

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101166537 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 200680014136. 1

代理人 钟晶

(22) 申请日 2006. 04. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

60/675, 580 2005. 04. 28 US

审查员 张娜

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 10. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/016376 2006. 04. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02006/116721 EN 2006. 11. 02

(73) 专利权人 日立化成研究中心公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 日立化成工业株式会社

(72) 发明人 三桥将人

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 7 页

(54) 发明名称

全血中基因的体外表达作为评定对饮食补充物个体差异的模型

(57) 摘要

本发明公开了一种用于为个体定制给药饮食组分例如补充物的方法。在该方法中,哺乳动物的全血被暴露于饮食组分。在暴露于所述饮食组分之后在某些情况中是在进一步刺激被暴露的血细胞之后,对白细胞中与疾病状态相关的标记物 mRNA 水平进行检测。通过将暴露后的 mRNA 水平与在未被暴露的血细胞中所得到的数值进行比较,可以确定所述饮食组分在哺乳动物中将发挥何种作用。通过针对许多可能的饮食组分的哺乳动物血液筛选,可以开发出一组优化的饮食组分,其对具体的哺乳动物进行定制以治疗或者防止疾病状态。

1. 一种检测饮食组分在个体哺乳动物中抵抗癌症或者自体免疫紊乱的潜在效率的方法,该方法包括:

在体外将哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分;

在所述暴露之后,检测所述全血中 mRNA 的量,其中,所述 mRNA 与所述癌症或者自体免疫紊乱相关,所述 mRNA 选自自由编码下列的 mRNA 所组成的组中:白介素-2、白介素-4、肿瘤坏死因子 α 、IgGFc 受体、Fas 配体、肿瘤坏死因子超家族成员 3 以及肿瘤坏死因子超家族成员 15;以及

基于检测结果鉴定所述饮食组分在所述哺乳动物中的潜在效率,其中, mRNA 量的变化与所述饮食组分的潜在效率相关,

检测未被暴露的全血中存在的所述 mRNA 的量,并通过将从未被暴露的全血中所检测到的所述 mRNA 的量与从被暴露的全血中所检测到的所述 mRNA 的量进行比较,以确定所述 mRNA 量的改变。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,该方法还包括:

在所述暴露之后,将所述全血暴露于刺激剂;以及

检测所述饮食组分的潜在效率,包括将从未被暴露的全血中获得的检测结果与在暴露于所述饮食组分和所述刺激剂之后所获得的检测结果进行比较。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,所述刺激剂选自自由植物凝集素、幅射和热聚 IgG 所组成的组中。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,在检测所述 mRNA 的量之前,将未被暴露的全血暴露于对照载体。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,所述对照载体是磷酸盐缓冲液或者二甲基亚砷。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,暴露全血包括加入肝素。

7. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,所述全血被刺激 5 个小时或者更少。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述全血被刺激 30 分钟至 4 个小时。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述饮食组分选自自由下列所组成的组中:维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖。

10. 一种检测选自自由维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌效率的方法,该方法包括:

将所述哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少;

检测所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码 IgG Fc 受体的 mRNA 的量;

将从所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较;以及

基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌效率,其中,所述 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

11. 一种检测选自自由维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌效率的方法,该方法包括:

将所述哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少；

使用幅射对所述哺乳动物被暴露的全血和未被暴露的全血进行刺激；

在所述刺激之后，检测所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码 PUMA 基因产物的 mRNA 的量；

将从所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较；以及

基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌效率，其中，所述 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

12. 一种检测选自维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率的方法，该方法包括：

将所述哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少；

使用植物凝集素对所述哺乳动物被暴露的全血和未被暴露的全血进行刺激；

在所述刺激之后，检测所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码选自白介素-2、白介素-4、肿瘤坏死因子 α 和 Fas 配体所组成组中的蛋白质的 mRNA 的量；

将从所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较；以及

基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率，其中，所述 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

13. 一种检测选自维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率的方法，该方法包括：

将所述哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少；

使用热聚 IgG 对所述哺乳动物被暴露的全血和未被暴露的全血进行刺激；

在所述刺激之后，检测所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码选自肿瘤坏死因子超家族 3 和肿瘤坏死因子超家族 15 所组成组中的基因产物的 mRNA 的量；

将从所述被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较；以及

基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率，其中，所述 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

全血中基因的体外表达作为评定对饮食补充物个体差异的模型

技术领域

[0001] 本发明涉及一种定制给药饮食组分例如补充物的方法。在该方法中,哺乳动物的全血被暴露于饮食组分。在暴露于饮食组分之后,在某些情况中是在进一步刺激被暴露的血细胞之后,检测与疾病状态相关的标记物 mRNA 在白细胞中的水平。通过将暴露之后的 mRNA 水平与未暴露的血细胞中所得到的数值进行比较,可以确定在哺乳动物中所述饮食组分将具有什么样的作用。通过对许多可能的饮食组分的哺乳动物血液筛选,可以开发出为具体的哺乳动物定制的最佳饮食组分,以治疗或者预防疾病状态。

背景技术

[0002] 已知饮食组分(补充物),例如维生素、多酚、姜黄等会在培养的细胞和动物中诱导各种生物学活性,这些活性中的一些已经被后续的临床研究所证实。这些活性中的一些也被认为对患者具有作用,其结果是各种疾病状态。例如,那些提高免疫系统组分活性的饮食组分可以被认为具有抵抗某些癌症的作用,而降低某些免疫系统组分活性的饮食组分可以在自体免疫疾病的情况下有疗效。然而,难以采用临床研究结果来为特定的个人设计个性化的饮食组分组合。如果在研究人群中同时存在应答者和无应答者,并且无应答者人群基本上大于应答者人群的话,则双盲临床试验将不再能够鉴定那些能够预期具有功效的饮食组分。而且,基因分型或者单核苷酸多态性分析仅仅可以在目的基因和热点已经被表征后用于饮食最佳化。所谓定制、个性化或者个体化的药物或者营养物的价值在科学团体和全体公众中都得到认识(参见 Jain, KK, " Personalized medicine, " Curr Opin Mol Ther 2002 ;4 :548-58)。然而,可以应用的技术仍然是有限的。

[0003] 各种报道已经显示饮食补充物的血液水平。期望将在已知标准血液水平上的各种饮食补充物的已知或者猜测作用与被考虑进行饮食治疗的哺乳动物的试剂个体结果进行比较。这将能够对来自其全血的哺乳动物白细胞中每种补充物的功效进行评定,其以设计哺乳动物的饮食或者饮食补充物组为目的。这些在白细胞中的作用将可以用于炎症、癌症免疫、自体免疫性疾病等。然而,还没有完成这些的有效方法,特别是在体外环境下没有。

发明内容

[0004] 本发明公开了为哺乳动物个体定制饮食组分例如补充物的方法,其基于在将哺乳动物的全血暴露于候选饮食组分之后检测白细胞中标记物 mRNA 的水平。

[0005] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种评定饮食组分在哺乳动物中抵抗癌症或者自体免疫紊乱的潜在效率的方法,该方法包括:将哺乳动物的全血暴露于饮食组分;在暴露之后,检测与癌症或者自体免疫紊乱相关的 mRNA 的量;以及基于检测结果鉴定所述饮食组分在所述哺乳动物中的潜在效率,其中 mRNA 量的变化与所述饮食组分的潜在效率相关。

[0006] 在更进一步的方面中,检测未被暴露的全血中所出现的 mRNA 的量,并通过将从未

被暴露的全血中所检测到的 mRNA 的量与从被暴露的全血中所检测到的 mRNA 的量进行比较来确定 mRNA 量的改变。

[0007] 在更进一步的方面中,所述方法还包括:在暴露之后,将所述全血暴露于刺激剂;以及评定饮食组分的潜在效率包括将从未被暴露的全血中获得的检测结果与在暴露于饮食组分和刺激剂之后所获得的检测结果进行比较。

