

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07D 309/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880023922.7

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101687834A

[22] 申请日 2008.2.13

[21] 申请号 200880023922.7

[30] 优先权

[32] 2007.5.11 [33] US [31] 60/917,425

[86] 国际申请 PCT/US2008/053803 2008.2.13

[87] 国际公布 WO2008/140842 英 2008.11.20

[85] 进入国家阶段日期 2010.1.8

[71] 申请人 麦特普罗泰欧米克斯有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 马修·L·特里普 维拉·康达

艾米·霍尔 艾纽·德赛

杰弗里·S·布兰德

[74] 专利代理机构 上海元达律师事务所

代理人 刘志华 朱巍

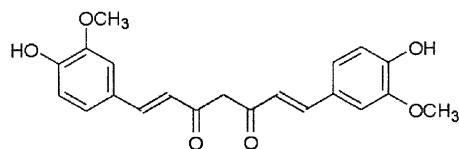
权利要求书 12 页 说明书 66 页 附图 6 页

[54] 发明名称

重金属解毒的组合物和方法

[57] 摘要

本发明描述了一种促进重金属解毒的组合物和方法。这个组合物和方法增加了关键解毒系统的活性，包括诱导 II 相解毒酶，比如谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 和 NADPH 醌还原酶的活性。



1、一种用于促进需要治疗的哺乳动物重金属解毒的组合物，所述组合物包含至少两种有疗效剂量的组分，选自啤酒花；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；锌；和3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

2、如权利要求1所述的组合物，其中组合物进一步包含化合物选自：
(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；

烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丙酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-

烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮, 和(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮。

[illegible]

-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; 和
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮。

5、如权利要求1所述的组合物，其中该组合物还包含一种药用赋形剂，

选自包衣料、等渗和吸收延迟剂、粘合剂、粘附剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、芳香剂、甜味剂、吸收剂、去垢剂和乳化剂。

6、如权利要求1所述的组合物，其中该组合物还包含一种或多种组分，选自抗氧化剂、维生素、矿物质、蛋白质、脂肪和碳水化合物。

7、一种用于促进需要治疗的哺乳动物的重金属解毒的方法，所述方法包括给该哺乳动物服用一种组合物，该组合物包含至少两种有疗效剂量的组分，选自啤酒花；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；锌；和3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

8、如权利要求7所述的方法，其中组合物进一步包含化合物：
(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R,5S)-3,4-二羟基

-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丙酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-

烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮，和(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮。

9、如权利要求 7 所述的方法，其中组合物进一步包含化合物选自：

[illegible]

[illegible]

-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮, 和 (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮。

11、如权利要求 7 所述的方法, 其中该组合物还包含一种药用赋形剂, 选自包衣料、等渗和吸收延迟剂、粘合剂、粘附剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、芳香剂、甜味剂、吸收剂、去垢剂和乳化剂。

12、如权利要求 7 所述的方法, 其中该组合物还包含一种或多种成分, 选自抗氧化剂、维生素、矿物质、蛋白质、脂肪和碳水化合物。

13、如权利要求 1 所述的组合物, 其中该组合物包含:

- a. 约 0.10 g 至约 10.00 g 的啤酒花;
- b. 约 5 mg 至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮;
- c. 约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌; 和
- d. 约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

14、如权利要求 7 所述的方法, 其中该组合物包含:

- a. 约 0.10 g 至约 10.00 g 的啤酒花;
- b. 约 5 mg 至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮;
- c. 约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌; 和
- d. 约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

15、一种用于促进需要治疗的哺乳动物的重金属解毒的方法，所述方法包括给该哺乳动物服用一种组合物，该组合物包含有疗效剂量的啤酒花。

重金属解毒的组合物和方法

相关申请的交叉引用

本专利申请要求于2007年5月11日提交的申请号为60/917,425的美国临时申请的优先权。

技术领域

本发明普遍涉及一种促进哺乳动物体内的重金属解毒的组合物和方法。更具体地说，发明涉及到使用啤酒花；锌；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；和3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮；或其中几种的组合在非急性状态下的重金属解毒。

背景技术

由于居住或职业暴露，许多金属可能会引起人们对健康的关注，其中，锑、砷、铋、镉、铈、铬、钴、铜、镓、金、铁、铅、锰、汞、镍、铂、银、碲、铊、锡、铀、钒和锌被认为是最容易引发这些问题的金属。这些元素许多是在我们的饮食和环境中普遍存在并且对维持身体健康是十分必要的。然而，过量的接触这些金属可能会导致急性或慢性中毒。

重金属中毒会导致神经和中枢神经系统功能的损害或降低，降低精力水平，损害血液组分，肺、肾、肝和其他重要器官。并且，长期慢性接触已被认为是导致与肌肉营养不良症、多发性硬化症、帕金森症或阿尔茨海默氏症的疾病状态相类似的身体、神经或肌肉退化的原因。此外，一些重金属已被

确定为烈性诱变剂和/或致癌物质。

重金属中毒的症状不难识别。这些症状通常是严重的，往往是与一个已知的金属接触或摄取有关。症状出现通常十分迅速，包括抽筋、恶心、呕吐、疼痛、出汗、头痛、呼吸困难、认知能力受损、运动和语言能力下降、躁狂症和抽搐。

慢性中毒症状与其他健康状况的症状很相似，病情往往会在几个月甚至几年时间内慢慢发展。然而，长期接触所产生的容易识别的中毒症状（认知能力受损、运动和语言能力下降、学习困难、紧张、情绪不稳定和失眠、恶心、嗜睡及身体不适）却很难以找到它们的产生原因。因此更进一步的问题在于如何去鉴定这些长期接触重金属发生，因为长期接触产生的症状会不时的减轻，导致一些深受其折磨的人延缓寻求治疗，他们认为这些症状是由于其他原因引起而非重金属中毒。

最通常遇到的有毒金属，包括铝、砷、镉、铁、铅和汞。砷和铅中毒往往是最常见的，因为它们广泛应用于冶炼过程、化学及玻璃制造，或农药（砷）使用，而铅的接触可能发生在管道、涂料、电池和 PVC 塑料中。砷毒性的靶器官包括血液、肾脏和消化系统、皮肤及中枢神经系统，而铅毒性的最通常的靶器官包括骨骼、大脑、血液、肾脏和甲状腺。

镉毒性通常作用于脑和肾，是由于环境中接触的 PVC 管、电池、油漆颜料造成的。

尽管铝本身不是“重”金属，但已被认为与神经毒性（哈拉塔克 T (Halatek T) 等人，《环境科学与保健杂志：A 辑：有毒有害物质与环境工程》(J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.)，43(2)：118-24，

2008), 老年痴呆症(波罗 P(Prolo P.) 等人,《生物信息学》(Bioinformation), 2007 2(1):24-7, 2007; 莫雷 DW(Molloy, DW) 等人, 《毒理学与环境卫生杂志 A 辑》(Toxicol Environ Health A.), 70(23):2011-9, 2007) 和细胞死亡(佐藤 E(Satoh E.) 等人,《生物与医药公报》(Biol Pharm Bull.), 30(8): 1390-4, 2007) 有关。

一些重金属已被确定为烈性诱变剂和/或致癌物质。这些金属影响细胞凋亡和细胞生长调控, 核转录调控和影响不同信号传导途径。这些金属也被确定为具有影响基因表达的活性、致癌、致突变和细胞毒性, 也会影响自由基生成。观点来自王 S(Wang S) 和施 X(Shi X),《生化及细胞分子生物学》(Mol Cell Biochem) 222; 3 - 9, 2001。

解毒酵素在调节化学致癌物质的毒性、氧化破坏、突变和肿瘤效果上发挥着主要的作用。越来越多证据表明, II 相解毒酶, 如谷胱甘肽 S - 转移酶 (GSTs) 和 NADPH 醌还原酶 (NQO1) 等的诱导活化可以使机体对抗有毒物质和化学致癌物, 特别是在中毒的初始阶段。NQO1 是一种黄素蛋白, 用于催化醌和氮氧化物的两个电子的还原反应 (莱利 RJ(Riley, RJ.) 和 P. 沃克曼 (P. Workman)《生化药理学》(Biochem Pharmacol), 43(8): 1657-69, 1992 和罗斯 D(Ross, D.) 等人, 癌症与转移评论 (Cancer Metastasis Rev), 12(2): 83-101, 1993)。尽管这种蛋白质的主要功能可能是通过减少单电子还原以及相关的氧化还原循环而减少活性氧的生成, 可是同时也在一些抗癌药物的活化和癌症预防中发挥作用 (贝格雷特 A(Begleiter, A.) 等人,《癌快报》(Cancer Lett), 45: 173-6, 1989 和贝格雷特 A(Begleiter, A.) 等人,《肿瘤学研究》(Oncol Res), 9(6-7): 371-82, 1997) 最近的研究表明 NQO1 也可能在调节转录因子 p53

和细胞凋亡过程中发挥作用 (亚瑟 G (Asher, G.)等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A), 98(3): 1188-93, 2001 和朗 D.J. 2nd (Long, D.J. 2nd)等人,《癌研究》(Cancer Res), 62(11): 3030-6, 2002)。

II 相酶的转录活化追溯到一个被称之为 ARE 的顺式作用转录增强子 (卢思莫尔 T.H. (Rushmore, T.H.)等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A), 87(10): 3826-30, 1990), 又或者可变亲电反应元件 (福瑞林 R. S. (Friling, R.S.)等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A), 87(16): 6258-62, 1990)。已表明转录因子 Nrf-2 能积极调节由 ARE 介导的 II 相解毒酶基因的表达。伊藤 (Itoh)等人 (《生物化学与生物物理学研究通讯》(Biochem Biophys Res Commun), 236(2): 313-22, 1997)最近建立的小鼠模型中的基因靶向分裂技术,表明 Nrf-2 是 II 相酶基因在亲电反应和活性氧反应中的普遍调节子。最新的研究表明,这种普遍调节子对亲电反击反应的基本反应机理已被证明是亲电剂改变了 Nrf-2 与其抑制蛋白 (Keap-1) 的相互作用,从而从抑制蛋白 Keap-1 的抑制作用中释放出 Nrf-2 的活性,最终通过 AREs 对 II 相酶基因和抗氧化应激蛋白基因产生诱导 (伊藤 K (Itoh,K.)等人,《基因和发展》(Genes Dev), 13(1): 76-86, 1999)。

有人建议从 Keap-1 解离出 Nrf-2 的过程中可能涉及到对上述其中一种蛋白的修饰,这种修饰可以通过直接或间接的机制来实现。例如, Nrf-2 可以被 MAP 激酶级联的组成酶磷酸化 (俞 R (Yu, R.)等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem), 274(39): 27545-52, 1999), 这可能导致其解离。另一方面, 丁科瓦-科斯托瓦 (Dinkova-Kostova)等人, (丁科瓦-科斯托瓦 A.T.(Dinkova-Kostova, A.T.)等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A), 98(6): 3404-9, 2001)

提供了另一种可能性，即这种复合体的解离可能是通过亲电试剂与其中一种或两种蛋白中的活性巯基残基的直接相互作用中获得的。这个假设通过 ARE 在基因表达中作为一个诱导剂的效力和它们与巯基的反应速率之间的紧密关系而得到了支持。这种机制意味着诱导剂将共价结合到 Keap-1 上或者 Nrf-2 上。

血红素氧化酶-1 (HO-1) 一个重要的血红素代谢酶，以及金属硫蛋白 II A (MT-2A)，一个与半胱氨多聚体结合的小金属结合蛋白，它们是人宫颈癌细胞 (HeLa) 被镉或锌处理后被诱导出来的两种蛋白。这两种蛋白质都被认为是参与对金属毒性的防御系统。血红素氧化酶是同时受到 Nrf-2 和 MTF-1 两种转录因子的调节，这种调节通过激活 ARE 和 MRE 在血红素氧化酶基因相应的结合位点来进行。

总的来说，医学研究已指明当人在接触到金属毒素的紧急情况下必须迅速完成解毒及去除有毒物质，只要这种金属毒物继续存在于一个活的病人或病人死亡的情况。对于金属毒性最常见解毒治疗包括化学灭活、代谢解毒、或例如，螯合作用。

目前，这些疗法对于轻度的重金属中毒被认为是既不合适也不需要的，从而迫切需要创造一个安全有效的解决个人亚急性中毒的解毒方法，这种方法可以在当毒素达到必要的水平如需要以上所说的更为极端的措施来解决之前进行。发明人确定了许多具有安全使用史的化合物，这些化合物调节关键解毒酶的活性，促进体内毒素的清除。此处所述的发明研究了对亚急性中毒解毒酶系统的加强和诱导，通过调节关键解毒酶和其他排毒和营养剂的伴随给药。

发明内容

本发明涉及一种促进哺乳动物在非急性情况下解毒的组合物和方法。更具体地说,发明涉及到使用啤酒花; 锌; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮; 和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮或其中几种的组合在非急性情况下的重金属解毒。

本发明第一个实施方式包含用于促进需要治疗的哺乳动物体内的重金属解毒的组合物。所述组合物包含至少两种有疗效剂量的组分,选自啤酒花; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮; 锌; 和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

第二个实施方式描述了用于促进需要治疗的哺乳动物体内重金属解毒的方法。所述方法包括给该哺乳动物服用一种组合物,该组合物包含至少两种有疗效剂量的组分,选自啤酒花; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮; 锌; 和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

该项发明的另一个实施方式描述了这个组合物的组成,包括: 约 0.10 克(g)至约 10.00g 的啤酒花; 约 5 毫克(mg)至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮; 约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌; 和约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

本发明还有一个实施方式描述了促进需要治疗的哺乳动物体内重金属解

毒的方法。在这个实施方式中，该方法利用了一种组合物，包括：约 0.10 g 至约 10.00 g 的啤酒花；约 5 mg 至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌；以及约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

在本发明又一个实施方式中描述了促进需要治疗的哺乳动物体内重金属解毒的方法。所述方法包括给该哺乳动物服用一种组合物，该组合物包含有疗效剂量的啤酒花。

附图说明

图 1 描述了 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮的化学结构。

图 2 描述了 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮的化学结构。

图 3 描述了对细胞核中的 Nrf-2 的蛋白免疫印迹分析，细胞核来自于被待测试复合物处理 4 个小时的 HepG2 细胞，组合物 DF-SH 是一个由啤酒花；7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮（姜黄素）；3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮（穿心莲内酯）； ρ 二氢异 α 酸(RIAA)的混合物和 Zn 的组合物(525:30:30:4:1)。

