

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101346138 B

(45) 授权公告日 2013.03.13

(21) 申请号 200680048821.6

A23L 1/30(2006.01)

(22) 申请日 2006.12.20

A61K 47/12(2006.01)

A61K 47/14(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/24(2006.01)

P-200503202 2005.12.21 ES

A61P 25/16(2006.01)

P-200602417 2006.09.25 ES

A61P 25/28(2006.01)

P-200602418 2006.09.25 ES

A61P 27/12(2006.01)

P-200603231 2006.12.20 ES

A61P 9/10(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 9/02(2006.01)

2008.06.23

(56) 对比文件

(86) PCT申请的申请数据

WO 2005013908 A2, 2005.02.17,

PCT/EP2006/070016 2006.12.20

WO 03068216 A1, 2003.08.21,

(87) PCT申请的公布数据

EP 1247523 A1, 2002.10.09,

WO2007/071733 EN 2007.06.28

WO 9828978 A1, 1998.07.09,

(73) 专利权人 布鲁迪科技有限公司

WO 2004112776 A2, 2004.12.29,

地址 西班牙巴塞罗那

审查员 肖西祥

(72) 发明人 J·C·多明果佩罗

J·A·威勒盖斯加西亚

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

A61K 31/202(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 30 页

(54) 发明名称

DHA、EPA 或 DHA 衍生的 EPA 用于治疗细胞氧化损伤相关疾病的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种富含二十二碳六烯酸 (DHA) 或二十碳五烯酸 (EPA) 或 DHA 衍生的 EPA 的酸用于制备一种药物的用途,所述药物用于治疗与氧化损伤相关的病变。具体而言,所述药物用于治疗与神经变性性疾病、眼部疾病、缺血性疾病和炎症疾病相关的病变、与动脉粥样硬化相关的病变、与 DNA 氧化损伤相关的病变和与体育锻炼相关的病变。

1. 二十二碳六烯酸 (DHA) 或二十碳五烯酸 (EPA) 用于制备治疗细胞氧化损伤的药物组合物的用途,其特征在于

所述二十二碳六烯酸或二十碳五烯酸被掺入到甘油酯中;

其中所述掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 是通过酶学方法获得的,并且所述 DHA 或 EPA 分子保留有双键;

并且其中所述 DHA 或 EPA 占总脂肪酸的重量百分数为 40%-100%,或者所述 DHA 或 EPA 结合到甘油酯的 sn-2 位上。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述细胞氧化损伤与下列病症或状况相关:

a) 一种选自衰老、体育锻炼、体育锻炼期间或之后的低血糖的生理状况;或

b) 一种选自神经变性疾病、眼部疾病、缺血性疾病、炎性病变、动脉粥样硬化的疾病;其中所述神经变性疾病选自多发性硬化、阿耳茨海默氏病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化和肌肉萎缩症;其中所述眼部疾病选自色素性视网膜变性、黄斑变性和白内障;其中所述缺血性疾病选自心肌梗塞和脑梗塞;并且其中所述炎性病变选自关节炎、血管炎、肾小球肾炎和红斑狼疮。

3. 掺入到甘油酯中的二十二碳六烯酸 (DHA) 或二十碳五烯酸 (EPA) 用于制备作为细胞抗氧化剂的治疗或非治疗性组合物或食品的用途,

其中所述掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 是通过酶学方法获得的,并且所述 DHA 或 EPA 分子具有双键;

并且其中所述 DHA 或 EPA 占总脂肪酸的重量百分数为 40%-100%。

4. 掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 用于制备作为抗衰老剂的治疗或非治疗性组合物或食品的用途,

其中所述掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 是通过酶学方法获得的,并且所述 DHA 或 EPA 分子具有双键;

并且其中所述 DHA 或 EPA 占总脂肪酸的重量百分数为 40%-100%。

5. 掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 用于制备作为体育锻炼的个体的运动绩效增强剂的治疗或非治疗性组合物或食品的用途,

其中所述掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 是通过酶学方法获得的,并且所述 DHA 或 EPA 分子具有双键;

并且其中所述 DHA 或 EPA 占总脂肪酸的重量百分数为 40%-100%。

6. 掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 用于制备在体育锻炼过程中维持个体体内的血糖水平的治疗或非治疗性组合物或食品的用途,

其中所述掺入到甘油酯中的 DHA 或 EPA 是通过酶学方法获得的,并且所述 DHA 或 EPA 分子具有双键;

并且其中所述 DHA 或 EPA 占总脂肪酸的重量百分数为 40%-100%。

7. 权利要求 3-6 任一项的用途,其中所述用途被用在食品工业中。

8. 权利要求 3-7 任一项的用途,其中所述用途被用在乳制品中。

9. 权利要求 5-6 任一项的用途,其中将所述 DHA 或 EPA 通过一种合适的方法给予,所述方法选自用在体育锻炼之前、期间和之后的任何特征的饮料;补充能量的棒;增进机能的棒;用作食物的固体和制品;饮食补充物和多维生素制品;增进机能的辅助手段;带有用于

皮肤吸收的纳米微囊剂的纺织品,以及其他任何合适的给予方法。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述饮食补充物和多维生素制品的形式为胶囊、片剂、丸剂、冻干形式,或者任何合适的给予形式。

11. 权利要求 1-2 任一项的用途,其中所述细胞氧化损伤包括活性氧簇 (ROS) 的产生。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述 ROS 为超氧阴离子。

13. 权利要求 1-2 任一项的用途,其中所述细胞氧化损伤包括 DNA 端粒的缩短。

14. 权利要求 1-2 任一项的用途,其中所述细胞氧化损伤包括过早性细胞衰老。

DHA、EPA 或 DHA 衍生的 EPA 用于治疗细胞氧化损伤相关疾病的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种富含二十二碳六烯酸 (DHA) 或二十碳五烯酸 (EPA) 或 DHA 衍生的 EPA 的酸用于制备一种药物的用途,所述药物用于治疗与氧化损伤相关的病变。

背景技术

[0002] ω -3 脂肪酸是维持细胞功能完整性所必需的,并且通常是人类健康所必需的。二十二碳六烯酸 (22 :6 n-3, DHA)——鱼油和海藻中的一种重要的 ω -3 组分——主要存在于脑中,以及视网膜的光感受器和突触中。富含 DHA 的饮食最初由肝脏代谢,然后经由血液中脂蛋白进行分布以满足各个器官的需要。给予 DHA 会导致其在组织水平上的浓度增加,还会导致与其代谢相关的 ω -3 二十碳五烯酸 (EPA) 浓度的增加,而给予 EPA 仅会在细胞水平上增加其自身浓度并降低 DHA 浓度。

[0003] 通常,将 DHA 掺入到细胞膜的磷脂中,这会影响细胞膜的组成和功能、影响活性氧簇 (ROS) 的产生、影响膜脂质的氧化、影响转录调控、影响类花生酸的生物合成并且影响细胞内信号转导。此外,在中枢神经系统中, DHA 涉及与记忆相关的学习能力的发育、涉及膜的应激功能、涉及感光细胞的生物发生并且涉及依赖于激酶蛋白 (kinase protein) 的信号转导。一种潜在饮食疗法的基础是修正 ω -3 脂肪酸的最适浓度以防止某种疾病的发生或发展,例如炎性疾病、肿瘤病变、心血管疾病、抑郁和神经障碍。

[0004] 在中枢神经系统中,脑和视网膜都显示出不同寻常的保留 DHA 的能力,甚至是在较长期食用缺乏 ω -3 脂肪酸的饮食的情况下。几项研究已经描述了 DHA 对神经元的保护作用,其中 DHA 以非常高的浓度存在。例如, DHA 涉及保护神经元细胞免遭由细胞凋亡导致的死亡。最近已经证明了 DHA (发现 DHA 在年长大鼠海马内含量会有所下降) 能够保护所述细胞的原代培养物抵御谷氨酸盐产生的细胞毒性。

[0005] 在视网膜的光感受器中,还已经证明了 DHA 可调节 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的水平。视网膜光感受器的外部区段含有视紫红质,并且具有比其他任何类型细胞都要高的 DHA 含量。DHA 集中于光感受器节段外膜 (segment disc's outer membrane) 的磷脂中。在降低最佳 DHA 浓度的情况下,观察到了视网膜功能障碍。视网膜色素上皮细胞 (RPE) 在 DHA 的吸收、贮留和转运中起到了非常积极的作用。光感受器和 RPE 细胞中高含量的 DHA 主要以如下生理特性与膜中的结构域相关联,其生理特性是有助于调节受体、离子通道、载体等,同时 DHA 似乎还可调节磷脂酰丝氨酸的浓度。

[0006] 目前尚不清楚这些作用完全是由 DHA 自身介导的还是由任何代谢衍生物介导的。已经在视网膜中鉴别出了某些 DHA 衍生物。尽管涉及所述衍生物合成的酶还没有被准确鉴别出来,但是最近的一些研究结果表明 A2 磷脂酶 (PLA₂) 和脂氧合酶 (LOX) 先后参与了所述合成过程。PLA₂ 将 DHA 从膜磷脂上释放出来, LOX 将 DHA 转化成其代谢活性衍生物。

[0007] 活性氧簇 (ROS) 是在行使正常细胞功能的过程中产生的。ROS 包括超氧阴离子、过氧化氢和 oxydril 自由基。它们的高化学反应性导致了蛋白、DNA 或脂质的氧化。超氧化

物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 是主要的抗氧化酶, 这些酶可抵御由于 ROS 的存在所导致的分子和细胞损伤。氧化应激激活了许多代谢通道; 其中一些是细胞保护性的, 而另一些会导致细胞死亡。最近的研究表明 ROS 的产生与降解之间的不平衡在许多疾病的发病机制中是一个显著的危险因素, 这种不平衡在某些情况下与上述抗氧化系统衰退相关。

[0008] DHA 是 ROS 的靶标, 所述 ROS 会对光感受器细胞和 RPE 造成损伤。光诱发的视网膜变性会促进光感受器中的 DHA 丧失。例如, 当 RPE 细胞损伤或死亡时, 光感受器功能就会退化, 因为 RPE 细胞是光感受器存活所必需的。因此, 氧化应激作用下的 RPE 细胞死亡会导致视力退化, 特别是当黄斑细胞受到影响时, 因为黄斑细胞决定了视力敏度。许多视网膜变性 (例如与年龄相关的黄斑变性和与眼底黄色斑点症相关的黄斑变性) 的病理生理学涉及会导致 RPE 细胞凋亡的氧化应激。事实上, RPE 细胞凋亡似乎是所观察到的与年龄相关的黄斑变性的主要因素。这类研究表明所述细胞已经发展出了高度有效的抗氧化机制 (利用高含量的 DHA) 以保护它们自己并且显示出显著的适应能力。

[0009] 此外, 自由基和衰老之间的关系已被十分普遍地接受了, 所根据的证据是无氧呼吸过程中产生的自由基会导致氧化损伤, 所述氧化损伤会积累并导致稳态机制的逐渐丧失、对基因表达模式的干扰以及细胞功能的丧失, 导致衰老和死亡。氧化剂的产生、抗氧化剂的保护作用和对氧化损伤的修复之间存在相互联系。已经进行了许多研究来确定抗氧化剂防护是否会随年龄增长而下降。这些研究包括对其主要组分的分析: SOD、CAT、GPx 酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽-S-转移酶的活性或表达, 以及具有抗氧化剂特性的低分子量化合物的浓度。例如, 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 体内 SOD 和 CAT 的过表达会将预期寿命增加 30% 并且降低蛋白质氧化导致的损伤。在上下文中, 在体外和体内将表皮组织暴露于 UV 线之下会产生自由基以及其他活性氧簇, 导致细胞氧化应激, 已经证明这会明显促进衰老。使皮肤过多暴露于紫外线辐射之下会导致急性或慢性损伤。在急性情况下, 会产生红斑或烧伤, 而慢性的过度暴露会增加患皮肤癌和衰老的风险。此外, 已知表皮细胞会通过增加各种蛋白的表达来对急性或慢性氧化应激起反应, 所述蛋白例如维持细胞完整性和抵抗氧化损伤所涉及的酶。

[0010] 在本领域中, 已经公知端粒是位于真核染色体末端的非编码的 DNA 区域。这些端粒由高度保守的 DNA 序列、重复的串联 (TTAGG)_n 和相关蛋白构成, 并且具有一种特别结构, 所述结构可妨碍与其他染色体末端的连接以防止端粒融合。这些端粒在保持染色体完整性、保护编码 DNA 免遭酶的作用及其降解、帮助保持染色体稳定性方面起到必不可少的作用。

[0011] 与半保留复制的编码序列相反, 所述端粒在连续的细胞分裂过程中逐渐丧失了其重复序列。现今, 认为需要一个尽可能小的端粒长度来保持端粒功能, 当这些端粒达到临界大小时, 它们难以在有丝分裂过程中分裂, 从而导致端粒联合 (TAS) 和染色体的不稳定性。所述染色体的不稳定性将伴随着产生误差的概率的增加, 所述误差能够导致显著的遗传改变。

[0012] 由于具有多个双键, 所述 ω -3 脂肪酸被认为在氧化应激过程中是自由基产生和传播的分子靶标, 所述氧化应激过程与脂质过氧化物的产生相关。然而, ω -3 脂肪酸饮食补充物在各种氧化应激敏感性研究中却获得了矛盾的结果。在人体内进行的一些研究已经

证实对 LDL 的氧化作用增加,而另一些研究则未发现这类作用。在用动物进行的研究中,已经发现使用 ω -3 脂肪酸的处理会导致对 LDL 的氧化作用的敏感性增加或降低。另一方面,已经在用富含鱼油饮食喂养 3 个月的小鼠肝脏内发现了抗氧化剂防御系统中所涉及基因过表达。

[0013] 此外,用胶质源性细胞系进行的各种体外研究已经证实富含 ω -3 脂肪酸的膜对氧化损伤更加敏感。给这些细胞长期补充高浓度 DHA 会导致培养基中脂质过氧化物的水平升高以及细胞死亡的百分比增加,所述细胞死亡是由于暴露于过氧化氢所诱导的凋亡导致的。然而,还已经证实了羊膜内给予二十二碳六烯酸乙酯可降低大鼠胎儿大脑中的脂质过氧化作用。认为这种反应是由于通过活化抗氧化酶实现的自由基螯合作用所导致的。脑抗氧化能力的增加对于抗氧化应激的主要内源防御 (primary endogenous defence) 很重要,因为脑内的多不饱和脂肪酸含量相对较高而抗氧化酶含量相对较低。

[0014] 这些矛盾的结果表明基于脂肪酸的氧化作用会随双键数目而增加的前提的假说并不适用于体内,因为其他可能的机制可能会降低氧化损伤,例如膜蛋白和膜脂质中 ω -3 脂肪酸的三维结构使得双键对 ROS 的攻击较不敏感;对促氧化酶 (例如 PLA₂) 的抑制或者对抗氧化酶的较高表达。

[0015] 另一方面,将体育锻炼和自由基的产生联系起来的想法起源于 80 年代早期,因为在对含氧量低的组织进行的缺血-再灌注事件中观察到了对膜脂质的损伤 (参见 Lovlin et al., Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 1987, 56(3) 313-6)。同时,在大鼠肌细胞内 (参见 Lew H. Etal. FEBS Lett, 1985; 185(2) :262-6, Sen CK et al., J. Appl. Physiol. 1994 ;77(5) :2177-87) 和人血液内 (参见 MacPhail Db et al., FreeRadic Res Commun 1993 ;18(3) :177-81, Gohil K. et al. J. Appl. Physiol. 1988 Jan ;64(1) :115-9) 观察到 GSSH/GSH 比例的增加。自由基还会影响到 DNA,并且剧烈的体育锻炼会增加对 DNA 的损伤,这可以由 8-OxodG 的增加来证实。力竭性体育运动 (跑马拉松) 会导致对 DNA 的损伤 (这在试验后一段时间内很明显) 并且还会导致对免疫活性细胞的损伤 (这可以与进行这类试验后的运动员体内免疫力下降联系起来)。

[0016] 然而,其他作者并没有观察到在持续游泳 90 分钟、持续跑步 60 分钟或通过划船进行力竭性运动之后的任何作用 (除了极小的损伤之外)。同时,对受过训练的和未受过训练的运动者进行的研究并没有发现二者的 8-oxo-dG 尿分泌有任何差异,即使是在那些发现了这样一种损伤的研究中也没有发现差异,认为这种损伤是所述运动的后续反应所带来的,而并不是因剧烈运动对 DNA 的作用产生的。

[0017] 剧烈体育锻炼产生氧化应激这一事件是本领域所公知的,但是其根源尚未得到完全确认。

[0018] 使用 n-3 脂肪酸进行的运动绩效相关的研究集中于抗炎性作用上,事实上,最初的测定试图发现这些营养物可能通过减少剧烈体育锻炼导致的支气管收缩来改善肺泡-毛细血管吸收的作用。在这一点上, Mickleborough 证明了在给予 3.2g EPA 和 2.2g DHA 的方案之后,它们通过减少优秀运动员体内的 TNF- α 和 IL-1 β 减少了促炎性细胞因子,同时支气管收缩也减少。Walser 将 n-3 脂肪酸的血管效应与表明了对体育锻炼不耐受的人体内阳性作用联系起来。另一方面, van Houten 等研究了 n-3 脂肪酸的高摄取与在患冠状动脉综合征后进行心脏康复治疗的患者的好恢复相关联。

[0019] 在对运动绩效进行的分析研究中,缺少阳性结果的原因是仅对患者而非健康人群进行了评估并且研究的是血管效应和抗炎性作用。

[0020] 同时,基于下述理论构想进行了研究:当使血浆内游离脂肪酸浓度高于 1mmol/L(发生在糖原耗尽时)时,能够进行的色氨酸转运可使其随后续 5-羟色胺(在长时间运动中的一种与所谓“中枢疲劳”有关的神经递质)的增加而增加。另一方面,已知 n-3 脂肪酸可能会通过上调脂肪酸氧化来减少血浆内游离脂肪酸的量,所述脂肪酸氧化是通过激活转录核因子 PPAR α 来实现的。然而,这些测定并不成功,因为 Huffman(2004)通过使用 4g n-3 脂肪酸(500g 含 300mg EPA 和 200mg DHA 的胶囊)的剂量方案对两种性别跑步者进行的研究并没有发现游离 TRP 有任何减少也没有发现运动知觉减少,也没有发现在绩效方面有任何统计学意义上的绩效增加,尽管在服用了 n-3 脂肪酸的受试者中存在改善绩效的统计学趋势,使得对于作者来说存在下述悬而未决的可能性:即导致所述研究的统计检定力降低的原因是所研究的受试者的数量较少(5 名男性和 5 名女性)。

[0021] 另一项后续研究使用玉米油作为安慰剂,并且评估了 n-3 脂肪酸对绩效的作用,该研究没有发现任何显著性差异。Raastad 每天给予足球运动员 1.6g EPA 和 1.04g DHA 并持续数周,在他们体内并没有发现任何的改善(参见 Raastad et al. Scand J. Med Sci Sports 1997 ;7(1) :25-31)。

[0022] 另一方面,已知游离脂肪酸会干扰肌肉对葡萄糖的利用,因为其在胞内水平上的类似物乙酰辅酶 A 会在线粒体内抑制丙酮酸脱氢酶(通过产物抑制),还会刺激糖原分解和糖原生成作用,在空腹期间导致平稳的高血糖,事实上,在空腹期间连续给予多不饱和脂肪酸有助于可能通过在肝脏水平激活葡萄糖-6-磷酸酶来维持血糖。还已知肌肉中一种脂肪酸组合物可以改变胰岛素敏感性,表明质膜中高含量的多不饱和脂肪酸可提高胰岛素的敏感性而高含量的饱和脂肪酸会产生相反的效果。

[0023] 体育锻炼会提高葡萄糖吸收、毛细血管灌注、糖原合成率和胰岛素敏感性。在肌肉收缩过程中,温度、胞内 pH、ATP/ADP 比例、Ca⁺⁺ 胞内浓度以及其他代谢产物会发生变化,它们可作为锻炼时的细胞功能调节的信使。在这一点上, Ca⁺⁺ 会调节大量的胞内蛋白,包括钙调蛋白激酶、蛋白激酶 C(PKC) 和神经钙蛋白,所述胞内蛋白是胞内信号转导过程中的重要介质。在有氧锻炼过程中,乙酰辅酶 A 羧化酶会被 AMP 激酶(AMPK) 所失活,这会导致丙二酰辅酶 A 水平下降,从而去除了对肉碱棕榈酰转移酶的抑制,导致线粒体内脂肪酸转运的增加(因此促进了脂肪酸氧化)。

[0024] AMPK 的激活作用可能包括刺激 GLUT4 和己糖激酶以及多种线粒体酶的表达。然而,令人吃惊的是, AMPK 激活并不是锻炼增加骨骼肌对葡萄糖应答的唯一途径(不依赖于胰岛素)。参见 Mora and Pessin, J. Biol. Chem. 2000 ;275(21) :16323-16328,该文献显示在增加肌肉内葡萄糖应答的过程中,确实存在数种可激活 GLUT4 和那些可通过体育锻炼来激活的因子的转录因子如 MEF2A 和 MEF2D。

[0025] 肌内脂质的增加在肥胖状态下和体育训练过程中较常见,但是结果是对肥胖人群来说肌内脂质的增加与胰岛素抵抗有关,而在运动员体内高活性的肉碱棕榈酰转移酶会使得脂肪酸经历 β 氧化。存在确凿的证据证明富含 n-3 脂肪酸的饮食——甚至伴随着糖血症和血胰岛素血症(insulinaemia)(胰岛素抵抗的信号)的增加——会在胰岛素受体水平上起作用以维持 GLUT-4 蛋白的易位水平,这已经特别地使用 DHA 证实过了(参见

Jaescchke H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1995 ;209 :104-11)。

发明内容

[0026] 本发明涉及出乎意料的发现：给予的二十二碳六烯酸（本文中也称为 DHA）或二十碳五烯酸（EPA）或 DHA 衍生的 EPA——无论是游离形式或是结合到甘油三酯中等等——可作为细胞抗氧化剂。

[0027] 通过这种方式并且考虑到 DHA 和 EPA 之间的代谢关联（DHA 可逆转为 EPA），此前所观察到并公开的关于给予 DHA 的所有作用一定适用于 DHA/EPA 的混合体系或者甚至适用于 EPA 的单组分体系，尽管 EPA 并没有被特别指出。

[0028] 因此，本发明的一个目的是使用二十二碳六烯酸制备一种用于治疗细胞氧化损伤的药物组合物。

[0029] 本发明的另一个目的是使用位于甘油主链的一个特定位点上的二十二碳六烯酸（DHA）用于治疗细胞氧化损伤，其中甘油酯的其余两个位点在它们的组成上也是特定的。

[0030] 本发明的另一个目的是使用二十二碳六烯酸（DHA）制备一种用于在 DNA 水平治疗细胞氧化损伤的组合物。具体而言，二十二碳六烯酸适用于在端粒缩短的自然过程中作为保护剂以及在治疗细胞氧化损伤的过程中作为过早性衰老的抑制剂。

[0031] 本发明的一个目的是使用二十二碳六烯酸制备一种用于治疗细胞衰老和遗传疾病的组合物以及一种用于治疗唐氏综合征的组合物，其中所述遗传疾病与线粒体呼吸链障碍有关。

[0032] 本发明的另一个目的是使用二十二碳六烯酸（DHA）制备一种用于治疗与体育锻炼相关的细胞氧化损伤的组合物。具体而言，二十二碳六烯酸适用于作为运动绩效增强剂以及在体育运动过程中作为血糖水平调节剂。

[0033] 本发明的另一个目的是使用二十二碳六烯酸制备一种用于增强运动绩效的组合物以及一种用于在体育锻炼后维持血糖水平的组合物，所述维持主要是通过给予食品、乳制品或者利用人们进行体育锻炼时通常使用的任何合适的给予形式来实现。