[0008] 在更进一步的方面中,所述刺激剂选自自由植物凝集素、辐射 (radiation) 和热聚 (heat-aggregated) IgG 所组成的组中。

[0009] 在更进一步的方面中,在检测 mRNA 的量之前,将未被暴露的全血暴露于对照载体 (vehicle)。

[0010] 在更进一步的方面中,所述对照载体是磷酸盐缓冲液或者二甲基亚砷。

[0011] 在更进一步的方面中,暴露全血包括加入肝素。

[0012] 在更进一步的方面中,所述全血被刺激 5 个小时或者更少。

[0013] 在更进一步的方面中,所述全血被刺激 30 分钟至 4 个小时。

[0014] 在更进一步的方面中,所述 mRNA 选自自由编码下列的 mRNA 所组成的组中:白介素 -2、白介素 -4、肿瘤坏死因子 α 、IgG Fc 受体、p21、Fas 配体、肿瘤坏死因子超家族成员 3, 以及肿瘤坏死因子超家族成员 15。

[0015] 在更进一步的方面中,所述饮食组分选自自由下列所组成的组中:维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸 (g-linoleic acid)、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜 (aged garlic)、伞蕈 (Agaricus)、蜂胶、桑黄 (meshimakobu)、诺丽提取物 (noni extract)、烷氧基甘油和墨角藻聚糖。

[0016] 在本发明更进一步的实施方式中,提供了一种检测选自自由维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌效率的方法,其包括:将哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少;检测被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码 IgG Fc 受体的 mRNA 的量;将从被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较;以及基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌效率,其中 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

[0017] 在本发明更进一步的实施方式中,提供了一种检测选自自由维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌效率的方法,该方法包括:将哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少;使用辐射对哺乳动物被暴露的全血和未被暴露的全血进行刺激;在所述刺激之后,检测被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码 p21 或 PUMA 基因产物的 mRNA 的量;将从被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较;以及基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌效率,其中 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

[0018] 在本发明更进一步的实施方式中,提供了一种检测选自自由维生素 A、维生素 C、维生素 D、维生素 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、姜黄色素、栝精、老

蒜、伞蕈、蜂胶、桑黄、诺丽提取物、烷氧基甘油和墨角藻聚糖所组成组中的饮食组分在哺乳动物中潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率的方法,其包括:将哺乳动物的全血暴露于所述饮食组分持续 4 小时或者更少;使用植物凝集素对哺乳动物被暴露的全血和未被暴露的全血进行刺激;在所述刺激之后,检测被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中编码选自由白介素-2、白介素-4、肿瘤坏死因子 α 和 Fas 配体所组成组中的蛋白质的 mRNA 的量;将从被暴露的全血和未被暴露的全血的血细胞中所获得的检测结果进行比较;以及基于比较结果鉴定所述饮食组分的潜在抗癌或抗自体免疫紊乱效率,其中 mRNA 量的变化与所述饮食组分的效率相关。

附图说明

[0019] 图 1 表示在使用植物凝集素对全血进行刺激后,白细胞中 IL-2、IL-4 和 TNF- α mRNA 水平的检测结果;

[0020] 图 2 表示在将全血暴露于各种饮食组分后,白细胞中 CD32A mRNA 水平的检测结果;

[0021] 图 3 表示在将全血暴露于各种饮食组分和辐射刺激后,白细胞中 p21mRNA 水平的检测结果;

[0022] 图 4 表示在将全血暴露于各种饮食组分和植物凝集素刺激后,白细胞中 Fas 配体 mRNA 水平的检测结果;

[0023] 图 5 ~ 7 表示在将全血暴露于各种饮食组分和热聚 IgG 刺激后,肿瘤坏死因子超家族成员 3 和 15mRNA 水平的检测结果。

具体实施方式

[0024] 在本发明的实施方式中,评定个体对各种饮食组分例如饮食补充物的响应差异。“饮食组分”是指形成哺乳动物饮食部分的任何化合物或者物质,而“饮食补充物”表示那些有益的饮食组分例如维生素和天然提取物,其被用于补充哺乳动物的饮食。在体外将肝素化的人全血与每种饮食组分进行孵育,并通过对被暴露于饮食补充物的白细胞中以及没有被暴露的白细胞中与病症(例如癌症、自体免疫疾病等)相关的基因表达进行定量,评定暴露于饮食组分所诱导的基因表达的变化。在某些情况下,在对 mRNA 水平进行定量之前,使用刺激剂例如植物凝集素、辐射或热聚 IgG(“HAG”)对全血进行刺激。另外,对于某些饮食补充物,在对未被暴露的全血的 mRNA 水平进行定量之前,将所述血暴露于通常在其中溶解所述饮食补充物的载体。

[0025] 发现某些饮食组分会提高或者抑制基因表达;但是鉴定了个体与个体间的实质差异,这种差异是统计学上显著的。对于给定的个体,通过将该个体的全血暴露于特定的饮食组分所诱导的 mRNA 的变化,将与饮食组分在预防或者治疗与所述 mRNA 相关的病症中的潜在效率相关。正相关和负相关都是有可能的;正相关将表示所述饮食组分将有效的抵抗所述病症,而负相关将表示所述饮食组分在个体中将没有效果并且不应该被使用。mRNA 水平的提高或者降低都可以作为所述饮食组分抵抗病症的潜在效率的信号,这依赖于病症的特征以及被定量的 mRNA。例如,与免疫系统活性相关的 mRNA(例如白介素-2(T 细胞激活的标记物))水平的提高,可以与抗癌的潜在效率正相关,而相同 mRNA 水平的降低可以与抵抗自

体免疫疾病的效率正相关。从筛选个体血针对许多饮食组分获得的数据可以用于设计一种饮食,为治疗或者预防与所定量的 mRNA 相关的疾病,例如癌症,优选该饮食。

[0026] 这种方法在工业上可以用于发现未加工的天然产品中所包含的普遍活性组分。在健康保健领域,所述方法将在涉及个性化饮食治疗中提供新的可能性。

[0027] 根据本发明的实施例,将对本发明进行更详细的解释;然而,这些实施例不应该被解释为限制本发明。

[0028] 实施例 1

[0029] 为了尽可能接近地评定白细胞在生理病症中的功能,本发明方法的实施例采用全血,而没有分离具体的白细胞群。作为抗凝血剂,柠檬酸葡萄糖溶液和乙二胺四乙酸钙螯合剂,一种对于许多生物活性关键的组分(参见 Eggesbo 等人, " LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL, " Cytokine 1996;8:152-60),肝素被用作该实施例的抗凝血剂。因为 mRNA 转录是蛋白质合成和后续生物活性的上游事件,所以在本发明的实施例中采用 mRNA 水平作为与所述 mRNA 所编码的蛋白质相关的生物活性的指示。本发明的实施例采用一种定量 mRNA 的方法,其能够鉴定基因表达中小到 20%~40% 的变化(参见 Mitsuhashi M., " Absolute quantitation of mRNA in human blood leukocytes as a model for phenotypic gene expression-based diagnostics, " Clin Chem, 2006)。

[0030] 在该实施例中,以下面的方式对植物凝集素所诱导的白介素-2(IL-2)、白介素(IL-4)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的基因表达进行定量。将 50 μ L 肝素化的全血与各种饮食补充物孵育 30 分钟的时间。采用下面的补充物:维生素 A、维生素 C 和维生素 D、表没食子儿茶素没食子酸酯(来自绿茶)、金雀异黄素(来自大豆)和姜黄色素(来自姜黄(spice turmeric))。已知维生素 A 会刺激免疫系统。维生素 C 表现出提高 T 细胞的活性。维生素 D 表现出对某些癌症具有保护性效果。表没食子儿茶素没食子酸酯是效力强大的抗氧化剂,表现出能够降低癌细胞中所发现的多药抗性,并优选诱导瘤细胞的凋亡。在许多研究中已经发现金雀异黄素具有抗癌活性;其功能的可能机制包括增量调节凋亡,抑制血管生成、抑制 DNA 拓扑异构酶 II 和抑制蛋白质酪氨酸激酶。姜黄色素在瘤细胞中具有促进凋亡的作用,并且干扰通常在这些细胞中高度过表达的转录因子 NF- κ B 的活性。