图 4 描述了对细胞核中的 Nrf-2 的蛋白免疫印迹分析，细胞核来自于被待测试复合物处理 4 个小时的 HepG2 细胞，组合物 3 组合物是一个异 α 酸

(IAA), 7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素)和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)的组合物(1:1:1)。

图 5 描述了测试志愿者在给药后体内金属硫蛋白 mRNA 水平的诱导增加, 志愿者服用的测试组合物其成分包括(每片): 锌(1.667 mg); 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(50 mg); 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(50 mg); 啤酒花(875 mg)和 ρ -二氢异 α 酸的混合物(6.667 mg)。

图 6 描述了测试志愿者在给药时使用替代引物后体内金属硫蛋白 mRNA 水平的诱导增加, 测试组合物成分包括(每片): 锌(1.667 mg); 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(50 mg); 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(50 mg); 啤酒花(875 mg)和 ρ -二氢异 α 酸的混合物(6.667 mg)。

图 7 描述的是测试组合物对临床重要的金属在尿排泄中的影响。*表示一个在尿液中可检测的增加。

图 8 描述的是测试组合物对非临床重要的金属在尿排泄中的影响。

图 9 描述的是测试组合物对营养物质在尿排泄中的影响。*表示一个在尿液中可检测的增加。

具体实施方式

本发明涉及一种促进哺乳动物在非急性情况下解毒的组合物和方法。更具体地说, 发明涉及到使用啤酒花; 锌; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二

烯-3,5-庚二酮;和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮或其中几种的组合在非急性情况下的重金属解毒。

本文所引用的专利、公布的申请以及科学文献是本领域技术人员所熟知的知识,这些共同被引用的文献的范围应与当他们以专门的、独立的方式被引用时相同。如果本文引用的任何文献与本说明书中的具体理论相矛盾,则应以后者为准。同样地,如果本领域技术人员对某词或某短语的定义的理解与本说明书中具体讲授的词汇或短语的定义相矛盾,则应以后者为准。

除非另有说明,本文中的技术和科学术语采用本发明所属领域技术人员通常理解的含义。本文引用了本领域技术人员熟知的各种方法和材料。阐述 DNA 技术的一般原理的标准参考著作包括萨姆布如克(Sambrook)等,《分子克隆:实验手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第二版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约(New York)(1989);和卡夫曼(Kaufman)等编辑,《医学分子和细胞生物学方法手册》(Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine),希尔希出版社(CRC Press),博卡拉顿(Boca Raton)(1995)。阐述药理学的一般原理的标准参考著作包括固德曼(Goodman)和奥尔曼(Oilman)的《治疗学的药理学基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics),第 11 版,麦格劳-希尔教育出版公司(McGraw Hill Companies Inc.),纽约(New York)(2006)。

在本说明书和所附权利要求中,除非文中明确指出,单数形式包括复数所指物。除非文中明确指出,本说明书所使用的单数形式,特别是“一”、“一个”、“一种”,也包含所指物的复数形式。此外,除非另有明确说明,本文所

使用的“或”的含义是“和/或”，而不是“要么……或……”。本文使用的“约”指近似地、左右、粗略地或附近。当“约”与一数值范围连用时，它扩大了所述数值的上下边界，改变了范围。通常，本文所使用的“约”一词使所述数值的上下值在 20% 内变动。

本文对变量的数值范围的描述，表示可以用与此范围内的任何值相等的变量实施本发明。因此，对于本质上离散的变量，此变量可等于此数值范围内的任何整数值，包括此范围的终点值。同样的，对于本质上连续的变量，此变量可等于此数值范围内的任何实数值，包括此范围的终点值。例如，如果所述变量的值介于 0-2，则对于离散变量，其值可为 0、1 或 2，对于连续变量，其值可为 0.0、0.1、0.01、0.001 或任何其他实数值。

下文详细叙述了本发明的具体实施方式。将结合这些具体实施方式对本发明进行说明，不应将这些具体实施方式理解为对本发明的限制。相反，这些说明旨在涵盖所附权利要求定义的本发明的意旨和范围内可能包含的替代方式、修改和等同方式。下文详细说明了大量具体细节，以便于深入理解本发明。实施本发明时可部分或全部不采用这些具体细节。在其他情况下，为了不对本发明造成不必要的含糊，未对熟知的工艺操作进行详细说明。

可采用本领域技术人员已知的任何合适材料和/或方法实施本发明。但是，文中描述了优选材料和方法。除非另有说明，下文的实施方式和实施例中所引用的任何材料、试剂等均可从商业来源获得。

本发明的第一个实施方式描述了用于促进哺乳动物的重金属解毒的组合物。所述组合物包含至少两种有疗效剂量的组分，选自啤酒花；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；锌；和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基

-5, 8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

在这个具体实施方式的一个方面, 这个组合物进一步包含化合物选自:

(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基

戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丙酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S,5R)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮；(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮；
(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮，和(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮。

[illegible]

基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮, 和 (4R,5S)-3,4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮。

[illegible]

[illegible]

酮；(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮；(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮，和(4S,5S)-3,4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮。这些在这个具体实施方式的另一个方面被进行了描述。

在这个具体实施方式的一些方面，该组合物进一步包含一种药用赋形剂，选自包衣料、等渗和吸收延迟剂、粘合剂、粘附剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、芳香剂、甜味剂、吸收剂、去垢剂和乳化剂。此外，在其他方面，该组合物还包含一种或多种组分，选自抗氧化剂、维生素、矿物质、蛋白质、脂肪和碳水化合物。

在这里，用到的“促进重金属解毒”指包括诱导解毒酶生成，增大存在的解毒酶的酶活性，或抑制解毒酶抑制因子。在代表性的、非限定性的实例中的解毒酶包括乙醇磺基转移酶、胺 N-甲基转移酶、胺 O-磺基转移酶、芳基 N-乙酰基转移酶(NAT2)、儿茶酚-O-甲基转移酶、半胱氨酸交联裂解酶、半胱氨酸 N-乙酰基转移酶、甘氨酸乙酰转移酶、谷氨酸乙酰转移酶、谷胱甘肽转移酶(GST)、血红素氧化酶-1、组胺 N-甲基转移酶、微粒体换氧化物水解酶(mEH)、金属硫蛋白、NAD(P)H: 醌氧化酶(NQO1)、酚-O-甲基转移酶、酚磺基转移酶、硫氰酸酶、硫醇-S-甲基转移酶、硫醇转移酶和 UDP-葡萄糖酸醛转移酶(UDP-GT)。

本发明中的过渡短语或权利要求主体中的“包含”或“包括”一词应被理解为具有开放式含义。换言之，这类词的含义与“至少有”或“至少包含”相同。当用于描述某工艺时，“包括”一词指此工艺至少包括所叙述的步骤，但是也可

包括其他步骤。当用于表述一种化合物或组合物时，“包括”一词指此化合物和组合物至少包括所叙述的特征或化合物，但是也可包括其他特征或化合物。

本文中的“化合物”可用其化学结构、化学名称或通用名称表示。当化学结构和化学名称或通用名称不一致时，以化学结构为准。本文描述的化合物可能包含一个或多个手性中心和/或双键，因此，可能存在立体异构体，例如双键异构体（即几何异构体）、对映异构体或非对映异构体。因此，本文所述的化学结构包括所有图示的或表述的化合物的所有可能对映异构体和立体异构体，包括纯立体异构体形式（例如几何纯、对映异构体纯或非对应异构体纯）和对映异构体及立体异构体的混合物。采用本领域技术人员熟知的拆分技术或手性合成技术，可将对应异构体和立体异构体混合物拆分成其对映异构体或立体异构体组分。这些化合物还可能以多种互变异构形式存在，包括烯醇式、酮式及其混合物。因此，本文所述的化学结构包括图示的或表述的化合物的所有可能互变异构形式。本文所述的化合物还包括同位素标记的化合物，其中一个或多个原子的原子量与自然界中通常存在的原子量不同。同位素的实例可以被并入本发明，包括但不限于 ^2H 、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 等。这些化合物可以非溶剂化形式和溶剂化形式存在，包括水合物形式和以氮氧化物形式存在。通常，这些化合物可能为水合物、溶剂化物或氮氧化物。某些化合物可能以多晶或非晶相形式存在。本发明范围内还涉及同系物、类似物、水解产物、代谢产物及化合物前体或药物前体。通常，除非另有说明，对于本文涉及的使用，所有物理形式均等效，且归于本发明的范围内。

本发明所述的化合物可以是盐的形式，特别是此化合物的可做药用的盐。

本发明的一种“可做药用的盐”是指本发明的一种化合物和能与该化合物成盐（例如，镁盐，本文中用“Mg”或“Mag”表示）的一种酸或一种碱所结合的产物，并且在治疗条件下受试者可耐受。通常，本发明的一种化合物的一种可做药用的盐的治疗指数（最低中毒剂量与最低有疗效剂量之比）大于等于 1。本领域技术人员应了解，最低有疗效剂量因人而异，因病症而异，因此应作出相应调整。

采用任何众所周知的可药用的载体即可制得本发明所述化合物在可药用的媒介中的剂型，可药用的载体包括稀释剂和赋形剂（参阅《雷明登氏制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第 18 版，杰纳罗，麦克出版社 (Gennaro, Mack Publishing Co.)，阿斯顿(Easton)，宾西法尼亚(PA)，1990 和《雷明登：药学的科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司 (Lippincott, Williams & Wilkins)，1995)。用于生成本发明的组合物的可药用的载体/媒介的类型取决于给哺乳动物服用该组合物的给药类型，可药用的载体通常是生理惰性的且无毒的。本发明所述组合物的剂型可能包含多种类型的本发明的化合物，以及可用于治疗正在接受治疗的症状/疾病的任何其他药理活性成分。“可做药用”一词表示可以与组合物中的其他成分相容，并且对接受者无毒。

本文中的“啤酒花”指葎草属植物的球果，其含有一种苦味芳香油，可用于酿造工业，用来抑制细菌作用并增加啤酒特有的苦味。优选来自蛇麻草的啤酒花。

“有疗效剂量”一词用于表示治疗所采用的剂量可实现所要求的治疗结果。此外，本领域技术人员应理解，可通过稍微调整和/或通过服用超过一种

本发明化合物或将本发明的一种化合物与其他化合物一起服用来降低或增加本发明的化合物的有疗效剂量。参阅,例如美讷 CL(Meiner, C.L.),“临床试验:设计、实施与分析(Clinical Trials: Design, Conduct, and Analysis)”,《流行病学和生物统计学专论》(Monographs in Epidemiology and Biostatistics),第8卷,牛津大学出版社(Oxford University Press),美国(USA)(1986)。因此,本发明提供了一种使给药/治疗适合给定哺乳动物的特殊紧急状况的方法。如以下实施例所述,可轻松确定有疗效剂量,例如首先凭经验提供较低剂量,然后逐步增加剂量,同时对有益效果进行评价。

本文中所使用的术语“啤酒花”,是指(1)把啤酒花浸入一种溶剂中,(2)把溶剂与啤酒花分离,(3)除去溶剂后形成的固体和亲水残基。典型的溶剂,可以包括但不限于二氧化碳、水、有机溶剂(比如,乙醇)或它们的混合物。

1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮图示在图1。这里所用的“1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮”指的是姜黄素,它是从姜黄的根茎中分离出来的黄色素的一部分。姜黄素被认为是重要的活性物质并在姜黄中起到生物活性的组分。尽管它的主要活性是消炎,但据报道其也具有抗氧化、抗过敏、促使伤口愈合、解痉、抗菌、抗真菌以及抗肿瘤的活性。

3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。这里所指的“3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮”是指穿心莲内酯,是一种双萜内酯。在双萜内酯族里,比如穿心莲内酯是植物中非常常见的,并用作抗炎。其作用机制被认为是抑制肥大细胞中的组胺的释放,

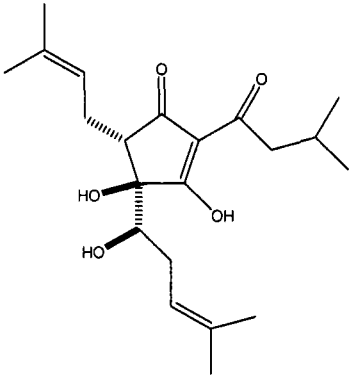
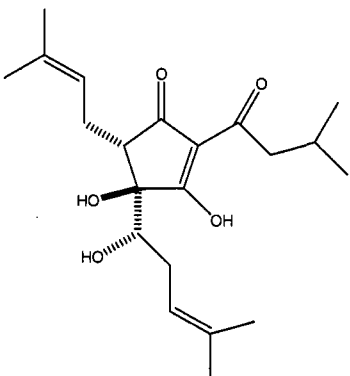
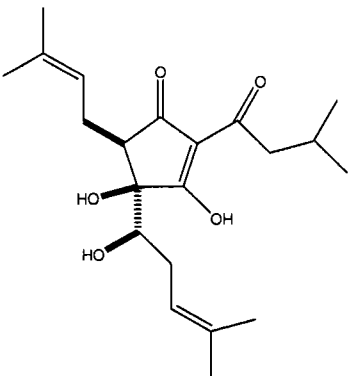
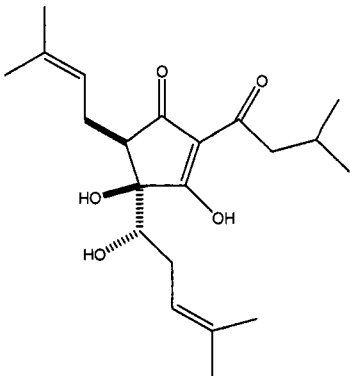
或者是抑制了脂氧化酶和环氧合酶从而减少了花生四烯酸致炎因素。