[0034] 在本发明中，短语“细胞氧化损伤”是指任何涉及内源或外源的细胞氧化剂种类的产生和降解之间失衡的过程。

[0035] 令人吃惊的是，本发明的发明人发现 DHA 能够抑制活性氧簇（ROS）的产生，不管是涉及过氧化物的依赖性诱导还是涉及超氧化物的依赖性诱导。更具体地说，DHA 减少了超氧阴离子的产生以及在氧化级联中产生的所有衍生种类，例如极其明显地减少了脂质过氧化反应。此外，发现抗氧化酶活性增加，这表明细胞通过诱导抗氧化剂（主要是酶）的表达以及通过抑制促氧化剂（例如 A2 磷脂酶）的表达来实现细胞适应。

[0036] 在本发明的一个实施方案中，所述二十二碳六烯酸掺入甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂、乙酯或游离脂肪酸中。优选地，所述二十二碳六烯酸形成甘油三酯的形式。

[0037] 在本发明中，“二十二碳六烯酸掺入甘油酯中”是指甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯和磷脂的三个酯化位点中至少有一个被二十二碳六烯酸酯化，且任选地其余酯化位点中至少有一个还被一种选自下列的酸酯化：短链、中链或长链脂肪酸和磷酸。优选地，所述甘油为甘油三酯。

[0038] 选择甘油三酯作为 DHA 的化学构造是根据从一项研究中获得的数据，所述研究比

较了四种分别为乙酯、磷脂、游离脂肪酸和甘油三酯形式的 ω -3 脂肪酸在口服后的生物利用度,研究数据表明再酯化的甘油三酯的生物可用度高于其他制品。

[0039] 在本发明的一个优选的实施方案中,发现所述二十二碳六烯酸占总脂肪酸的重量百分数为 20-100%、优选地占总脂肪酸的 40-100%,并且更优选地,所述二十二碳六烯酸占总脂肪酸的重量百分数为 66-100%。

[0040] 在另一个优选地实施方案中,所述二十二碳六烯酸通过酯键结合到甘油的至少一个特定位置上(结构化脂质),以制备一种用于治疗细胞氧化损伤的药物组合物。

[0041] 这类甘油还可包括至少一种脂肪酸和/或一种磷酸以使得所述二十二碳六烯酸可以结合到选自 sn-1、sn-2 和 sn-3 的位点上;还可任选地包括至少一种选自短链和/或中链脂肪酸和磷酸的酸,并且当结合到 sn-2 位上时,所述甘油还可任选地包括至少一种选自脂肪酸和磷酸的酸。

[0042] 在这一点上,当任选地提及该术语时,应该理解的是结合到选自 sn-1、sn-2 和 sn-3 的位点上的二十二碳六烯酸可能还包括或可能不包括至少一种选自短链和/或中链脂肪酸和磷酸的酸;或者另外应该理解的是结合到 sn-2 位上的二十二碳六烯酸可能还包括或可能不包括至少一种选自长链脂肪酸和磷酸的酸。

[0043] 令人惊奇的是,本发明的发明人已经发现与使用二十二碳六烯酸制备一种用于治疗细胞氧化损伤的药物组合物的疗效相比,使用结构化甘油会使疗效产生出乎意料的增加至少两倍或者甚至三倍,所述结构化甘油中已经选定了二十二碳六烯酸的位置和结合到甘油上的其余化合物组成。

[0044] 所述一般性定义涉及含有位于甘油主链中特定位置上的脂肪酸的脂肪。与体内脂肪酸生物分布相似,所述长链多不饱和脂肪酸(PUFA)优选地位于甘油的 sn-2 位并且考虑到肠道吸收过程,利用脂肪酶将甘油三酯水解为游离脂肪酸、甘油二酯和甘油一酯,由此所述游离脂肪酸和 sn-2 甘油一酯可被肠道上皮细胞(称为肠上皮细胞)直接吸收。

[0045] 使用经由酯键结合到甘油主链特定位置上的二十二碳六烯酸可产生增加的生物活性;在占脂肪酸总量的摩尔百分数相同的条件下可产生增加的抗氧化保护作用;以及对可使甘油酯内二十二碳六烯酸产生抗氧化作用的给药剂量的依赖性降低。

[0046] 有利的是,本发明的发明人已经发现使用结合到甘油的选自 sn-1、sn-2 和 sn-3 的位点上的二十二碳六烯酸——所述甘油任选地还包括至少一种选自短链和/或中链脂肪酸和磷酸的酸——可产生增加的生物活性;在占脂肪酸总量的摩尔百分数相同的条件下可产生增加的抗氧化保护作用;以及对可使甘油内二十二碳六烯酸产生抗氧化作用的给药剂量的依赖性降低。

[0047] 还有利的是,本发明的发明人已经发现使用结合到甘油的 sn-2 位上的二十二碳六烯酸——所述甘油任选地还包括至少一种选自长链脂肪酸和磷酸的酸——也可产生增加的生物活性;在占脂肪酸总量的摩尔百分数相同的条件下可产生增加的抗氧化保护作用;以及对可使甘油酯内二十二碳六烯酸产生抗氧化作用的给药剂量的依赖性降低。

[0048] 优选地,与二十二碳六烯酸一起存在于甘油中的酸为短链脂肪酸(C1-C8)或中链脂肪酸(C9-C14)或磷酸,因为这些酸不具有功能活性而仅具有能量活性,因此这些酸不会与二十二碳六烯酸竞争。

[0049] 因此,更优选地,本发明涉及使用结合到甘油中的二十二碳六烯酸,其中 sn-1 和

sn-3 位之一是游离的或者是被中链脂肪酸 (C9-C14) 或短链脂肪酸 (C1-C8) 或磷酸所占据, 并且其中 sn-2 位被功能性 DHA 所占据。因此, 可使 DHA 实现较高的增长, 因为这样的 DHA 可被肠道细胞更有效地吸收。

[0050] 因此, 合成结构化甘油酯可提高其抗氧化作用, 其中当二十二碳六烯酸未与其他脂肪酸竞争时它可以结合到甘油的任一位置上而当 DHA 与至少一种脂肪酸竞争时它会结合到甘油酯的 sn-2 位上; 因此合成结构化甘油酯是制备一种用于治疗氧化性细胞损伤的组合物的优选方式。

[0051] 本发明的发明人已经发现可更好地制备富含本发明的含 DHA 的组合物的细胞以对抗新的氧化应激形式, 并且因此使由此产生的有害作用最小。即生物膜中存在的 DHA 会诱导对氧化应激的细胞适应性应答。适应性应答为一种当与有毒试剂 (低于致死浓度) 接触时可引起细胞应答的细胞现象, 所述细胞应答随后会保护所述细胞免遭处于致死浓度的相同有毒试剂的有害作用, 或者换言之, 适应性应答是一种通过与低浓度的试剂接触而产生有益效应, 所述试剂在高浓度时是有害的。

[0052] 给予 DHA 具有下列实质性优点:

[0053] a) 增加细胞抗氧化活性;

[0054] b) 所给予的剂量不具有细胞毒性;

[0055] c) 所给予的剂量不会对细胞抗氧化状态造成明显改变;

[0056] d) 适应性细胞抗氧化活性。

[0057] 由于上述全部原因, 本发明的一个优选的实施方案涉及使用二十二碳六烯酸制备一种用于治疗与细胞氧化性损伤相关的疾病的药物组合物, 所述疾病为神经变性疾病, 优选地选自下列疾病: 多发性硬化、阿耳茨海默氏病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化和肌肉萎缩症等等。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中, 与氧化损伤相关的疾病为眼部疾病, 优选地作为一种选自色素性视网膜变性 (pigmentary retinosis)、黄斑变性和白内障等等的疾病。

[0059] 在另一个实施方案中, 与氧化损伤相关的疾病为缺血性疾病, 特别是心肌梗塞、脑梗塞等。

[0060] 在本发明的另一个实施方案中, 与氧化损伤相关的疾病为炎性病变, 优选地选自关节炎、血管炎、肾小球肾炎和红斑狼疮等等。

[0061] 在另一个优选的实施方案中, 与氧化损伤相关的疾病为动脉粥样硬化。

[0062] 本发明的另一方面为使用 DHA 作为在端粒缩短的自然过程中的保护剂并且使用 DHA 作为过早性衰老的抑制剂。

[0063] 产生端粒联合 (TAS) 的机制仍旧是未知的, 但是本发明的发明人认为端粒联合与端粒酶的酶活性不足有关, 所述端粒酶合成端粒特有的 DNA 重复序列, 从而稳定端粒长度。

[0064] 端粒酶在胎儿细胞中非常活跃, 但是在成人组织细胞中没有过多的活性。TAS 很少存在于正常细胞中, 但是在病毒感染的细胞或肿瘤细胞中已经观察到了 TAS。

[0065] 已经观察到体外端粒重复的数目以及体内细胞衰老的功能逐渐下降, 这与衰老过程中端粒酶活性的抑制有关。类似地, 本发明的发明人已经研究了来自于一直健康的人的成纤维细胞和淋巴细胞中的端粒长度, 已经发现在所述成纤维细胞的体外增殖过程中存在端粒缩短且端粒长度与供体年龄之间存在负相关性。

[0066] 尽管随着细胞复制自然会发生端粒缩短,但是当在 DNA 中诱导氧化损伤时观察到了过早性衰老和端粒破损。端粒对氧化损伤更加敏感并且与基因组的其它部分相比对端粒破损的修复效率较低。这会积累端粒损伤,所述损伤会在 DNA 复制过程中使端粒缩短更快,降低了细胞复制的预期寿命。活性氧簇 (ROS)——特别是超氧阴离子、过氧化氢和 oxidril 自由基——在某些细胞类型的复制过程中会加速端粒的缺失,尽管他们不论是否使端粒缩减,都会诱导过早性衰老。

[0067] 令人惊奇的是,本发明的发明人已经发现使用二十二碳六烯酸在 DNA 水平上治疗细胞氧化损伤可减缓端粒的缩减速率并且因此会抑制细胞衰老。

[0068] 本发明的发明人已经在超过 20 种人类成纤维细胞株中发现了端粒缩减速率和细胞抗氧化能力之间存在负相关性。这些过早衰老的成纤维细胞的大多数细胞参数与正常衰老的成纤维细胞的细胞参数相同(形态学、脂褐素的积累和基因表达的变化)。具有较低抗氧化防护的成纤维细胞缩减其端粒的速率更快,反之亦然。在具有较低抗氧化防护的细胞中端粒缩减速率更快。此外,自由基清除剂会减缓端粒的缩减速率。

[0069] 这些数据与人成纤维细胞中端粒缩减速率数据一致,所述数据证实了抗氧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的重要作用。这些数据证实端粒长度主要由氧化应激和细胞抗氧化防护能力之间的关系决定。因此,与年龄相关的端粒长度是细胞整个生命周期所经历的氧化损伤历史的累积量度。

[0070] 对于线粒体呼吸链障碍相关的遗传疾病和唐氏综合征,已经证实了氧化应激与端粒缩减速率之间的关系。

[0071] 因此, DNA 中的氧化细胞损伤与端粒缩减之间的现有关系以及其在细胞衰老中的作用使得可以使用二十二碳六烯酸作为在端粒缩短的自然过程中的强保护剂并且使用二十二碳六烯酸作为过早性衰老的抑制剂。

[0072] 另一方面,与基于化学合成和其后的纯化过程(色谱分离、分子蒸馏等)的其他方法相比,使用酶来生产富含 ω -3 脂肪酸的油具有多种优势。前者需要极端的 pH 和高温条件,所述条件可以通过氧化作用、顺反异构化或双键迁移来部分地破坏所有顺式 ω -3PUFA 的全部双键。酶法合成所用的温和条件(温度低于 50°C、pH 6-8 且较少的化学试剂)提供了一种合成选择,保留了 ω -3PUFA 的原始结构同时增加了酰基甘油酯的结构选择性,从营养学的观点来看所述结构是最有利的化学结构。

[0073] 含有 DHA 的药物组合物可以以油或乳剂的形式存在,所述组合物可通过口服、舌下、静脉内、肌内、局部、皮下或直肠途径来给药,或者甚至仅通过使本发明的活性成分微乳剂以液体或蒸气形式与位于呼吸道入口的嗅觉器官相接触来给药。因此,可通过微乳剂的喷射、喷雾或雾化或者通过吸入来进行给药。

[0074] 任选地,所述药物组合物还包括另一种活性成分。

[0075] 类似地,所述含有 DHA 的药物组合物可被用在食品工业中以使食品(例如乳制品,如酸乳酪、乳等)中富含天然抗氧化剂例如 DHA。

[0076] 因此,在本发明的另一个实施方案中,将所述药物组合物给予已经接受了对抗与氧化损伤相关疾病疗法的患者。

[0077] 本发明的另一个目的是使用 DHA 作为运动绩效增强剂以及在体育运动过程中作为血糖水平调节剂。

[0078] 通过这种方式,本发明的发明人吃惊地发现在体育锻炼过程中使用所述二十二碳六烯酸会使运动绩效增加,同时在进行这类体育锻炼之后(未给予碳水化合物)维持血糖水平(糖血)。

[0079] 在本发明的上下文中,术语“业余运动员”或“非竞赛运动员”是指任何以零散方式和非专业方式进行体育锻炼的人。且短语“竞赛运动员”或“受过训练的运动员”是指任何以正规方式和/或专业水平进行体育锻炼的人。类似地,术语“体育锻炼”和“体育运动”可等价的互换使用,术语“运动员”用于指男性和女性。

[0080] 运动绩效

[0081] 为了评价运动绩效,存在几种可验证这类运动绩效提高的参数。

[0082] 在进行有氧运动的运动员体内,当在 UV₂(无氧阈)时的最大氧耗百分数% VO_{2max} 增加时认为绩效增加,因为在赛季期间受过良好训练的运动员体内的 VO_{2max} 很难增加。在该阈值时的 VO_{2max} 百分数的细微变化是直接和绩效增加相关的数据。

[0083] 发明人已经证实当将基础的三角运动试验(triangular effort trial)与用 DHA 处理 4 个月后进行的试验比较时,通气阈值 2 时的氧耗量(VO₂) 的增加的绝对值($p < 0.019$)和相对于体重的相对值($p < 0.036$)均具有统计学显著性。竞赛自行车运动员($p < 0.047$)和非竞赛自行车运动员中均显示出该参数的增加,后者的该参数的差异不具有统计学显著性(图 24)。

[0084] 另一个与运动绩效增加有关的参数是心搏频率的增加,其中设定了运动试验的 UV₂;因为如果在该无氧阈时心搏频率增加,则认为该运动员能够略增加以较高强度保持有氧代谢的能力。本发明的发明人已经观察到,当将在基础试验中得到的心搏频率与在服用 DHA 4 个月后的三角试验中得到的心搏频率进行比较时在 UV₂时的心搏频率有所增加($p = 0.082$)。在具有高竞赛水平的自行车运动员小组中显著地证明了这些数据($p < 0.017$)(图 25)。

[0085] 在这一点上,达到在统计学上显著的 UV₂所需的时间增加(图 26)。

[0086] 最终,如果运动员经受过有氧训练则达到相同运动水平时的心搏频率较低。本发明的发明人已经发现当在运动员消耗 2000ml O₂/分钟时将两个试验在该点的上述数据进行比较时,被给予 DHA 的自行车运动员的心搏频率以统计学显著性($p < 0.043$)方式下降(图 27)。

[0087] 由这些研究可以总结出在持续服用 DHA 4 个月的运动员体内已经观察到在 UV₂时绝对和相对氧耗量均增加(分别为 $p < 0.008$ 和 $p < 0.015$)、对应于 UV₂ 的负荷增加($p < 0.063$)并且当运动员的氧耗量为 2000ml/分钟时心搏频率下降($p < 0.062$)。所有这些参数都表明在以 2.1g DHA/24 小时(6 粒药物含量为 70 重量%的 500mg 胶囊)的剂量(分为每日 3 次)服用 4 个月后,运动绩效增加。示出的所述量为本发明的示例性且非限制性的量。

[0088] 在运动试验之后,还分析了几项与氧化损伤相关的生物化学变量。

[0089] 1. 血浆总抗氧化能力(PTAC)。当进行矩形运动时,PTAA 的增加是全面的且具有统计学显著性($p < 0.05$)。当考虑全部自行车运动员或仅考虑竞赛自行车运动员时,在给予 DHA 3 周后的运动员体内上述增加较高,而对于业余运动员,基础试验与服用 DHA 3 周后进行的试验之间没有任何差异(图 28)。

[0090] 2. 丙二酰二醛 (MDA) MDA 是将脂质过氧化物与硫代巴比土酸反应后获得的主要产物,所述脂质过氧化物是通过氧化应激产生的。结果表明当进行所有运动试验时对血浆脂质的氧化损伤都有显著增加 ($p < 0.035$)。在摄取 DHA 3 周后,进行运动试验时对脂质的氧化损伤比开始时低 ($p < 0.05$)。受过训练的运动员体内的这种差异比业余运动员体内的差异大得多 (图 29)。

[0091] 3. 8-氧-7,8-二氢-2'-脱氧鸟苷 (8-oxodG)。8-oxodG 是一种氧化应激生物标记。当进行矩形运动试验时对 DNA 的氧化损伤增加 ($p < 0.011$)。这种氧化损伤在给予 DHA 3 周后会下降 ($p < 0.035$)。非竞赛自行车运动员内的氧化应激下降比竞赛自行车运动员体内的氧化应激下降更明显,但是这种差异不具有统计学显著性 (图 30)。

[0092] 血糖研究

[0093] 为研究血糖水平,用自行车矩形运动试验,维持最大负荷等于 75% VO_{2max} 所对应的速率并且维持斜率常数为 2%,所述 VO_{2max} 是按照进行最大矩形运动试验计算的。试验时间为 90 分钟且试验过程中耗水量无限制。

[0094] 由于未摄取含糖类饮料,所以预计会出现低血糖。与预期的一样,在第一次运动试验中第二次取样的样品 (试验结束 20 分钟后的样本与试验开始前 20 分钟的起始样本比较) 中出现低血糖。然而, DHA 给药 4 个月后获得的数据表明血糖的维持量具有统计学显著性,这在先前并未被观察到过并且这代表了本研究中一项惊人的发现。

[0095] 通常,在矩形运动试验过程中可观察到血糖水平呈统计学显著性下降 ($p < 0.0009$)。然而,该行为会随着所要分析的运动员类型不同而不同 ($p < 0.003$):对于通常的竞赛自行车运动员来说,试验过程中血糖的下降没有显著变化,但是对于业余自行车运动员来说,基础试验过程中血糖的下降比通常的竞赛自行车运动员体内血糖的下降要高;并且服用 DHA 3 周或 4 个月后,所述下降基本消失 (图 31、32 和 33)。

[0096] 在以 75% VO_{2max} 进行 90 分钟且不饮用含糖类饮料的运动试验中,正常血糖量的存在代表了这样一项发现,所述发现将体育运动过程中的 DHA 行为与所观察到的和上文提到的涉及增加胰岛素敏感性的行为联系在一起。在这一点上,继 1997 年的关于 AMPK (AMP 激活的蛋白激酶) 的出版物 (Winder 和 Hardie) 之后, Goodyear 和 Kahn (1998) 推断胰岛素或者锻炼所导致的骨骼肌内葡萄糖应答的分子机制是不同的,所述 1997 年的出版物公开了下述事实:在锻炼过程中 IIa 型纤维中 AMPK 含量较高,认为 AMPK 具有抑制乙酰辅酶 A 羧化酶和促进葡萄糖转运等功能的多效作用。这可能解释了下述发现,即运动员体内的升糖反应 (glycemic response) 与根据对静态人群进行的研究所预计的升糖反应不同。

[0097] 根据上述关于 DHA 对运动绩效和血糖的作用的研究,可以推断出下述结论:

[0098] 1) 已经证明持续摄取 DHA 超过 3 周可使竞赛自行车运动员和业余自行车运动员二者体内的血浆总抗氧化能力 (PTAC) 以全面且具有统计学显著性 ($p < 0.05$) 的方式增加。对脂质的氧化损伤也较低 ($p < 0.05$) (受过训练的运动员体内的差异比业余自行车运动员体内的差异要大)。最终,已经证明了在摄取 DHA 3 周后对 DNA 的损伤下降 ($p < 0.035$),所述损伤是利用尿标记物 (8-oxodG) 测得的。

[0099] 2) 已经证明持续摄取 DHA 4 个月后,运动绩效更高 (在 UV2 时的负荷、心搏频率以及 VO_{2max} 的百分数均增加)。在摄取 DHA 4 个月后以 75% VO_{2max} 进行 90 分钟运动试验中还观察到具有统计学显著性的正常血糖量。

[0100] 这两种效应（运动绩效的增强和长期锻炼期间血糖量正常）之间的关联既非预期的也非本领域中已知的。

[0101] 此外，应该可以推断出这种效应之间的关联是所需要的并且是目前尚未发现的增进机能的辅助手段。

[0102] 本发明的另一个目的是使用二十二碳六烯酸制备一种通过任何合适给药方法用于增强运动绩效并且在体育锻炼之后维持正常血糖水平的组合物。

[0103] 应该考虑欧盟食品科学委员会推荐的下述用于在体育锻炼过程中饮用的饮料组合物的组分（参见 http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out64_en.pdf）。

[0104]

80 kcal/1000 ml	能量	350 kcal/1000 ml
20 mmol/l (460 mg/l)	Na ⁺	50 mmol/l (1150 mg/l)
200 mOsm/kg 水	渗透压	330 mOsm/kg 水
至少 75%的热量来源于具有高血糖载量 (charge) 的糖类 (葡萄糖、麦芽糊精、蔗糖)		
维生素 B1 0.2 mg/100 mg 糖类		

[0105] 在这一点上，含有糖类的目的在于维持血糖量以避免快速消耗肌糖原和肝糖原。应该考虑到是糖类浓度产生的渗透压的增加会导致胃排空减少的缺陷，同时会伴有许多运动员不希望有的胃满的感觉。因此，通过加入 DHA 来制备具有较低浓度糖类的饮料在增强运动绩效方面具有不容置疑的强大优势。

[0106] 因此，本发明的另一方面涉及一种含有 DHA 的药物组合物，所述组合物可被用在食品工业中以使食品（例如乳制品，如酸乳酪、乳等）中富含天然抗氧化剂如 DHA；或者所述组合物可被制成合适的给药方式，选自用在体育锻炼之前、期间和之后的任何特征的饮料；补充能量的棒；增进机能的棒；用作食物的固体和制品；饮食补充物和多维生素制品（例如，胶囊、片剂、丸剂、冻干形式，或者任何合适的给药形式）；增进机能的辅助手段；带有用于皮肤吸收的纳米微囊剂的纺织品，以及其他任何合适的给药方法。

附图说明

[0107] 图 1. 包皮细胞 (foreskin cell) 培养基中 DHA 浓度对 ROS 的胞内产生过程的影响。实验前，在存在甘油三酯（其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%）的条件下将所述细胞培养 3 天。(A) 使用 DHR123 对细胞进行 ROS 检测，所述细胞用 40 或 60mM AAPH 处理过 180 分钟。所述数据为三次独立实验的平均值。(B) 使用 CDCFDA 对细胞进行 ROS 检测，所述细胞用黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系处理过 180 分钟。为进行比较，加入用 100 μM 维生素 E (对照) 获得的数据。所述数据为三次独立实验的平均值。

[0108] 图 2. 包皮细胞培养基中 DHA 占甘油三酯的比例对 ROS 的胞内产生过程的相应影响。(A) 实验前，在存在每种甘油三酯的条件下将所述细胞培养 3 天。X 轴上的浓度为可使用 DHA 含量为 70 重量%的甘油三酯获得的浓度的等效值。使用 DHR123 对细胞进行 ROS 检测，所述细胞用 40mMAAPH 处理过 180 分钟。所述数据为三次独立实验的平均值。(B) 油中

DHA 浓度分别为 20%、50%和 70%时抗氧化保护作用的图示。

[0109] 图 3. DHA 浓度对包皮细胞中 TBARS 的产生的影响。以所示浓度进行实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。使用 40mM AAPH 诱导氧化应激 6 小时并且等待 24 小时。所述数据为三次独立实验的平均值。

[0110] 图 4. 包皮细胞培养基中 DHA 浓度对超氧阴离子的产生的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。在用 40mM AAPH 进行细胞氧化诱导后立即利用化学发光法进行超氧阴离子检测,并且在一些实验中还存在 10mM Tyron 或 0.1875UA/ μ l 的外源 SOD。所述数据代表三次独立实验。