[0031] 在与所述饮食补充物进行孵育之后,加入 100 μ g/mL 的植物凝集素(PHA),并在 37°C 下将孵育额外持续 2 个小时。每种饮食补充物的含量(参见表 I,注解)都比所报道的血液水平稍高。如下所描述的,接着纯化 mRNA,合成 cDNA,并如以下所述,通过 TaqMan 实时聚合酶链式反应(PCR)对 IL-2、IL-4 和 TNF- α 的水平进行定量(参见 Holland 等人, " Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, " Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7276-80)。

[0032] 从被暴露于饮食组分的全血以及保持未被暴露的全血中制备 mRNA 和 cDNA。简言之,将自制的 96 孔过滤板(filterplate)置于收集板之上,并应用 150 μ L 5mM Tris(pH 7.4)。接着在 4°C 下,以 120 $\times$ g 离心 1 分钟,将 50 μ L 血样应用到每个孔,并立即在 4°C 下 120 $\times$ g 离心 2 分钟,接着对每个孔使用 300 μ L 磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行清洗一次,并在

4℃下 2000×g 离心 5 分钟。接着,将 60 μL 裂解缓冲液贮液 (stock lysis buffer) 应用到过滤板,然后在 37℃下孵育 10 分钟,其中所述裂解缓冲液贮液含有例如 0.5% 月桂酰肌氨酸、4×SSC、10mM Tris HCl,7.4、1mM EDTA、0.1% IGEPAL CA-630 和 1.791M 硫氰酸胍,并被补充 1% 2- 巯基乙醇 (Bio Rad,Hercules,CA,USA)、0.5mg/mL 蛋白酶 K (Pierce,Rockford,IL,USA)、0.1mg/mL 鲑鱼精子 DNA (5 Prime Eppendorf/Brinkmann, Westbury, NY, USA)、0.1mg/mL 大肠杆菌 (*E. coli*) tRNA (Sigma)、10mmol/L 在表 2 中所示的每种特异性反向引物混合物 (cocktail) 以及标准的 RNA34 寡聚核苷酸。接着将过滤板置于固定寡聚 (dT) 的微孔板 (GenePlate, RNature) 上,并在 4℃下 2000×g 离心 5 分钟。在 4℃下存储过夜后,使用 100 μL 单纯 (plain) 裂解缓冲液对微孔板进行清洗 3 次,接着在 4℃下使用 150 μL 清洗缓冲液 (0.5M NaCl,10mM Tris(pH 7.4),1mM EDTA) 清洗 3 次。通过加入 30 μL 含有 1×RT- 缓冲液、1.25mM 每种 dNTP、4 单位 rRNasin 以及 80 单位 MMLV 反转录酶 (Promega) (不含引物) 的缓冲液并在 37℃下孵育 2 小时,在每个孔中直接合成 cDNA。特异性引物引导的 cDNA 存在于溶液中,寡聚 (dT)- 引导的 cDNA 保持固定在微孔板上。对于 TaqMan PCR,将所得到的 4 μL cDNA 直接转到 384 孔 PCR 板中,向其中应用 5 μL TaqMan 通用主体混合物 (master mix) (ABI) 以及 1 μL 寡聚核苷酸混合物 (正向和反向引物每种都为 15 μM 以及 3~6 μM TaqMan 探针),在 PRISM 7900HT (ABI) 中进行 PCR,其通过一个循环的 95℃下 10 分钟,接着 45 个循环的 95℃下 30 秒、55℃下 30 秒以及 60℃下 1 分钟。也可以采用 SYBR Green PCR;对于该 PCR,将 cDNA 在水中稀释 3~4 倍,并将 4 μL cDNA 溶液直接转移到 384 孔 PCR 板中,向其中应用 5 μL 主体混合物 (BioRad,Hercules,CA) 和 1 μL 寡聚核苷酸混合物 (正向和反向引物每种都为 15 μM),在 PRISM 7900HT (ABI) 中进行 PCR,其通过一个循环的 95℃下 10 分钟,接着 45 个循环的 95℃下 30 秒以及 60℃下 1 分钟。在单独的孔中扩增每一种基因。通过分析软件 (SDS, ABI) 确定 Ct。

[0033] 选择 IL-2、IL-4 和 TNF-α 分别作为 T- 细胞激活、IgE 级联反应 (可能的过敏反应) 激活和细胞毒性的标记物。为了进行精确的统计分析 (研究者的 t- 检验),使用 3 等份的全血作为起始材料。数据被表达为循环阈值 (Ct),其是产生一定量的 PCR 产物所需要的 PCR 循环数 (图 1),将使用 PHA 刺激的样品的 Ct 减去未刺激的样品的 Ct 所得到的 ΔCt,将使用饮食补充物处理的样品的 ΔCt 减去未处理的对照样品的 ΔCt 所得到的 ΔΔCt (表 I)。因为 Ct 是对数标度 (log scale) 的,因此 1 个 ΔCt 或者 ΔΔCt 意味着两倍量或一半量,负的 ΔCt 意味着表达的提高。

[0034] 图 1 表示全血中 PHA 诱导的基因表达。将 50 μL 肝素化的全血与各种浓度 (A) 或者 100 μg/mL (B) 的 PHA 在 37℃下孵育 2 小时 (A) 或各种时间长度,接着根据上面所描述的,对 IL-2 (■)、IL-4 (▲) 和 TNF α (◆) 的水平进行定量。每个数据都是来自三等份全血的平均 Ct ± 标准偏差,。

[0035] 正如图 1 所示,PHA 以剂量依赖的模式诱导 IL-2、IL-4 和 TNF-α mRNA 的表达,其 EC₅₀ 大约是 10~20 μg/mL (图 1A)。mRNA 的诱导是快速的,并在 30~60 分钟之后达到稳定水平 (plateau) (图 1B)。为了避免对 PHA 自身的次级作用,PHA 剂量和孵育时间被固定在最大水平 (100 μg/mL 和 120 分钟)。如表 I 所示,饮食补充物对每种 mRNA 的作用都表现出实质性的个体差异。因为使用 100 μg/mL PHA 的基因表达是过饱和的 (图 1A),因此低于 -0.65 ΔΔCt 的变化显著,具有统计学显著性。令人感兴趣的是,在所有 7 个实例中,绿

茶表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 都增强 PHA 所诱导的 IL-4 表达,但它的作用对 IL-2 和 TNF- α 的作用表现出个体差异 (表 I)。对于 IL-2 和 IL-3,7 个人表现出降低,1 个人表现出提高,3 个人没有变化 (表 I)。姜黄的姜黄色素 (Cur.) 在 2 个实例中显著地降低 IL-2、IL-4 和 TNF- α 的表达,但在其他 5 个人中没有变化 (表 I)。维生素 A、维生素 C 和维生素 D 除了 1-3 例外,全部都增强 IL-4 的表达 (表 I)。大豆金雀异黄素 (在表 I 中标记为“Gen”) 主要是没有活性的,但某些个体表现出显著的应答 (表 I)。

