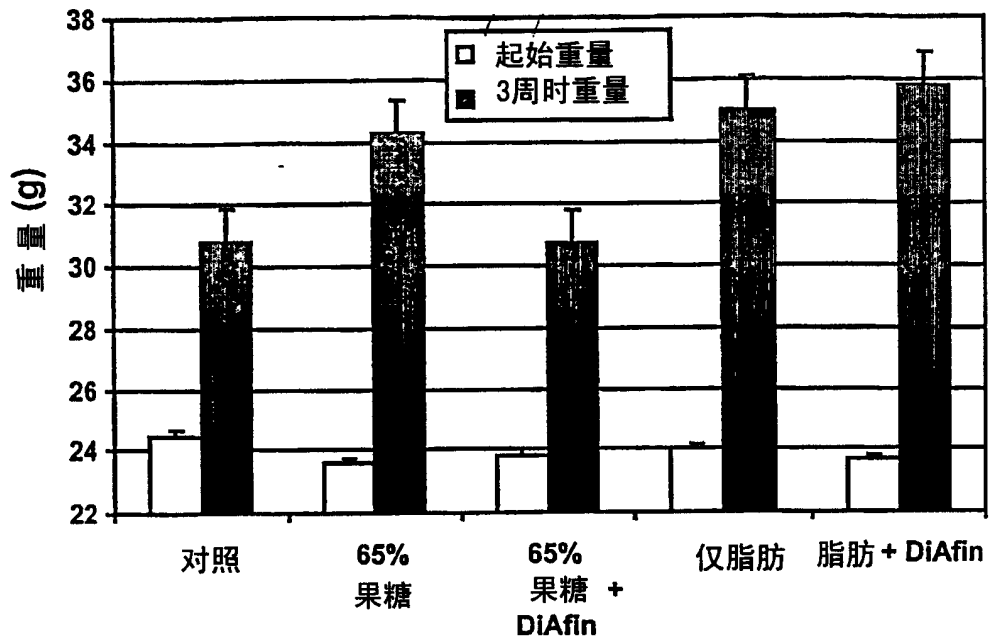


图2

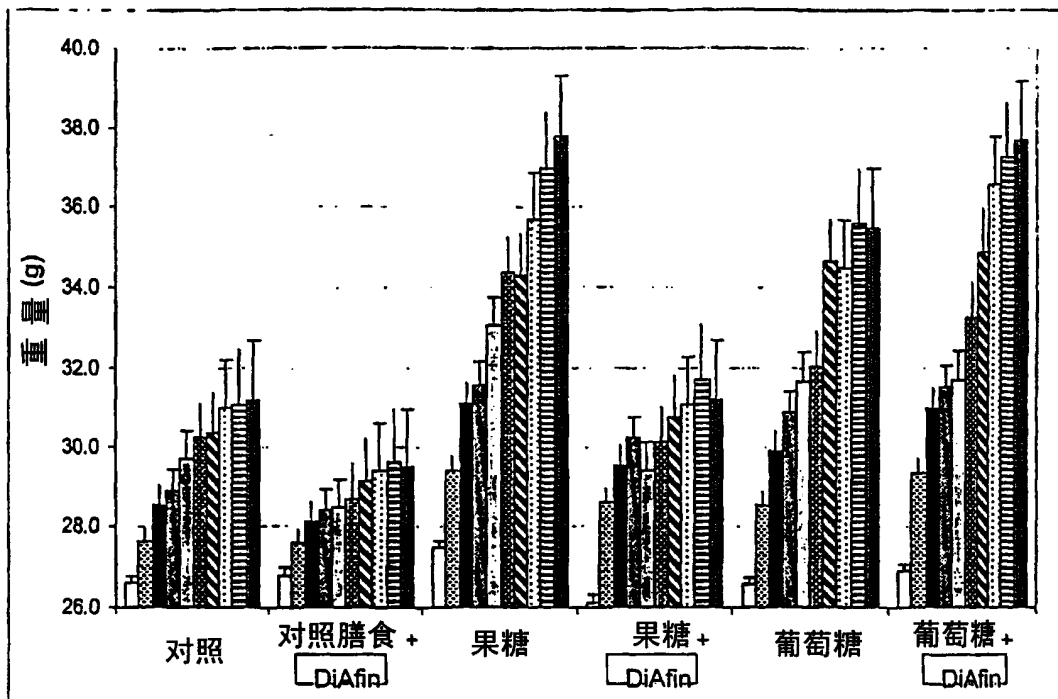