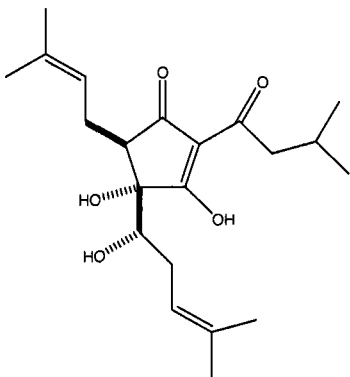
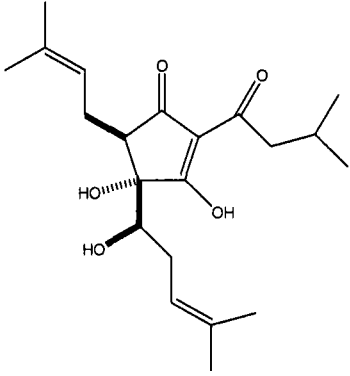
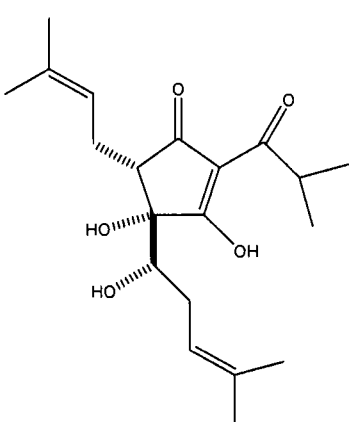
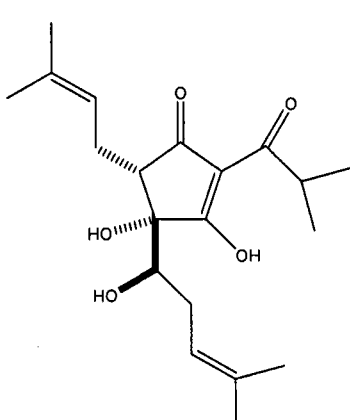
本发明使用的术语"还原异α酸(RIAA)是指α酸从啤酒花中分离出来,再依次被异构化和还原,其中包括顺式和反式。还原异α酸的实例包括但不限于二氢异α酸,更具体的是ρ二氢异α酸(表1),四氢异α酸(表2),和六氢异α酸(表3)和他们的衍生物。“ρ”指的是那些还原的α酸,其中的还原是指侧链4-甲基-3-戊烯酰基中羰基的还原。

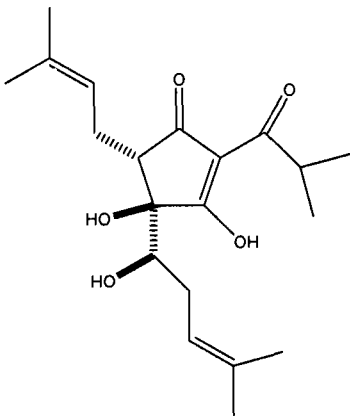
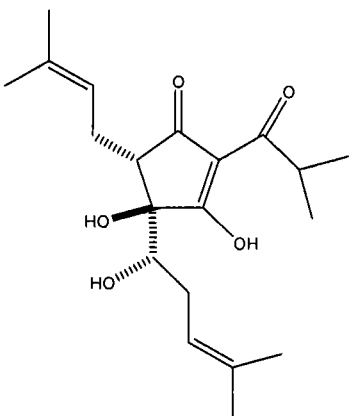
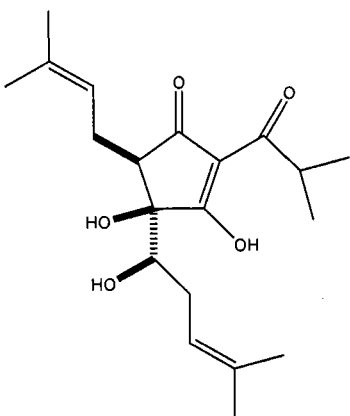
表 1

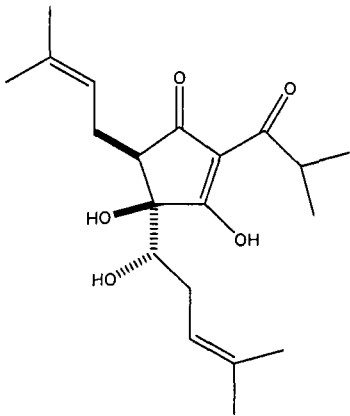
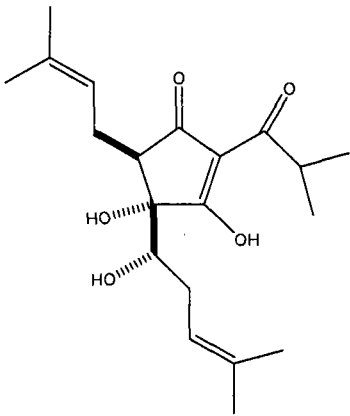
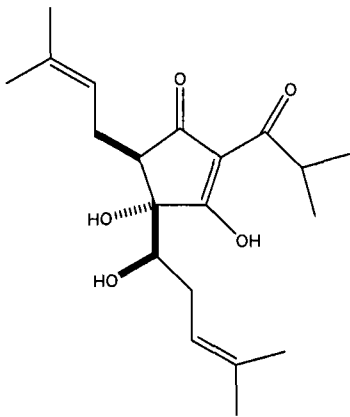
ρ二氢异α酸

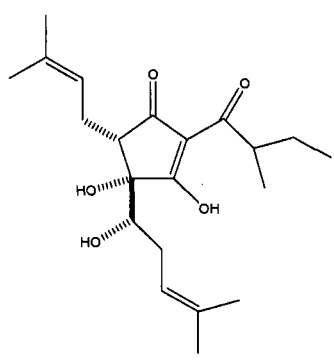
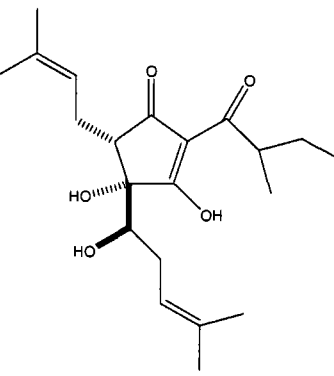
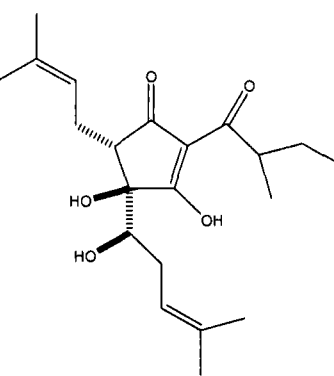
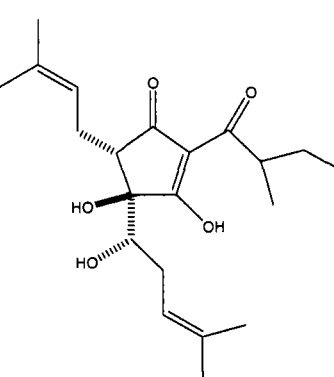
化学名	别名	结构
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	ρ(6S)顺 n 异α酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	ρ(6R)顺 n 异α酸	

(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 反 n 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 反 n 异α 酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 顺 ρn 异α 酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 顺 n 异α 酸	

(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	(6S) 反ρ n 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(3-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	ρ(6R) 反 n 异α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	ρ(6S) 顺 co 异α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	ρ(6R) 顺 co 异α 酸	

(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6R)$ 反 co 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6S)$ 反 co 异α 酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6R)$ 顺 co 异α 酸	

(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6S)$ 顺 co 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6S)$ 反 co 异 α酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	$\rho(6R)$ 反 co 异α 酸	

(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 顺 ad 异α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 顺 ad 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 反 ad 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 反 ad 异α 酸	

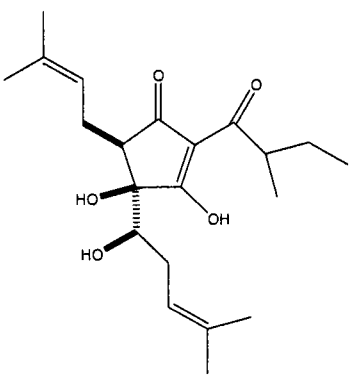
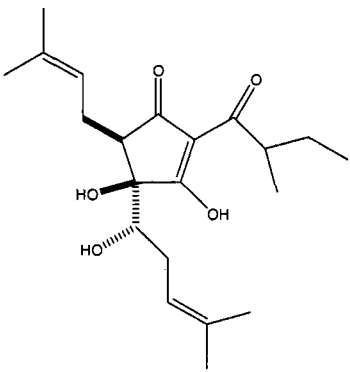
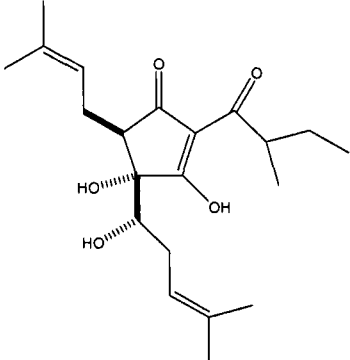
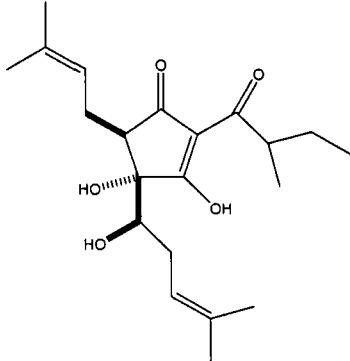
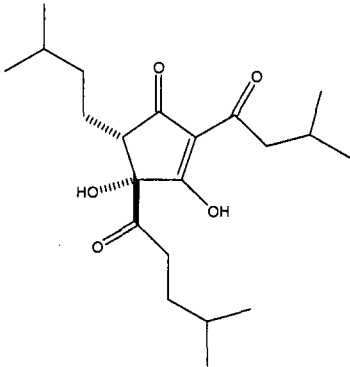
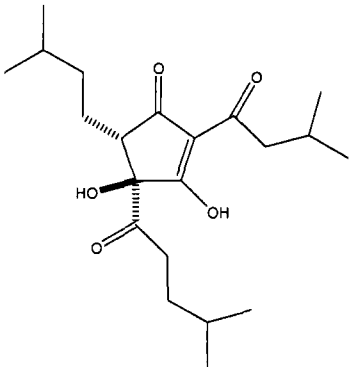
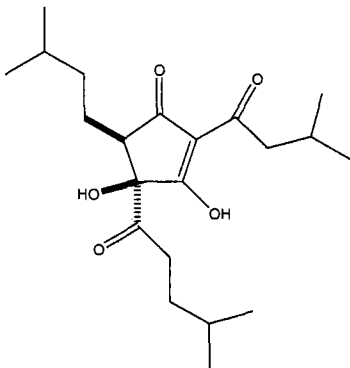
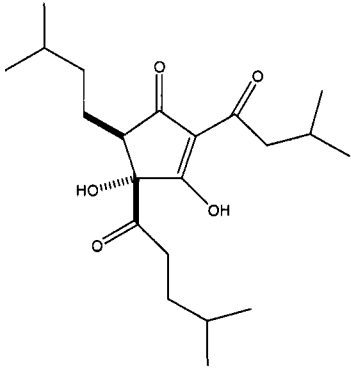
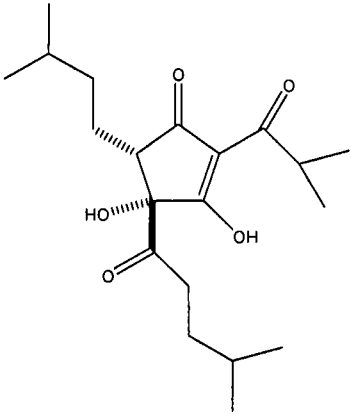
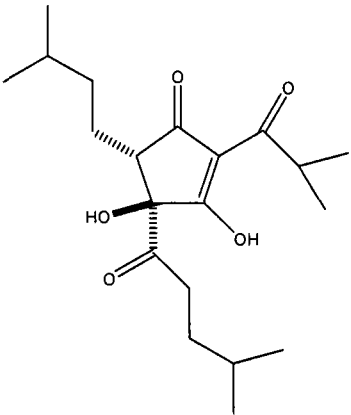
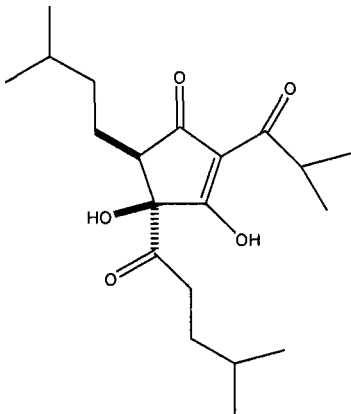
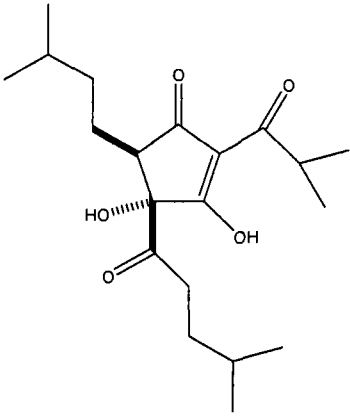
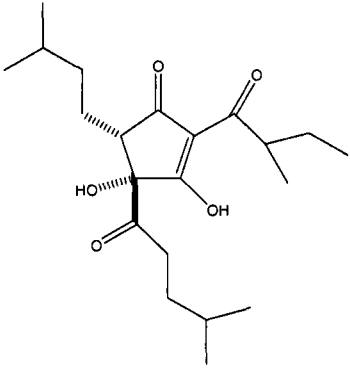
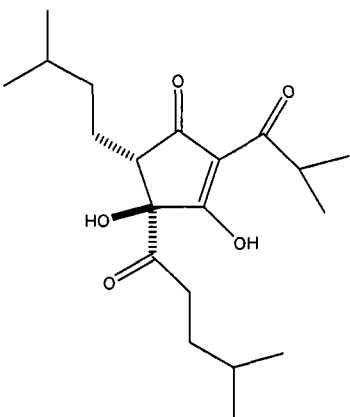
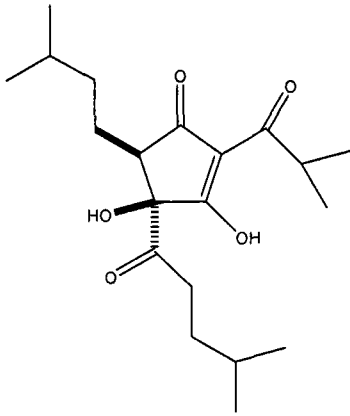
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 顺 ad 异α 酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 顺 ad 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6S)$ 反 ad 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	$\rho(6R)$ 反 ad 异α 酸	

表 2

四氢异 α 酸

化学名	别名	结构
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢顺 n 异 α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢反 n 异 α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢顺 n 异 α 酸	