[0036] 表 I 饮食补充物在体外对有丝分裂素诱导的基因表达的作用

[0037]

mRNA	饮食补充物*	$\Delta \Delta Ct$ (平均值 $\pm$ 标准偏差, n=3) **						
		对象 1	对象 2	对象 3	对象 4	对象 5	对象 6	对象 7
IL-2	VA	-0.98$\pm$0.04	-1.61$\pm$0.32	0.49 $\pm$ 0.33	-0.29 $\pm$ 0.21	-1.16$\pm$0.02	-0.26 $\pm$ 0.20	-0.66$\pm$0.35
	VC	-0.18 $\pm$ 0.54	0.00 $\pm$ 0.60	<u>1.04$\pm$0.21</u>	<u>1.47$\pm$0.19</u>	-0.80$\pm$0.13	<u>1.02$\pm$0.05</u>	0.07 $\pm$ 0.27
	VD	-0.13 $\pm$ 0.07	0.06 $\pm$ 0.40	0.00 $\pm$ 0.15	-0.31 $\pm$ 0.30	-0.45 $\pm$ 0.61	-0.55 $\pm$ 0.14	-0.86$\pm$0.12
	EGCG	-0.1 $\pm$ 0.02	-0.67 $\pm$ 0.48	<u>1.32$\pm$0.54</u>	<u>0.81$\pm$0.11</u>	-0.99$\pm$0.33	<u>1.1$\pm$0.14</u>	-0.41 $\pm$ 0.29
	Gen.	-0.41 $\pm$ 0.53	<u>0.90$\pm$0.44</u>	0.11 $\pm$ 0.23	0.08 $\pm$ 0.04	-0.02 $\pm$ 1.03	0.00 $\pm$ 0.27	-0.28 $\pm$ 0.20
	Cur.	<u>1.47$\pm$0.59</u>	<u>2.51$\pm$0.23</u>	0.31 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.27	0.03 $\pm$ 0.20	0.01 $\pm$ 0.14	-0.01 $\pm$ 0.21
IL-4	VA	-2.14$\pm$0.08	-1.56$\pm$0.34	-0.15 $\pm$ 0.40	-0.98$\pm$0.41	-1.24$\pm$0.13	-0.65 $\pm$ 0.09	-1.15$\pm$0.39
	VC	-2.20$\pm$0.72	-0.86$\pm$0.62	-0.77$\pm$0.40	-0.43 $\pm$ 0.17	-1.22$\pm$0.17	-0.77$\pm$0.09	-1.30$\pm$0.22
	VD	-0.17 $\pm$ 1.0	0.06 $\pm$ 0.15	-0.77$\pm$0.40	-0.43 $\pm$ 0.17	-1.22$\pm$0.17	-0.77$\pm$0.09	-1.30$\pm$0.22
	EGCG	-1.83$\pm$0.20	-1.56$\pm$0.46	-0.82$\pm$0.34	0.92$\pm$0.25	-1.37$\pm$0.3	-0.9$\pm$0.01	-1.47$\pm$0.41
	Gen.	-1.83$\pm$0.20	-1.56$\pm$0.46	-0.82$\pm$0.34	-1.04$\pm$0.16	-0.45 $\pm$ 0.34	-0.34 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.25
	Cur.	<u>1.27$\pm$0.78</u>	<u>3.09$\pm$0.15</u>	-0.01 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.27	0.00 $\pm$ 0.20	0.10 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.26
TNF α	VA	-1.56$\pm$0.11	-0.57$\pm$0.94	0.51 $\pm$ 0.03	-0.08 $\pm$ 0.29	-0.76$\pm$0.34	-0.50 $\pm$ 0.10	-1.11$\pm$0.24
	VC	-1.82$\pm$0.65	0.10 $\pm$ 1.14	-0.04 $\pm$ 0.27	0.09 $\pm$ 0.16	-1.21$\pm$0.14	-0.48 $\pm$ 0.04	-0.40 $\pm$ 0.15
	VD	-0.25 $\pm$ 1.47	0.14 $\pm$ 0.40	-0.04 $\pm$ 0.27	0.09 $\pm$ 0.16	-1.21$\pm$0.14	-0.48 $\pm$ 0.04	-0.40 $\pm$ 0.15
	EGCG	-1.14$\pm$0.32	-0.63 $\pm$ 0.66	0.33 $\pm$ 0.62	-0.16 $\pm$ 0.12	-1.22$\pm$0.29	-0.66$\pm$0.14	-0.94$\pm$0.46
	Gen.	-1.14$\pm$0.32	-1.01$\pm$0.04	0.33 $\pm$ 0.62	-0.16 $\pm$ 0.12	-0.32 $\pm$ 0.54	-0.02 $\pm$ 0.20	-0.17 $\pm$ 0.
	Cur.	<u>3.52$\pm$1.84</u>	<u>3.64$\pm$2.26</u>	0.83 $\pm$ 0.60	0.45 $\pm$ 0.15	0.13 $\pm$ 0.17	0.07 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.21

[0038] *VA :维生素 A (终浓度 = 100nM), VC :维生素 C (10 μ g/mL), VD :维生素 D (100nM), EGCG :表没食子儿茶素没食子酸酯 (绿茶) (10 μ M), Gen :金雀异黄素 (大豆) (2 μ M), Cur. :

姜黄色素 (姜黄 (turmeric)) (200nm)。

[0039] ** 黑体 :显著增强 ;下划线斜体 :显著抑制

[0040] 表 2 基因引物序列

[0041]

mRNA	TAQMAN 探针	正向引物	反向引物
IL-2	CTGATGAGAC AGCAACCATT GTAGAATTTTC TGAA	GAAGTAAAGG ATCTGAAAC AACATTC	TGTTGAGATG ATGCTTTGAC AAAA
IL-4	CGATTCCTGAA ACGGCTCGACAGG	CACAGGCACAAGCAGCTGAT	CCTTCACAGG ACAGGAATTC AAG
TNF- α	ACTTTGCCGA GTCTGGGCAGG	TCAATCGGCCCGACTATCTC	CAGGGCAATG ATCCCAAAGT
CD32A	CTGAACCCCA GGGCACCTAC TGACG	GCTGACGGCG GCTACATG	GAGGAAGAGT CAGGTAGATG TTTTATCA
p21	CCACTCCAAA CGCCGGCTGATC	TTCTGCTGTCTCTCCTCAGATTCT	GGATTAGGGC TTCCTCTTGG A
PUMA	CCCCGCCCA TCAATCCCA	GGGCCAGACTGTGAATCCT	ACGTGCTCTC TCTAAACCTA TGCA
FasL	FAM-CTGAGCCATC GGTGAACTA ACAGATAAGC A- TAMRA	TGGCAGCATC TTCATTCTA AATG	GAAATGAGTC CCCAAAACAT CTCT
TNFSF3		AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA	CACGGCCCCAAAGAAGGT
TNFSF15		TGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT	CCATTAGCTTGTCCCCTTCTTG
RNA34	CCAAGGCCCA GCCCTCACAC A	AGCCCCCTCACTCCCAA	GGGTGCTGTGCTTCTGTGAAC

[0042] 实施例 2

[0043] 在本发明的方法的该实施例中,在个体的白细胞中评定 CD32AmRNA 的表达。这种 mRNA 编码 IgG Fc 受体,并涉及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。提高 CD32A mRNA 水平的饮食组分将被预计能够推动个体的 ADCC 活性,并因此提供直接的抗癌活性。可选择地,这些饮食组分能够增强最近开发的昂贵的基于单克隆抗体的治疗 (例如曲妥单抗 (trastuzumab) (Herceptin) 或者利妥昔单抗 (rituximab) (Rituxan)) 的效率,其通过同时提高循环的白细胞中的 IgG Fc 受体 mRNA 水平。这里所描述的方法可以用于检测 CD32A mRNA 水平,除了未采用刺激剂如植物凝集素以外。它们的引物序列被表示在上面的表 2 中。

[0044] 所采用的饮食补充物是:维生素 A ("VA";100nmol/L,终浓度)、维生素 C ("VC",10mg/mL)、维生素 D ("VD",100nmol/L)、维生素 E ("VE";1IU/mL)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (从绿茶获得的卡瑟森 (catechin) 多酚) ("EGC" 或 "卡瑟森 (catechin)" ;10mmol/L)、 γ -亚油酸 (植物油中的多不饱和脂肪酸) ("rLA";1mg/mL)、金雀异黄素 (大豆) ("Gen";2mmol/L)、姜黄色素 ("Cur";姜黄 (spice turmeric)) (200nmol/L)、栲精 ("Que";植物色素类黄酮) (100nmol/L)、老蒜 (Kyolic ("Kyo"),全长)、落叶松茸 ("Aga";Kyowa,全长)、蜂胶 ("Pro";1:10 稀释)、桑黄 ("Mesh")、诺丽提取物 (noniextract) ("Noni") 以及鲨鱼肝油 ("Alk";烷氧基甘油) (剂量未确认)。所有这些饮食组分都被报道对免疫系统或者癌症有作用,或者对两者都有作用。除了上面实施例 1 中所讨论的饮食组分外,已知维生素 E 对免疫吞噬作用有强大的作用,并对动物特别是在压力下在降低对感染的易感性方面已经表现出有益。缺乏 γ -亚油酸会导致