[0111] 图 5A. 包皮细胞培养基中 DHA 浓度对 SOD 活性的影响。以 0.5 μ M(A)、5 μ M(B) 和 50 μ M(C) 的 DHA 浓度进行实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。通过分析鲁米诺所产生的化学发光的降低来间接分析 SOD 活性,鲁米诺所产生的化学发光的降低是内源 SOD 活性所导致的。使用可立即生成超氧阴离子的 0.1mM 黄嘌呤 /0.05U/ml 黄嘌呤氧化酶体系进行氧化诱导。所述数据代表三次独立实验。

[0112] 图 5B. 包皮细胞培养基中 DHA 浓度对 SOD 活性的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。评估未诱导细胞系统或用 40mM AAPH 诱导的细胞系统内的 SOD 活性。所述数据代表三次独立实验。

[0113] 图 6. 包皮细胞培养基中 DHA 浓度对 GPx 活性的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。评估未诱导细胞系统或用 40mM AAPH 诱导的细胞系统内的 GPx 活性。所述数据代表三次独立实验。

[0114] 图 7. ARPE-19 细胞培养基中 DHA 浓度对 ROS 的胞内产生的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。使用 DHR123(A) 或 CDCFDA (B) 对细胞进行 ROS 检测,所述细胞用 40 或 60mM AAPH 处理过 180 分钟。所述数据为三次独立实验的平均值。

[0115] 图 8. ARPE-19 细胞培养基中甘油三酯中 DHA 浓度对 ROS 的胞内产生的相应影响。实验前,在存在每种甘油三酯的条件下将所述细胞培养 3 天。X 轴上的浓度为可使用 DHA 含量为 70 重量%的甘油三酯获得的浓度的等效值。使用 DHR123 对细胞进行 ROS 检测,所述细胞用 40mM AAPH 处理过 180 分钟。所述数据为三次独立实验的平均值。(B) 油中 DHA 浓度分别为 20%、50%和 70%时抗氧化保护作用的图示。

[0116] 图 9. DHA 浓度对 ARPE-19 细胞中 TBARS 的产生的影响。以所示浓度进行实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。使用 40mM AAPH 诱导氧化应激 6 小时并且等待 24 小时。所述数据为三次独立实验的平均值。

[0117] 图 10. ARPE-19 细胞培养基中 DHA 浓度对超氧阴离子的产生的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。在用 40mM AAPH 进行细胞氧化诱导后立即利用化学发光法进行超氧阴离子检测。所述数据代表三次独立实验。

[0118] 图 11. ARPE-19 细胞培养基中 DHA 浓度对 GPx 活性的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。评估未诱导细胞系统或用 40mM AAPH 诱导的细胞系统内的 GPx 活性。所述数据代表三次独立实验。

[0119] 图 12. ARPE-19 细胞培养基中 DHA 浓度对 SOD 活性的影响。实验前,在存在甘油三酯(其中 DHA 占总脂肪酸重量的 70%)的条件下将所述细胞培养 3 天。评估未诱导细胞系统或用 40mM AAPH 诱导的细胞系统内的 SOD 活性。所述数据代表三次独立实验。

[0120] 图 13. 通过化学合成(A和C)或酶法合成(B和D)获得的 DHA 浓度对 ARPE-19 细胞(A和B)或包皮细胞(C和D)内抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。

[0121] 图 14. 通过化学合成获得的油的纯化程度对 ARPE-19 细胞内由 DHA 诱导的抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。

[0122] 图 15. 化学结构对 ARPE-19 细胞内由 DHA 诱导的抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。

[0123] 图 16. DHA 浓度对 ARPE-19 细胞内谷胱甘肽胞内浓度的影响。存在 BSO 的影响。

[0124] 图 17. 重新合成的谷胱甘肽对 ARPE-19 细胞内由 DHA 诱导的抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。

[0125] 图 18. DHA 浓度对包皮细胞内谷胱甘肽胞内浓度的影响。存在 BSO 的影响。

[0126] 图 19. 通过化学合成获得的油的纯化程度对 ARPE-19 细胞内由 EPA 诱导的抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。DHA 的比较研究。

[0127] 图 20. EPA 浓度对包皮细胞内抗氧化应激的细胞保护作用百分数的影响。DHA 的比较研究。

[0128] 图 21. EPA 浓度对包皮细胞内谷胱甘肽胞内浓度的影响。存在 BSO 的影响。

[0129] 图 22 为比较柱状图,示出了不同剂量的结构化甘油三酯和非结构化甘油三酯中 DHA 百分比对细胞保护作用百分数的影响。

[0130] 当将非结构化的甘油三酯的化学结构(甘油三酯)与其中 sn-1 和 sn-3 位已经被正辛酸(结构化的)所置换的相同结构进行比较时(二者均通过酶学方法实现且 DHA 含量的起始水平为 20%和 70%),所述图 22 示出了上述添加物所实现的惊人效果。

[0131] 从图中可以看出,浓度相同时,结合到甘油酯(结构化的)——特别是甘油三酯——sn-2 位上的二十二碳六烯酸的保护作用百分数比含非结构 DHA 的甘油酯的保护作用百分数高 3 倍。

[0132] 在图 22 中,保护作用百分数说明了对照细胞与相对于对照细胞用 DHA 处理过的细胞的活性氧簇的胞内浓度差异间的关系,两种细胞均经受了以百分数形式表示的相同的氧化应激。换言之,保护作用百分数的存在说明与对照细胞相比,在处理过的细胞内活性氧簇胞内生成的降低程度具有统计学显著性。

[0133] 图 23 为比较图,示出了在加入或未加入 DHA 的氧化应激条件下培养的人成纤维细胞内的端粒平均长度与细胞群的传代数间的关系。

[0134] 所述图 23 示出了在存在 DHA 的氧化应激条件下进行观察时,上述添加物所实现的惊人效果,与对照或无 DHA 的情况相比存在 DHA 时端粒缩短指数较低。

[0135] 图 24 为示出了在基础水平和服用 DHA 4 个月后,竞赛、非竞赛和全体自行车运动员在“通气阈值 2”(UV2)时的绝对氧耗量的图。

[0136] 图 25 为示出了在基础水平和服用 DHA 4 个月后,竞赛、非竞赛和全体自行车运动员在 UV2 时的心搏频率的图。

[0137] 图 26 为示出了在基础水平和服用 DHA 4 个月后,竞赛、非竞赛和全体自行车运动

员达到 UV2 所需时间的图。

[0138] 图 27 为示出了在基础水平和服用 DHA 4 个月后,竞赛、非竞赛和全体自行车运动员的通气阈值时的氧耗量为 2000ml/min 时心搏频率的图。

[0139] 图 28 为示出了在基础水平和服用 DHA 3 周后,竞赛、非竞赛和全体运动员的血浆总抗氧化能力的图。在每种情况下,均示出了进行运动试验之前的抗氧化能力(左柱)和之后的抗氧化能力(右柱)。

[0140] 图 29 为示出了在基础水平和服用 DHA 3 周后,根据 MDA 浓度测得的对竞赛、非竞赛和全体运动员血浆脂质的氧化损伤的图。在每种情况下,均示出了进行运动试验之前的氧化损伤(左柱)和之后的氧化损伤(右柱)。

[0141] 图 30 为示出了在基础水平和服用 DHA 3 周后,使用氧化应激标记物 8-oxodG 测得的对竞赛、非竞赛和全体运动员 DNA 的氧化损害的图。在每种情况下,均示出了进行运动试验之前的氧化损伤(左柱)和之后的氧化损伤(右柱)。

[0142] 图 31 为示出了体育锻炼过程中未服用 DHA 或者服用了 DHA3 周或 4 个月的竞赛运动员体内的血糖的图。

[0143] 图 32 为示出了体育锻炼过程中未服用 DHA 或者服用了 DHA3 周或 4 个月的非竞赛运动员体内的血糖的图。

[0144] 图 33 为示出了体育锻炼过程中未服用 DHA 或者服用了 DHA3 周或 4 个月的竞赛和非竞赛运动员体内的血糖的图。

具体实施方式

[0145] 下列实施例为本发明的说明性且非限制性实施例。

[0146] 实施例

[0147] 用于评估抗氧化活性的材料和方法

[0148] 细胞培养物

[0149] 所用细胞模型为获取自美国典型微生物菌种保藏中心(American Type Culture Collection)的包皮细胞(未分化的表皮成纤维细胞,CRL-2076)和 ARPE-19 细胞(视网膜色素上皮细胞,CRL-2302)。使细胞培养物置于特别设计用于这一目的的具有合适生长条件的培养箱中,所述生长条件为温度 37°C、CO₂ 浓度 5%和湿度 95%。将 ARPE-19 细胞在装有 DMEM-F12 培养基(Biological Industries)的培养瓶中生长至 0.3×10^4 细胞/cm² 的汇合度,所述 DMEM-F12 培养基补加了 10%胎牛血清、青霉素抗生素(100U/mL)、链霉素(100 μg/mL)和谷氨酰胺(Biological Industries)。使 CRL-2076 成纤维细胞在装有伊思考夫改良杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM)(Biological Industries)的培养瓶中维持生长,所述培养基中补加了 10%胎牛血清、青霉素抗生素(100U/mL)、链霉素(100 μg/mL)和谷氨酰胺(Biological Industries)。将所述细胞由 75ml 培养瓶转移至 6、12 或 96 孔板中,使其在 37°C 下贴附于底物 24 小时以便进行实验(10⁶ 个细胞/mL)。

[0150] 将 DHA 整合到所述细胞中

[0151] 加入不同浓度的 DHA-TG(0.5-50 μM),以含 20、50 和 70% DHA 的 DHA-TG(油密度 0.92g/mL)为原料,通过将油溶于乙醇中制备储液(1:100)并且使用血清制备的培养基制备工作溶液。在 37°C 下,将细胞用补加了 DHA-TG 的培养基培养 3 天。

[0152] 诱导氧化应激

[0153] 使用不同的诱导剂氧化性地刺激细胞：

[0154] a) 黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系 ($0.8\text{mM}/10^{-2}\text{U/mL}$)，催化将次黄嘌呤和黄嘌呤氧化为尿酸的氧化反应，同时将 O_2 还原为 $\text{O} \cdot^{-2}$ 和 H_2O_2 。

[0155] b) 2,2'-偶氮二-(2-脒基丙烷)二盐酸盐 (AAPH) ($1-100\text{mM}$) 被广泛用作自由基的亲水引发剂，诱导脂质和蛋白质的过氧化反应。AAPH 会通过已形成的过氧自由基的作用来氧化 DNA、蛋白质和脂质。AAPH 还会作用于内源防护系统，因为它会使关键性的酶 SOD 失活，从而失去 CAT 和 GPx 的保护能力。

[0156] 产生活性氧簇 (ROS)

[0157] 使用二氢罗丹明 123 (DHR123, Molecular Probes) 和 2,7-二氯荧光素二乙酸盐 (H_2DCFDA , Molecular Probes) 作为荧光探针通过荧光技术通过一个连续系统中测量人皮肤 CRL-2076 成纤维细胞和 ARPE-19 视网膜上皮细胞的原代培养物中的 ROS 水平，每 30 分钟测量一次直至 180 分钟。对于这两种情况，这是一种非特异性测量 ROS 产生的方法。将荧光探针加入到细胞 (1×10^6 个细胞 / mL) 中至终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。使用激发波长为 488nm 且发射波长为 525nm 的 Mithras 荧光读数器测量氧化探针 (2,7-二氯荧光素和罗丹明 123) 的荧光，记录为时间的函数。使用通过下文概述的 MTT 分光光度技术确定的细胞存活率来调制所获得的荧光。

[0158] 细胞存活率

[0159] 进行细胞存活率研究以评估各种样本的细胞毒性作用。该方法包括将可溶于水性介质的 MTT 试剂 (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴, Sigma) 加入孵育培养基中。成活的细胞可代谢这种化合物并将其转化为甲贍盐。该盐为一种不溶于水性介质、可溶于 DMSO 并且可用于测量细胞存活率的显色化合物。所述方法包括每孔加入 $20 \mu\text{l}$ 7.5mg/ml (过量) 的 MTT 溶液。使其在 37°C 下孵育 1 小时以使得所述成活细胞可代谢该化合物并产生甲贍盐，而非成活细胞则不能。在孵育 1 小时后，沉淀细胞，并加入 $100 \mu\text{l}$ DMSO，使甲贍盐溶解。最后用酶标仪读取 550nm 处的吸光度。将存活率结果表示为相对于对照的光密度百分数，将对照记为具有 100% 的存活率。利用 96 孔板绘制细胞存活率曲线，其中每孔接种约 20,000 个细胞 (在根据细胞生长率函数分析适合的细胞数目后接种) 且每孔的培养基体积约为 $200 \mu\text{l}$ 。在使细胞与浓度范围足够宽的各种浓度产物接触 72 小时后，研究所述产物的效率以找出 IC_{50} 值。利用 Sigma Plot 8.0 修正实验结果使其适用于 Hill 方程以确定 IC_{50} ， IC_{50} 定义为将培养物存活率降为对照的 50% 时所需的 DHA 浓度。

[0160] 测定蛋白质

[0161] 所述测定基于比色检测和利用了优化的 2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸 (dizincinic acid) 制剂的总蛋白质定量，所述二喹啉甲酸组分使得可以测量稀释样本中浓度范围为 $0.5-20 \mu\text{g/ml}$ 的蛋白。该方法使用 Cu^{+1} 检测剂，所述检测剂在碱性介质中可被蛋白质还原为 Cu^{+2} 。两个 BCA 分子与所述亚铜离子螯合可形成紫色反应产物。所述水性复合物在 562nm 处有吸收。利用校准曲线可获得一个方程，结果以 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白表示。所用的商业化试剂盒为 Pierce 的 MicroBCA (No. 23235)。

[0162] 直接分析产生的 ROS

[0163] 测量产生的脂质氢过氧化物

[0164] 利用紫外可见分光光度法测得的细胞裂解产物中的丙二酰二醛 (MDA) 可用作脂质过氧化反应的标记物。MDA 和 4- 羟基烯醛 (hydroxyalkenal, HAE) 是多不饱和脂肪酸及相关酯的过氧化反应产物。对这些醛的直接测量给出了一种简便的脂质过氧化反应指数。通过 Calbiochem 的商业化脂质过氧化反应试剂盒 (No. 437634), 使用了在 45°C 下可与 MDA 反应的显色剂 (溶于乙腈的 N- 甲基 -2- 苯基 - 咪唑)。一个 MDA 分子与两个发色剂分子缩合可产生一个在 586nm 处有最大吸收的稳定发色团, 检测极限为 0.1 μ M。使用 40mM AAPH 诱导 6 小时并且等待 24 小时。通过在液氮中循环冻融来裂解细胞 (10^7 细胞 /mL)。对样本分级分离以测量 MDA 和蛋白质。结果表示为 μ M MDA/mg 蛋白。

[0165] 测量产生的超氧阴离子

[0166] 使用鲁米诺 (Calbiochem, No. 574590) 利用化学发光技术在微量板上直接测量超氧阴离子。使用化学发光法检测超氧阴离子的原因在于鲁米诺可能接近所有产生超氧化物的胞内位点、在于鲁米诺反应的高特异性、极小的胞内毒性以及与其他化学技术有较高的灵敏性。化学发光法是根据超氧阴离子氧化鲁米诺的反应可产生光子, 所述光子可使用标准照度计来迅速地测量。在我们的测试中, 我们对 ELISA 的微量板使用 MITHRAS 化学发光读数器并且给出了自由基的短半衰期, 使用增强剂来增加测试的灵敏度并且放大应答。该试剂可被用于活细胞, 因为所述试剂无毒且不会使亚细胞系统组分变性。还可使用特异性超氧阴离子螯合剂——Tyron (4,5- 二羟基 -1,3- 苯二磺酸, Sigma) 来研究抑制超氧阴离子生成的能力, 所述 Tyron 常常被用于在体外对 ROS 的生成进行阻断测试, 它可透过细胞膜; 且超氧化物歧化酶 (SOD, Sigma) 可用作酶阻断剂, 成为内源抗氧化防护体系中首要的酶。每 60 秒分析一次细胞的化学发光测量值, 持续分析 4100 秒, 频率为 120 秒 / 循环, 所述细胞经过了 AAPH 氧化应激诱导处理。结果表示为 UA 化学发光 /mg 蛋白。

[0167] 测定抗氧化酶活性

[0168] 测量谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性

[0169] GPx 催化过氧化物的还原反应成为还原态谷胱甘肽, 该过程具有保护细胞免遭氧化损伤的功能。GPx 使用谷胱甘肽作为最终的电子供体以再生还原态的硒代半胱氨酸。通过与谷胱甘肽还原酶相偶联的反应来间接测量 GPx。利用谷胱甘肽还原酶并使用 NADPH 作为辅酶将由反应产生的氧化态谷胱甘肽 (GSSG) 回收再循环为还原态谷胱甘肽, 所述反应通过使 GPx 作用于氢过氧化物来实现。随着 NADPH 被氧化为 NADP^+ , 其在 340nm 处的吸光度会降低。340nm 处吸光度的降低速度与样本的 GPx 活性成正比。使用 Cayman 的 ELISA 微量板分光光度试剂盒 (No. 703102) 来检测原代培养物的细胞裂解物中的 GPx。在 37°C 下使细胞贴附于底物上培养 24 小时。通过在 50mM Tris (pH 7.5)、5mM EDTA 和 1mM DTT 中超声来获得细胞裂解物。通过测定 $A_{340\text{nm}}/\text{min}$ (ΔA_{340}) 的变化来获得 GPx 的活性, 表示为纳摩尔 NADPH/min/mg 样本蛋白。

[0170] 测量超氧化物歧化酶活性 (SOD)

[0171] 该化学发光法基于与 SOD (Calbiochem No. 574590) 阳性对照相比的细胞上清液中的 SOD 活性分析。黄嘌呤氧化酶 - 黄嘌呤 - 鲁米诺系统中存在 SOD 会导致所产生的化学发光降低, 对超氧阴离子歧化作用的下降与 SOD 活性成比例。用 MITHRAS 照度计进行分析, 时间间隔为 50ms 直至终反应时间为 520s。

[0172] 还通过使用四唑盐检测超氧化物自由基的反应测定细胞裂解物中超氧化物歧化

酶活性 (SOD), 所述自由基由黄嘌呤氧化酶 / 次黄嘌呤体系生成。在微量板上使用分光光度法测量 3 种类型的 SOD (Cu-Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD), 所述 SOD 为胞质和线粒体内的 SOD。定义 1 单位 SOD 为歧化 50% 的生成的超氧阴离子时所需的酶量。按照生产商所优化的方案使用 Cayman 试剂盒 (N. 706002) 检测原代培养物的细胞裂解物内的 SOD。该测定法的动力学范围为 0.025-0.25SOD 单位 /ml。

[0173] 测定胞内内源抗氧化剂浓度

[0174] 测量还原态谷胱甘肽的胞内浓度 (GSH)

[0175] 使用直接的动力学测定法测量细胞裂解物内的还原态谷胱甘肽 (GSH)。细胞内的谷胱甘肽可主要以还原态形式 (总谷胱甘肽的 90-95%) 存在, 成为组织内的主要抗氧化剂。其作用是去除外源物的毒性并移除氢过氧化物以保持细胞的氧化还原态。利用所述技术测量生物样本 (细胞裂解物) 中的总谷胱甘肽 (GSSG+GSH), 所述生物样本已经用碘基水杨酸进行过去蛋白处理 (Sigma-Aldrich CS0260 试剂盒)。GSH 导致 5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB) 被连续地还原为 5-硫代 (2-硝基苯甲酸) (TNB), 并且利用谷胱甘肽还原酶和 NADPH 回收再利用所形成的 GSSG。利用分光光度法在 412nm 处测量 TNB。特异性抑制 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的丁硫氨酸亚砷胺 (BSO) 可用作合成抑制剂。

[0176] 评估人皮肤模型中 DHA 的抗氧化活性

[0177] 在此体外测定中, 使用包皮细胞 (未分化的表皮成纤维细胞, ATCC CRL-2076) 作为细胞模型用于测定 DHA 的潜在美容用途, 由于包皮细胞在体外可对各种氧化诱导剂可作出很好的应答所以它们是一种合适的细胞类型, 此外包皮细胞还是一种仅需要常规营养和培养条件的原代培养物, 因此成为一种可外推至体内应答的良好体外模型。

[0178] 结果

[0179] 设定起始条件以在所有研究条件下获得活性细胞模型。这是指结果是利用代谢活性细胞获得的。在先的研究已经证实在包皮细胞中浓度低于 1000 μ M 的 DHA 不会影响研究 (为期 3 天) 中的细胞存活率。也不会影响使用黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系或 AAPH 的氧化应激研究中的细胞存活率。还已经证实连续 3 天向包皮细胞培养物加入浓度最高达 50 μ M 的 DHA 不会明显增加细胞氧化水平, 所述氧化水平是使用两种探针即二氢罗丹明 (DHR123) 和 2,7-二氯荧光素 (H_2DCFDA) 并根据细胞荧光测得的, 所述探针分别对超氧阴离子和氢过氧化物检测具有较高特异性。一旦确立了这些条件, 即可评估掺入到包皮细胞膜中的 DHA 抗氧化应激的总抗氧化能力, 所述氧化应激是由黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系或 AAPH 诱导产生的。

[0180] 当使用 40mM AAPH 诱导适度的氧化应激并且使用 DHR123 作为 ROS 检测剂时, 浓度为 0.5 μ M (59% 的保护作用) 和 5 μ M (33% 的保护作用) 的 DHA 均对活性氧簇生成显示出抑制作用, 浓度为 10 μ M (26% 的保护作用) 的 DHA 作用较弱而浓度为 50 μ M 的 DHA 没有作用 (图 1A)。当使用 60mM AAPH 对细胞进行剧烈诱导时, 浓度为 0.5 μ M (40% 的保护作用) 和 5 μ M (29% 的保护作用) 的 DHA 均显示出抗 ROS 生成的保护作用, 而较高浓度的 DHA 则失去这种保护作用 (图 1A)。

[0181] 我们还注意到 0.5 μ M 的 DHA 可抵御黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系诱导的氧化应激 (图 1B), 这表明 DHA 对活性氧簇——氧化过程中产生的超氧阴离子和氢过氧化物——具有螯合作用。比较 DHA 与亲脂抗氧化剂如维生素 E 的抗氧化能力 (图 1B), 我们发现它们具有

类似的保护作用动力学 (DHA 将细胞氧化抑制了 33.46% 而维生素 E 抑制了 30%)。

[0182] DHA 保护作用动力学应答表明 DHA 总是在诱导后的 60-120 分钟期间产生最大的抗氧化作用,因此说明 DHA 的氢过氧化物和超氧阴离子螯合能力达到饱和。抗氧化作用基本上是剂量依赖性的,因为增加 DHA 浓度会导致 ROS 螯合能力下降,浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 时具有最有效的抗氧化能力。在这一点上,另一个用于使系统效率最优化的重要参数是 DHA 占总脂肪酸的比例。如图 2 所示,在甘油三酯浓度相同时,DHA 比例下降至 50% 或 20% 会明显降低细胞的抗氧化能力,并且在低浓度或中浓度时 DHA 会恢复为促氧化剂。这些结果似乎说明 DHA 的细胞抗氧化作用并不仅取决于其浓度,其分子定位 (即 DHA 在甘油三酯结构中的分布) 也是决定性因素。

[0183] 在特异性抑制 ROS 生成方面,我们分析了脂质过氧化物 (TBARS) 和超氧阴离子的生成。所获得结果表明与未诱导的细胞相比,用 AAPH 处理过的细胞会产生较高浓度的可与硫代巴比土酸反应的物质 (TBARS),表示为 $\mu\text{M MDA}/\text{mg 蛋白}$ (图 3)。与预计的一样,将 DHA 掺入到包皮细胞的膜中会以剂量依赖性方式 (0.5 、 5 和 $50 \mu\text{M}$) 使基础的细胞脂质过氧化反应略有增加 (图 3)。在用 40mM AAPH 进行了氧化诱导的细胞内,DHA 具有保护所述成纤维细胞避免产生膜脂质氢过氧化物的抗氧化能力,其作用是反浓度依赖性的。 $0.5 \mu\text{M}$ DHA 的保护作用为 87%、 $5 \mu\text{M}$ DHA 的保护作用为 85% 且 $50 \mu\text{M}$ DHA-TG 的保护作用为 48% (图 3)。