(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢反 n 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -5-(3-甲基丁基)-4-(4- 甲基戊酰基)-2-(3-甲基 丙酰基)环戊-2-烯-1-酮	四氢顺 co 异α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -5-(3-甲基丁基)-4-(4- 甲基戊酰基)-2-(3-甲基 丙酰基)环戊-2-烯-1-酮	四氢反 co 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -5-(3-甲基丁基)-4-(4- 甲基戊酰基)-2-(3-甲基 丙酰基)环戊-2-烯-1-酮	四氢顺 co 异α 酸	

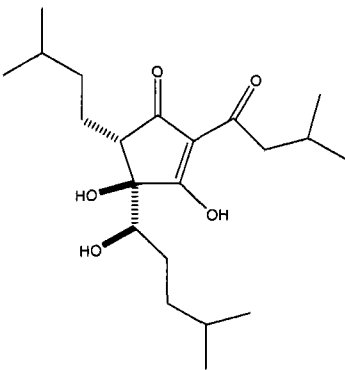
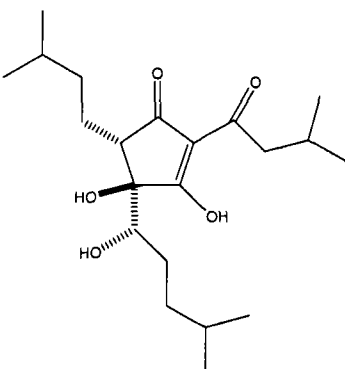
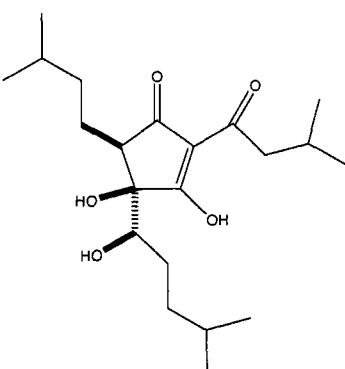
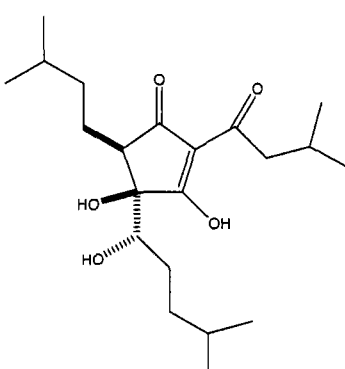
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -5-(3-甲基丁基)-4-(4- 甲基戊酰基)-2-(3-甲基 丙酰基)环戊-2-烯-1-酮	四氢反 co 异α 酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -2-(2-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢顺 ad 异α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -2-(2-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢反 ad 异α 酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -2-(2-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢顺 ad 异α 酸	

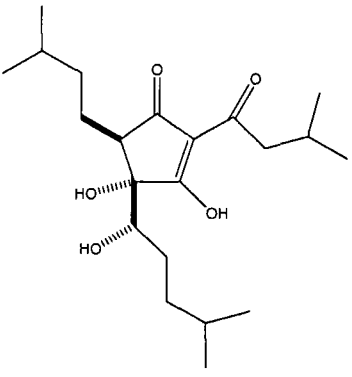
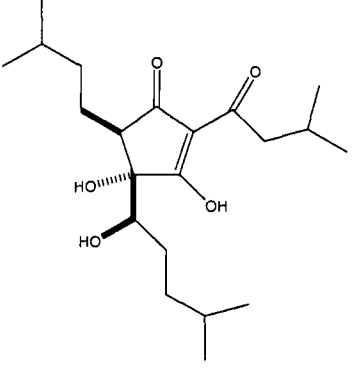
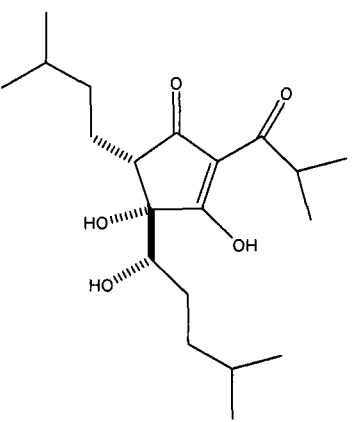
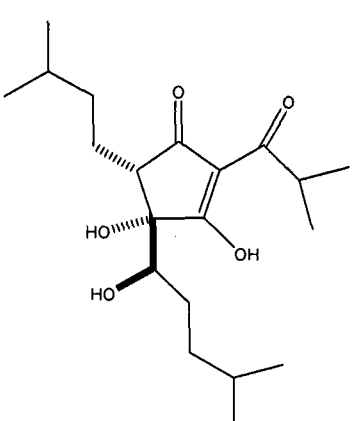
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -2-(2-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁 基)-4-(4-甲基戊酰基)环 戊-2-烯-1-酮	四氢反 ad 异 α 酸	
--	------------------------	--

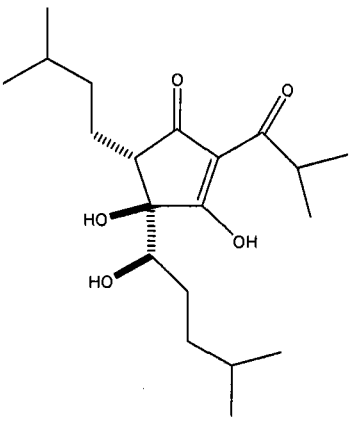
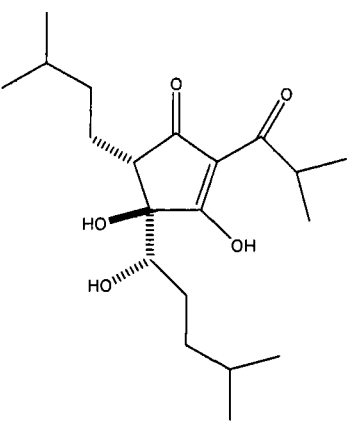
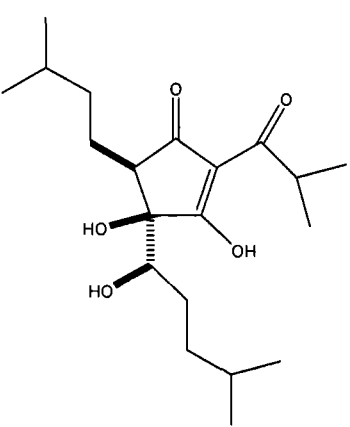
表 3

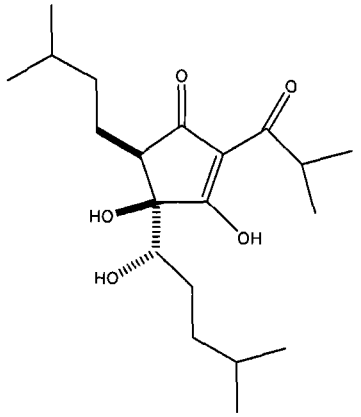
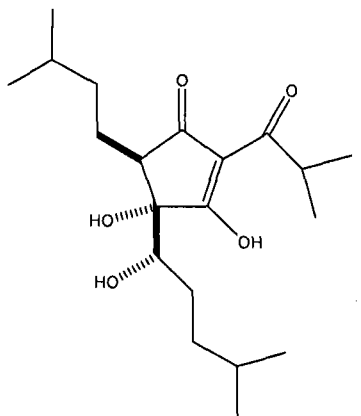
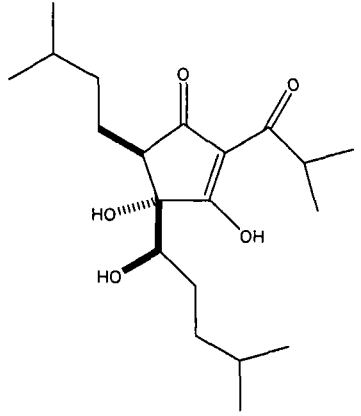
六氢异 α 酸

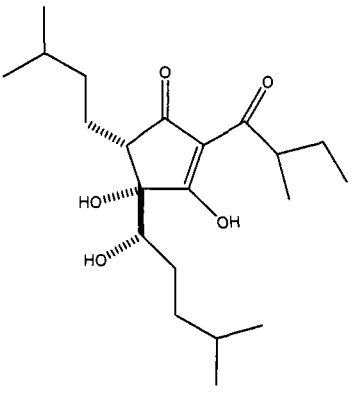
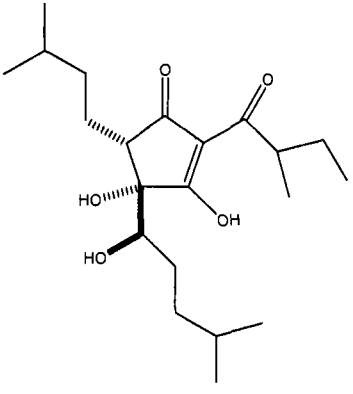
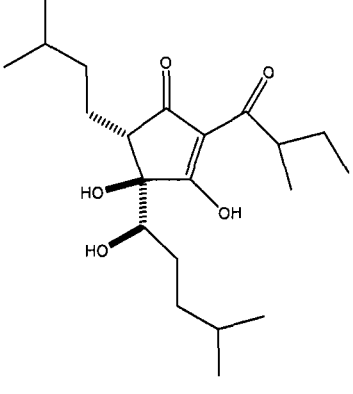
化学名	别名	结构
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6S)顺 n 异 α 酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6R)顺 n 异 α 酸	

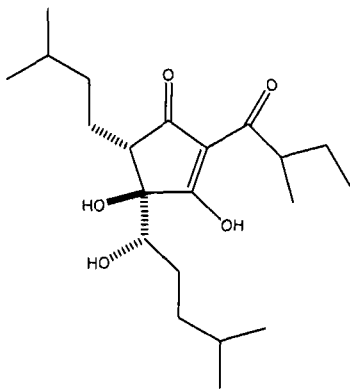
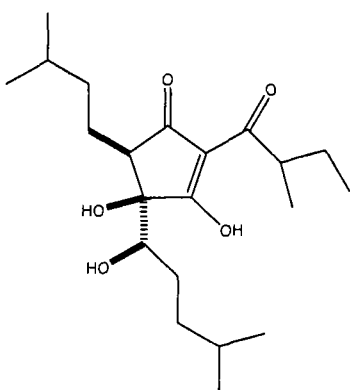
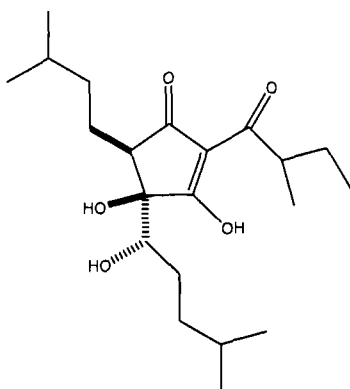
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6R)反 n 异α酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6S)反 n 异α酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6R)顺 n 异α酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6S)顺 n 异α酸	

(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6S)反 n 异α酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-1-羟基-4-甲基 戊基]-2-(3-甲基丁酰 基)-5-(3-甲基丁基)环戊 -2-烯-1-酮	六氢(6R)反 n 异α酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)顺 co 异α酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)顺 co 异α酸	

(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)反 co 异α酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)反 co 异α酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)顺 co 异α酸	

(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)顺 co 异α酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)反 co 异α酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)反 co 异α酸	

(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-2-(2-甲基 丁酰基)-5-(3-甲基丁-2- 烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮	六氢(6S)顺 ad 异α酸	
(4S, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)顺 ad 异α酸	
(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)反 ad 异α酸	

(4R, 5S)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)反 ad 异α酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)顺 ad 异α酸	
(4R, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)顺 ad 异α酸	

(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1S)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6S)反 ad 异α酸	
(4S, 5R)-3, 4-二羟基 -4-[(1R)-羟基-4-甲基戊 -3-烯-1-基]-5-(3-甲基 丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲 基丙酰基)环戊-2-烯-1- 酮	六氢(6R)反 ad 异α酸	

本文使用的术语“衍生物”或“衍生”一词指一种化学物质在结构上与另一种物质相关，并且理论上可以从另一种物质获得，即一种物质可以由另一种物质制得。衍生物可包括通过化学反应获得的化合物或是新发现的合成方法得到的化合物。参阅伯杰勒 M. (Verzele, M.) 和德库克雷尔 D. (De Keukeleire, D.)，食品科学进展 27：啤酒花和啤酒苦味酸化学与分析 (Developments in Food Science 27: Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids)，埃尔塞维尔科学出版社(Elsevier Science Pub. Co.)，1991，纽约(New York)，美国(USA)，整体引用于本文，作为对啤酒花化学的详细论述。

本发明的第二个具体实施方式描述了用于促进哺乳动物重金属解毒的方

法, 所述方法包括给该哺乳动物服用一种组合物, 该组合物包含至少两种有疗效剂量的组分, 选自啤酒花; 1, 7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1, 6-二烯-3, 5-庚二酮; 锌; 和 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5, 8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

在这个具体实施方式的一个方面, 这个方法的组合物进一步包含化合物选自: (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基

-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4R, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丙酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5R)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1R)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊-3-烯-1-基]-2-(2-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)环戊-2-烯-1-酮, 和(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-羟基-4-甲基戊

-3-烯-1-基]-5-(3-甲基丁-2-烯-1-基)-2-(2-甲基丙酰基)环戊-2-烯-1-酮。

在这个具体实施方式的另一个方面，这个方法的组合物进一步包含化合物选自：(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮；和(4R, 5S)-3, 4-二羟基-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)-4-(4-甲基戊酰基)环戊-2-烯-1-酮。

[illegible]

-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮; (4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基
-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮;
(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮, 和(4S, 5S)-3, 4-二羟基-4-[(1S)-1-羟
基-4-甲基戊基]-2-(3-甲基丁酰基)-5-(3-甲基丁基)环戊-2-烯-1-酮。

在这个具体实施方式的一些方面，这个组合物进一步包含一种药用赋形剂，选自包衣料、等渗和吸收延迟剂、粘合剂、粘附剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、芳香剂、甜味剂、吸收剂、去垢剂和乳化剂。此外，在其他方面，

该组合物还包含一种或多种组分，选自抗氧化剂、维生素、矿物质、蛋白质、脂肪和碳水化合物。

本发明的方法旨在用于任何可通过本发明的方法受益的哺乳动物。这些哺乳动物首选人类，但是本发明并不限于人类，也可供兽医使用。因此，根据本发明，“哺乳动物”或“需要治疗的哺乳动物”包括人类以及非人类哺乳动物，特别是家畜，包括但不限于猫、狗和马。