免疫系统的缺陷；其是产生支持免疫的前列腺素的中间产物。栲精已经表现出推动大鼠中自然杀伤细胞的活性，并抑制肥大细胞、嗜碱粒细胞和嗜中性白细胞的脱粒。老蒜提取物已经被用作免疫系统推进剂几十年。蕈蘑菇 (*Agaricus mushrooms*) 例如姬松茸 (*Agaricus blazei*) 的提取物已经表现出具有抗肿瘤作用。蜂胶，一种从蜂房 (bee hive) 获得的抗生素，其含有咖啡酸苯乙酯，其在动物模型中已经表现出防止癌形成。蜂胶通过提高凋亡过程抑制癌细胞的生长。桑黄 (*Phellinus linteus*) 是重要的药用蘑菇，其含有抗肿瘤的 β -葡聚糖；其水提取物已经表现出抑制肿瘤的增殖。诺丽提取物是从印度桑树 (*Morinda citrifolia*) 的果实获得的，其含有被称作 noni-ppt 的富含多糖的物质，其已经表现出显著延长患有肺部肿瘤的老鼠的存活持续时间。例如在鲨鱼肝油中所发现的烷氧基甘油已经被采用为抗癌治疗剂和免疫增强剂。可以被采用的其他饮食组分是墨角藻聚糖，其是从海藻获得的，并且已经表现出抑制肿瘤细胞入侵和提高免疫系统组分水平。在该实施例中，采用磷酸缓冲液作为对照。

[0045] 孵育是在 37°C 下进行 3 个小时。接着对 CD32AmRNA 进行定量，图 2 表示了这些结果。空心圆表示 $p < 0.05$ 。每个符号都是平均值 $\pm$ S. D.，其中 S. D. 来自三等份 50mL 的肝素化全血。大豆金雀异黄素的血浆浓度被报道在单次食用大豆之后 8 小时为 4mmol/L。因此，在全血中与 2mmol/L 大豆金雀异黄素进行 3 小时孵育是合理可以达到的。

[0046] 在该个体中的结果表示饮食组分维生素 D 和 E、表没食子儿茶素没食子酸酯、 γ -亚油酸、金雀异黄素、蜂胶和诺丽提取物将适合在该个体中用于被优化为抗癌活性的饮食中。

[0047] 实施例 3

[0048] 在该实施例中，四个个体的肝素化全血与各种饮食补充物在 37°C 下预孵育 1 ~ 2 个小时（与实施例 2 中相同的血浓度），接着使用 1Gy 幅射进行刺激。然后将血在 37°C 下孵育 2 个小时。接着使用实施例 1 中所描述的方法对 p21mRNA 的水平进行评定。表 2 中提供了这些引物的序列。选择 p21 mRNA 作为凋亡标记物，其能够指示每种饮食组分对 DNA 损伤响应的作用。作为 p21 的替代，可以对 PUMA (p53 增量调节的凋亡调控因子) mRNA 进行定量。

[0049] 结果表示在图 3 中。在该图中，空心圆表示没有进行幅射刺激而得到的数值，而实心圆表示使用幅射所得到的数值。每个符号都是平均值 $\pm$ S. D.，其中 S. D. 来自三等份 50mL 的肝素化全血。

[0050] 正如在图中所表示的，个体对饮食组分的响应大不相同。这些结果可以用于设计个体的饮食，其被优化用于通过促进癌细胞中的凋亡治疗或者预防癌症。

[0051] 实施例 4

[0052] 在该实施例中，两个个体的肝素化全血与各种饮食补充物在 37°C 下预孵育 1 ~ 2 个小时（与实施例 2 中相同的血浓度），接着使用植物凝集素进行刺激。接着，将血在 37°C 下孵育 2 个小时。接着使用实施例 1 中所描述的方法对 Fas 配体 (FasL) mRNA 的水平进行评定。表 2 中提供了这些引物的序列。选择 Fas 配体 mRNA 作为凋亡标记物，其能够指示每种饮食组分对促进凋亡的作用。

[0053] 结果表示在图 4 中。在该图中，实心符号表示与对照没有显著区别的数值，交叉阴影的符号表示代表与对照数值比显著提高的数值 ($p < 0.05$)，空心符号表示与对照数值比

显著降低的数值 ($p < 0.05$)。每个符号都是平均值 $\pm$ S. D., 其中 S. D. 来自三等份 50mL 的肝素化全血。

[0054] 如图 4 所示, 对所述饮食组分的个体响应相当不同。这些结果可以用于设计个体的饮食, 其被优化用于通过促进瘤细胞中的凋亡治疗或者预防癌症。

[0055] 实施例 5

[0056] 在该实施例中, 两个个体的肝素化全血与各种饮食组分在 37°C 下预孵育 30 分钟 (与实施例 2 中相同的血浓度), 接着使用 $1.2\ \mu\text{L}$ 热聚 IgG 进行刺激。热聚 IgG (HAG) 是通过在 PBS 中在 63°C 下对 20mg/mL 人 IgG (Sigma, St. Louis) 加热 15 分钟制备的 (参见 Ostreiko 等人, *Immunol Lett.* 15, 311 (1987), 这里作为参考加以引入)。接着, 将血在 37°C 下孵育 2 个小时。接着除了使用 SYBR Green PCR 定量 mRNA 外, 使用实施例 1 中所描述的方法对 TNFSF3 和 TNFSF15 mRNA 的水平进行评定。TNFSF3 也被认为是淋巴毒素- α (LT- α)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β) 和淋巴毒素- β (LT- β)。分泌的 LT- α 装配成可溶的同源三聚体, LT- α_3 。所分泌的 LT- α 也会与膜连接 (membrane-associated) 的 LT- β 形成复合体以产生两类异源三聚体, LT- α_1/β 和 LT- α_2/β_1 。TNFSF3 是由激活的初生 (naive) CD4 细胞、非极化分泌 IL-2 的效应细胞和 Th1 效应细胞所表达的, 并且 TNFSF3 受体是由许多肿瘤细胞所表达的。TNFSF15 也被称作 TL1A, 其是属于 TNF 超家族的 II 型跨膜蛋白。TNFSF15 主要在内皮细胞中表达, 其表达由 TNF- α 和 IL-1 α 所诱导。TNFSF15 以高亲和力与死亡受体 3 (DR3) 结合, 其目前被称作 TNF 受体超家族成员 25 (TNFRSF25)。根据细胞环境, DR3 通过 TNFSF15 的连接能够激发两条信号通路之一: 转录因子 NF- κ B 的激活, 或者天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 和凋亡的激活。

[0057] 上面的表 2 中提供了这些引物的序列。这些 mRNA 被选择为凋亡标记物, 其能够指示每种饮食组分对免疫系统活性和凋亡响应的作用。

[0058] 这些结果被表示在图 5、图 6 和图 7 中。在图 5 中, 空心圆表示使用 PBS 作为对照从实例 1 获得的 TNFSF3 值, 而实心圆表示在使用 HAG 刺激时所获得的 TNFSF3 值。而且, 灰色阴影的圆表示 HAG 诱导 TNFSF3 在被暴露于栲精的血中表达。因为 TNFSF3 受体在某些癌细胞上表达, 因此该基因表达的提高可以提高这些细胞的凋亡, 因此栲精可以是在对个体具有抗癌性能的饮食中所包含的良好候选。空心的三角和实心的三角表示来自实例 2 的相同数值。图 5 中的 Y-轴数值表示循环阈值 (Ct)。每个符号都是平均值 $\pm$ S. D., 其中 S. D. 来自三等份 50mL 的肝素化全血。图 6 和图 7 表示在两个实例中对 TNFSF15 的定量结果 (图 6), 以及在另外 5 个实例中仅给药维生素 A 的结果 (图 7)。正如可以从图 6 中看出的, 维生素 A 在一个实例中 (实例 1) 降低了 TNFSF-15 表达的基线, 并消除了对 HAG 的作用。在图 7 中所表示的重复 (follow-up) 数据中, 维生素 A 在实例 1 中以及在总共 7 个实例的两个中 (两幅图中都有实例 1), 对 HAG-所诱导的 TNFSF15 的表达表现出抑制作用。在诸如实例 1 的实例中, 维生素 A 可以用于治疗或者预防免疫系统被不适当地激活的病症例如自体免疫疾病。