图3

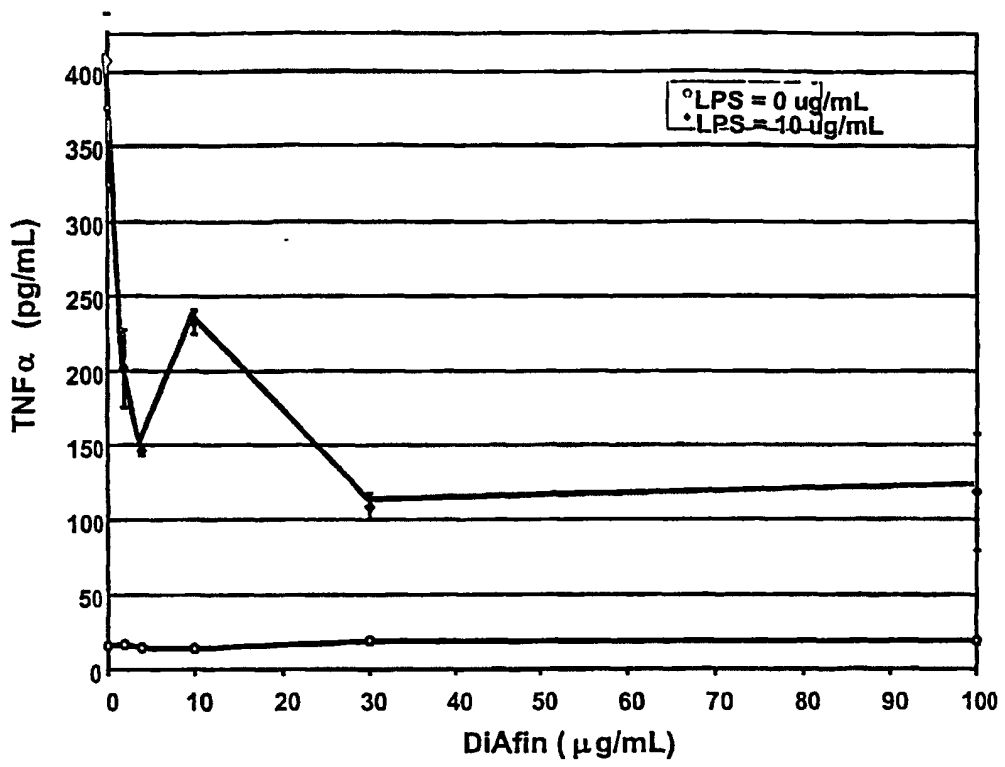


图4

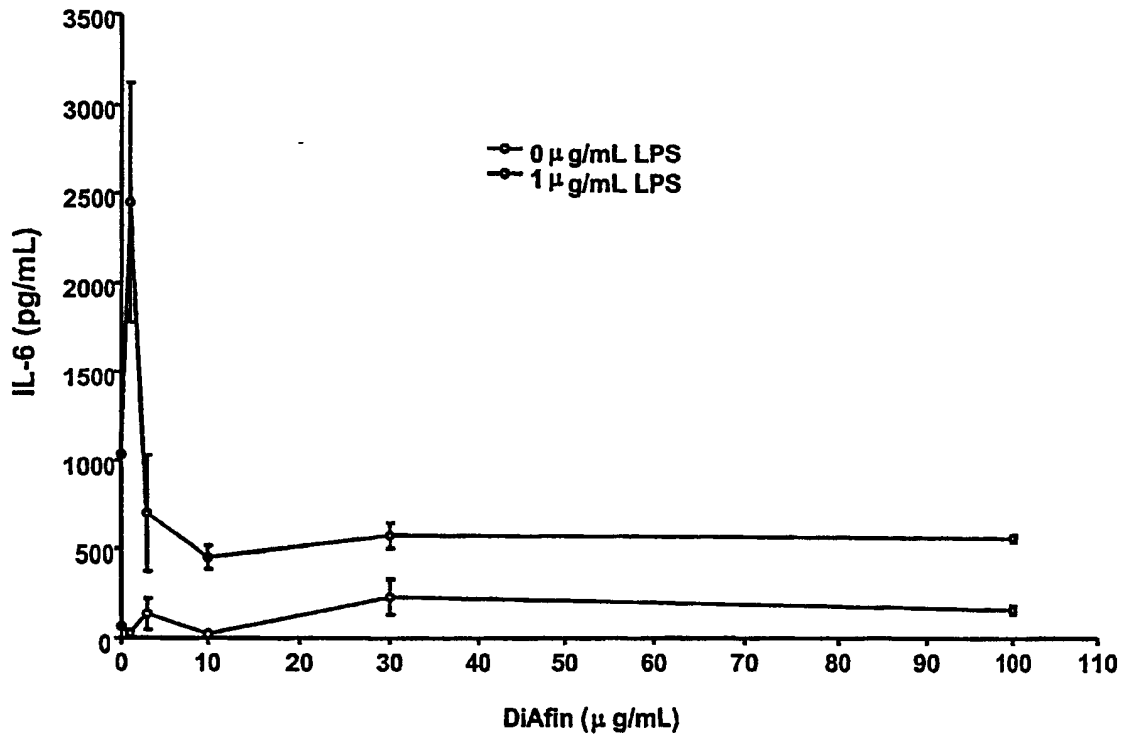