[0184] 然后分析了超氧阴离子的生成。用 40mM AAPH 进行氧化应激处理过的包皮细胞会产生超氧阴离子,其生成量是未诱导细胞的 2.5 倍,生成的超氧阴离子维持在恒定水平 (图 4)。与对照相比,含有 DHA 且未经氧化诱导的细胞内不具有更高水平的胞内超氧阴离子 (图 4)。在氧化应激条件下 (图 4),浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 的 DHA 会抑制超氧阴离子的生成达 16.5%、浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的 DHA 会抑制超氧阴离子的生成达 10% 且浓度为 $50 \mu\text{M}$ 的 DHA 会抑制超氧阴离子的生成达 9%。通过加入 Tyron (4,5-二羟基-1,3-苯二磺酸,一种可透过细胞膜并可作为胞内超氧阴离子的高度特异性螯合剂的化合物) 和胞外 SOD (内源抗氧化防护系统中歧化胞内超氧阴离子的首要酶阻断剂) 证实了所述方法的特异性。在存在外源 SOD 或 Tyron 的情况下,用 AAPH 刺激的细胞内 (先前已经掺入或未掺入 DHA) 超氧阴离子的产生会被完全抑制并且达到基础值 (图 4)。

[0185] 最后,我们分析了 DHA 是否会通过改变首要的细胞抗氧化酶活性来行使其抗氧化活性。分析了包皮细胞 (含有或不含有 DHA) 中 SOD 和 GPx 的活性。在含有 DHA 的情况下,黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶体系可用作超氧阴离子的瞬时产生器 (总测量时间为 520 秒,每 50 秒测量一次)。所得结果表明这是具有快速动力学的良好氧化诱导,同时可直接观察到歧化反应并且未产生超氧阴离子。氧化诱导后 15 秒所达到的最大化学发光可作为 SOD 活性的间接和定性的量度 (图 5A)。在不含 DHA 的情况下,数值达到了 $310\text{U. A. 化学发光}/10^6$ 细胞,而在与 $0.5 \mu\text{M}$ DHA 预孵育的系统中该值下降至 $150\text{U. A. 化学发光}/10^6$ 细胞 (52% 的抗氧化保护作用) (图 5A)。在用 $5 \mu\text{M}$ 和 $50 \mu\text{M}$ DHA 处理过的细胞内,抗氧化效率分别维持在 52% 和 42% 的保护作用 (图 5A)。此外,已知 AAPH 会通过扩散所产生的过氧自由基来氧化 DNA、蛋白质和脂质,作为抗氧化剂的 DHA 可防止能歧化超氧阴离子的 SOD 的失活,维持胞内的过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的内源抗氧化防护系统。图 5B 证实了这一方面,其中已证实处于基态时 DHA 的存在不会使 SOD 活性增加 (-10/-15%),但是存在 DHA 时会抑制由于氧化应激过程导致的 SOD 活性丧失,保持甚至增加 SOD 活性 (10/20%)。至于 GPx 活性

(图 6),发现处于细胞基态时适当浓度的 DHA 会使 GPx 活性增加 (5 μ M 时高达 17%),但是高浓度的 DHA 会使 GPx 活性下降 (50 μ M 时下降 20%)。处于氧化应激状态时可完全维持这种效应 (图 6)。这些结果表明在所有测试浓度下 DHA 均可与内源抗氧化防护系统协作,所述防护系统涉及通过产生的 SOD 来歧化超氧阴离子,并且适当浓度的 DHA 还能够控制氢过氧化物的生成,因为它会增加 GPx 活性。

[0186] 评估视网膜细胞模型中 DHA 的抗氧化活性

[0187] 在此体外研究中,所述细胞模型基于 ARPE-19 细胞 (视网膜色素上皮细胞, ATCC CRL-2302),由于 ARPE-19 细胞在体外可对各种氧化诱导剂作出很好的应答所以它们是一种合适的细胞类型,此外 ARPE-19 细胞还是一种仅需要常规的营养和培养条件的原代培养物。ARPE-19 细胞还可构成一种良好的眼科模型,因为它具有所述视网膜色素上皮细胞的生物特性和功能特性。

[0188] 结果

[0189] 使用该细胞系进行的测定类似于前述部分中所述的对包皮细胞进行的测定。在所有工作条件下 (DHA 的作用,氧化应激的作用),保持细胞存活所需的基本需求是相同的。在基础细胞氧化态下,以所要分析剂量掺入的 DHA 也不会导致任何显著变化。

[0190] 当使用 40mM AAPH 诱导适度的氧化应激并且使用 DHR123 作为 ROS 检测剂时,浓度为 0.5 μ M (43% 的保护作用) 和 5 μ M (32% 的保护作用) 的 DHA 均对活性氧簇生成表现出抑制作用,但浓度为 50 μ M (4% 的保护作用) 的 DHA 的作用较弱 (图 7A)。当使用 60mM AAPH 对细胞进行剧烈诱导时,浓度为 0.5 μ M (13% 的保护作用) 的 DHA 具有抗 ROS 生成的保护作用,而较高浓度的 DHA 的作用较弱 (图 7A)。上述结果类似于使用包皮细胞获得的结果,但是一个明显不同的作用是观察到的抗剧烈氧化诱导的保护作用较弱。通过,用对过氧化物更加特异的 CDCFDA 进行 ROS 检测,也证明 DHA 可产生抗氧化应激的保护作用,所述氧化应激是由 AAPH 诱导的 (图 7B)。

[0191] DHA 保护作用动力学也总是在诱导后的 60-120 分钟期间显示出最大的抗氧化作用,因此说明 DHA 的氢过氧化物和超氧阴离子螯合能力达到饱和。在量上,抗氧化能力基本上是剂量依赖性的,因为增加 DHA 浓度会导致 ROS 螯合能力下降,浓度为 0.5 μ M 时具有最有效的抗氧化能力 (图 7A 和 7B)。在这一点上,另一个用于使系统效率最优化的重要参数是 DHA 占总脂肪酸的比例。将 DHA 占脂肪酸的比例从 70% 降低至 50-20% 可显著地且不成比例地降低最佳浓度 (0.5-5 μ M) 的 DHA 的细胞抗氧化能力,当 DHA 为高浓度时 (图 8A 和 8B),与包皮细胞不同的是 DHA 以不成比例的方式变为促氧化剂。这些结果证实了 DHA 的细胞抗氧化作用并不仅取决于其浓度,其分子定位 (即 DHA 在甘油三酯结构中的分布) 也是决定性因素。

[0192] 在特异性抑制 ROS 生成方面,分析了脂质过氧化物 (TBARS) (图 9) 和超氧阴离子 (图 10) 的生成。所获得结果非常类似于用包皮细胞获得的结果。与未诱导的细胞相比,用 AAPH 处理过的细胞会产生较高浓度的可与硫代巴比土酸反应的物质 (TBARS) 以及较高浓度的超氧阴离子。将 DHA 掺入到 ARPE-19 细胞的膜中会以剂量依赖性方式 (0.5、5 和 50 μ M) 使细胞的基础脂质过氧化反应略有增加,但是在氧化诱导处理过的细胞内,DHA 具有抑制所述细胞产生膜脂质过氧化物的细胞抗氧化活性,所述活性与其浓度成反比。0.5 μ M DHA 的保护作用为 64%、5 μ M DHA 的保护作用为 58% 且 50 μ M DHA 的保护作用为 42% (图 9)。

然后分析超氧阴离子的生成。与对照相比,含有 DHA 且未进行氧化诱导过的细胞内不具有较高水平的胞内超氧阴离子(图 10A)。使用 40mM AAPH 诱导的氧化应激可生成超氧阴离子,超氧阴离子产量可被 DHA 部分抑制(浓度为 0.5-50 μ M 时抑制 20-16%)。存在 DHA 时,该抑制作用与 SOD 活性一致(图 10B)。未发现处于基态时 DHA 的存在会使 SOD 活性增加(-10/15%),但是如在包皮细胞中的情况一致,存在 DHA 时会抑制由于氧化应激过程导致的 SOD 活性丧失,保持基础 SOD 活性。

[0193] 最后,进行了一项分析以研究 DHA 是否会改变作为首要细胞抗氧化剂的 GPx 酶的活性(图 11)。处于细胞基态时所测试的所有浓度的 DHA 均会增加 GPx 活性(12-40%),且处于氧化诱导状态时可完全地维持这种效应,同样表现出使 GPx 活性升高 2.5 倍(图 11)。与包皮细胞的情况一样,这些结果表明通过调节内源细胞酶系统抗氧化防护系统,DHA 可实现其抗氧化作用的一部分。

[0194] 合成方法对掺入甘油三酯中的 DHA 抗氧化活性的影响

[0195] 在此体外测量中,ARPE-19 细胞(视网膜色素上皮细胞,ATCC CRL-2302)和包皮细胞(未分化的表皮成纤维细胞,CRL-2076)可用作细胞模型,由于这两种细胞在体外可对各种氧化诱导剂作出很好的应答所以它们是合适的细胞系。通过化学方法(CHEM)或酶学方法(ENZ)获得的金枪鱼油甘油三酯(DHA20%-TG,DHA 占 20%(摩尔百分数))或含有 50% 或 70%(摩尔百分数)DHA 的油衍生物(DHA50%-TG 和 DHA70%-TG)可用作活性成分。

[0196] 结果

[0197] 当使用 40mM AAPH 在 ARPE-19 细胞中诱导适度的氧化应激并且使用 DHR123 或 H₂DCFDA 作为 ROS 胞内检测剂时,浓度为 0.5 μ M 和 5 μ M 的天然 DHA(DHA20%-TG)和掺入通过化学方法获得的甘油三酯中的 DHA(DHA50%-TG-CHEM 和 DHA70%-TG-CHEM)均对活性氧簇的生成具有抑制作用,浓度为 50 μ M 时具有较弱的作用(图 13A)。该作用取决于 DHA 的含量,依次为 DHA70%-TG-CHEM > DHA50%-TG-CHEM > DHA20%-TG。浓度相同时(0.5、5 和 50 μ M),通过酶学方法获得的油在所有 DHA 含量时(DHA70%-TG-ENZ 和 DHA50%-TG-ENZ)均显示出较高的活性(图 13B)。在与包皮细胞类似的研究中,结果甚至更加令人吃惊。与高剂量 DHA70%-TG-CHEM 和 DHA50%-TG-CHEM 所显示出的促氧化活性(图 13C)不同,所有浓度的酶来源的油(DHA70%-TG-ENZ 和 DHA50%-TG-ENZ)均具有抗氧化性(图 13D)。利用色谱法移除化学方法获得的油中的本征聚合物(DHA70%-Tg-BPM)会使得 ARPE-19 细胞中的抗氧化活性下降得更多,在高浓度时变为促氧化性(5 和 50 μ M)(图 14)。掺入甘油三酯中的 DHA 的抗氧化活性也高于(至少两倍)掺入其他化学结构(例如乙酯、游离脂肪酸或与血清白蛋白连接的脂肪酸)中的 DHA 的抗氧化活性,所述甘油三酯是通过酶法合成获得的(图 15)。

[0198] 通过掺入 DHA 所显示出的细胞抗氧化活性涉及先前考虑的所有方面例如维持 SOD 和 GPx 酶活性,而且还涉及谷胱甘肽(GSH)胞内浓度的增加。在 ARPE-19 细胞中(图 16),DHA 诱导 GSH 胞内浓度增加,所述浓度增加与 GSH 的重新合成直接相关,因为加入 BS0(GSH 合成的特异性抑制剂)会消除 DHA 的保护作用(图 17),直接导致 GSH 胞内浓度的降低(图 15)。包皮细胞表现出了类似的情况(图 18)。

[0199] 通过酶法合成获得的 DHA 的抗氧化活性的改善也适用于另一种 ω -3 脂肪酸例如二十碳五烯酸(EPA)。在使用 ARPE-19 细胞进行的研究中,证实通过酶学方法获

得的 EPA (EPA70% -TG-ENZ) 具有抗氧化活性,但是与使用 DHA (DHA70% -TG-ENZ) 时观察到的抗氧化活性相比非常低,同时也证实了通过化学方法获得的 EPA (不含聚合物 (EPA-70% -TG-BPM)) 则具有很高的促氧化性 (图 19)。此外,在包皮细胞中通过酶学方法获得的 EPA (EPA70% -Tg-ENZ) 显示出显著的抗氧化活性,甚至高于 DHA (DHA70% -TG-ENZ) 的抗氧化活性 (图 20),同 DHA 一样 EPA 的抗氧化活性与 GSH 胞内浓度的增加有关 (图 21)。

[0200] 评估掺入结构化甘油三酯中的 DHA 在视网膜细胞模型中的抗氧化活性

[0201] 在此体外研究中,将 ARPE-19 细胞 (视网膜色素上皮细胞,ATCC CRL-2302) 用作细胞模型,由于 ARPE-19 细胞在体外可对各种氧化诱导剂作出很好的应答所以它们是一种合适的细胞类型,此外 ARPE-19 细胞还是一种仅需要常规的营养和培养条件的原代培养物。此外,ARPE-19 细胞是一种良好的眼科模型,因为它具有所述视网膜色素上皮细胞的生物特性和功能特性。已经使用衍生自金枪鱼油的结构化甘油三酯 (DHA20% -TG, DHA 占 20% (摩尔百分数)) 或含有 70% DHA 的油 (DHA70% -TG, DHA 占 70% (摩尔百分数)) 用作活性成分,其中通过酶学方法用辛酸置换 sn-1 和 sn-3 位的脂肪酸。在这些新化合物中, DHA20% -TG 中 DHA 的摩尔含量为 7% 且 DHA70% -TG 中 DHA 的摩尔含量为 22%。

[0202] 结果 (参见图 22)

[0203] 当使用 40mM AAPH 诱导适度的氧化应激并且使用 DHR123 作为 ROS 检测剂时,浓度为 0.5 μ M 和 5 μ M 的掺入常规甘油三酯中的 DHA (DHA20% -TG 和 DHA70% -TG) 均对活性氧簇的生成表现出抑制作用,浓度为 50 μ M 的 DHA 的作用较弱 (图 22)。该作用取决于 DHA 的含量,即为 DHA70% -TG > DHA20% -TG。浓度相同时,实际 DHA 浓度低 2-3 倍的结构化油显示出与 DHA20% -TG 相同 (浓度为 0.5 μ M) 或更高 (浓度为 5 μ M 和 50 μ M) 的活性。对于 DHA70% -TG,结构化甘油三酯的效力稍微低于最佳浓度 (0.5 μ M 和 5 μ M),但是高浓度 (50 μ M) 时的情况相反,通常显示出更稳定且剂量依赖性更弱的作用。

[0204] 评估人皮肤模型中 DHA 作为一种与年龄相关的端粒长度保护剂的活性

[0205] 在此体外测定法中,可使用包皮细胞 (未分化的表皮成纤维细胞, ATCC CRL-2076) 作为细胞模型用于测定 DHA 的潜在美容用途,由于包皮细胞在体外可对各种氧化诱导剂作出很好的应答所以它们是一种合适的细胞类型,此外包皮细胞还是一种仅需要常规的营养和培养条件的原代培养物,因此成为一种可外推至体内应答的良好体外模型。

[0206] 方法学

[0207] 细胞培养物

[0208] 所用的细胞模型为获取自美国典型微生物菌种保藏中心的包皮细胞 (未分化的表皮成纤维细胞, CRL-2076)。将细胞培养物置于特别设计用于这一目的的具有合适生长条件的培养箱中,所述生长条件为温度 37°C、CO₂ 浓度 5% 和湿度 95%。使 CRL-2076 成纤维细胞在装有伊思考夫改良杜尔贝可培养基 (Biological Industrie) 的培养瓶中维持生长,所述培养基中补加了 10% 胎牛血清、青霉素抗生素 (100U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL) 和谷氨酰胺 (Biological Industries)。

[0209] 将 DHA 整合到所述细胞中

[0210] 加入浓度为 0.5 μ M 的通过酶法合成的 DHA-TG 70%, 通过将油溶于乙醇中制备储液 (1 : 100) 并且使用血清制备的培养基制备工作溶液。在 37°C 下,将细胞用补加了 DHA-TG 的培养基培养 3 天。

[0211] 诱导氧化应激

[0212] 使用浓度为 40mM 的 2,2'-偶氮二-(2-脒基丙烷)二盐酸盐 (AAPH) 氧化性地刺激细胞, AAPH 被广泛用作自由基的亲水引发剂, 诱导脂质和蛋白质的过氧化反应。AAPH 会通过已形成的过氧自由基的作用来氧化 DNA、蛋白质和脂质。AAPH 还会作用于内源防护系统, 因为它会使关键性的酶 SOD 失活, 从而失去 CAT 和 GPx 的保护能力。

[0213] 测量端粒长度

[0214] 可利用原位杂交技术来评估由高度重复的 DNA 构成的端粒区域。所述荧光原位杂交方法 (FISH) 可检测是否存在端粒并且将每个细胞或每个染色体组的端粒定量, 所述杂交方法使用与所述端粒序列互补的探针。被称为 flow FISH 的方法联合使用流式细胞术和 FISH 技术 (使用 pan- 端粒 PNA (肽核酸) 作为探针), 并且可以利用荧光强度来测量位于各个细胞染色体末端的平均端粒长度。我们的目的在于测量 PAN 标记的分裂中期染色体的荧光强度。将结果表式为端粒荧光单位 (TFU), 每 1TFU 对应 1kb 的重复端粒。

[0215] 结果

[0216] 利用 flow-FISH 分析人成纤维细胞内的端粒平均长度的变化, 所述人成纤维细胞是在加入或未加入 DHA 的氧化应激条件下培养的 (图 23)。使用线性回归分析端粒长度与细胞群传代数之间的关系。对于所有分析的培养物来说, 可以直接将回归的斜率理解为端粒缩短指数。在人成纤维细胞中, AAPH 的处理会显著加快端粒缩减指数, 所述 AAPH 会诱导产生过量的胞内自由基。另一方面, 与未加入 DHA 的情况相比, 加入浓度为 0.5 μ M 的 DHA 可将所述指数降低 50%, 已经证明加入 0.5 μ M DHA 可增加细胞抗氧化防护。此外, 与正常的成纤维细胞对照相比, 加入 DHA 能够降低端粒缩减指数。