[0059] 在上面所描述的实施例中, 采用已经确定血液水平的饮食补充物。然而, 在该方法的其他实施方式中, 各种天然产物的粗提取物都可以被筛选以鉴定活性组分。通过选择适当的 mRNA 目标, 可以完成各种功能。选择对通过进行定量以鉴定饮食组分对特定病症的潜在效率的适当 mRNA, 是本领域技术人员的能力范围内的。这些结果证明体外的生理基因

表达分析是用于鉴定饮食补充物在个体中效率的适当方法。负响应即使在高浓度的饮食补充物的情况下也能够揭示这些人不太可能预计白细胞功能被所测试的饮食补充物在采血时达到期望的放大或者抑制。尽管该研究采用了具体的饮食补充物,但是该方法能够相同地应用于其他饮食组分例如具体的食物。

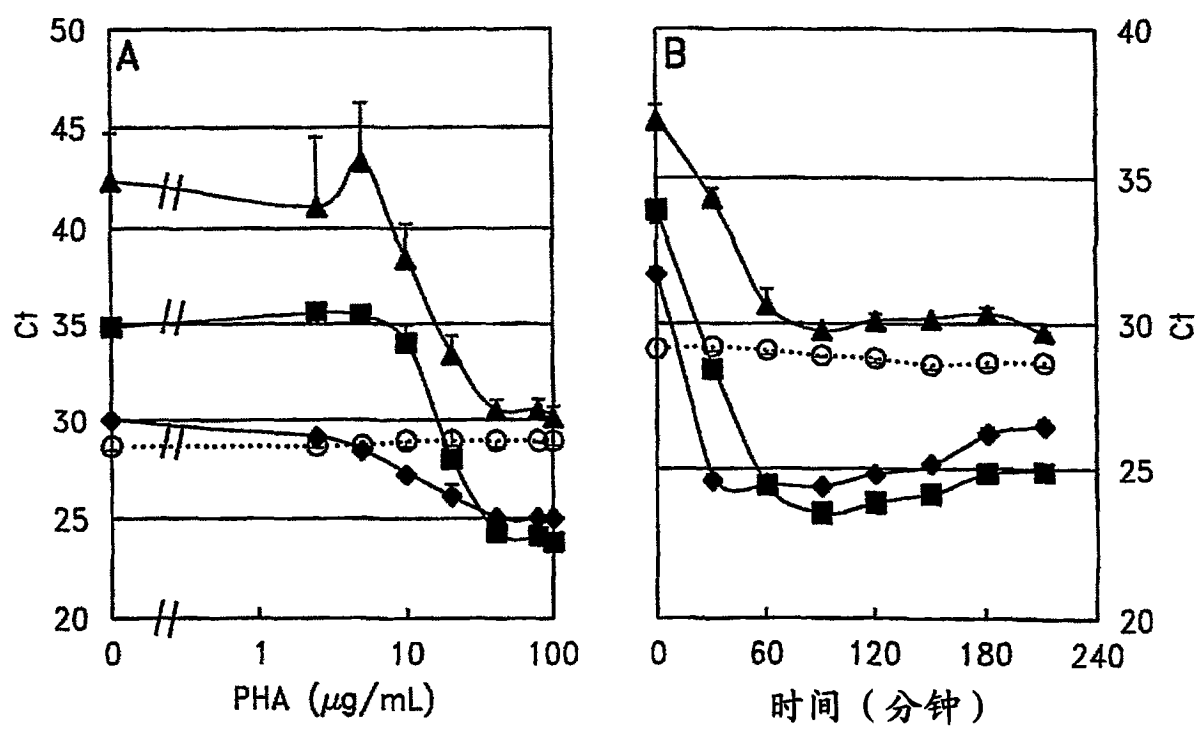


图 1

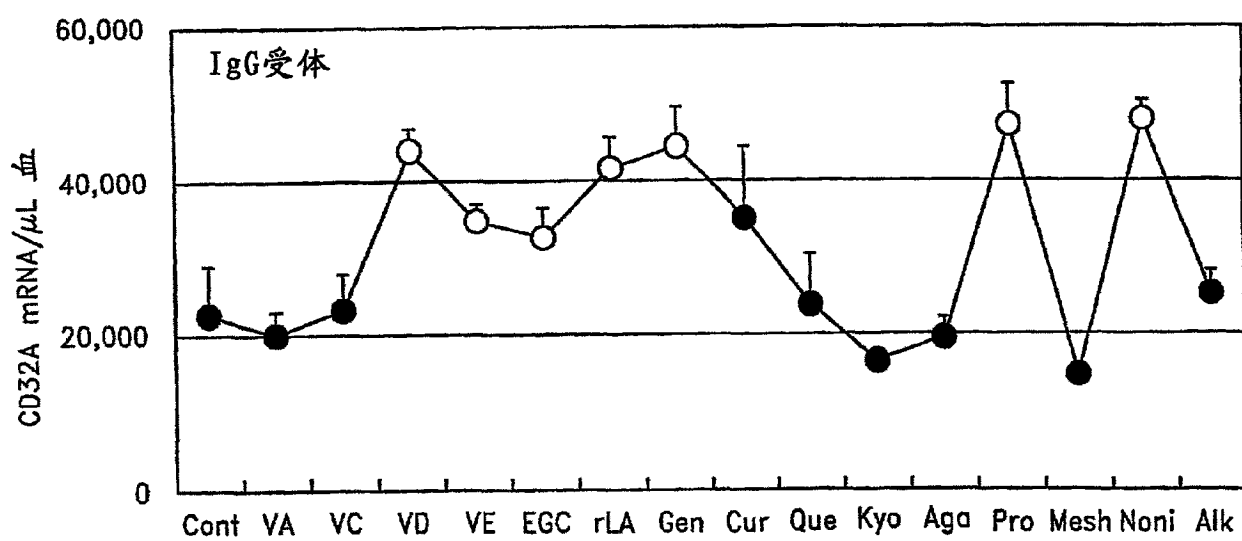
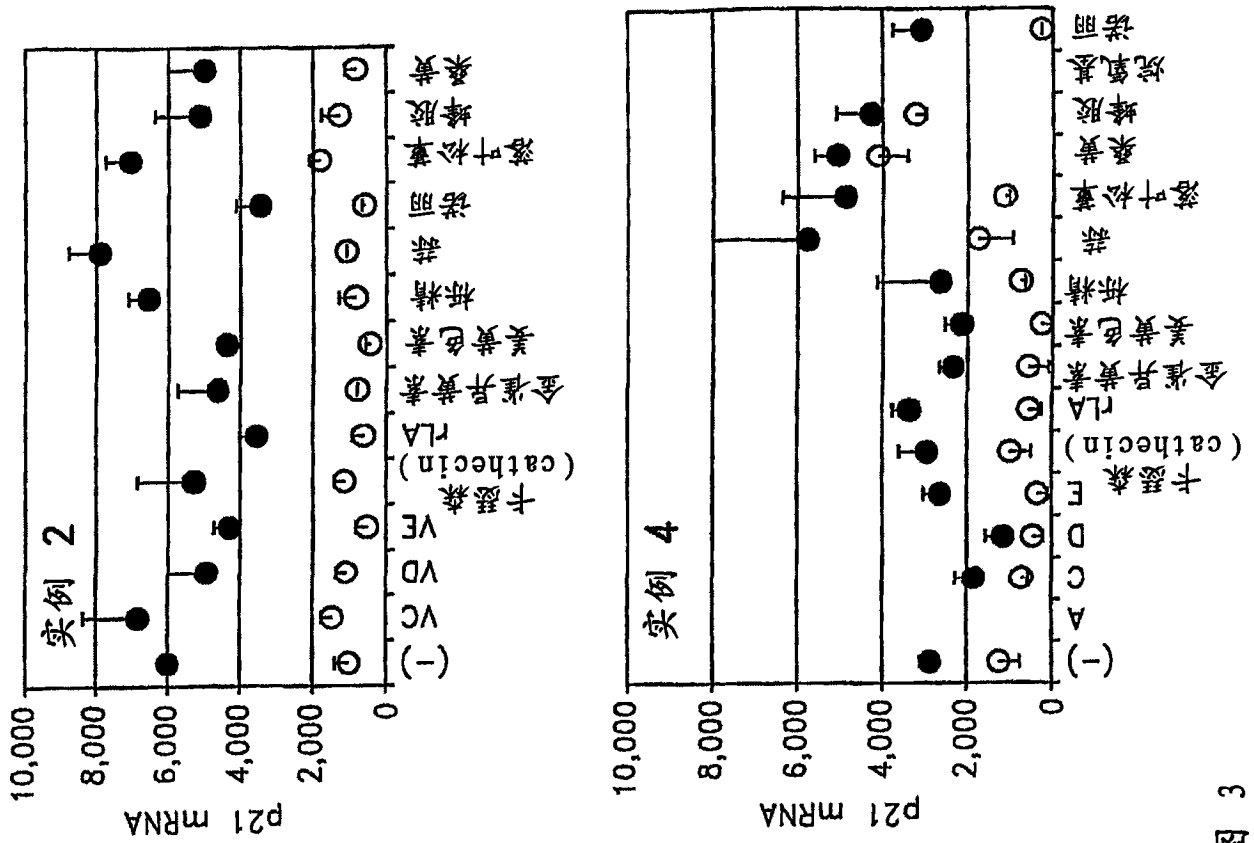