图5

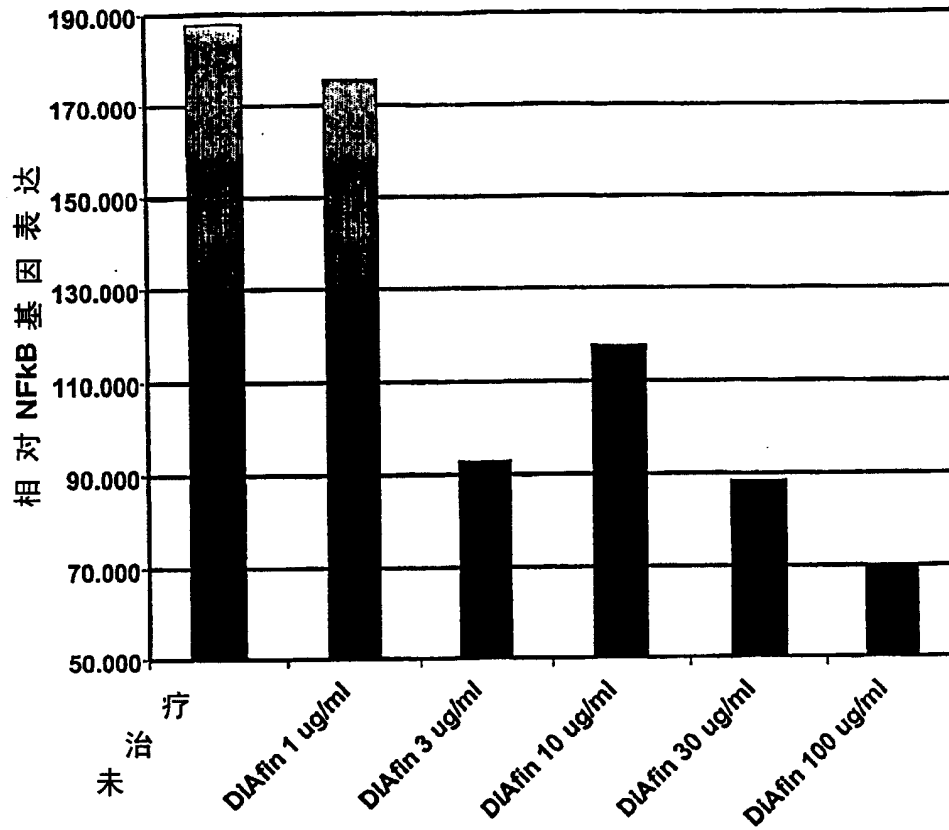


图6