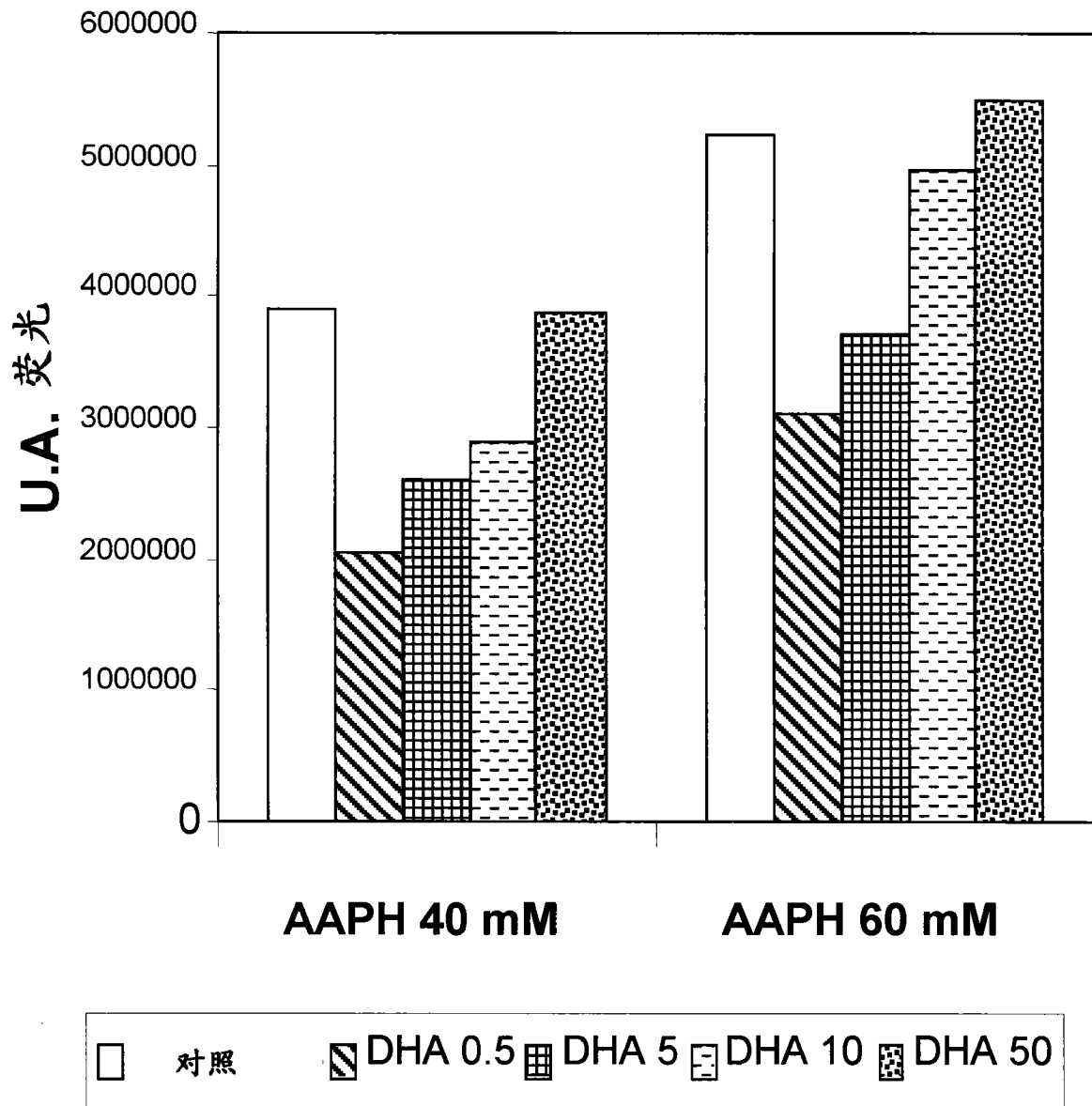


图 1A

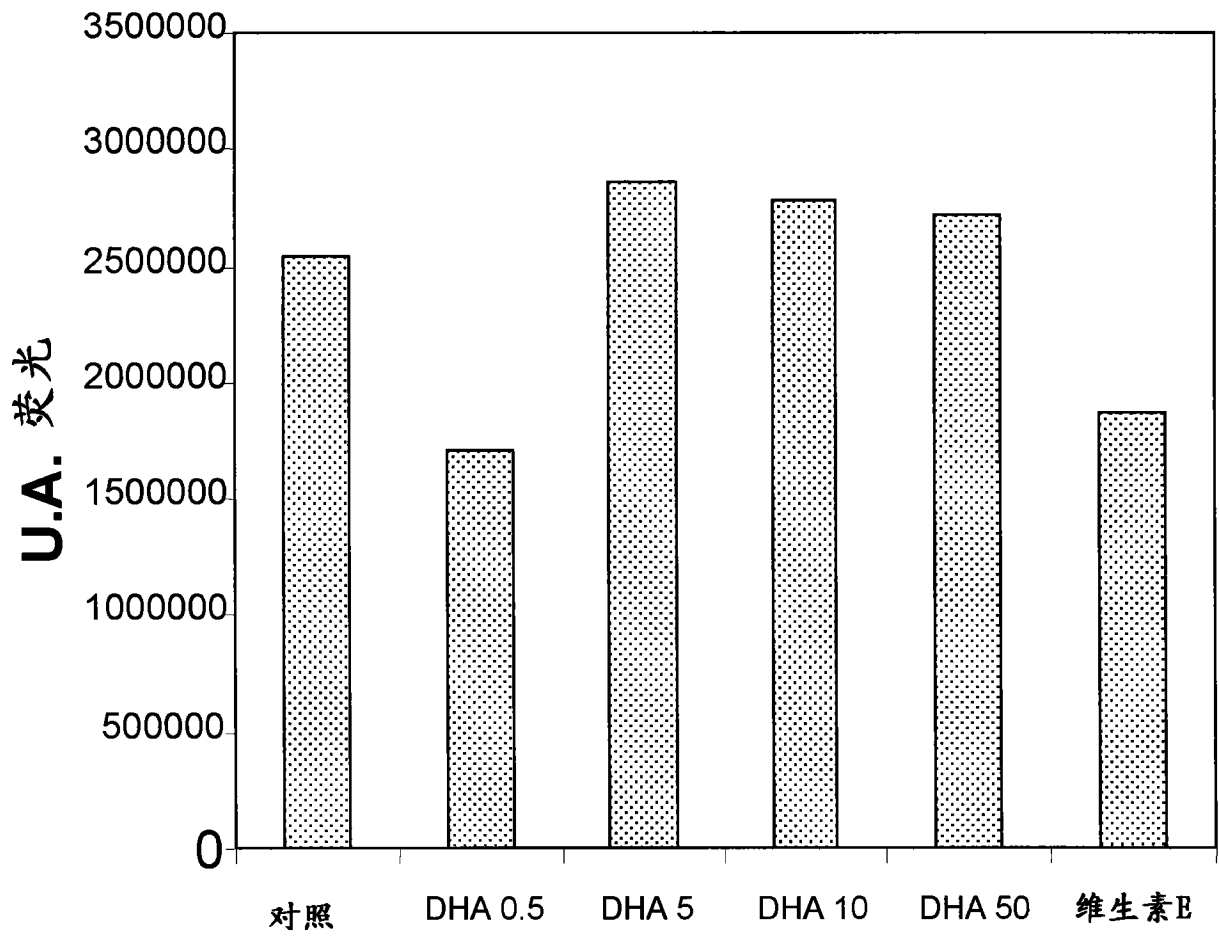


图 1B

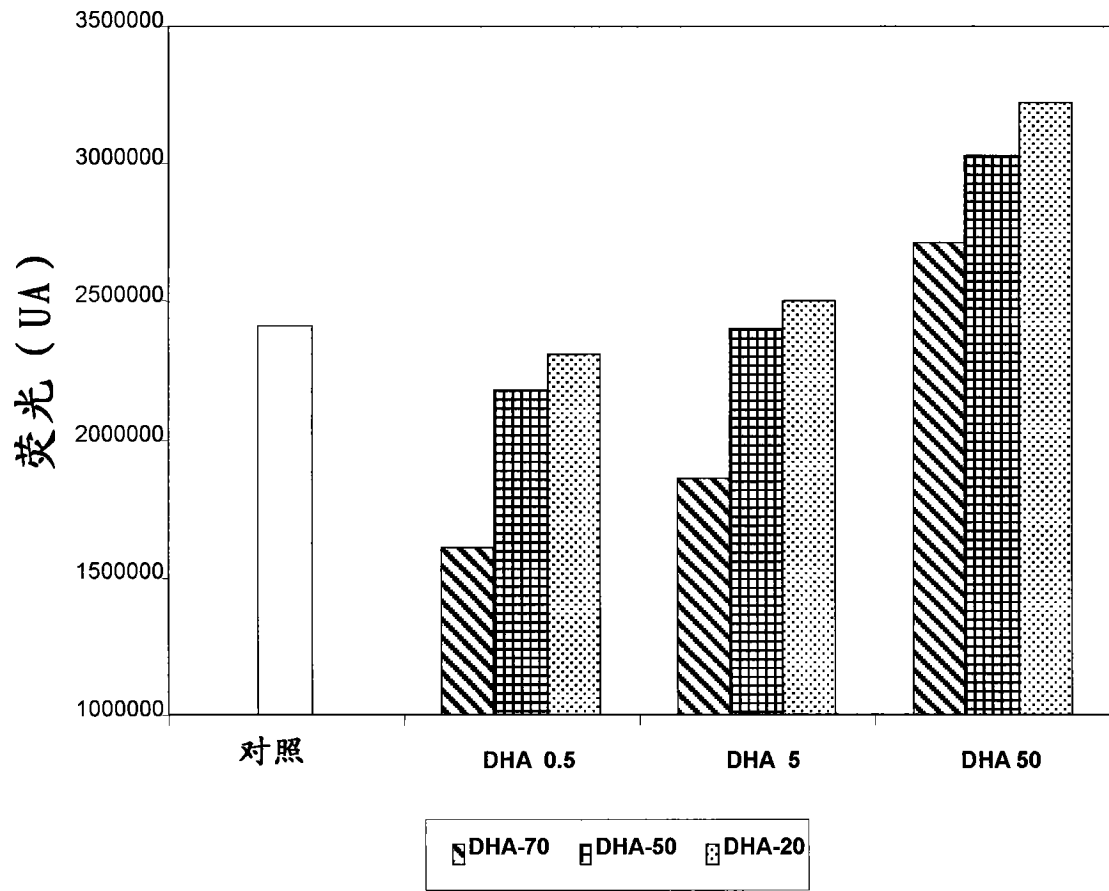


图 2A

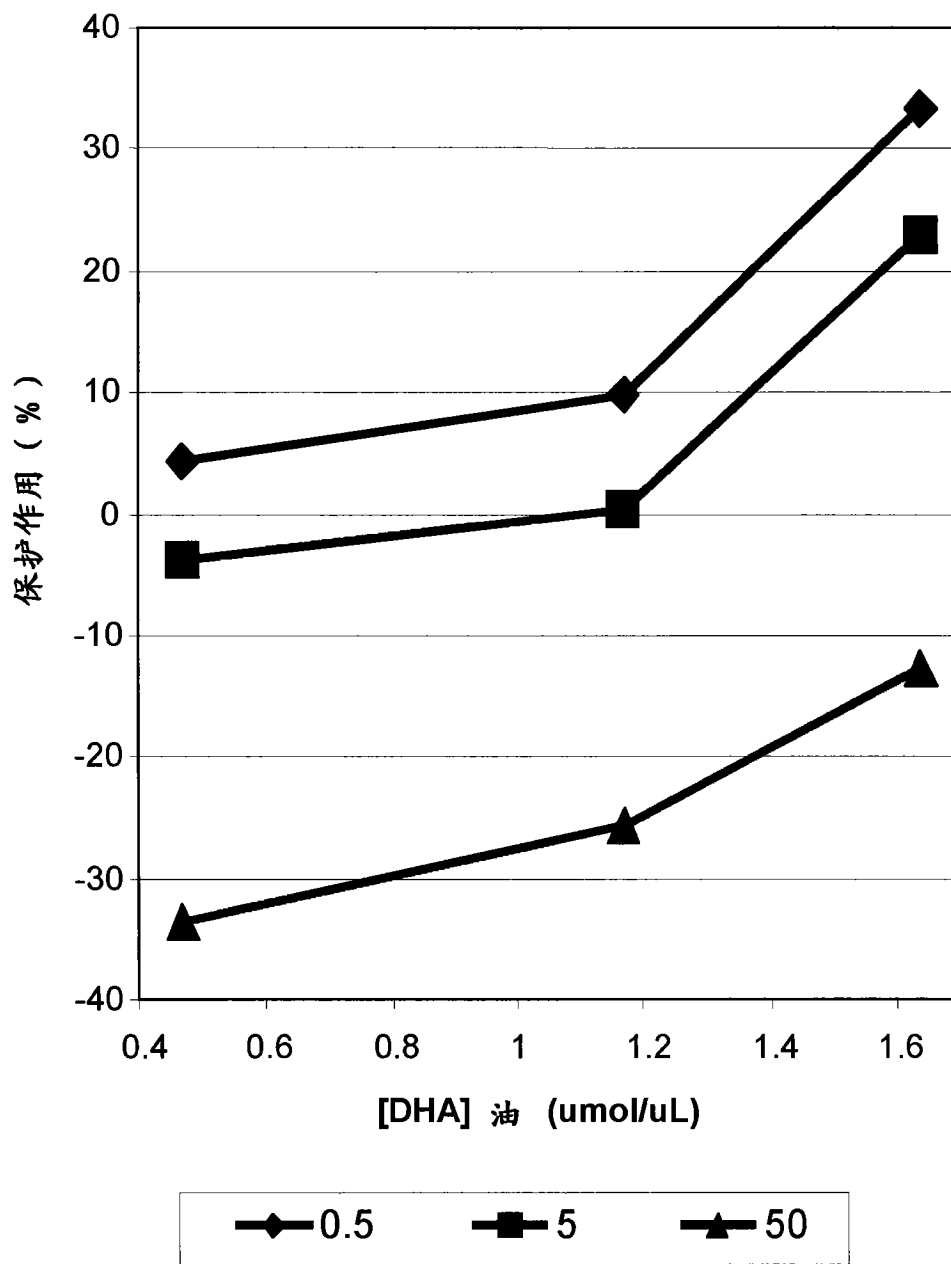


图 2B

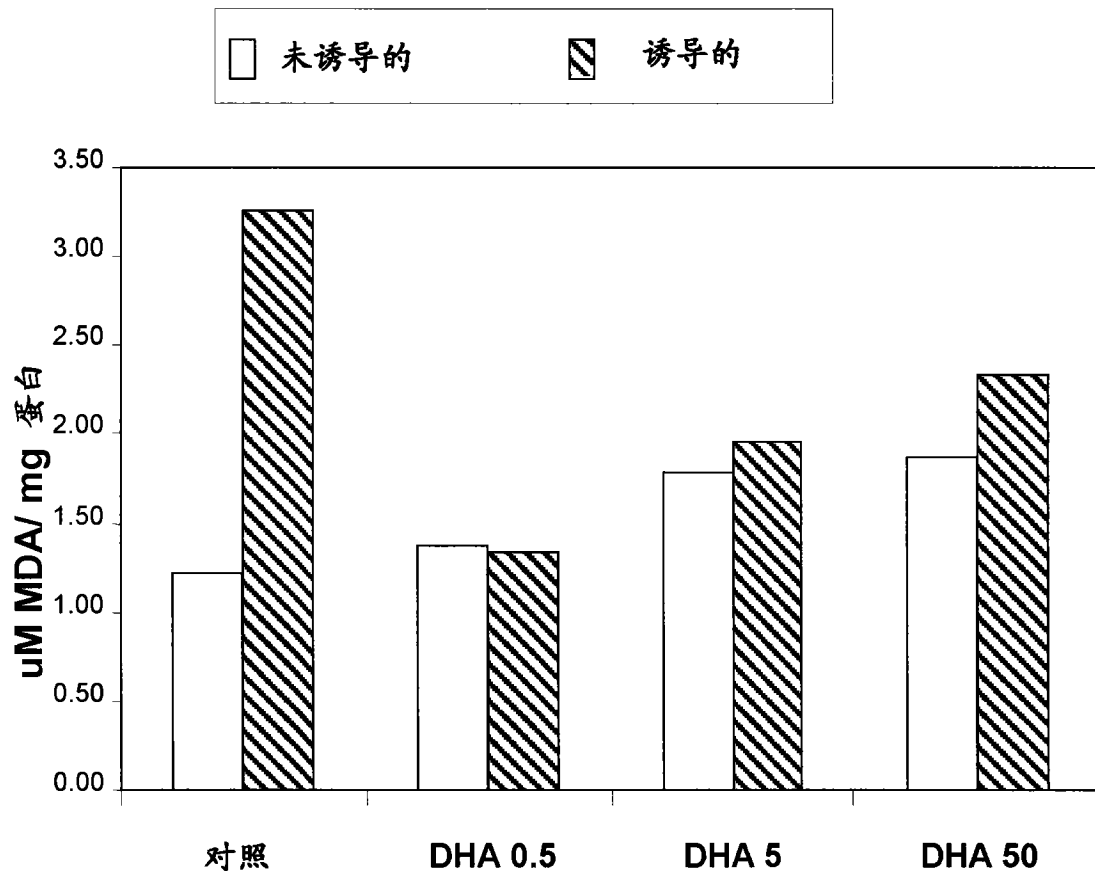


图 3

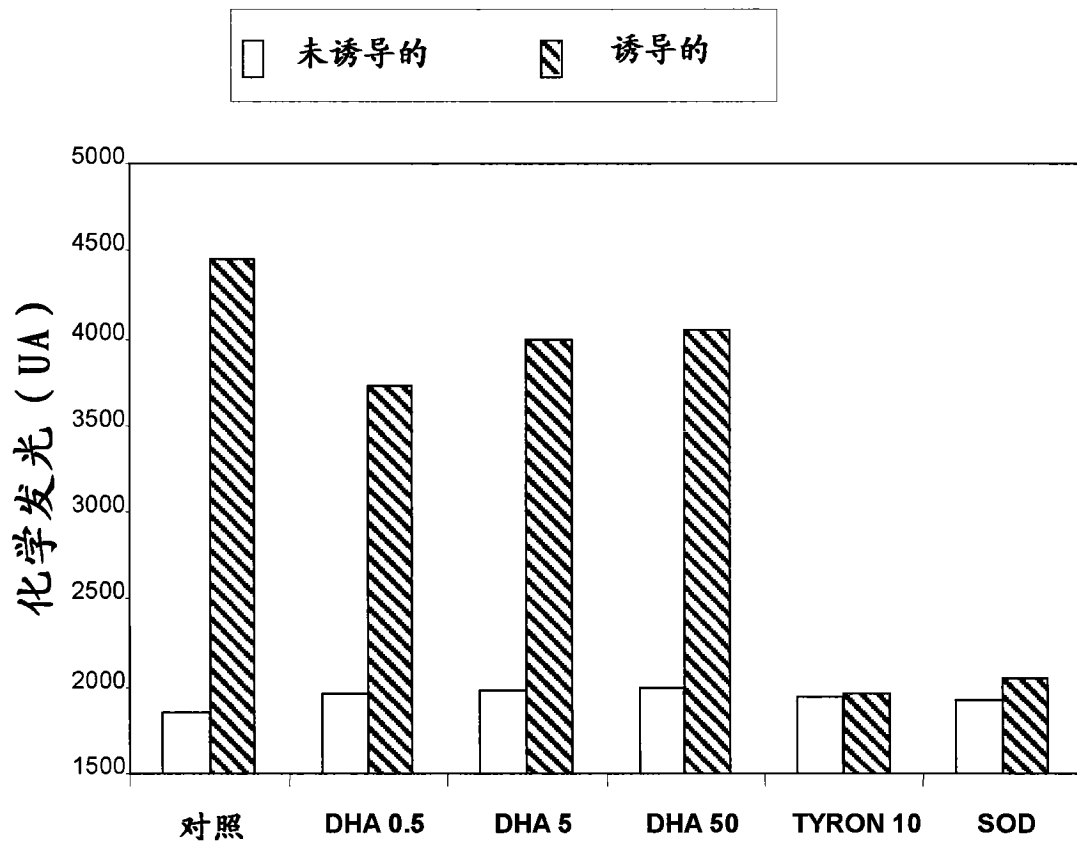


图 4

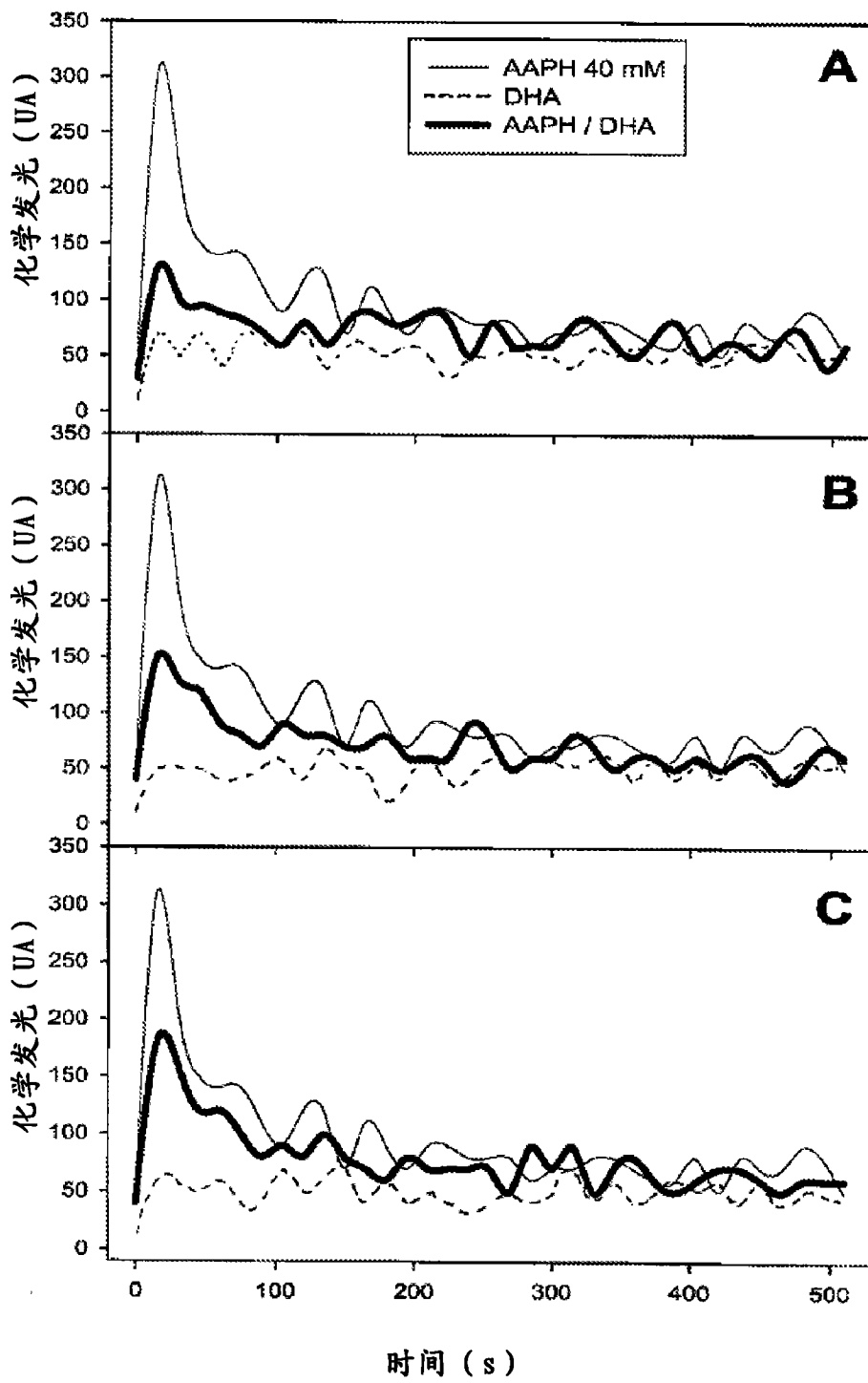


图 5A

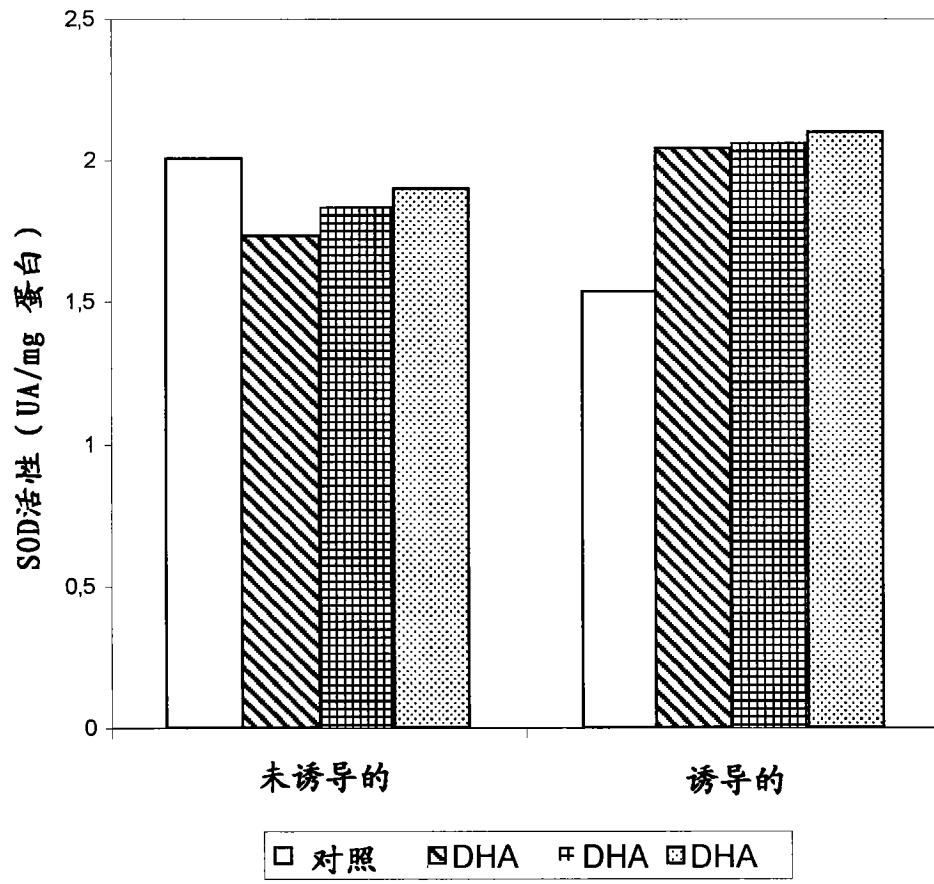


图 5B

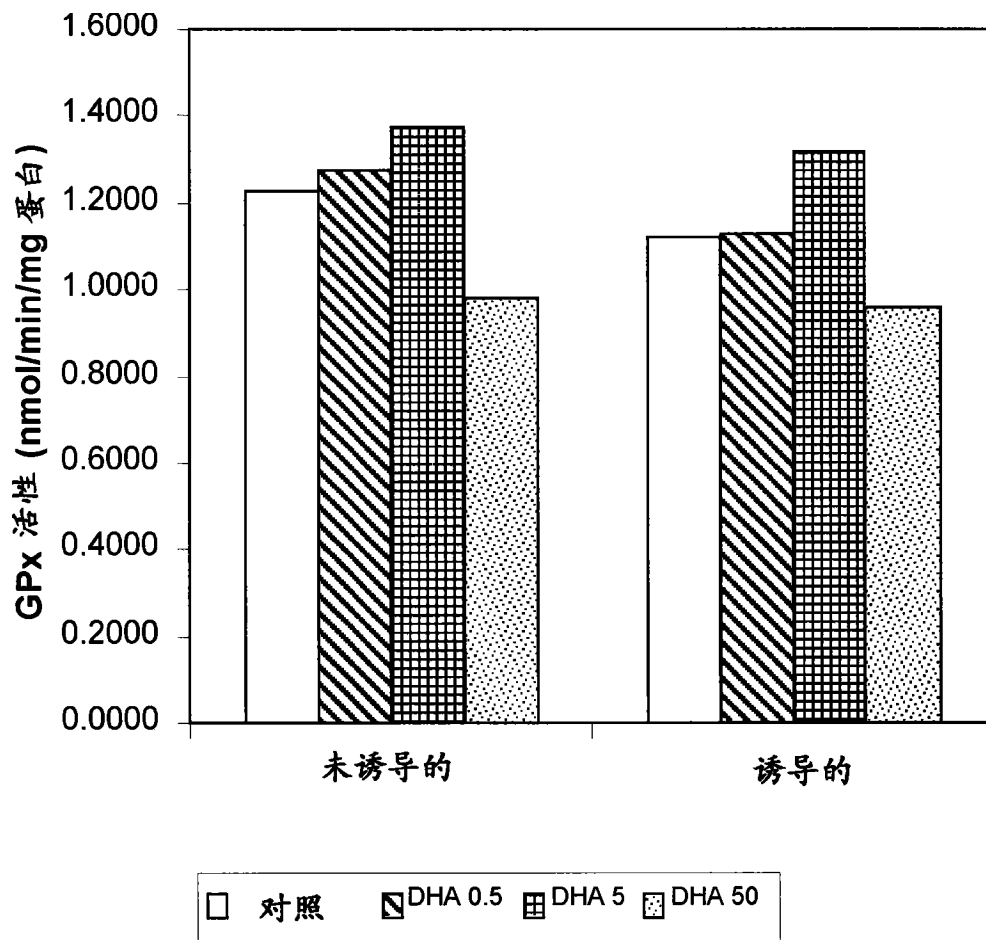


图 6