图 2

图 3



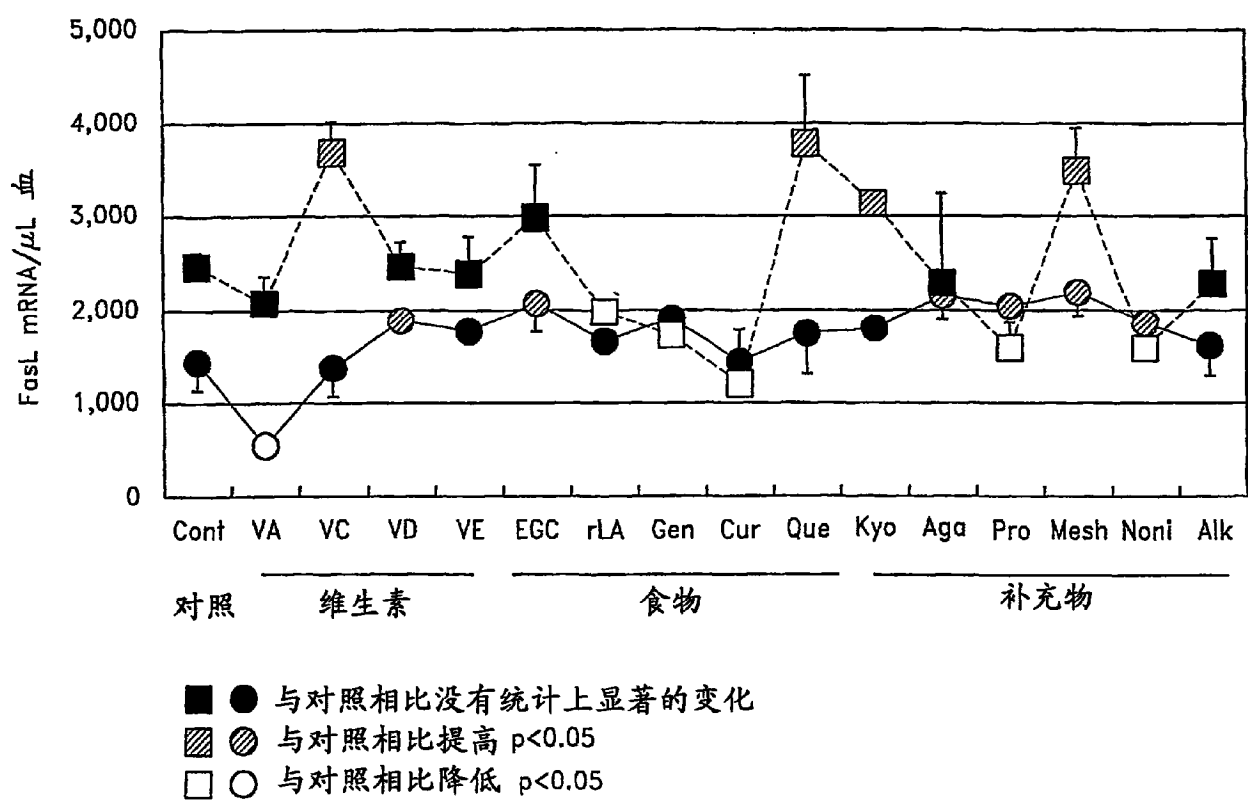


图 4

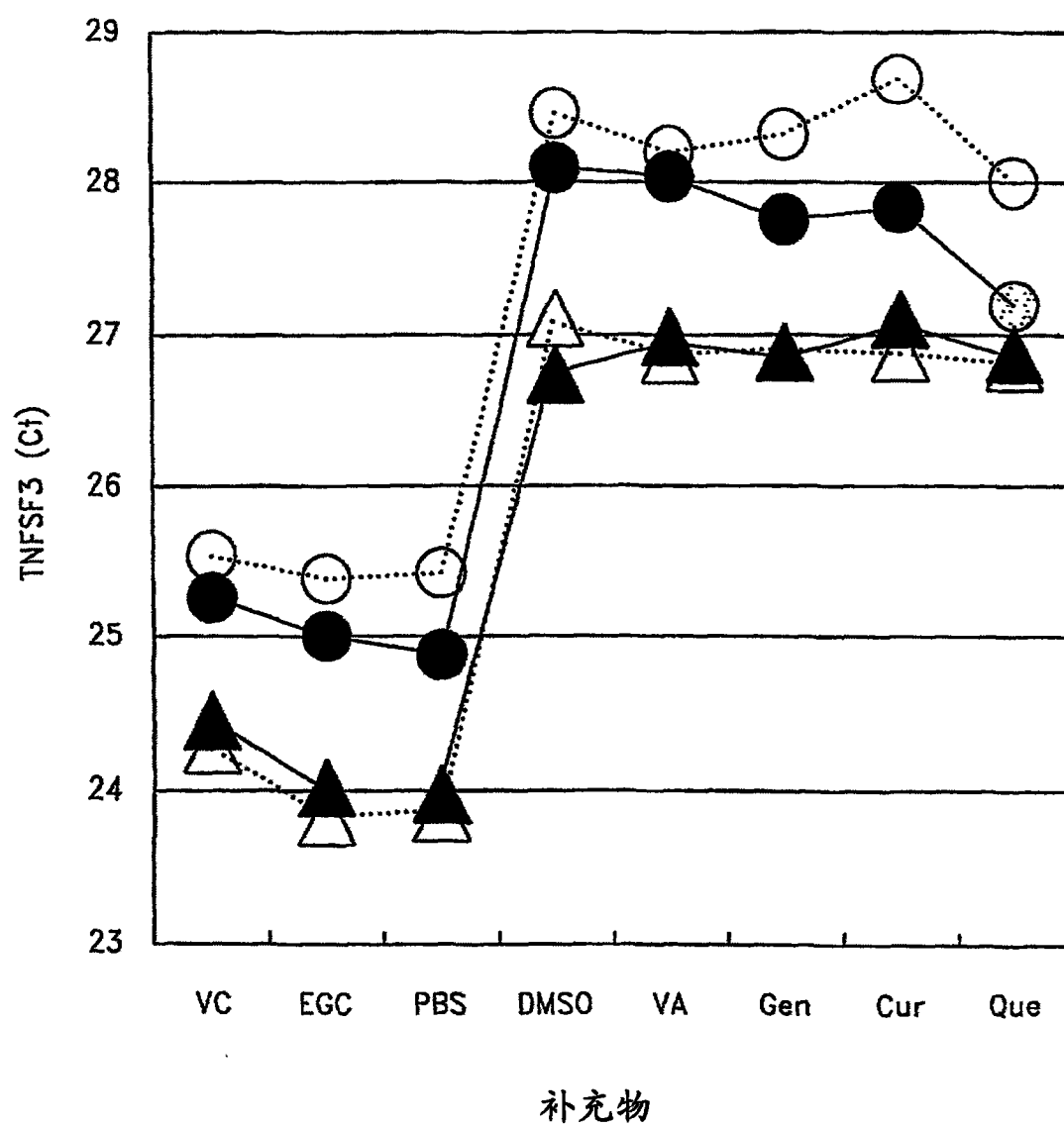