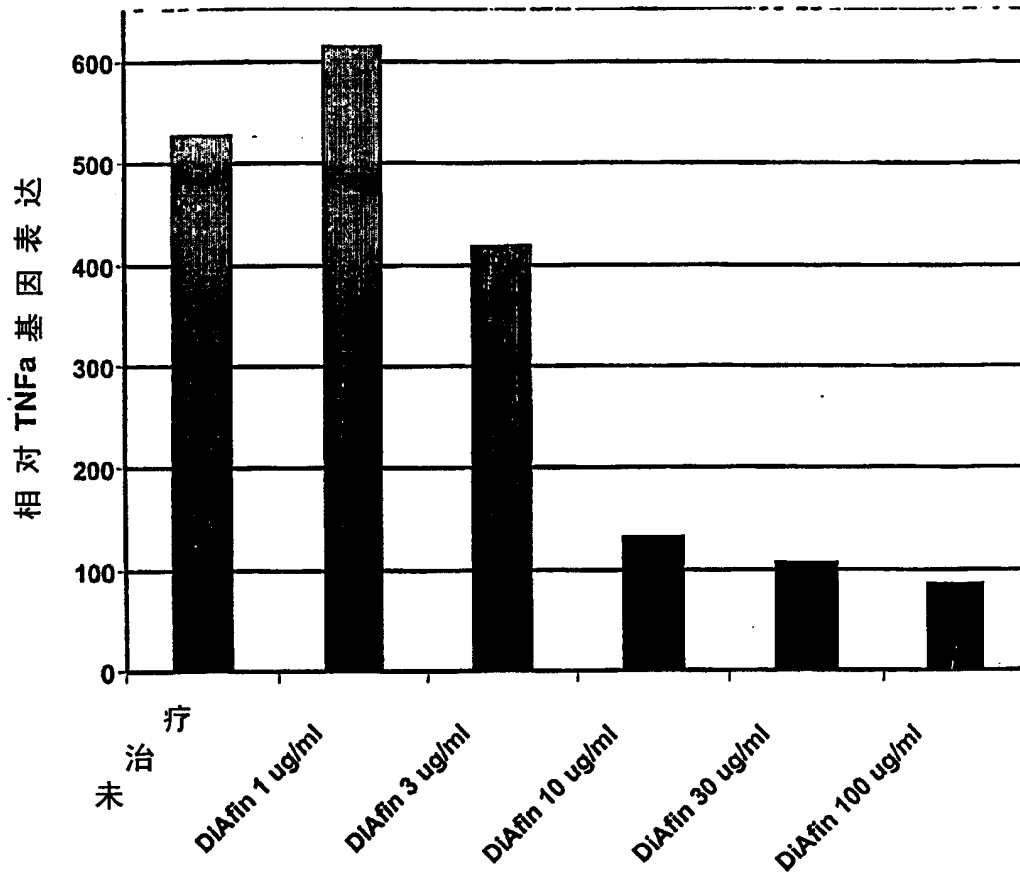


图7

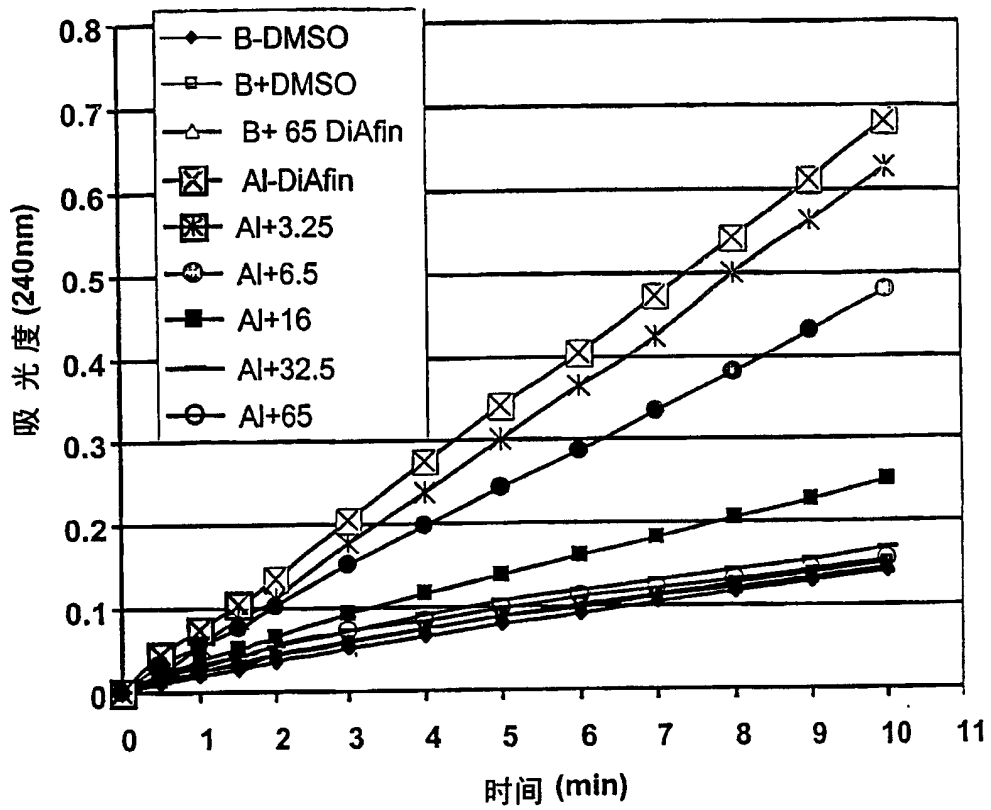


图8