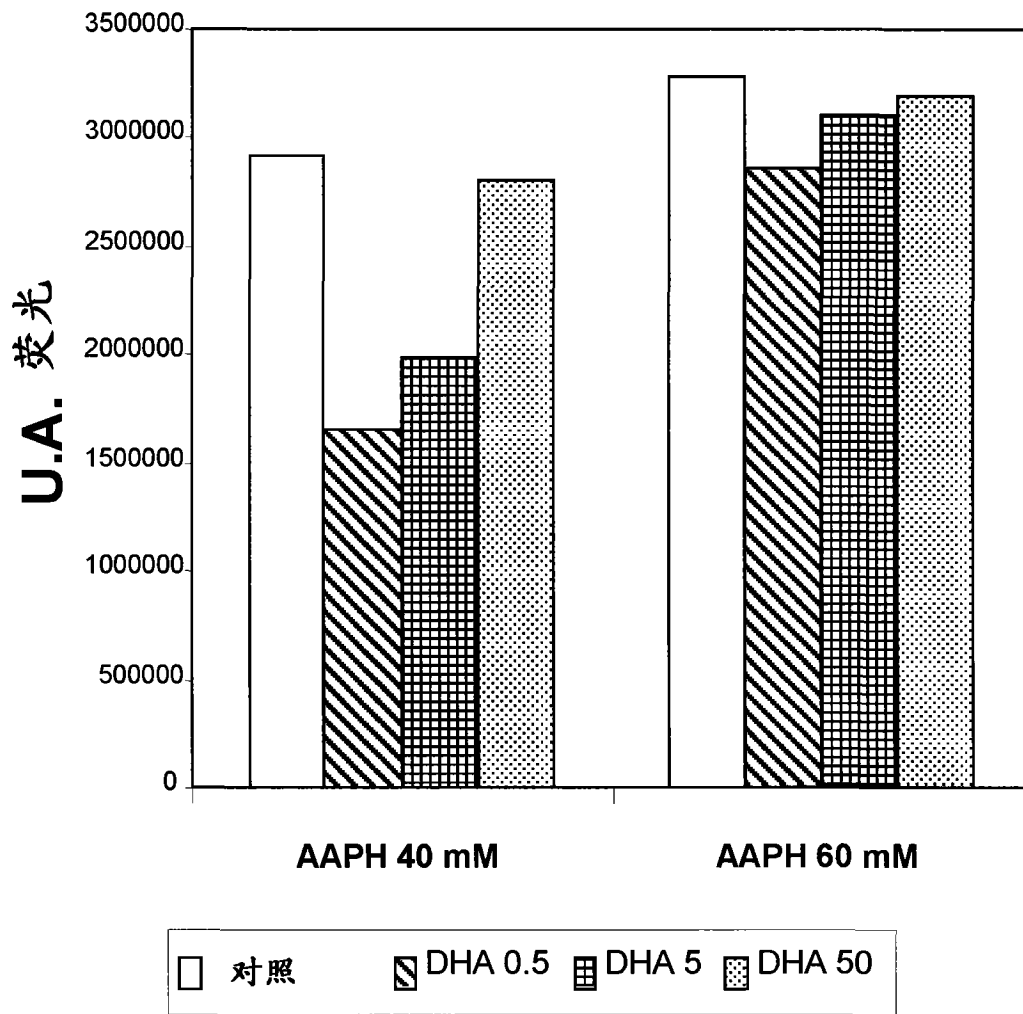


图 7A

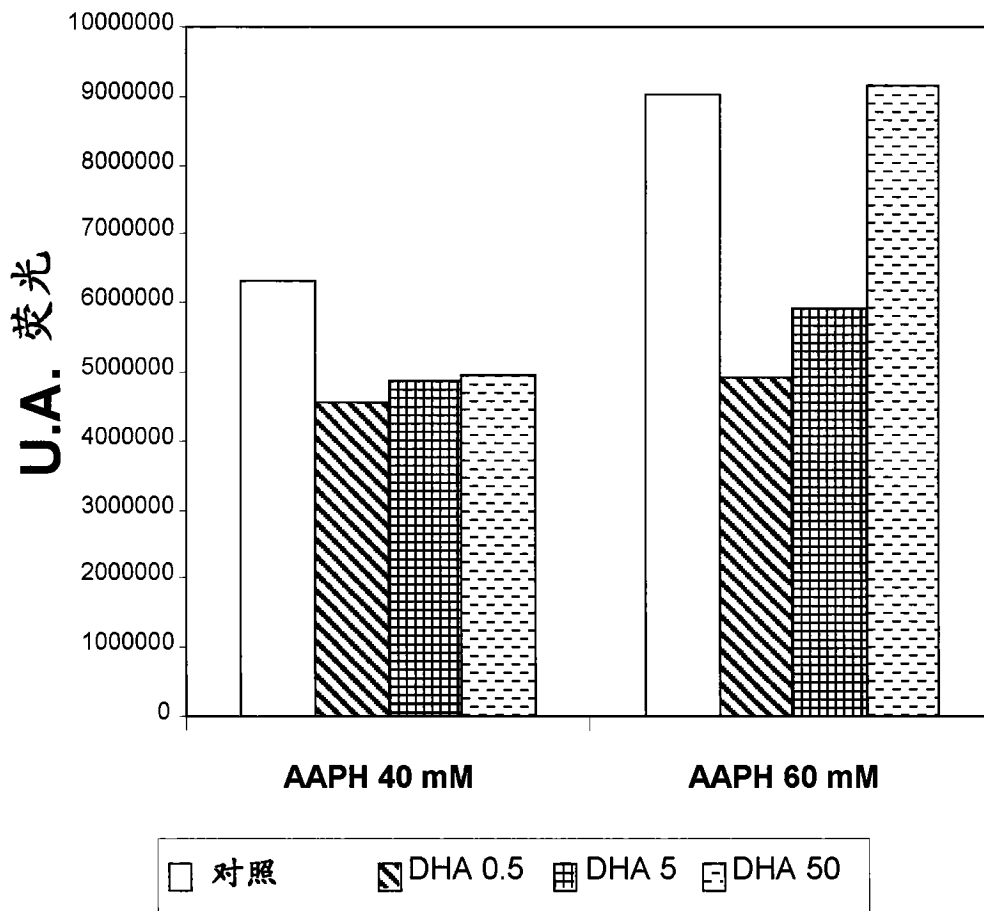


图 7B

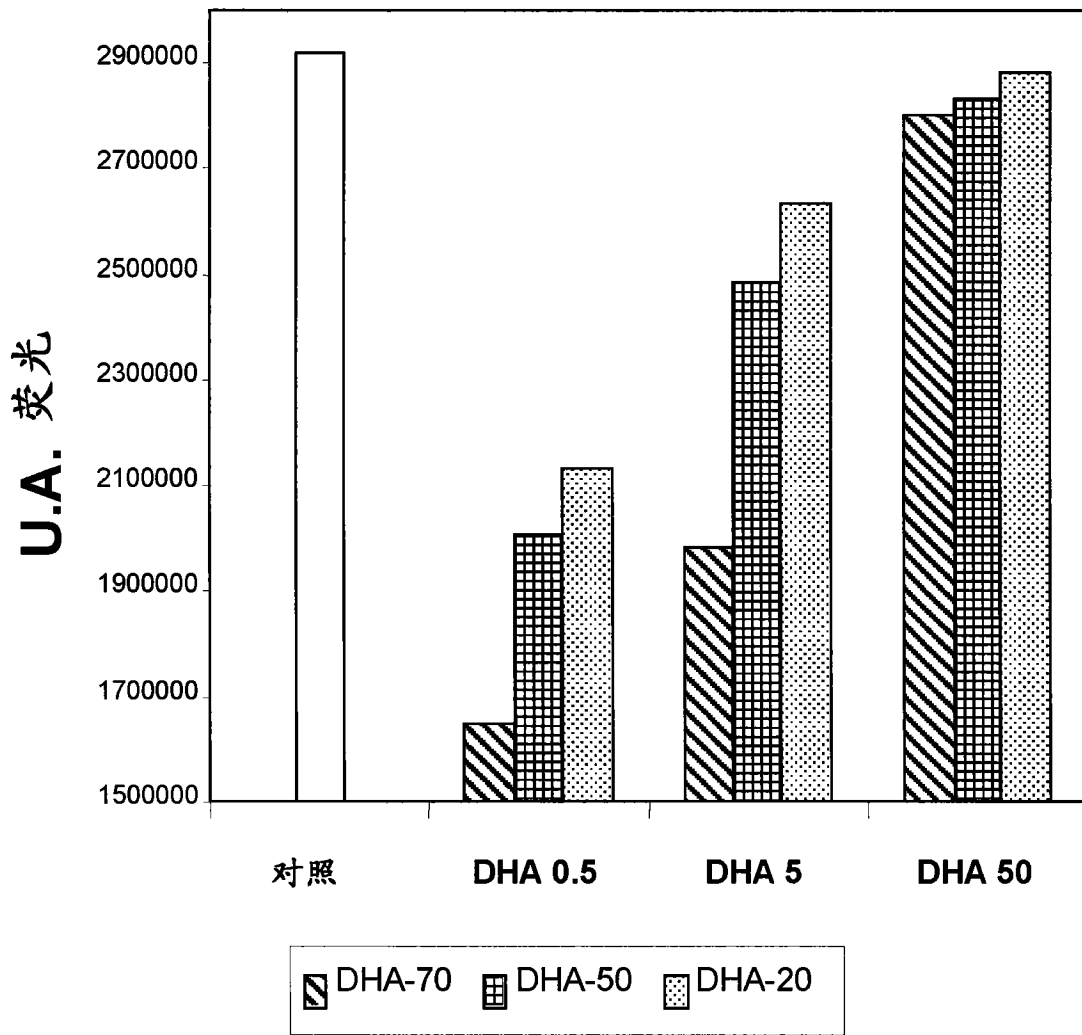


图 8A

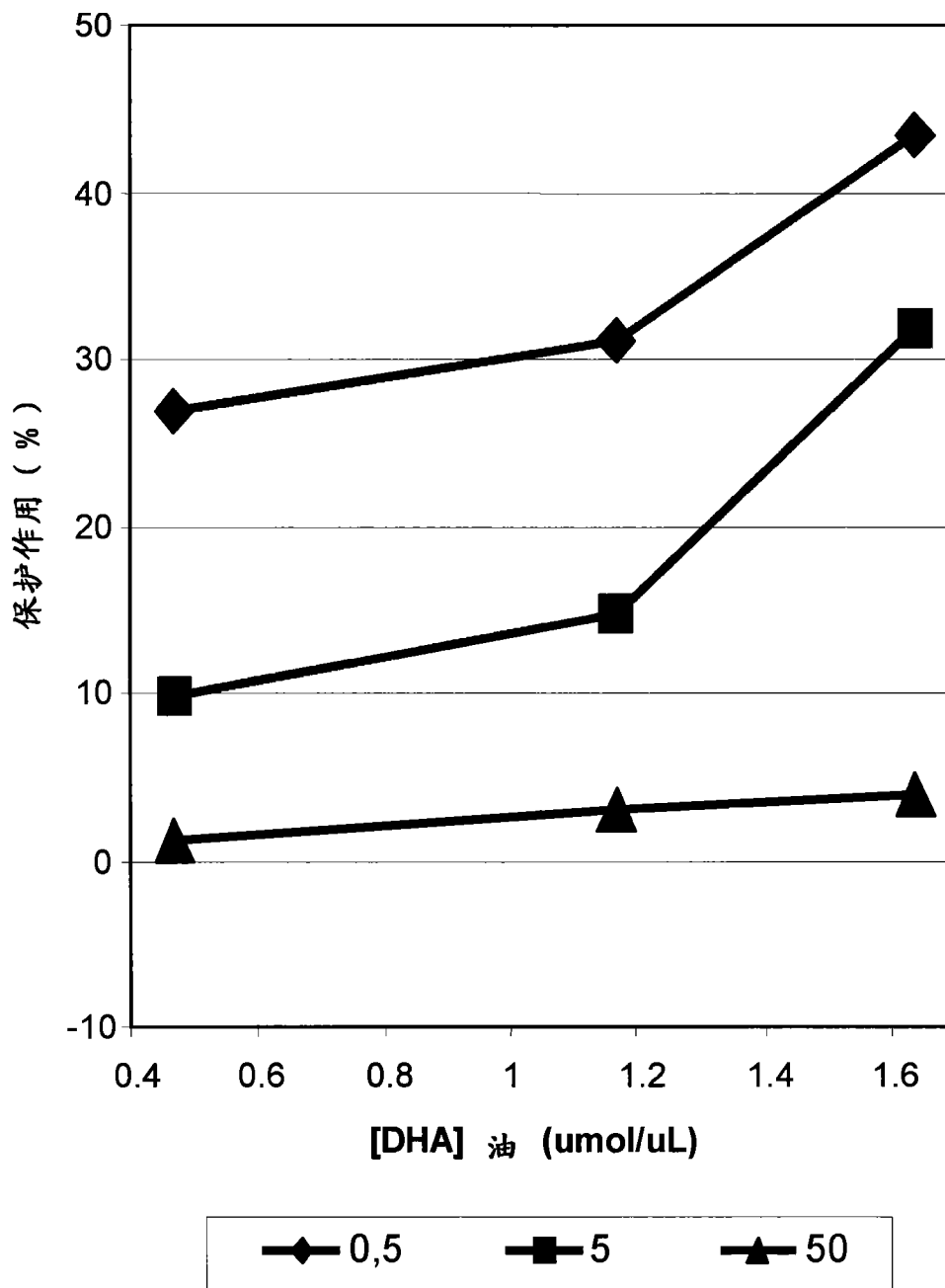


图 8B

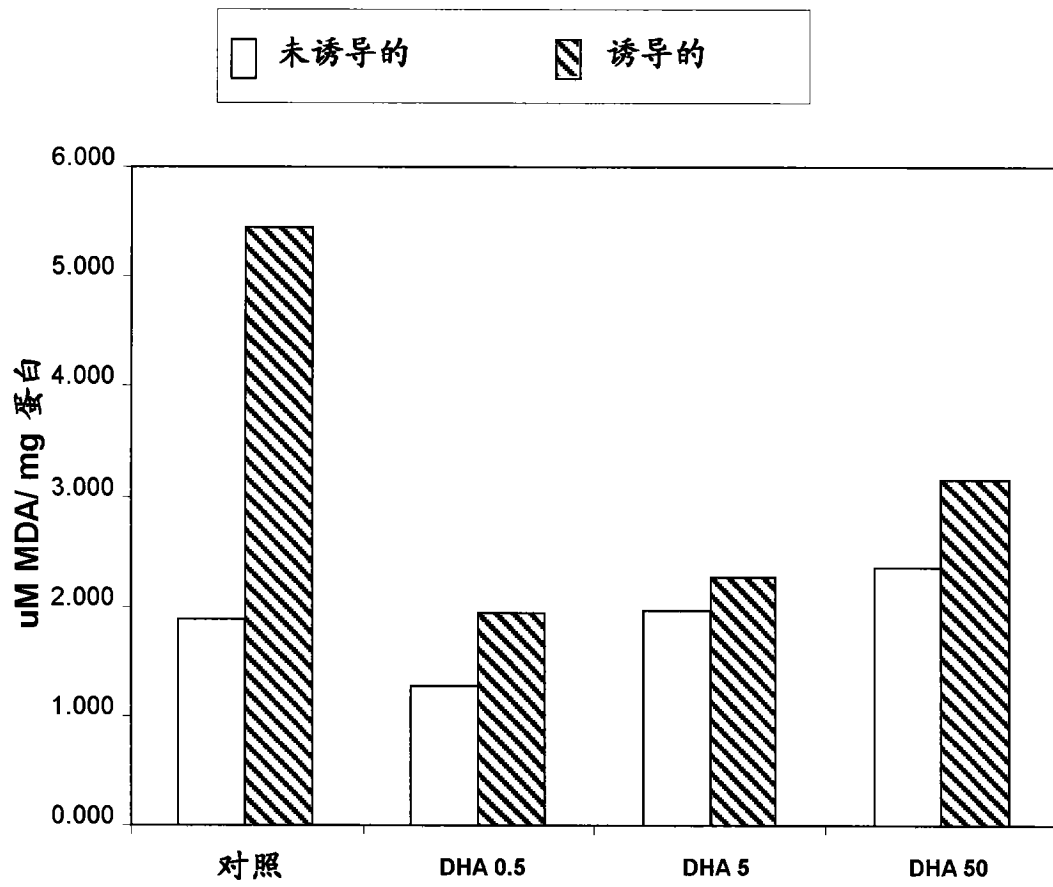


图 9

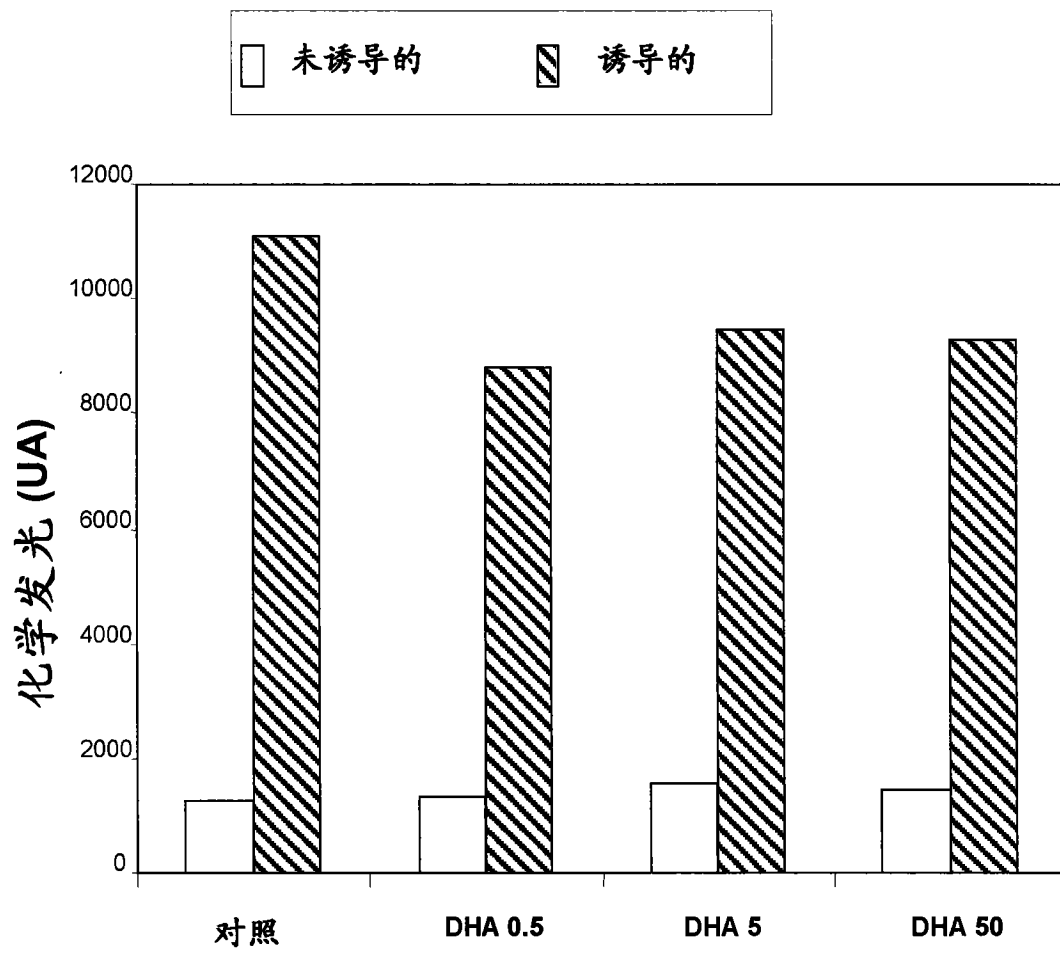


图 10

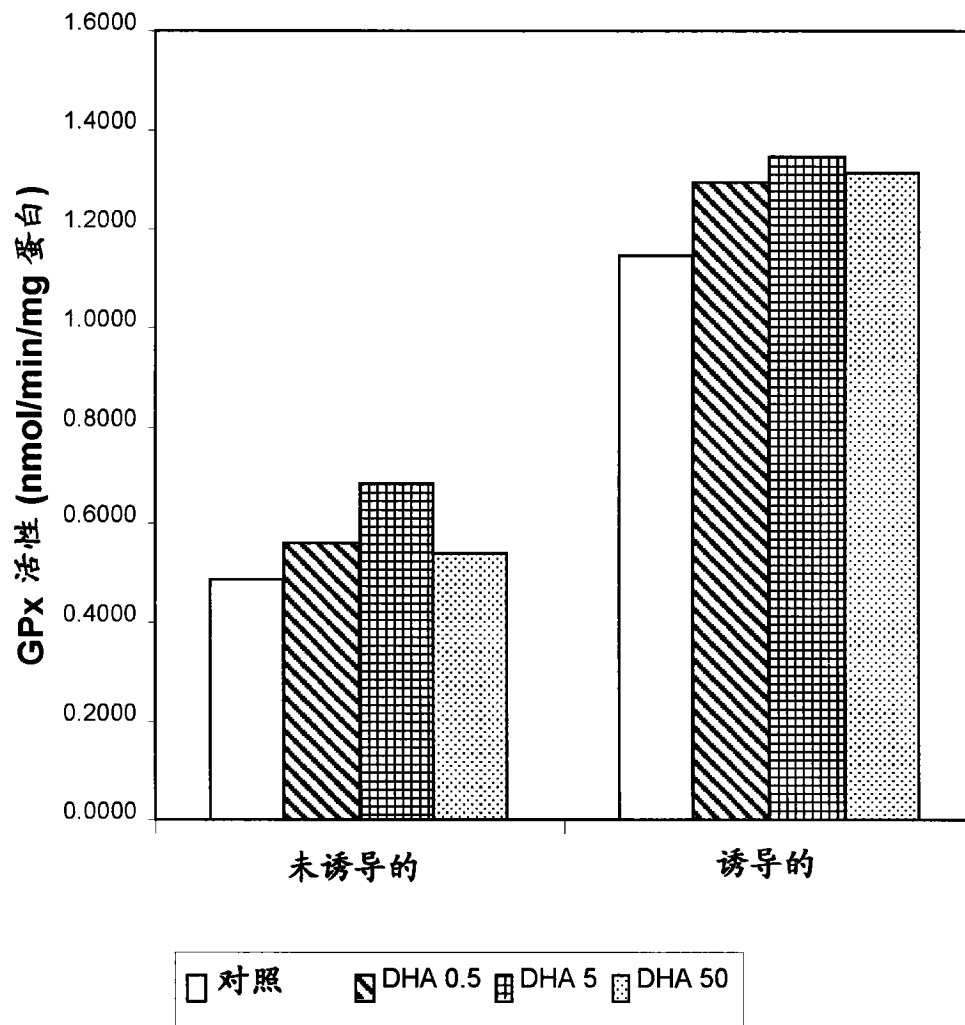


图 11

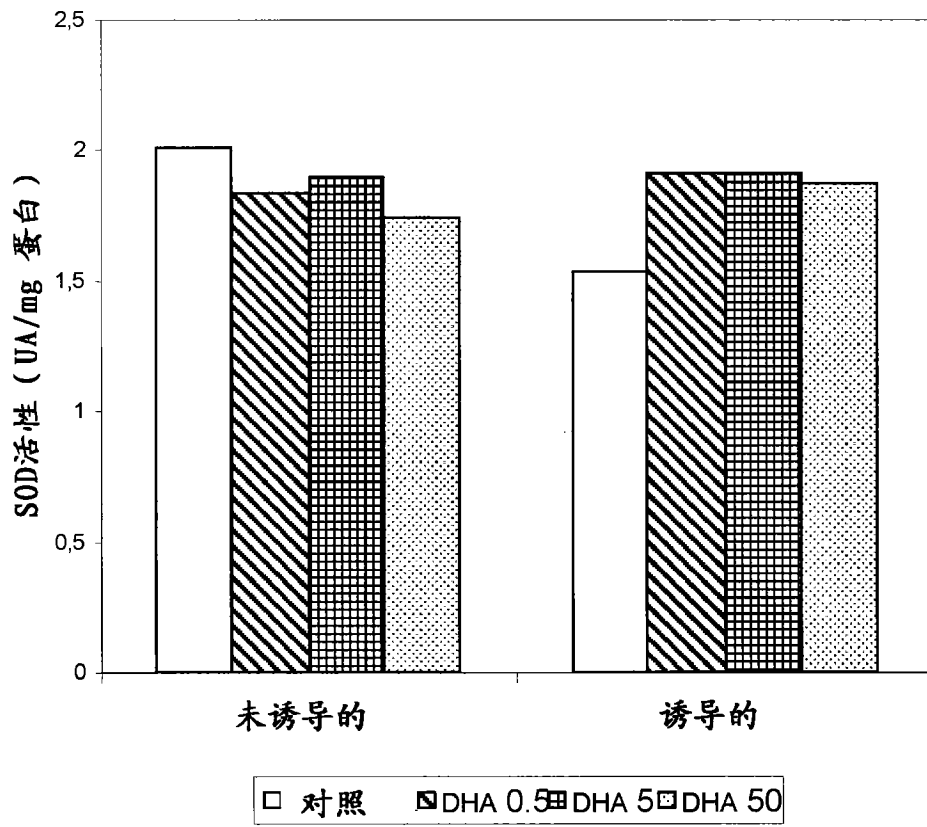


图 12

包皮细胞

ARPE-19 细胞

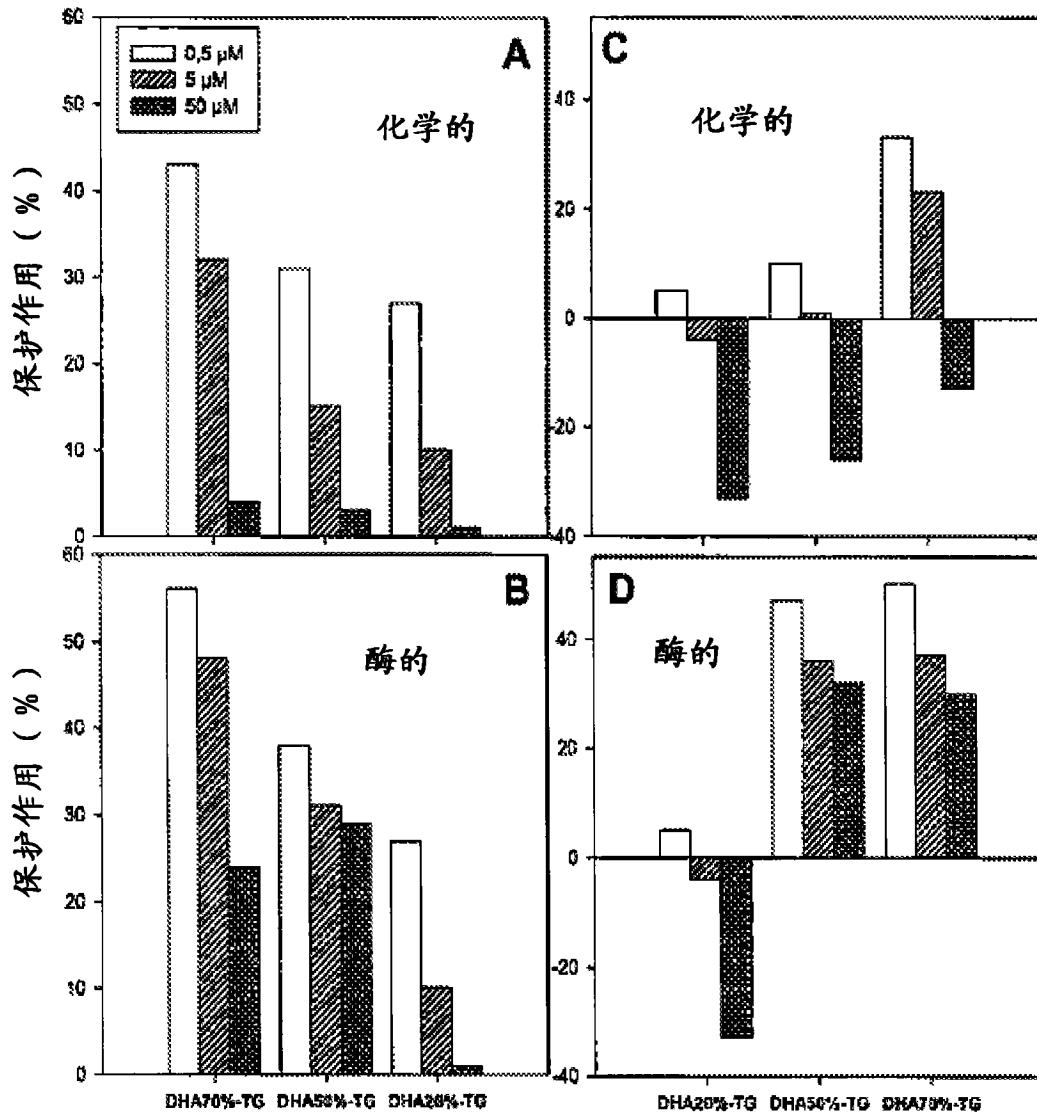