图 5

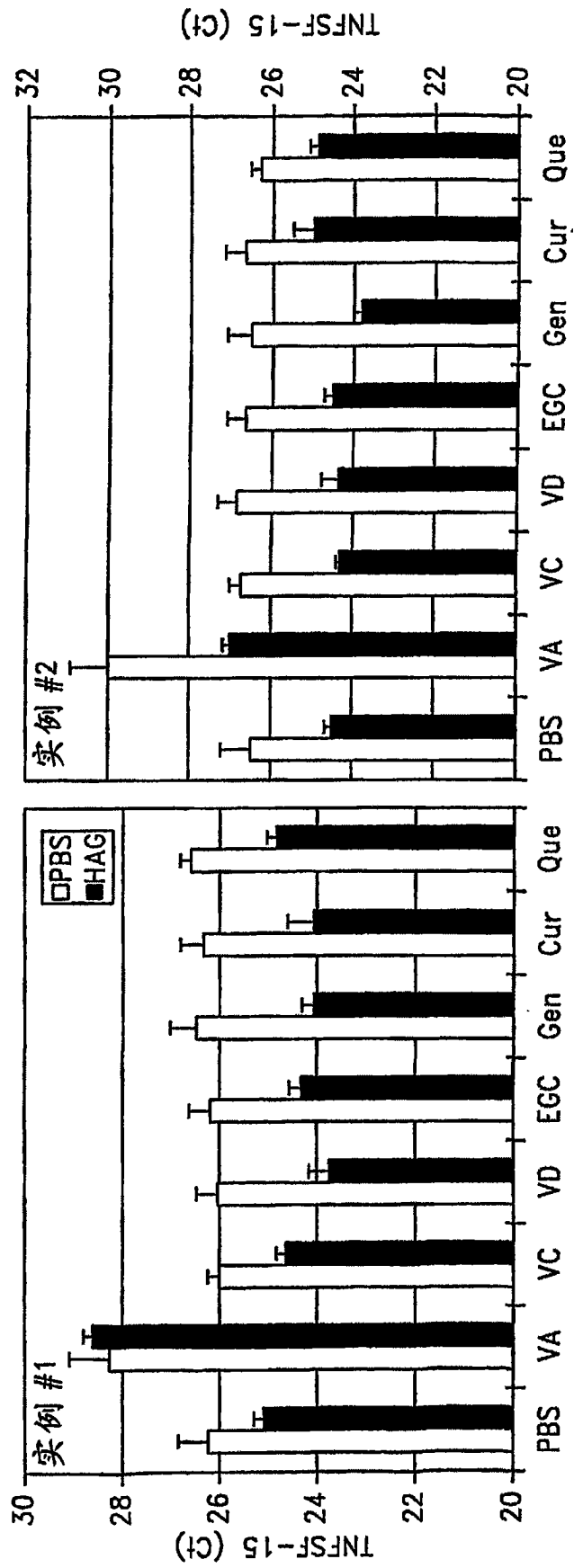


图 6

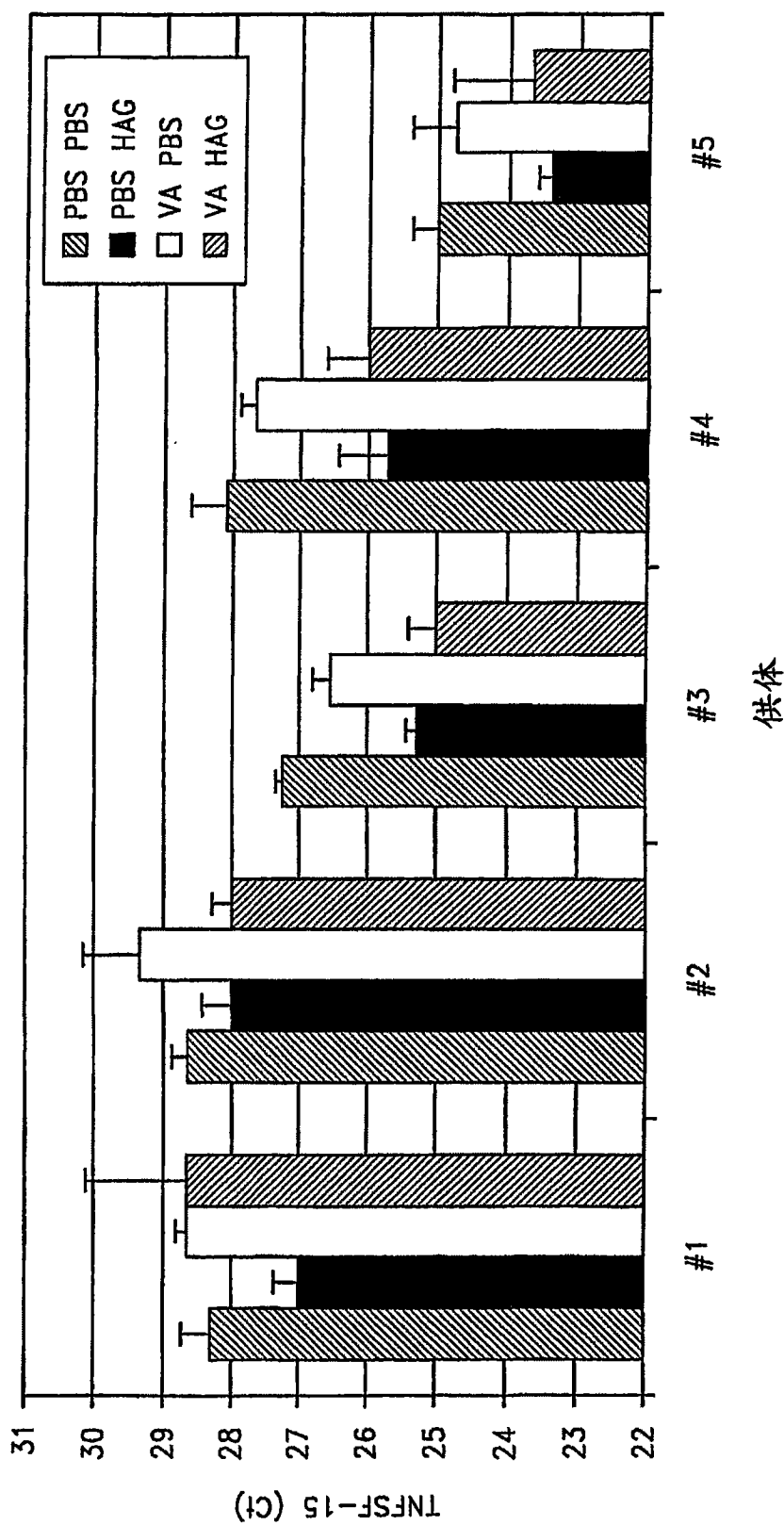


图 7