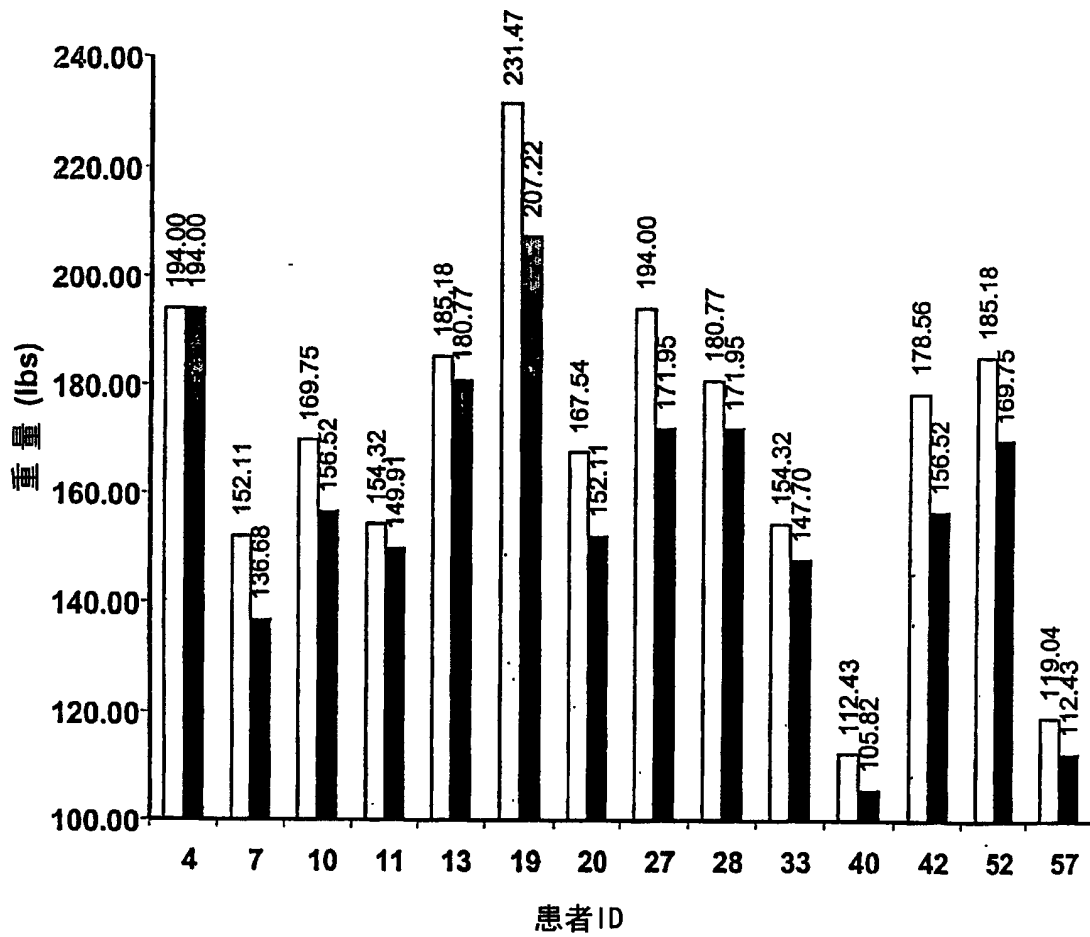


图9

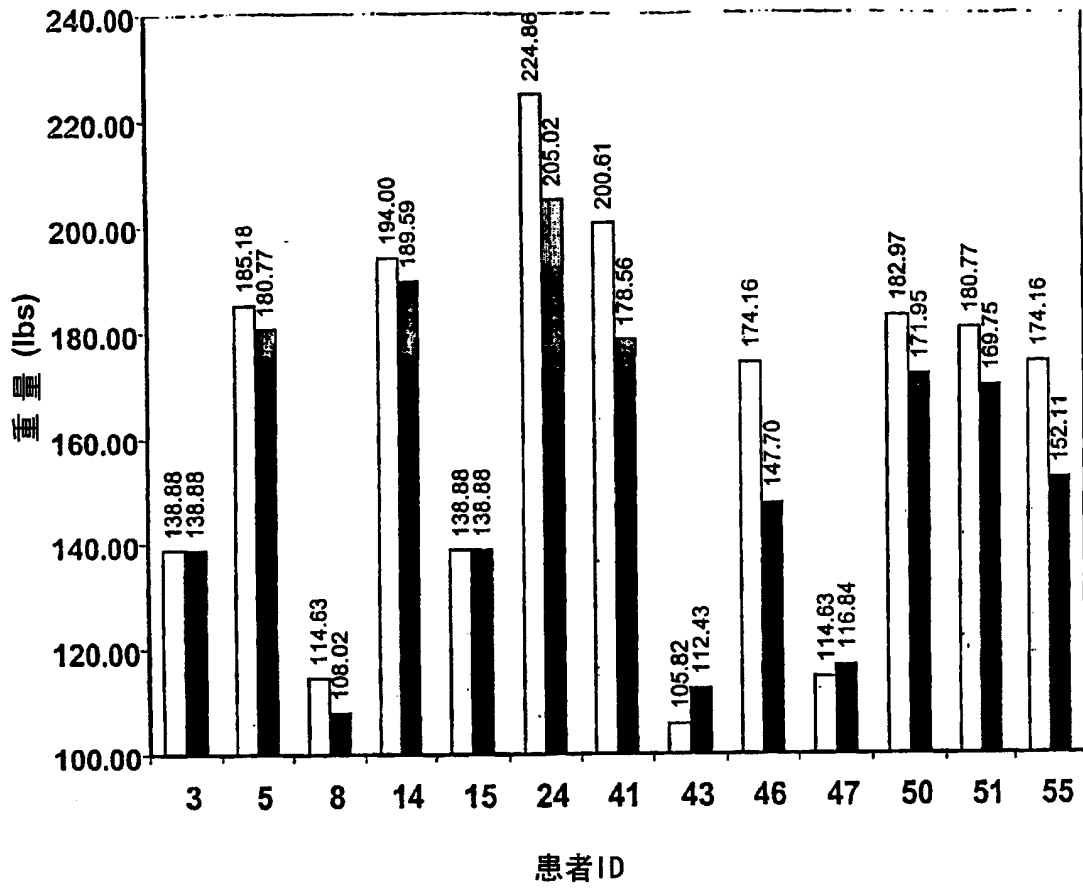