图 13

保护作用 (%)

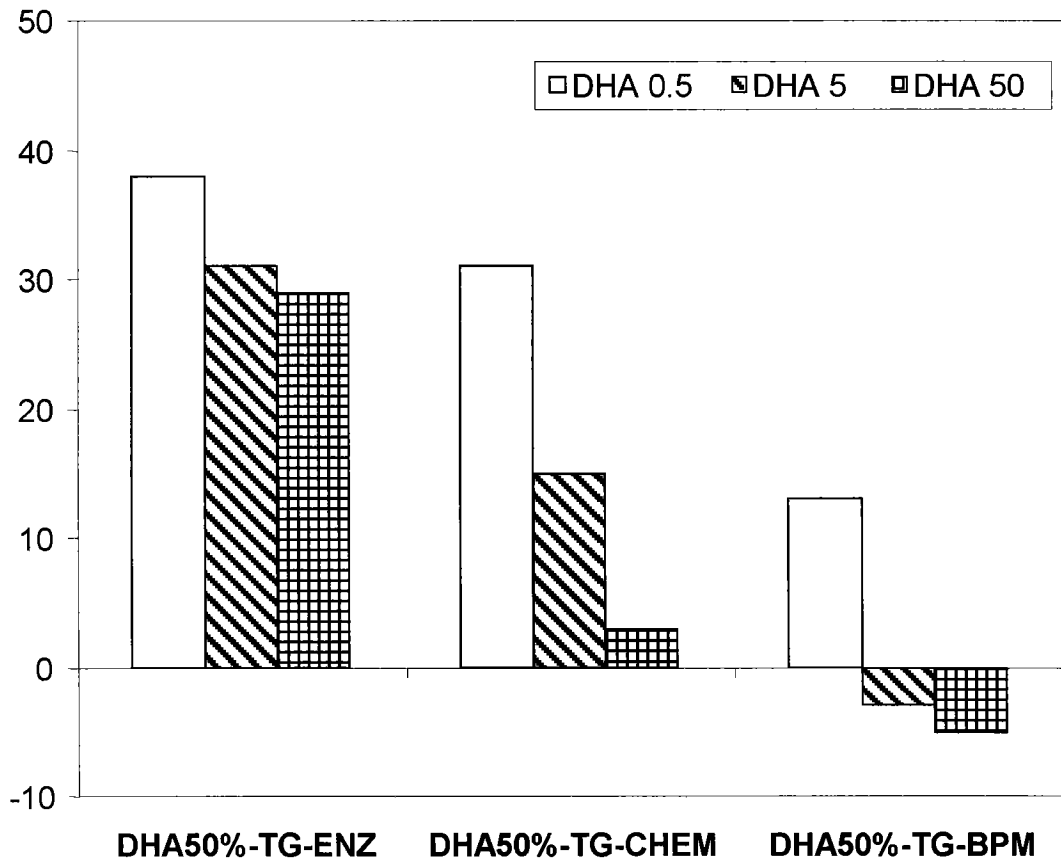


图 14

保护作用 (%)

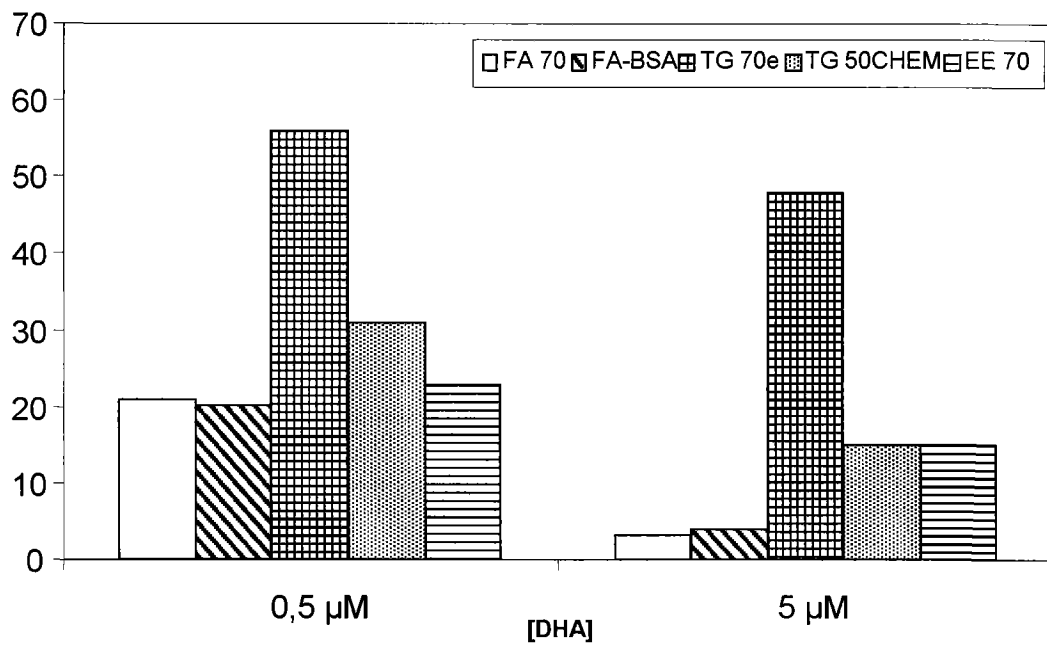


图 15

[GSH] 增加 (%)

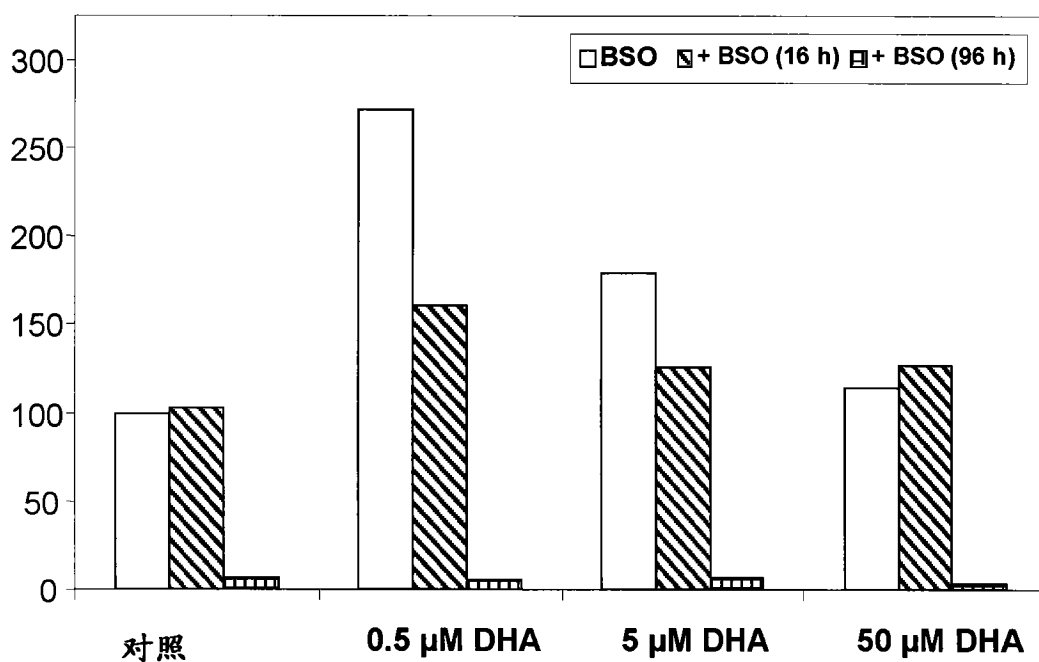


图 16

保护作用 (%)

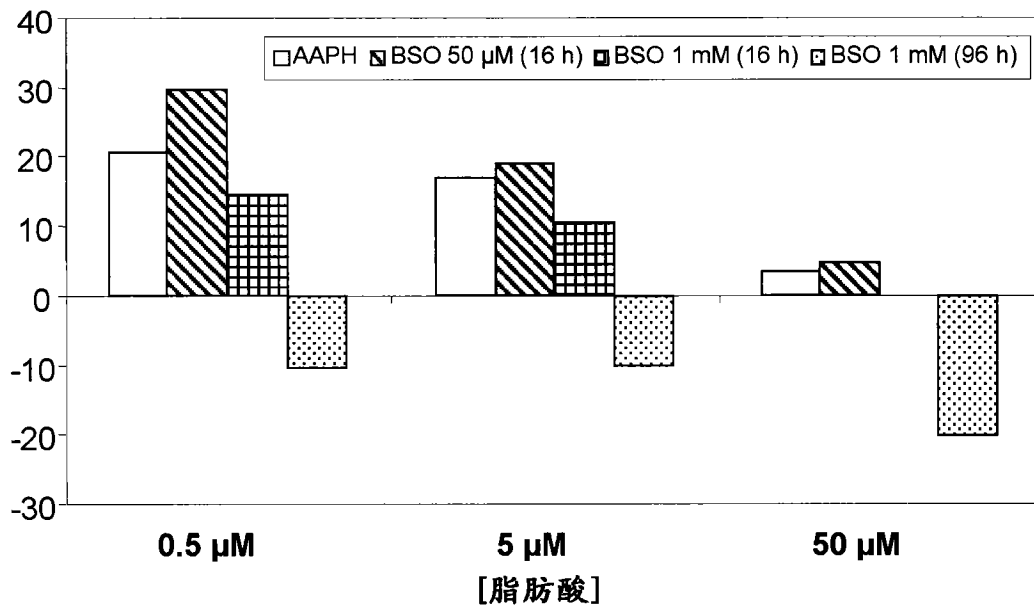


图 17

[GSH] 增加 (%)

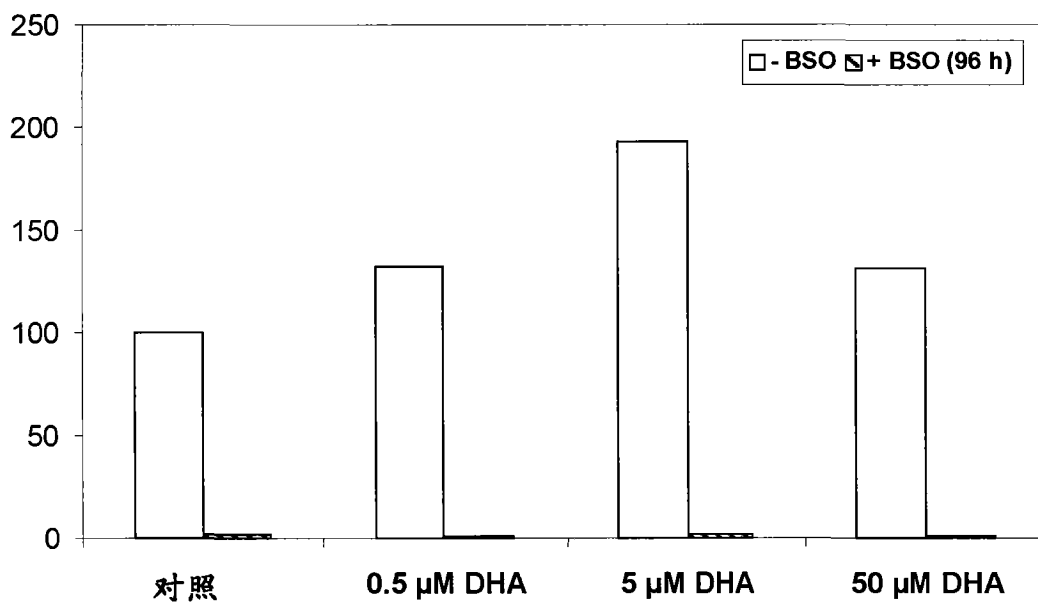


图 18

保护作用 (%)

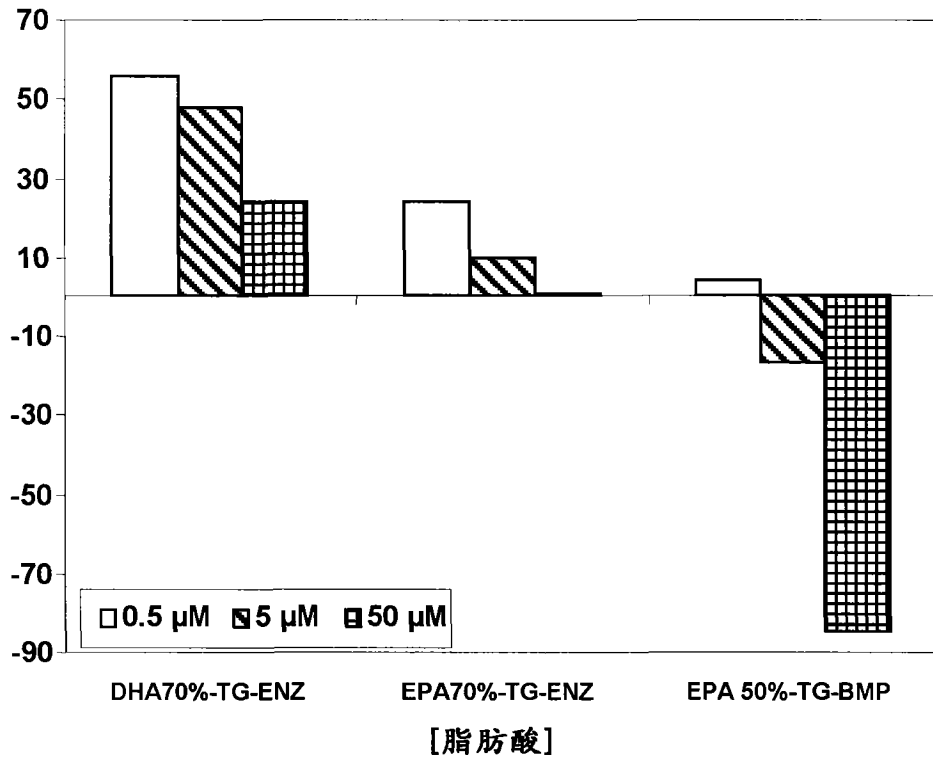


图 19

保护作用 (%)

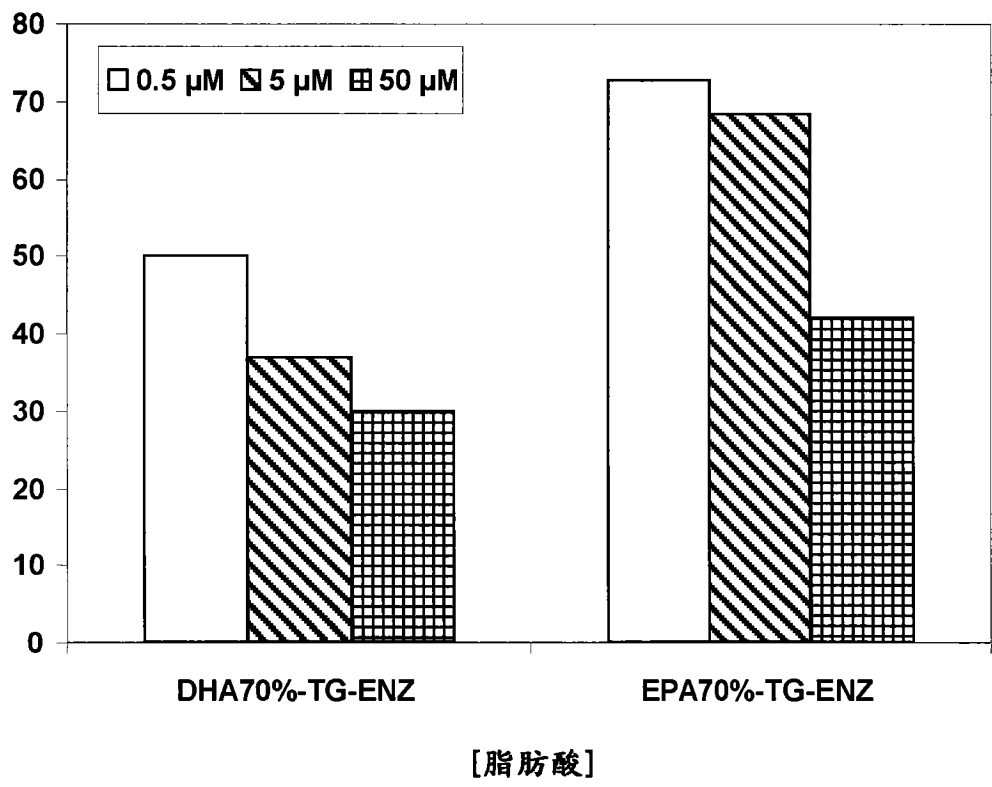


图 20

[GSH]增加 (%)