这个组合物包含：约 0.10 g 至约 10.00 g 的啤酒花；约 5 mg 至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌；以及约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。这个组合物在本发明的第三个具体实施方式被描述，同时在本发明的另一个具体实施方式中进一步描述了一种促进哺乳动物重金属解毒的方法，这个方法利用的组合物包括：约 0.10 g 至约 10.00 g 的啤酒花；约 5 mg 至约 1200 mg 的 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮；约 0.10 mg 至约 24 mg 的锌；以及约 5 mg 至约 1200 mg 的 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮。

在本发明的又一个具体实施方式中介绍了一种用于促进哺乳动物的重金属解毒的方法，所述方法利用的组合物包含有疗效剂量的啤酒花。

下列实施例旨在进一步描述本发明的某些优选实施方式，并不限制其性质。本领域技术人员仅需常规实验应能够认可，或能够确定，对于本文所述的具体物质和过程的众多等同物。

实施例

实施例 1

测试样对解毒酶活性的影响

测试材料 - 由麦特金尼斯公司 (Metagenics Inc) (圣克利门蒂 (San Clemente), 加利福尼亚 (CA), 美国 (USA)) 提供所有用于测试的化合物。在二甲基亚砜 (DMSO) 中制备测试化合物, 并将其储存于 -20°C 。萝卜硫素、谷胱甘肽和 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 购自西格玛化学 (Sigma Chemicals) (圣路易斯 (St. Louis), 密苏里 (MO))。其他所有的化学品均为分析纯。

细胞培养与处理 - 大鼠肝细胞系 RL-34 购自日本健康科学会 (东京 (Tokyo), 日本 (Japan))。细胞以对数生长期保存在补充了 5% 热灭活 FBS, 100 国际单位 (IU) 青霉素, 和 100 微克/毫升 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 链霉素的 DMEM 培养基中。人肝细胞系 HepG2 购自美国标准生物品收藏中心 (ATCC) (马纳萨斯 (Manassas), 弗吉尼亚 (VA))。细胞以对数生长期保存在补充了 10% 灭活 FBS, 100 IU 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 DMEM 培养基中。

RL-34 细胞系中的酶活性 - 在 6 孔板中细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度传代培养。第二天向细胞中加入培养基中的测试化合物直至达到 0.1% DMSO 的浓度。细胞与测试物一起在 37°C 的加湿孵化器中保温 2 天, 然后裂解细胞并分析酶活。用测试化合物处理过后, 细胞接下来用 0.5 毫升 (ml) PBS 冲洗两次以去除所有的存留液体。为了裂解细胞, 在每一个孔中加入 150 微升 (μL) 的缓冲液 D (含有 0.8% 洋地黄皂苷的 2 毫摩尔/升 (mM) 的 EDTA) 并在室温下保温 15 分钟。细胞裂解液以 10,000 转/分钟的转速离心 10 分钟。含有细胞裂解液的上清液转移到 96 孔板中。蛋白质的测定使用喹啉甲酸试剂盒 (圣

路易斯(St. Louis), 密苏里(MO))。相同浓度的蛋白用于所有的酶活性测定。

谷胱甘肽转移酶(GST)的活性测定 - 含有 GST 酶的细胞裂解液(20 μ L)加入紫外平底 96 微孔板的每一个孔中。每个孔加入反应缓冲液(300 μ L), 最终形成在每 100mM KPO₄ 中含有 8 mM 的谷胱甘肽和 3.2 mM 的 CDNB。CDNB 的酶转化反应在 340 nm 波长和照射时间大于 3 分钟条件下测定以决定 GST 的活性。((阿帕蒂(Apati, p.), 等(et al.), 《药学和药理学杂质》(J Pharm Pharmacol), 58(2):251-6, 2006, 和 Habig, W.H., M.J. 派勃斯特(M.J. Pabst), 和 W.B. 雅各比(W.B. Jakoby), 《生物化学杂志》(JBiol Chem.), 249:7130-9, 1974)。

还原型辅酶 II 醌氧化还原酶测定(NQO1) - 为了测定 NQO1 的活性, 在 96 平底微孔板每一个孔中加入含有 NQO1 酶的细胞裂解液 20 μ L。每个孔加入反应缓冲液(200 μ L), 最终达到每孔中含有 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 μ M FAD, 1 mM G6P, 30 μ M NADP, 2 单位/毫升(U/ml) G6PDH, 0.06% BSA, 725 μ M MTT 和 50 μ M 甲萘醌。在 610 nm 的波长下 MTT 的还原反应进行 3 分钟后测定 NQO1 的诱导活性 (Feng, R., 等(et al.), 《生物化学杂志》(JBiol Chem.), 280(30):27888-95, 2005, 和普罗哈斯卡 H. J. (Prochaska, H. J.), 和 A. B. 圣玛丽亚(Santamaria), 《分析生物化学》(Anal Biochem.), 169:328-36, 1988)。NQO1 活性的诱导值通过与对照组的比率来决定。

报告和表达质粒的共转染 - 血红素氧化酶报告子的结构在之前已经描述过 (Gong, P., 等(et al.), 《生物化学与生物物理学集刊》(Arch Biochem Biophys), 405(2):265-74, 2002)。根据制造商说明的步骤, 用来自 Invitrogen 公司的脂质体 2000 转染试剂转染细胞。HepG2 细胞在含有无血清

和抗生素的 MEM 培养基的 96 孔白板中以每孔 5×10^4 细胞的密度传代培养。第二天，在 25 μL 的 opti-MEM 培养基中稀释构建有 pRL-TK 基因的 HO-1 报告子（共 0.2 微克(μg) DNA，比例为 2:1）并轻微混合。在 25 μL 的 opti-MEM 培养基中稀释 0.5 μL 的脂质体 2000 并在室温下保温 5 分钟。然后把经过稀释的 DNA 和稀释的脂质体 2000 混合，轻微混合并在室温下保温 20 分钟。然后将细胞与 50 μL 上述混合物在 37° C 加湿孵化器中保温 6 小时。经过 6 小时的保温后，加入 100 μL 无血清和抗生素的 MEM 培养基继续保温 18 小时。去除培养基，然后加入培养基中的测试化合物直至达到 0.1% DMSO 的浓度并培养 24 小时。编码海肾荧光素酶的质粒 pRL-TK 作为对每个转染的内参。

荧光素酶活性 - 转染两天后，根据制造商的方案（试剂盒(Promega)），细胞用磷酸盐缓冲剂冲洗，然后在被动裂解液中裂解，裂解液来自于双荧光素酶报告质粒测试系统。首先，用 100 μL 的底物 LARII 测定细胞裂解液中萤火虫荧光素酶活性。然后加入 100 μL 的 STOP & GLO 试剂灭活萤火虫荧光素酶，同时活化海肾荧光素酶，其活性同样被检测。在珀金埃尔默(PerkinElmer)照度计中进行分析，相关的荧光素酶活性计算方法如下：100,000/海肾荧光素酶的活性（使用单位）3 萤火虫荧光素活性（使用单位）。每一个转染重复 3 次。

定量 PCR - HepG2 细胞在 6 孔板中以每孔 3×10^5 个细胞的密度传代培养。第二天，加入培养基中的测试化合物直至达到 0.1% DMSO 的浓度。细胞与测试物在 37° C 加湿孵化器中保温 8 小时。然后根据制造商说明，使用 TRI 试剂（西格玛化学(Sigma Chemicals)）纯化 mRNA 用于基因表达分析。mRNA 纯化后，逆转录 cDNA 用于 QPCR 的分析。逆转录使用常规逆转录试剂盒

(Omniscript RT Kit) (Qiagen, 巴伦西亚(Valencia), 加利福尼亚(CA), 在 37° C, 60 分钟, 用 2 µg 起始 mRNA 在 Techgene 热循环仪(thermocycler) (Techne, 伯林顿(Burlington), 新泽西州(NJ)) 中产生 20 µL 反应物。这些待测样品被送到 John Tine 博士功能基因组学中心, 奥尔巴尼大学 (伦斯勒(Renasselaer), 纽约(NY))。利用 Taqman®探针化学和 $\Delta \Delta Ct$ 量化进行定量 PCR。一式三份在每孔中加入 20 ng 全 RNA 以及利用 GAPDH 作为内部对照来分析。其余 5 个分析的基因分别是 GSTA1、NQO1、HMOX1 和两种类型的金属硫蛋白, 分别是 hMT1&2 和 hMT1&1alt。表达金属硫蛋白基因的方案来自于艾代米尔(Aydemir)等的工作。(《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci USA), 103(6); 1699-704, 2006), 利用两个正向引物和两个反向引物的结合, 和 2 个 Taqman®探针与 MT1H、-1H-like、-1G、-1L、-1E、-1A 和 MT2 进行匹配。

蛋白质印迹探测 - HepG2 细胞系采用上文所述方法培养并加入测试物保温 4 小时, 然后裂解细胞分离出细胞核组分 (迪格纳穆(Dignam), J. D., R. M. 莱柏维兹(R. M. Lebovitz), and R. G. 罗德(R. G. Roeder), 《核酸杂志》(Nucleic Acids Res), 11(5):1475-89, 1983)。总的蛋白质浓度用喹啉甲酸试剂盒 (西格玛(Sigma)) 测定。总细胞裂解液 (含 60 µg 总蛋白) 通过电泳分离, 对 Nrf-2 的检测是将其与初级抗体在 4° C 的条件下过夜 (圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology, Inc), 圣克鲁斯(Santa Cruz), 加利福尼亚(CA))。当在利用增强化学发光系统(ECL)使蛋白可视化以后, 连有辣根过氧化物酶的次级抗体加入并保温一小时 (GE 医疗(GE Healthcare), 皮斯卡塔韦(Piscataway), 新泽西州(NJ))。密度通过采用柯达分子成像软件 (伊士曼柯达公司(Eastman Kodak Company), 罗切斯特(Rochester), 纽约

(NY)) 测量条带的净强度来测定。

数据分析 - 诱导的 GST 和 NADPH 醌还原酶活性根据测试物与对照载体 (DMSO) 的比率来决定。GST 和 NQO1 的活性归一为同等蛋白的活力。对于各种情况最少使用两孔。血红素氧化酶启动子的诱导活性根据测试物与对照载体 (DMSO) 的比率来决定。荧光素酶的活性是用作为对照的海肾荧光素酶的活性对照归一化。对于各种情况最少使用四孔。数据代表了三个独立实验的平均值 (SEM)。

结果

酶活性 - 萝卜硫素是已知的 Nrf-2 的活化剂并在酶活性测试中作为对照组。根据科学文献的惯例, 用测试物诱导的结果相当于 DMSO 对照组的 20% 则认为有活性。在 RL-34 细胞系中通过萝卜硫素 (3 $\mu\text{g/ml}$)、穿心莲内酯 (25 $\mu\text{g/ml}$)、黄腐醇 (1 $\mu\text{g/ml}$)、杏梅 (20 $\mu\text{g/ml}$)、睡茄 (20 $\mu\text{g/ml}$)、Osteosine (20 $\mu\text{g/ml}$)、MCHA (20 $\mu\text{g/ml}$) 和 Arthred porcine (20 $\mu\text{g/ml}$) 诱导的 GST 的活性 (表 4) 可达到 $\geq 20\%$ 。通过 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮 (姜黄素) (5 $\mu\text{g/ml}$)、3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮 (穿心莲内酯) (25 $\mu\text{g/ml}$)、黄腐醇 (1 $\mu\text{g/ml}$)、萝卜硫素 (3 $\mu\text{g/ml}$)、睡茄 (20 $\mu\text{g/ml}$)、I3C (25 $\mu\text{g/ml}$)、白藜芦醇 (20 $\mu\text{g/ml}$)、牛奶蓣 (25 $\mu\text{g/ml}$)、异 α 酸 (IAA) (5 $\mu\text{g/ml}$)、石榴 (25 $\mu\text{g/ml}$)、小白菊内酯 (20 $\mu\text{g/ml}$)、印度醋栗 (amla) (25 $\mu\text{g/ml}$)、齐墩果酸 (25 $\mu\text{g/ml}$)、DIM (25 $\mu\text{g/ml}$)、槲皮素 (20 $\mu\text{g/ml}$)、黄连素 (20 $\mu\text{g/ml}$)、肉桂 (25 $\mu\text{g/ml}$)、葛根 (20 $\mu\text{g/ml}$)、山葵根茎 (25 $\mu\text{g/ml}$)、西洋菜 (25 $\mu\text{g/ml}$)、

淫羊藿(20 µg/ml)、氯酸(25 µg/ml)、秋葵(20 µg/ml)、Bonistein(20 µg/ml)、薄荷(25 µg/ml)、蓝莓(25 µg/ml)、黄连(25 µg/ml)、山葵粉(25 µg/ml)、HHIAA(5 µg/ml)、股善镁 (Osteosine) (20 µg/ml)、蒲公英(25 µg/ml)、绿咖啡(25 µg/ml)和 THIAA(5 µg/ml)诱导的NQO1 酶的活性(表 5)可达到≥20%。

表 4

在 RL-34 细胞系中对用于诱导 GST 酶活性的测试化合物的筛选结果

测试化合物	µg/mL	GST 诱导活性	SEM	n
萝卜硫素	3	1.8	0.12	5
穿心莲内酯	25	1.4	0.03	4
黄腐酚	1	1.4	0.05	3
杏梅	20	1.4		1
DF-SH	50	1.3	0.1	3
睡茄	20	1.3	0.02	2
股善镁(Osteosine)	20	1.2		1
MCHA	20	1.2		1
阿神丽德 (Arthred)	20	1.2		1
猪胶原蛋白				
氨基葡萄糖	20	1.1		1
白藜芦醇	20	1.1	0.08	2
CLA	20	1.1	0.03	2
蒲公英	25	1.1	0.19	4

I3C	25	1.1	0.08	2
黑升麻	20	1.1	0.04	2
啤酒花	50	1.1	0.01	3
异 α 酸 (IAA)	5	1.1	0.05	4
维生素 C	20	1.1	0.01	2
依普黄酮	20	1.1	0.00	2
氯原酸	25	1.1		1
柠檬酸钾	20	1.1	0.04	2
透明质酸	20	1.1		1
阿神丽德 (Arthred)	20	1.0	0.01	2
牛胶原蛋白				
肉桂	25	1.0	0.01	2
RIAA	5	1.0	0.00	2
黄芪	20	1.0		1
Broc 19	25	1.0		1
Broc 49	25	1.0		1
豆蛋白质	20	1.0		1
Broc 11	25	1.0		1
芦丁	20	1.0	0.04	2
苏子	20	1.0	0.03	3
橄榄油	20	1.0	0.05	2
小白菊内酯	20	1.0	0.06	2