图10

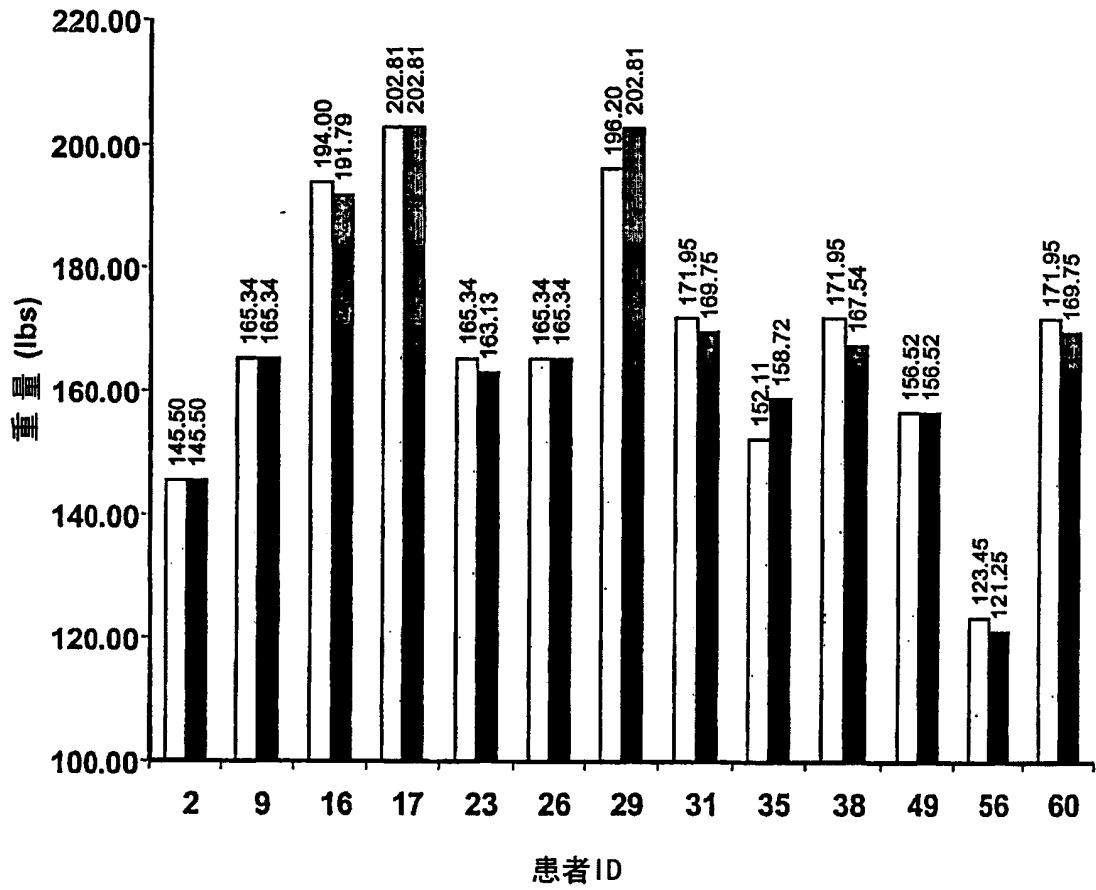


图 11

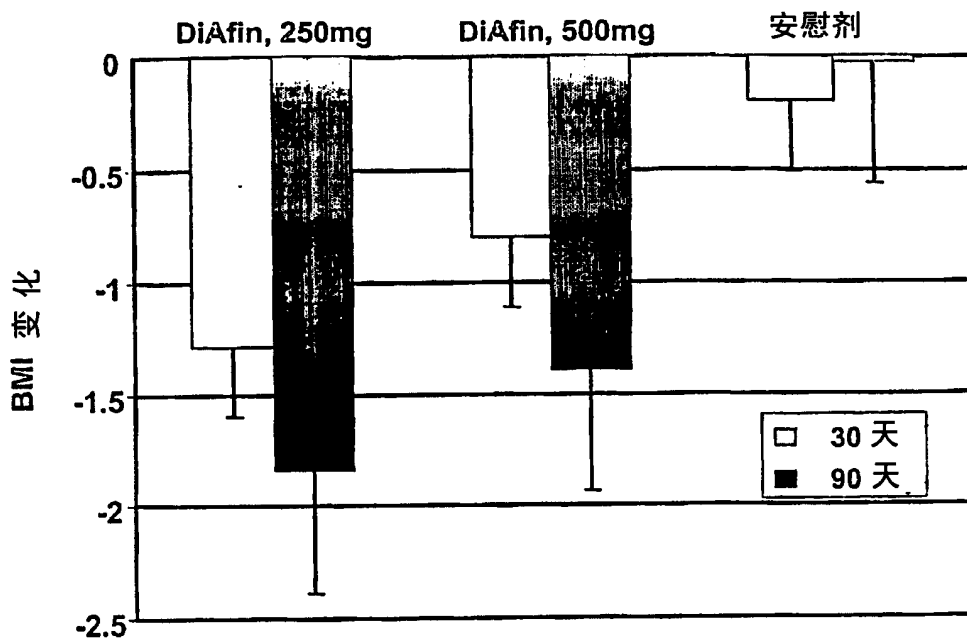