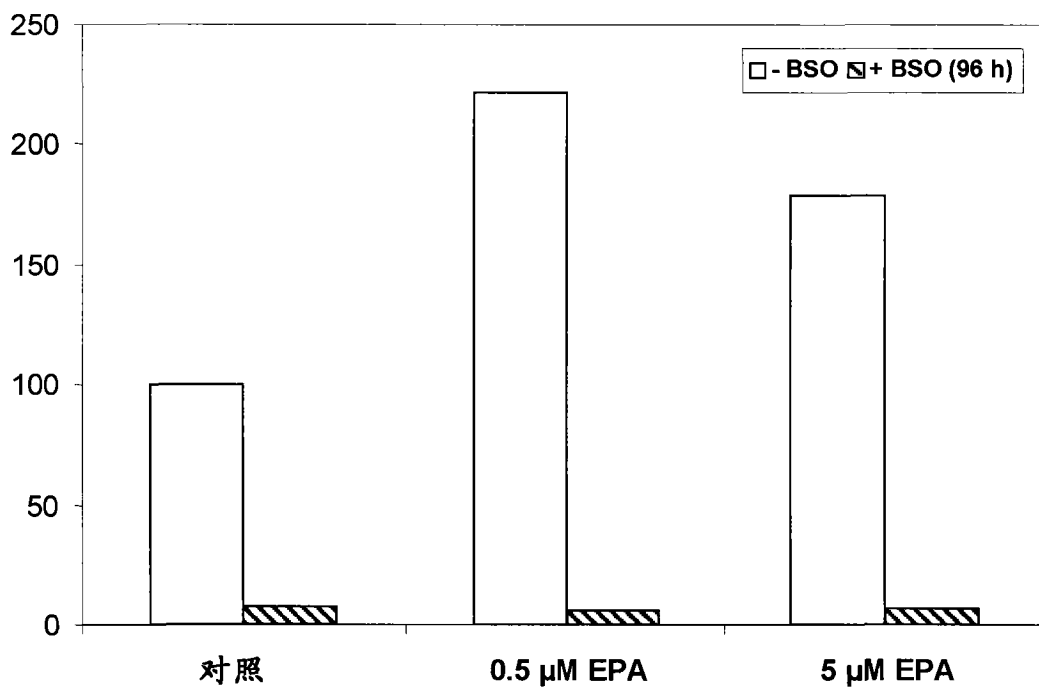


图 21

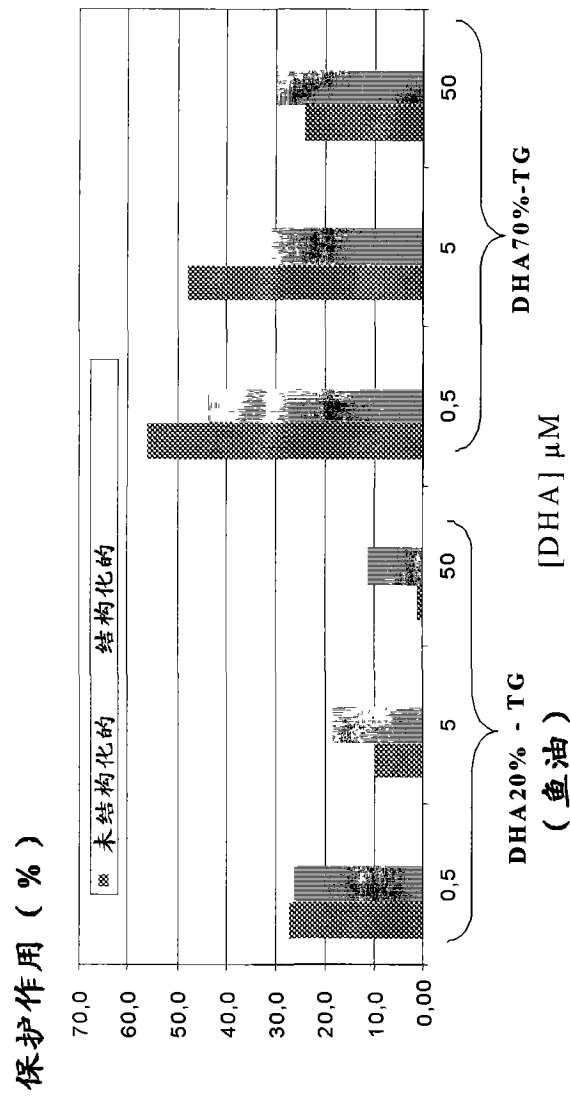


图 22

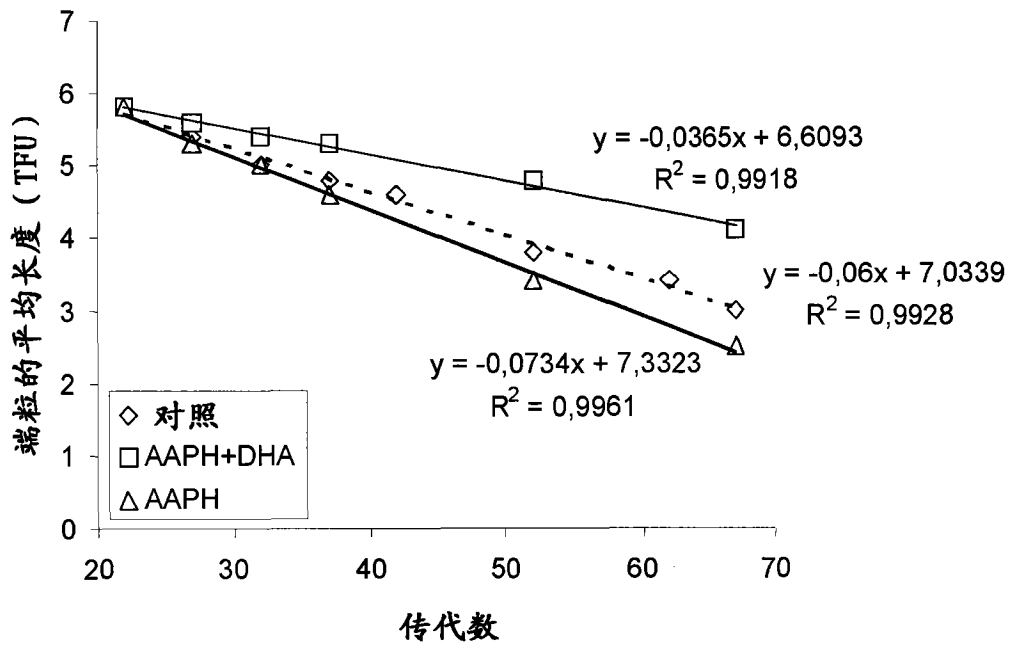


图 23

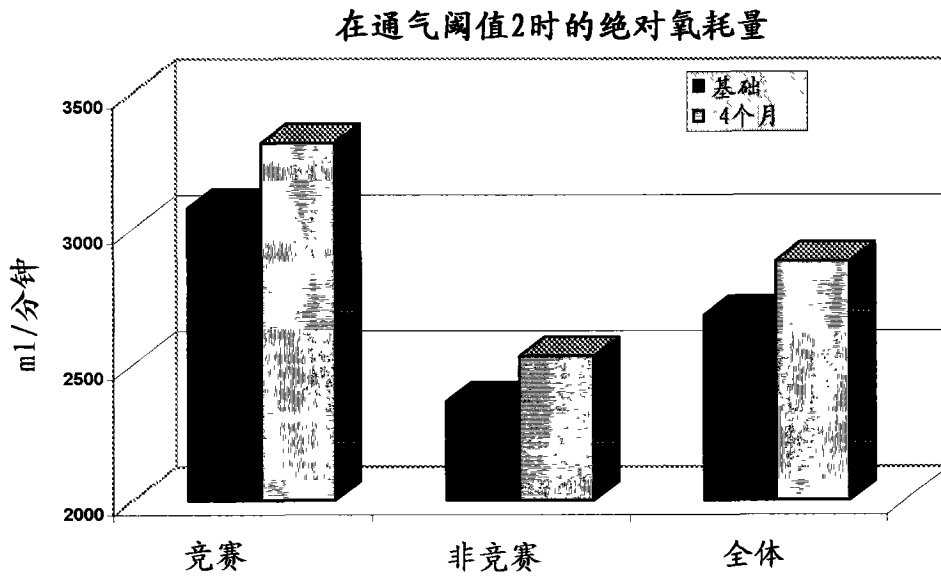


图 24

在通气阈值2时的心搏频率

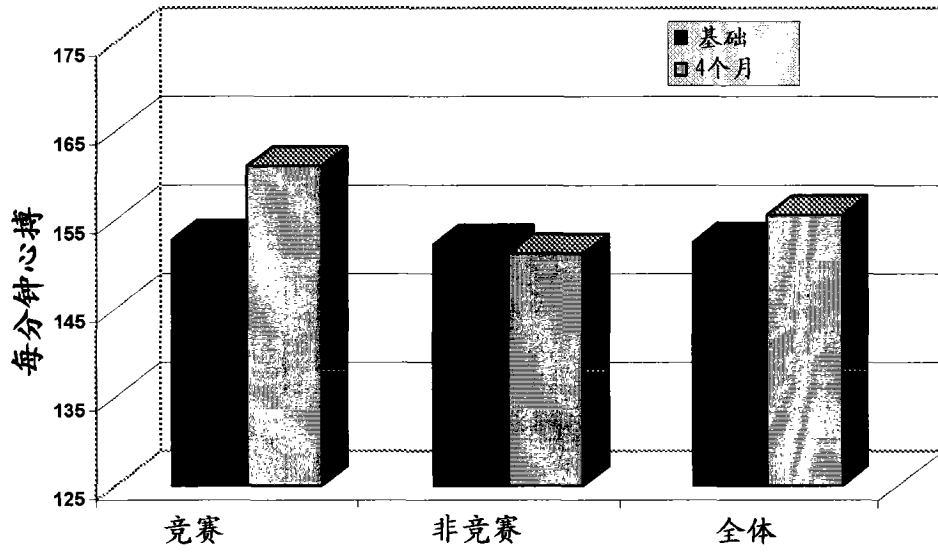


图 25

通气阈值2的时间

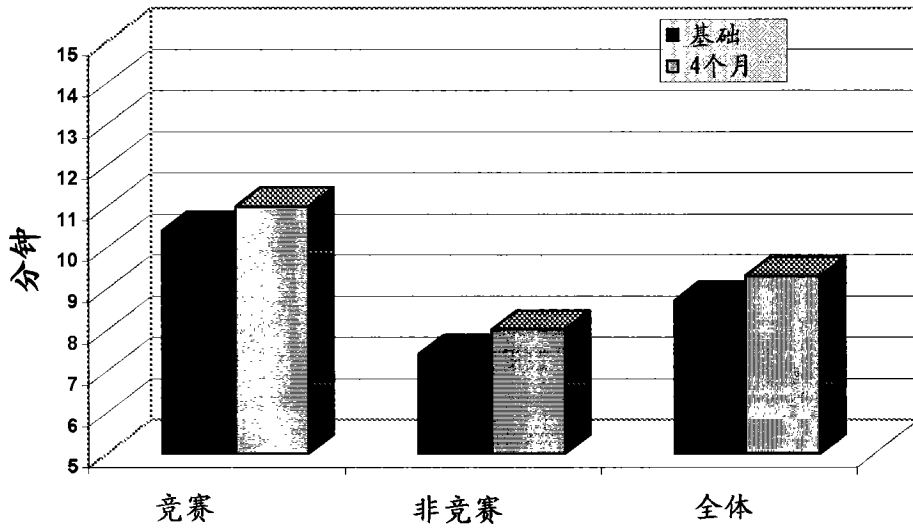


图 26

氧耗量为2000ML/分钟时的心搏频率

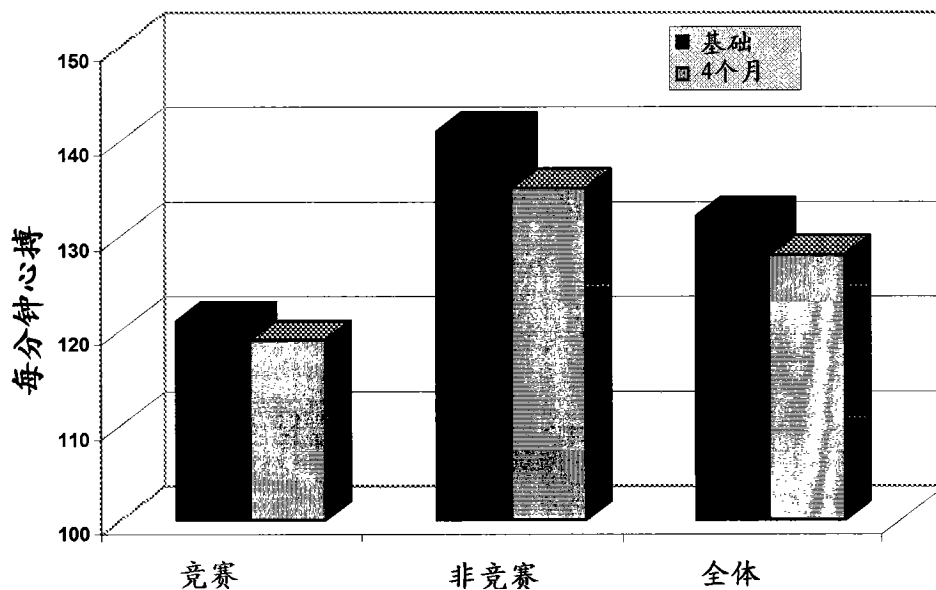


图 27

血浆总抗氧化能力

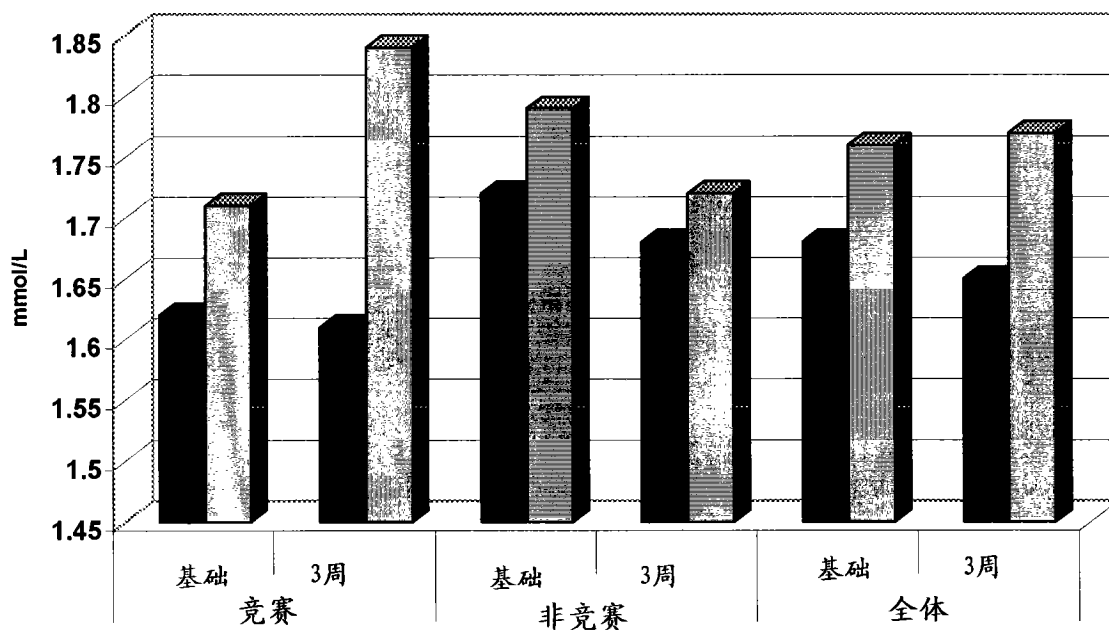


图 28

对血浆脂质的氧化损伤

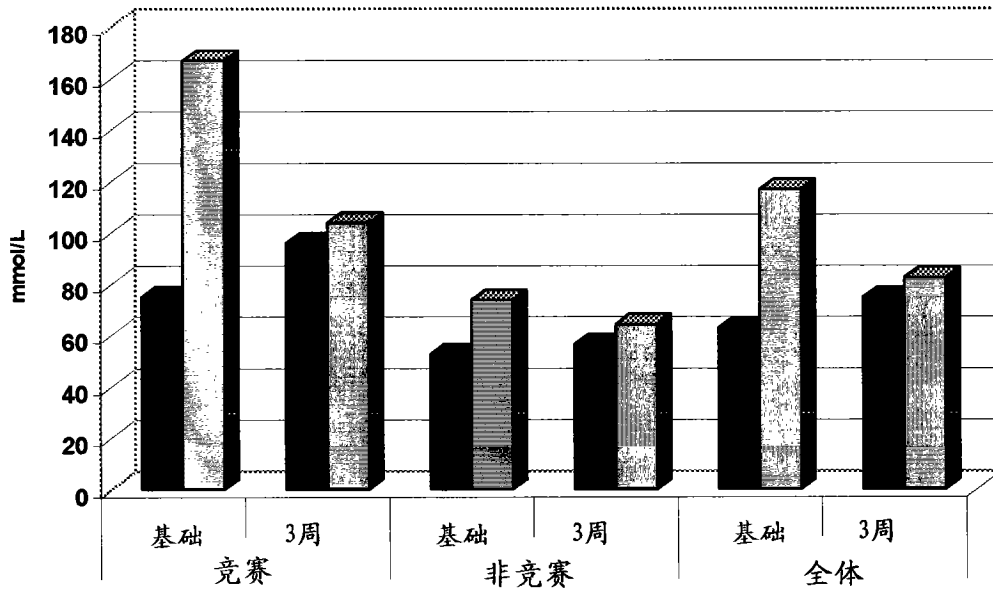


图 29

对DNA的氧化损伤

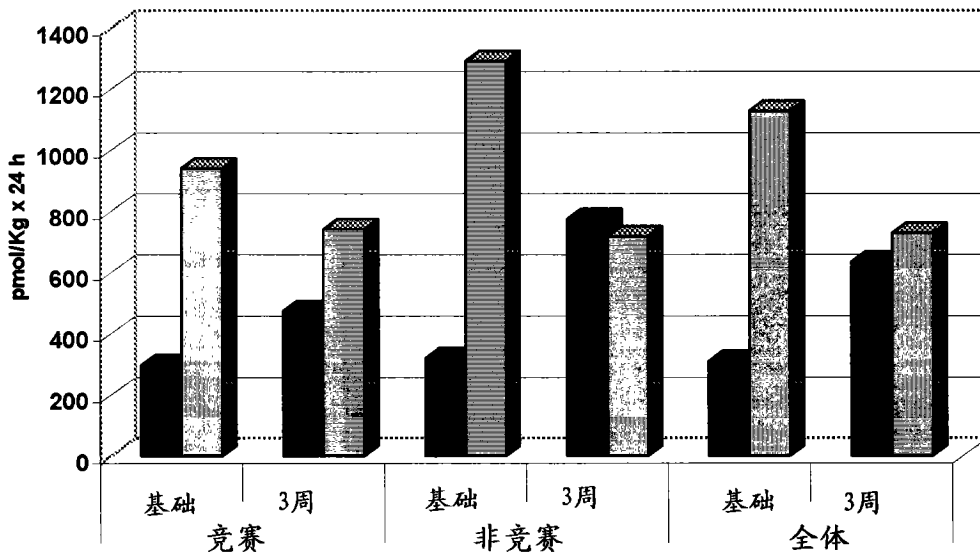


图 30

竞赛自行车手体内的血糖

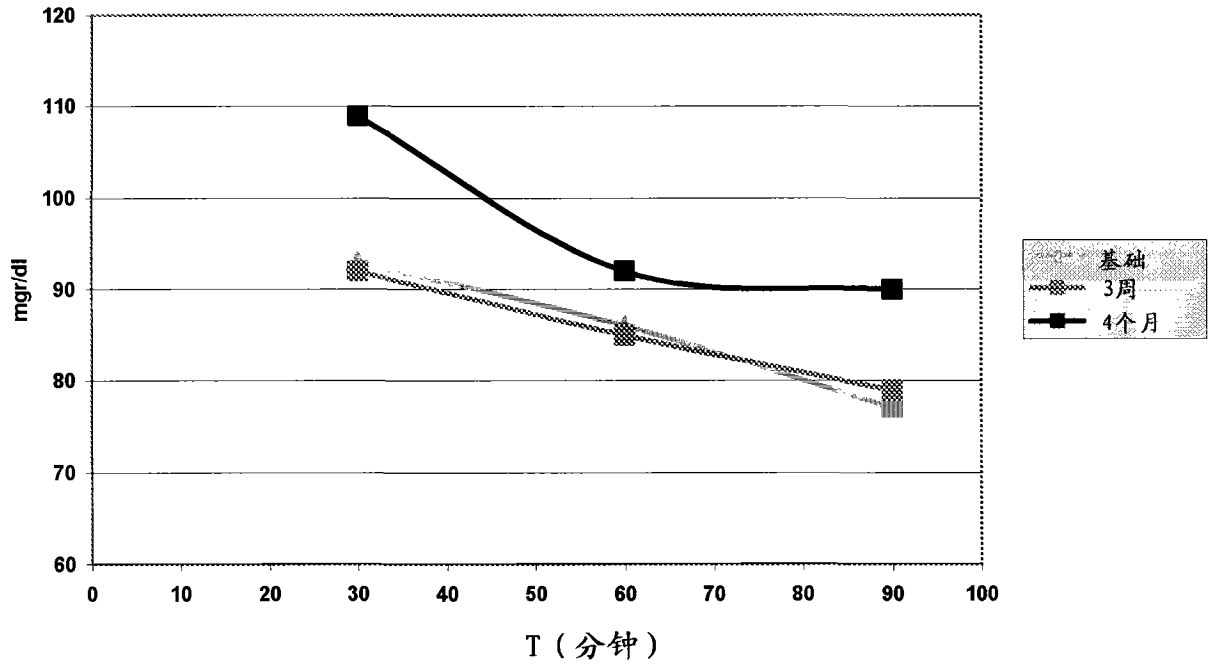


图 31

非竞赛自行车手体内的血糖

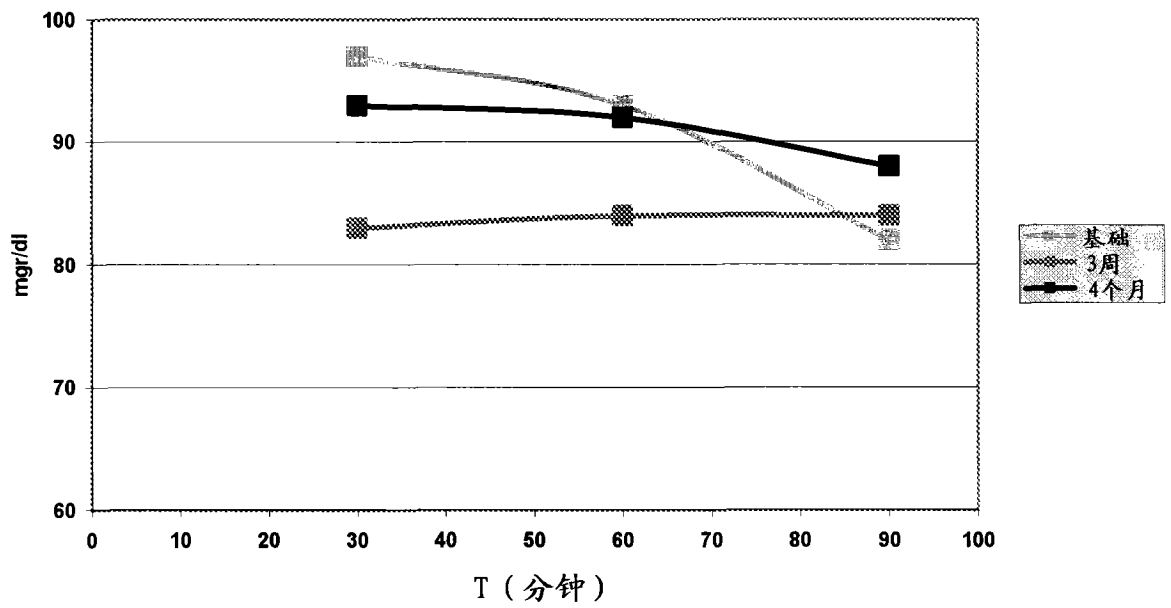


图 32

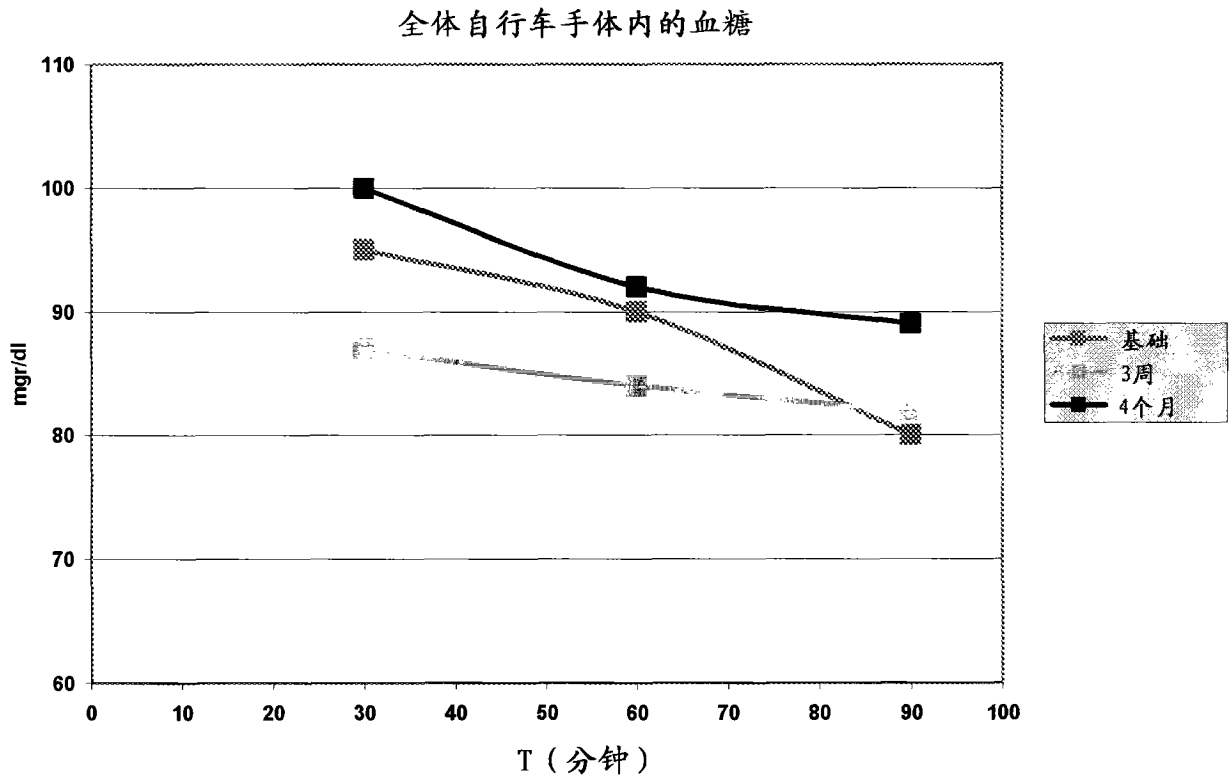


图 33