HHIAA	5	1.0	0.01	3
槲皮素	20	1.0	0.02	2
富贵草碱	25	1.0	0.03	2
石榴	25	1.0	0.04	3
齐墩果酸	25	1.0	0.01	4
亚麻子	20	1.0	0.07	2
姜黄素	5	1.0	0.04	2
菊粉	20	1.0	0.04	2
摇羊霍	20	1.0	0.09	2
蓝莓	25	1.0	0.05	2
爱尔兰藓	25	1.0	0.08	2
Fructus LL	20	1.0	0.08	2
低聚果糖	20	1.0	0.05	2
DIM	25	1.0	0.00	2
Broc 13	25	1.0		1
葛根	20	1.0	0.07	2
THIAA	5	1.0	0.02	3
薄荷25	25	1.0	0.05	2
印度醋栗 (amla)	25	1.0	0.02	4
碱性牛奶蛋白	20	1.0		1
甘蔗原素	20	1.0	0.05	2
牛奶蓟	25	1.0	0.04	4

光甘草定	20	1.0		1
山嵛菜粉	25	1.0	0.04	2
根皮苷	20	1.0	0.01	2
绿咖啡	25	1.0	0.03	2
Broc 12	25	1.0		1
胡黄连	25	1.0	0.03	3
绿茶	25	1.0		1
黄连素	20	1.0		1
脱氢表雄酮	20	1.0	0.01	2
Broc 10	25	1.0		1
蛋黄多肽	20	1.0	0.01	2
Broc 14	25	1.0		1
橄榄苦苷	20	1.0	0.04	2
维生素 K2	20	1.0		1
大蒜	25	1.0	0.06	2
魔鬼爪	20	1.0	0.12	2
天然 II 型胶原蛋白	20	1.0	0.04	2
山嵛菜根茎	25	1.0	0.00	2
橘皮苷	20	1.0	0.07	2
西洋菜	25	1.0	0.05	2
薯蓣属	20	1.0	0.05	3
DHA	20	1.0	0.03	2

红茶	20	1.0	0.13	2
洋苏叶 MB	20	0.9	0.04	2
秋葵属	20	0.9	0.10	2
大豆异黄酮	20	0.9	0.04	2
Broc 09	25	0.9		2
黑米	20	0.8	0.14	2
红麴	20	0.8	0.09	2

DF-SH 是一个含有啤酒花；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素)；3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)； ρ -二氢异 α -酸(RIAA)和 Zn(525:30:30:4:1)的组合。

表 5

在 RL-34 细胞系中对用于诱导 NQO-1 酶活性的测试化合物的筛选结果

测试化合物	$\mu\text{g/mL}$	NQO1诱导活性	SEM	n
姜黄素	5	4.6	1.59	3
穿心莲	25	4.5	1.00	4
DF-SH	50	4.0	0.43	3
黄腐酚	1	3.7	0.78	3
萝卜硫素	3	3.7	0.76	4
睡茄	20	2.4	0.72	2

I3C	25	2.4	0.34	2
白藜芦醇	20	2.2	0.44	2
啤酒花	50	2.0	0.15	3
牛奶蓣	25	2.0	0.04	4
异 α 酸 (IAA)	5	1.9	0.16	4
石榴	25	1.8	0.41	3
小白菊内酯	20	1.7	0.25	2
印度醋栗 (amla)	25	1.6	0.09	4
齐墩果酸	25	1.5	0.08	4
DIM	25	1.5	0.22	2
槲皮素	20	1.4	0.07	2
黄连素	20	1.4	0.47	2
肉桂	25	1.4	0.28	2
葛根	20	1.4	0.06	2
山嵛菜根茎	25	1.4	0.17	2
西洋菜	25	1.3	0.03	3
摇羊霍	20	1.3		1
氯原酸	25	1.2	0.02	2
秋葵	20	1.2	0.28	2
伯纳斯坦 (Bonistein)	20	1.2		1
薄荷	25	1.2	0.09	4
蓝莓	25	1.2	0.04	2

胡黄连	25	1.2	0.03	2
山嵛菜粉末	25	1.2	0.03	2
HHIAA	5	1.2	0.07	3
股善鎂(Osteosine)	20	1.2		1
蒲公英	25	1.2	0.01	2
绿咖啡	25	1.2	0.01	2
THIAA	5	1.2	0.08	3
RIAA	5	1.1	0.01	2
爱尔兰藓	25	1.1		1
Broc 10	25	1.1		1
Broc 19	25	1.1		1
Broc 49	25	1.1		1
黑米	20	1.1	0.10	2
甘蔗原素	20	1.1	0.06	2
DHEA	20	1.1	0.11	2
Broc 09	25	1.1		1
Broc 12	25	1.1		1
Broc 14	25	1.1		1
亚麻子	20	1.1	0.05	2
大豆异黄酮	20	1.1	0.02	2
Arthred Porcine	20	1.1		1
大蒜	25	1.0		1

橘皮苷	20	1.0	0.04	2
富贵草碱	25	1.0	0.16	2
Broc 11	25	1.0		1
紫苏	20	1.0	0.05	2
李子	20	1.0		1
CLA	20	1.0	0.05	2
洋苏叶 MB	20	1.0	0.03	2
MCHA	20	1.0		1
薯蓣	20	1.0	0.12	2
橄榄苦苷	20	1.0	0.02	2
Broc 13	25	1.0		1
光甘草定	20	1.0	0.02	2
Arthred Bovine	20	1.0	0.13	3
黑升麻	20	1.0	0.03	2
橄榄油	20	1.0	0.06	2
根皮苷	20	1.0	0.02	2
天然 II 型胶原蛋白	20	1.0	0.04	2
氨基葡萄糖	20	1.0		1
黄芪	20	1.0		1
DHA	20	0.9	0.03	2
透明质酸	20	0.9		1
菊粉	20	0.9	0.03	2

低聚果糖	20	0.9	0.07	2
维生素 C	20	0.9		1
蛋黄多肽	20	0.9		1
柠檬酸钾	20	0.9	0.05	2
红茶	20	0.9	0.00	2
绿茶	25	0.9		1
维生素 K2	20	0.9	0.02	2
碱性牛奶蛋白	20	0.9		1
芦丁	20	0.9	0.07	2
Fructus LL	20	0.9	0.03	2
依普黄酮	20	0.8	0.02	2
红麴	20	0.8	0.04	2
魔鬼爪	20	0.08	0.14	2

DF-SH 是一个含有啤酒花；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素)；3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)； ρ -二氢异 α -酸(RIAA)和 Zn(525:30:30:4:1)的组合。

H0-1 转录激活 - 血红素氧化酶受到 Nrf-2 和 MTF-1 两种转录因子的共同调节，调节方式是通过血红素氧化酶基因上的 ARE 和 MRE 两个结合位点的激活来进行。萝卜硫素是一种已知的化合物能激活 Nrf-2 转录因子进而诱导 HepG2 细胞系中的血红素氧化酶启动子使其产生活性(表 6)。通过测试物诱导与 DMSO 对照物诱导的结果的比值达到百分之三十则认为是有活性。测试物

1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素)、黄腐酚、3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)、萝卜硫素、异 α 酸(IAA)、齐墩果酸、绿茶儿茶素、牛奶蓣、富贵草碱、氯化锌、大蒜、印度醋栗(amla)水果提取物和肉桂诱导血红素氧化酶启动子活性表达。

表 6

HepG2 细胞系中用测试物对血红素氧化酶(HO-1) 荧光素酶报告子的激活

测试物	血红素氧化酶活性诱导值	
	活性	$\pm$ SEM
姜黄素	6.1	$\pm$ 2.55
黄腐酚	5.4	$\pm$ 0.64
穿心莲提取物	4.4	$\pm$ 0.57
萝卜硫素	4.2	$\pm$ 0.70
异 α 酸(IAA)	3.6	$\pm$ 0.85
齐墩果酸	2.7	$\pm$ 1.20
绿茶儿茶素	2.6	$\pm$ 0.49
牛奶蓣	2.0	$\pm$ 0.28
富贵草碱	1.7	$\pm$ 0.01
ZnCl ₂	1.5	$\pm$ 0.01
大蒜	1.4	$\pm$ 0.01
Alma 果提取物	1.3	$\pm$ 0.50
肉桂粉	1.3	$\pm$ 0.01

基因表达 - 相对于 GAPDH 的基因的相对表达 (RE) 分析被报告出来。为了确定对照细胞的相对表达量, 对所有的样品计算 DMSO 对照组的 RE 平均值处理后的比率。hMT1&2 和 hMT1&2alt 的平均值被计算并表示为 MT1, 2。GSTA1 和 NQO1 的平均值被计算并表示为 II 相酶基因诱导。对于金属硫蛋白 (M1, 2), 血红素氧化酶 (HMOX1) 和 II 相酶 (GSTA1 和 NQO1) 的基因表达平均值见表 7。作为一个对照, CdCl₂ 对 MT 和 HMOX1 都具有诱导作用, 却不能增加 II 相酶的量。或者, 萝卜硫素可以增加 II 相酶和 HMOX1 而不会增加 MT 的量。测试物能增加 $\geq 20\%$ (依序) 的 II 相酶, 包括: 穿心莲、异 α 酸 (IAA) 和姜黄素; HMOX1 包括姜黄素、穿心莲、墨角藻目、叉枝藻、异 α 酸 (IAA) 和黄腐酚; MT 包括齐墩果酸、墨角藻目、黄腐酚和叉枝藻。

表 7

HepG2 细胞用测试物处理后的基因表达情况 (数值单位为 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

	MT1, 2 (平均值)		HMOX1		Phase II (平均值)	
	与 DMSO 的比率	+/-SD	与 DMSO 的比率	+/-SD	与 DMSO 的比率	+/-SD
DMSO 对照	1.00	0.26	1.00	0.15	1.00	0.09
CdCl ₂ (40 μM)	83.31	18.50	21.23	5.28	0.94	0.23
萝卜硫素 (3)	0.67	0.16	8.82	1.98	1.84	0.44
穿心莲 (25)	0.87	0.12	2.43	0.37	2.29	0.39
姜黄素 (5)	0.90	0.48	2.09	1.14	1.15	0.43
ZnCl ₂ (10)	12.43	8.98	0.97	0.16	0.94	0.09

异 α 酸 (IAA) (5)	0.89	0.12	1.26	0.15	1.26	0.18
RIAA (5)	0.83	0.22	2.54	1.82	1.15	0.35
THIAA (5)	0.90	0.17	1.11	0.01	0.99	0.13
黄腐酚 (1)	0.90	0.40	1.11	0.12	1.02	0.19
啤酒花 (20)	1.35	0.31	1.31	0.15	0.69	0.29
啤酒花 (50)	2.12	0.61	1.25	0.08	1.14	0.64
SH 配方 (10)	0.95	0.13	1.64	0.20	1.06	0.07
SH 配方 (20)	1.04	0.13	3.55	0.15	1.52	0.07
SH 配方 (50)	0.79	0.30	1.14	0.12	0.66	0.09
3C 配方 (1)	1.15	0.14	0.85	0.12	0.84	0.16
3C 配方 (2.5)	1.05	0.11	1.03	0.05	1.00	0.20
3C 配方 (5)	2.07	2.00	30.34	49.01	29.93	59.01
3C 配方 (7.5)	1.12	0.11	2.14	0.33	11.12	21.07
齐墩果酸 (25)	2.39	0.52	1.88	1.41	0.91	0.27
睡茄 (20)	1.06	0.18	1.17	0.23	0.98	0.24
As. Nod Mesh (25)	1.05	0.08	0.82	0.02	0.68	0.16
C. Chamissoi (25)	1.01	0.07	1.04	0.13	0.86	0.15
C. Cripus (25)	1.07	0.18	0.90	0.20	0.79	0.16
墨角藻王 (25)	1.28	0.18	2.12	1.37	6.82	11.77
绿茶 (25)	0.85	0.09	0.77	0.00	0.83	0.11
叉枝藻 (25)	1.19	0.03	1.63	0.89	0.97	0.02
爱尔兰藓 (25)	2.07	2.26	0.91	0.07	0.91	0.07
Sarcodiotheca (25)	0.88	0.09	0.85	0.15	0.77	0.08

配方3C 是同等比率的异 α 酸 (IAA), 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素)和3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-

亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)的一个组合。配方 SH 是由啤酒花; ρ 异 α 酸; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素); 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯); 和锌(525:4:30:30:1)的组合。灰色阴影表明只有一次平行测定。

Hrf-2 易位 - Hrf-2 从胞质易位到细胞核中的过程已经被证明发生在被外源性化学物质和抗氧化剂处理后(Chan J. Y. and M. Kwong,《细胞化学和细胞物理学报》(Biochim Biophys Acta), 1517(1): 19-26, 2000, and Chan, K., 等 et al.,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci USA), 93(24): 13943-8, 1996)。如图 3 和 4, 在经测试物处理 4 小时后的 HepG2 细胞核部分中观察到了 Nrf-2。在 Nrf-2 核转移过程中, 萝卜硫素作为对照表现出显著增加。啤酒花; 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素); 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯); ρ 异 α 酸和锌的组合(525:4:30:30:1)以及异 α 酸(IAA); 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮(姜黄素); 3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮(穿心莲内酯)的组合(1:1:1)也发现了 Hrf-2 到细胞核的显著易位。

实施例 2

测试组合物对金属硫蛋白 mRNA 生成的影响

本实验是一项针对生物标记的一种独特保健品组合对金属解毒和消除的

影响的研究调查。

九个志愿者被召集并进行 14 天的跟踪观察。在第一次随访获得基线评价。测试物包括（每片剂）锌 (1.667 mg)；3-(2-(十氢-6-羟基-5-羟甲基-5,8a-二甲基-2-亚甲基萘基)亚乙基)二羟基-4-羟基呋喃-2(3H)-酮 (50 mg)；1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-二烯-3,5-庚二酮 (50 mg)；啤酒花 (875 mg) 和 ρ -二氢异 α -酸混合物 (6.667 mg)，测试立即开始并持续作用 10 天。