图12

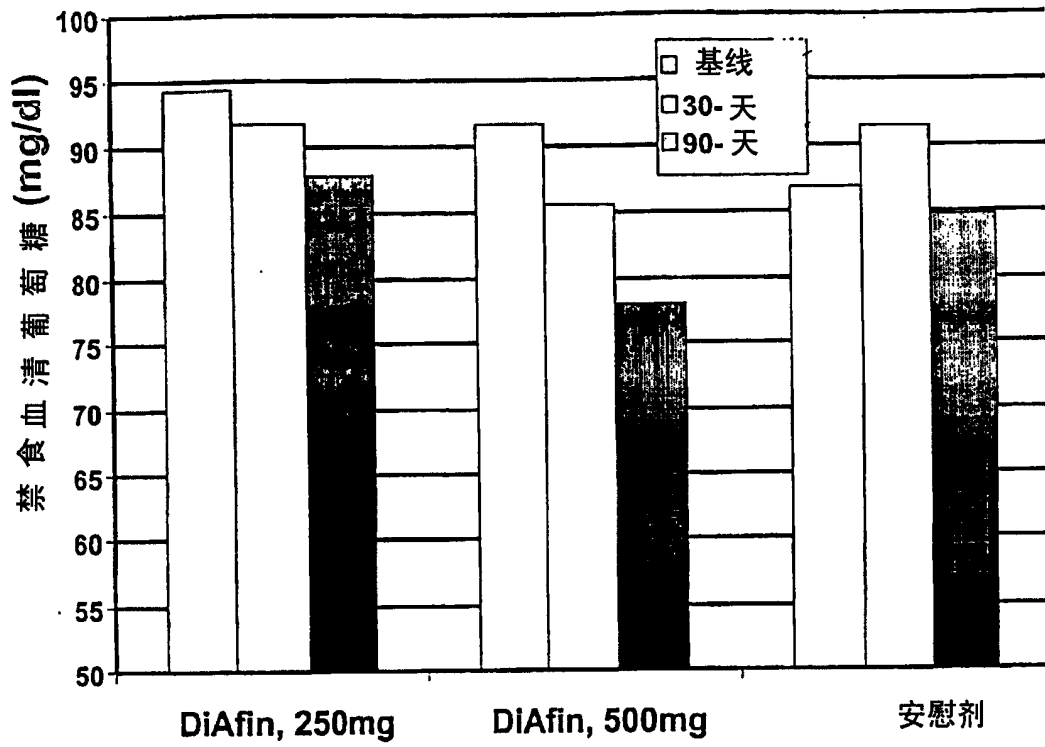


图13