分别在第二次随访（第 3 天）、第三次随访（第 6 天）、第四次随访（第 8 天）、第五次随访（第 10 天）和第六次随访（第 14 天）做出临床评价。在停药四天后进行第六次随访。在第一到第五次随访获得基本安全实验采样，包括全血球计数，全面代谢面板和 γ -谷氨酰转移酶水平。疗效终点包括金属硫蛋白 1 和 2 的信使 RNA 水平（反映基因上调）以及有毒和营养微量元素的无端尿排泄物。

人血液样本的金属硫蛋白 mRNA 的测量评价方法如下：

RNA 抽提 - 样本收集后，将 2 ml 的全血与 5 ml RNeasy lysis buffer 混合（Qiagen 公司，克雷森斯 (Creston), 德克萨斯 (TX)）。用 RNeasy spin column 血液 RNA 分离试剂盒（Qiagen 公司 (Qiagen)，克雷森斯 (Creston), 德克萨斯 (TX)）并根据制造商的操作规范来提取 RNA。RNA 的浓度用微滴 (Nanodrop) 分光光度计测量（微滴技术 (Nanodrop)，威尔明顿 (Wilmington)，德国 (DE)）。

逆转录酶分析 - 用 RNeasy spin column 第一链合成试剂盒（Qiagen 公司 (Qiagen)，克雷森斯 (Creston), 德克萨斯 (TX)）将 RNA 逆转录第一链 cDNA 并根据制造商的操作规范使用 oligo-dT 设计引物。

引物和探针 - 为了定量 GAPDH 表达，作为内参的 Taqman 基因表达检测

系统来自于应用生物系统公司（福斯特城(Forster City)，加利福尼亚(CA)；assay Hs99999905_ml）应用于 Taqman 分析并针对人金属硫蛋白基因的引物和探针在之前已经描述过(艾德米尔 TB(Aydemir TB),布兰查德 RK(Blanchard RK)和卡曾斯 RJ(Cousins RJ), 2006 年轻人补锌对金属硫蛋白, 锌转运以及白细胞中的细胞因子基因表达的改变(Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations). 《美国科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 103, 1699-1704)。正向和反向引物和经高效液相色谱纯化并标记有 5'-FAM 和 3'-TAMRA 的 Taqman 探针来自于欧普龙(Operon)生物技术公司(Huntsville, AL)。

这些试剂的序列如下:

hMT1, 2-F	5' - GCACCTCCTGCAAGAAAAGCT
hMT1, 2-R	5' - GCAGCCTTGGGCACACTT
hMT1, 2-T	5' - FAM CACAGCCCACAGGGCAGCAGG TAMRA
hMT1, 2Alt-F	5' - GCACCTCCTGCAAGAAGAGCT
hMT1, 2Alt-R	5' - GCAGCCCTGGGCACACTT
hMT1, 2Alt-T	5' - FAM ACAGCCCACAGGACAGCAGG

定量 PCR 分析-采用两步法进行基于 Taqman 的 RT-定量 PCR。如上文所述合成第一链 cDNA。在第一次实验中, 加入相当于 20 ng cDNA 的起始 RNA 到定量 PCR 的反应体系中。用于探测金属硫蛋白表达的反应体系含有 1X Taqman Master Mix (应用生物系统公司(Applied Biosystems), 福斯特市(Foster City), 加利福尼亚(CA)), 400 nM 正向和反向引物, 以及 200 nM 的 Taqman

探针。用于探测 GAPDH 表达的反应体系含有 1X Taqman Master Mix (应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 和由制造商推荐使用的 1X 基因特异性检测试剂。所有的反应体系一式三份。不含 cDNA 模板的反应体系作为阴性对照组。在第二次实验中, 使用样品的子样品, 加入相当于 100 ng 的 cDNA 的起始 RNA 到上述其他体系中进行定量 PCR。用一个参考样品做上述两个分析作为交叉分析比较。

反应板在应用生物系统 7900HT (Applied Biosystems 7900HT) 测序系统上进行反应。AmpliTaq Gold 聚合酶在 95°C 下活化 10 分钟, 然后是 40 次循环, 过程包括在 95°C 下变性 15 秒, 和在 60°C 下退火和扩增 60 秒。

扩增后的数据用 ABI Prism SDS2.1 软件分析 (应用生物系统 (Applied Biosystems))。基因表达的相对定量用 $\Delta\Delta C_t$ 方法 (温纳 J (Winer J), Jung CKS, Shackel I, 威廉姆斯 (Williams), PM. 1999. 对监测体外心肌细胞的基因表达的实时定量反转录聚合酶链反应的发展和验证 (Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro). 《分析生物化学》(Anal Biochem), 270, 41-49), 使用 GAPDH 的表达作为内参使每个样品的表达规范化。

结果以图的形式描述在图 5 和 6 中, 通过增加测量肝脏解毒金属硫蛋白 mRNA 水平来体现干预的功效。

实施例 3

测试组合对重金属在尿排泄中的影响

此项研究的进行是为了确定测试组合物对人志愿者的重金属在尿排泄中的影响。

研究设计 - 研究对象和处理方案与上述例 2 中描述的相同。收集尿液样品和重金属测试由热那亚诊断 (Genova Diagnostics)，南卡罗莱纳 (SouthCarolina)，美国 (USA)，按照他们内部步骤进行。

结果 - 表 8 报告在测试的志愿者体内临床有关的微量元素的减少。图 7 和 8 描述了测试组合物对于临床重要金属（图 7）和非临床重要金属（图 8）在尿排泄的结果。可以从图 7 中看到，测试组合物显著促进许多重要金属的排泄。图 9 描述了测试组合物对营养物在尿排泄中的影响。

表8

尿排泄物中的重金属

金属	V1 avg*	V5 avg	%变化
铝	10.41	11.29	8.4
锑	0.061	0.063	4.1
砷	17.25	21.36	23.9
钡	2.35	2.95	25.5
铋	ND	ND	
镉	0.16	0.30	90.5
钙	93.13	93.38	-1.9
铯	5.33	5.01	-5.9
铬	2.25	1.38	-38.9

钴	0.12	0.30	148.4
铜	8.29	9.46	14.2
肌氨酸酐	43.12**	58.86	36.5
钷	ND	ND	
镓	0.033	0.059	80.0
铁	ND	ND	
铅	0.35	0.617	76.2
锂	22.50	24.50	8.9
镁	54.13	51.00	-5.8
锰	0.51	2.07	327.0
汞	ND	ND	
钼	39.5	45.75	15.8
镍	1.3883	1.4867	7.1
铈	ND	ND	
铂	1.256	0.087	-93.1***
钾	2307.13	2594.38	12.5
铷	1831.38	1758.38	-4.0
硒	89.75	89.00	-0.8
锶	101.75	96.00	-5.7
硫	519.38	466.38	-10.2
铊	0.31	0.29	-6.9
钍	ND	ND	

锡	2.19	1.68	-23.3
钨	ND	ND	
铀	ND	ND	
钒	1.10	1.08	-2.3
锌	330.5	326.0	-1.4

* =以微克/克(μg/g) 肌酐表示, 除非另有说明

** =以毫克/100毫升(mg/dL) 表示

*** =提出的数据只用于金属可检测的水平

ND =在可检测限度以下。

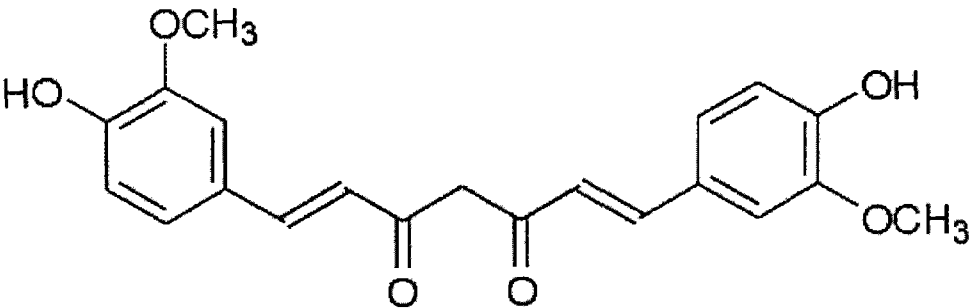


图 1

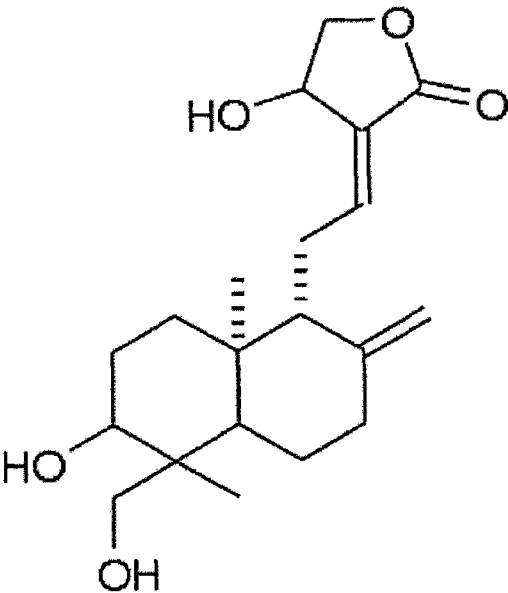


图 2

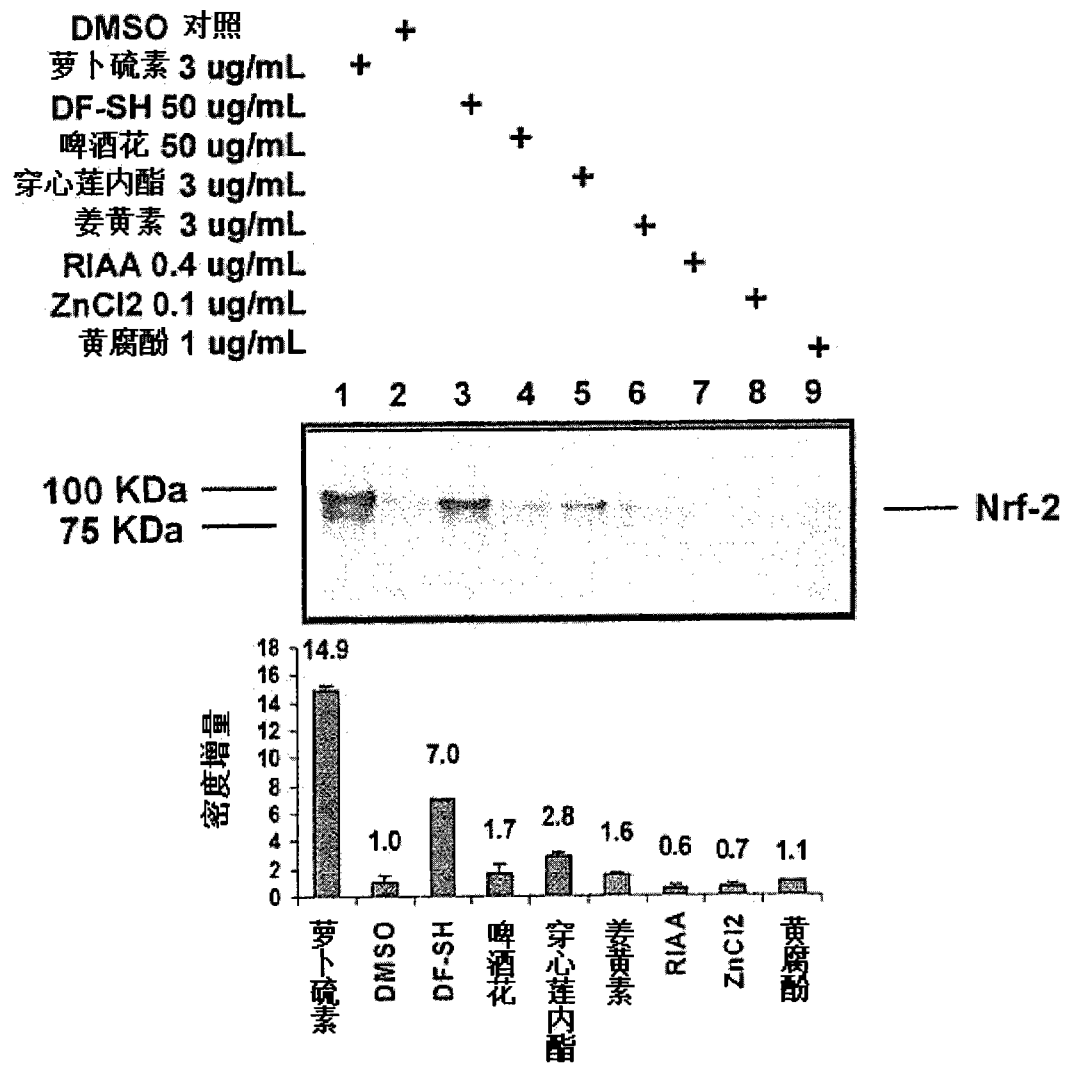


图 3

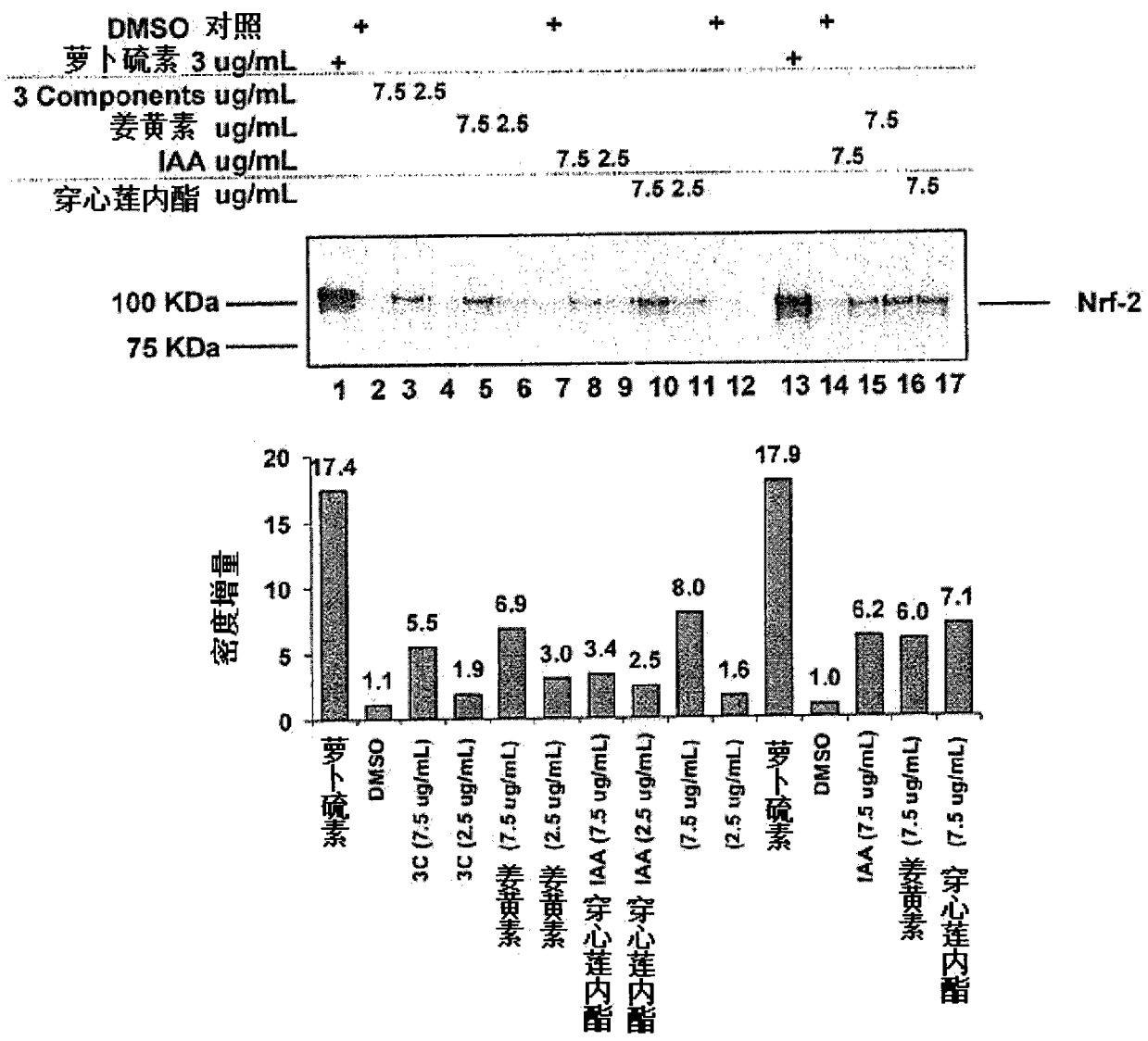


图 4

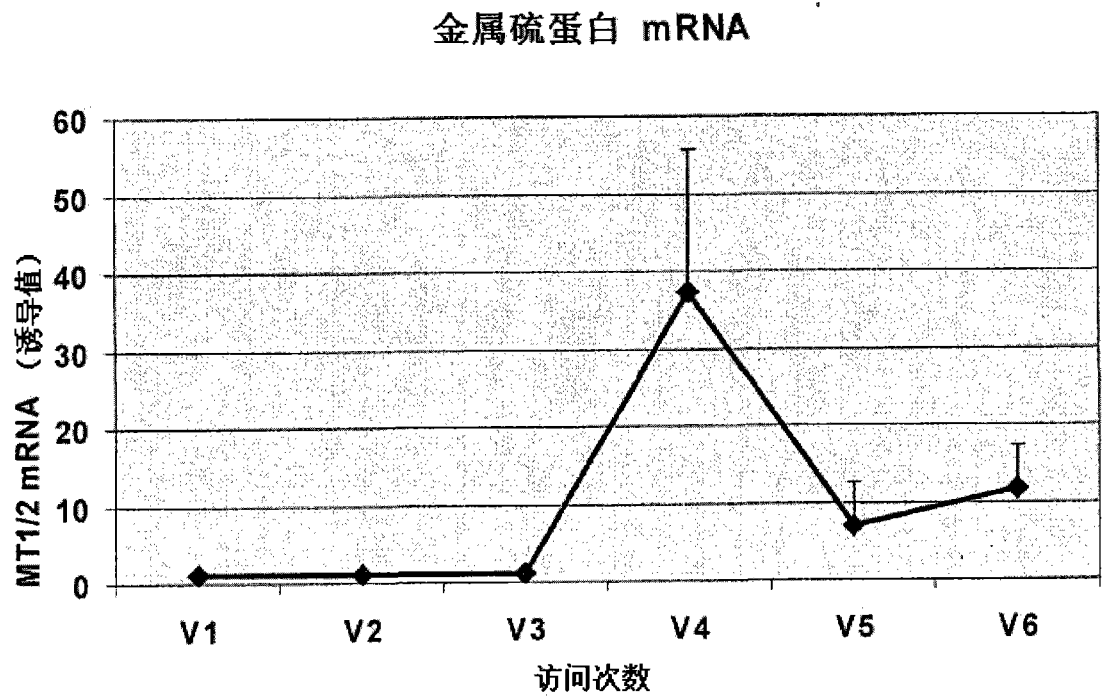


图 5

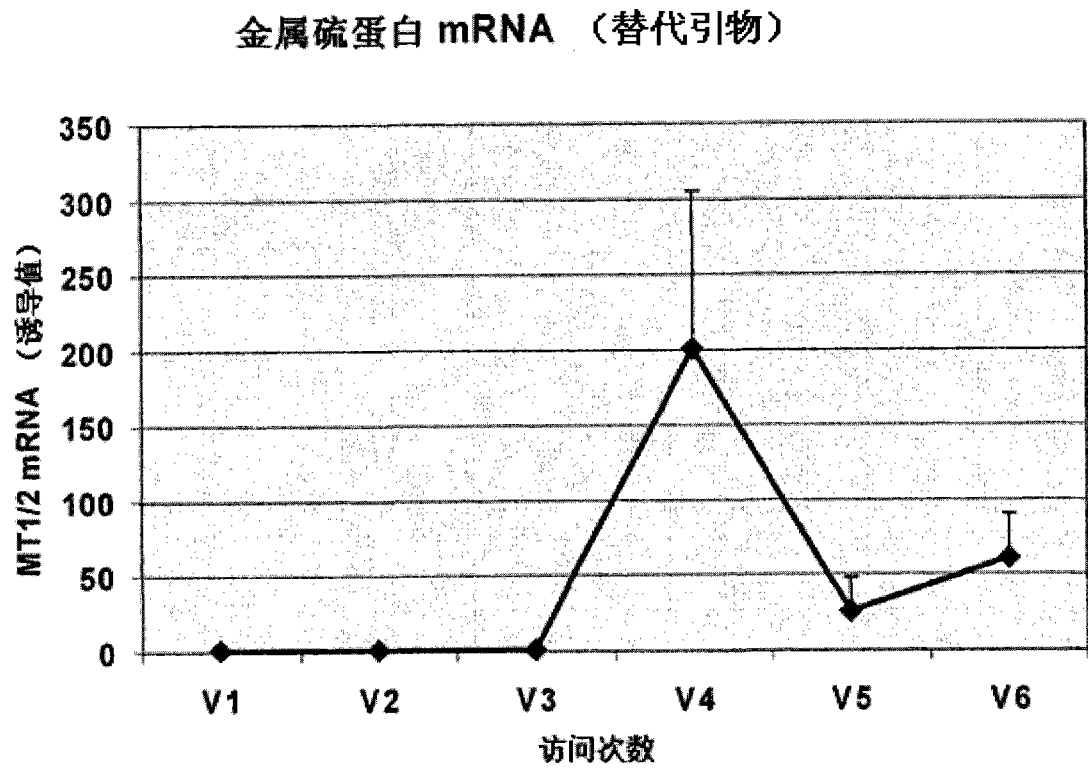


图 6

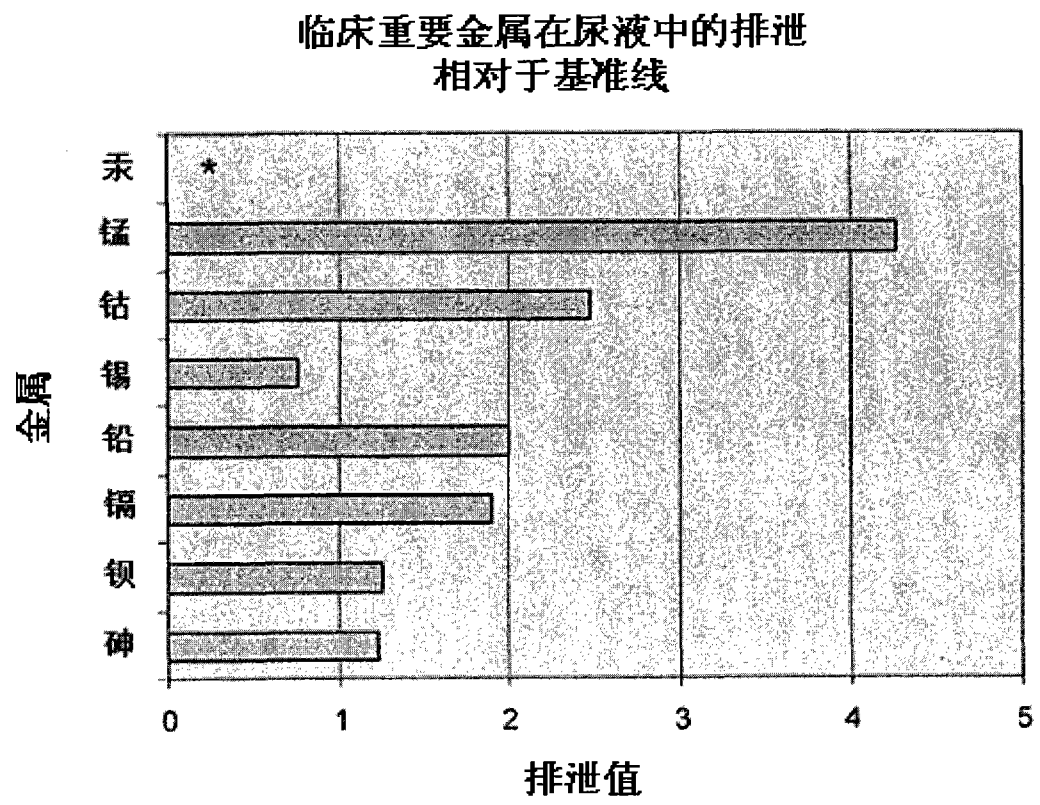


图 7

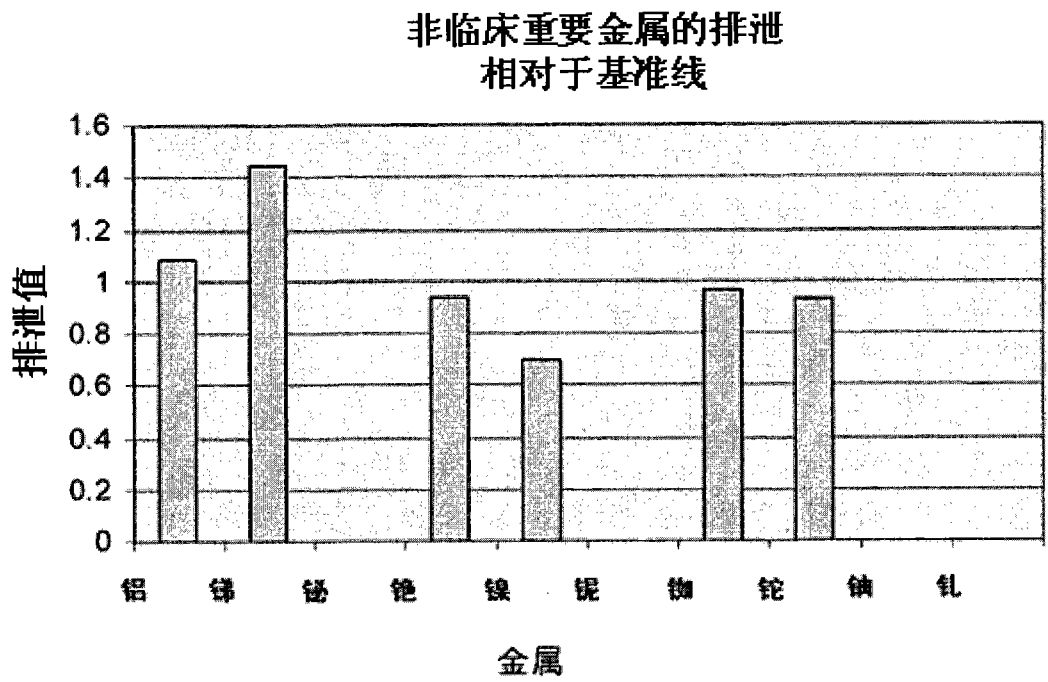


图 8

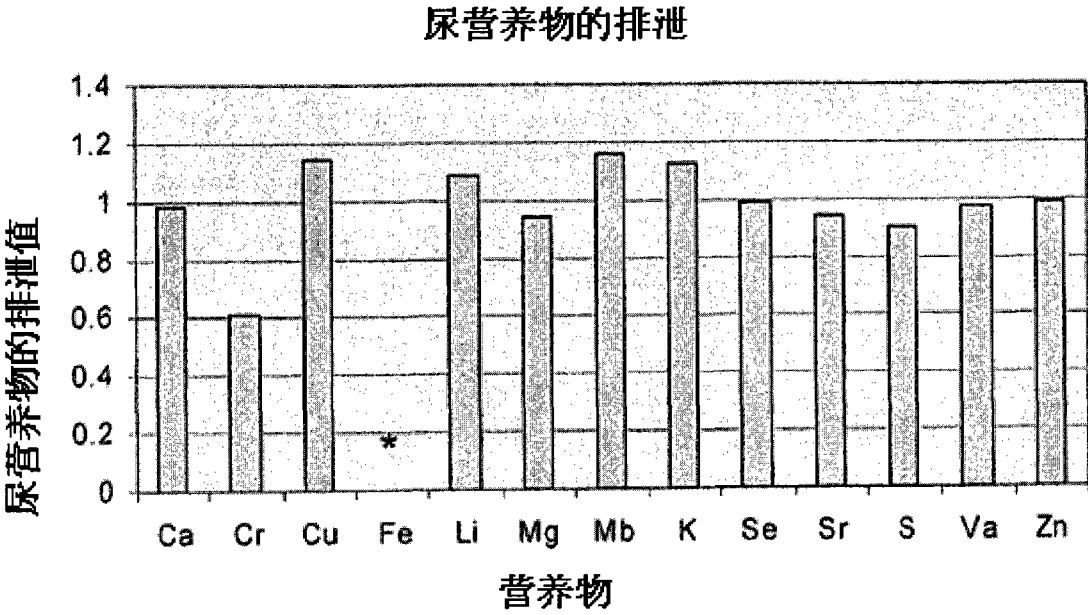


图 9