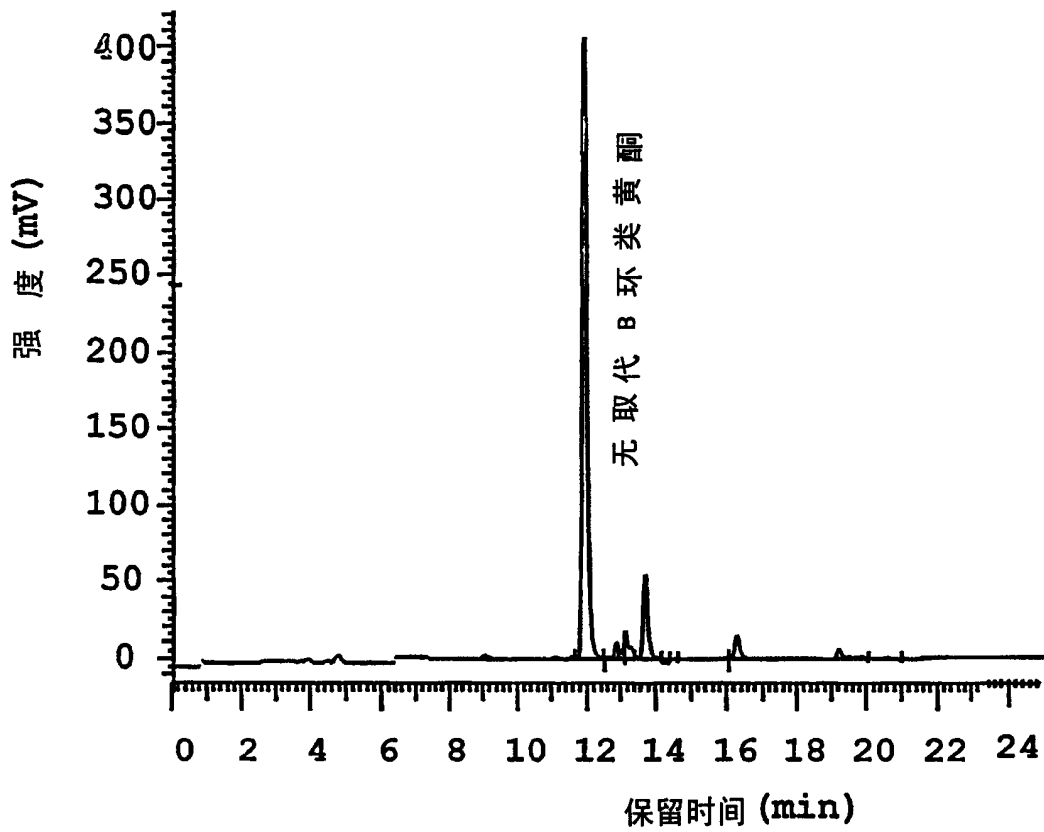


图14

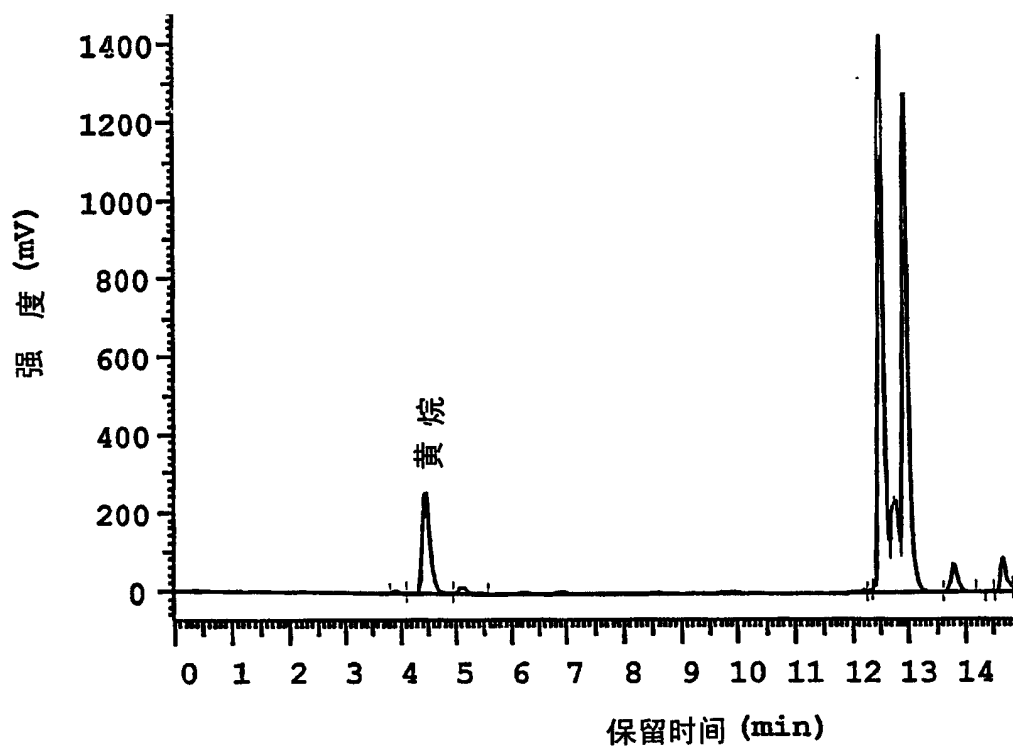


图15