



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103153320 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201180035847.8

A61K 36/82(2006.01)

(22)申请日 2011.05.24

A61K 36/258(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 9/20(2006.01)

申请公布号 CN 103153320 A

A61K 9/48(2006.01)

(43)申请公布日 2013.06.12

A61K 9/16(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/347,789 2010.05.24 US

(56)对比文件

CN 1355048 A, 2002.06.26,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

CN 1286051 A, 2001.03.07,

2013.01.22

CN 101142956 A, 2008.03.19,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/037797 2011.05.24

郭长江等. 水果对衰老机体抗氧化防御体系功能的干预研究.《中国营养学会第九次全国营养学术会议项目总结论文集》.2004,摘要、第65页“3.6结论”部分、第67页“4.5结论”部分.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/149981 EN 2011.12.01

李宗信等. 中药单味药及其有效成分抗氧化自由基的动物实验及临床研究.《河北中医药学报》.2002,第17卷(第4期),第23-28页.

(73)专利权人 NSE产品公司

地址 美国犹他州

佚名. 食水果抗衰老.《北方园艺》.2009,(第1期),第74-76页.

(72)发明人 A·玛斯塔喀迪斯 S·伍德

R·温德鲁奇 T·A·保罗拉

J·L·巴杰 M·巴特利特

S·B·弗格森 J·昌

刘芝兰. 自由基与衰老及延缓衰老药物干预.《临床心身疾病杂志》.2005,第11卷(第2期),第192-193页.

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

詹锦岳. 浅谈延缓衰老的中药及药理.《时珍国医国药》.2000,第11卷(第2期),第111页.

代理人 赵蓉民 刘明

审查员 童欣

(51)Int.Cl.

A61K 36/185(2006.01)

权利要求书3页 说明书14页 附图5页

(54)发明名称

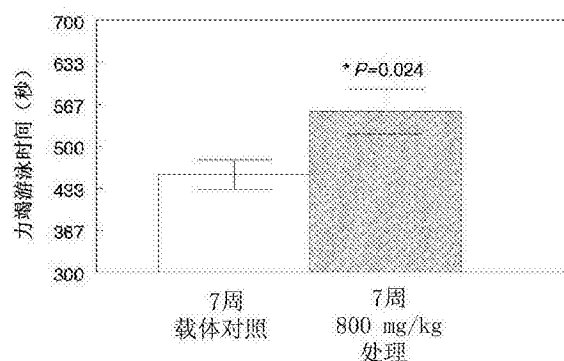
用于抵抗衰老作用的口服制剂

(57)摘要

如本文所述的口服制剂可以包含石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草,其中每一种在被施用给对象时均以有效抵抗和/或防止对象中衰老作用的量存在。衰老作用可以包括基因表达中年龄相关的变化。

力竭游泳试验

对照对处理



1.口服制剂,其包括6.5wt%至8.0wt%的石榴提取物、3.5wt%至5.0wt%的人参提取物和83.0wt%至89wt%的冬虫夏草(*c.sinensis*),其中所述石榴提取物包括至少85wt%石榴多酚,并且所述人参提取物包括3:1到5:1比率的人参皂苷Rb1和人参皂苷Rg1。

2.权利要求1所述的口服制剂,其中所述冬虫夏草包括选自蝙蝠蛾拟青霉(*p.hepialid*)和中国被毛孢(*h.sinensis*)的至少一种菌株。

3.权利要求1所述的口服制剂,还包括选自以下的至少一种添加剂:树胶、防结块剂、卵磷脂、微晶纤维素、硅胶和调味剂。

4.权利要求1所述的口服制剂,还包括选自以下的至少一种另外的活性剂:北五味子提取物、全葡萄提取物、辅酶Q<sub>10</sub>、红景天提取物、酸樱桃提取物和L-肉碱酒石酸盐。

5.权利要求1所述的口服制剂,其以选自以下的剂型存在:胶囊、片剂、粉剂、饮料、薄片、糖果剂、咀嚼剂、凝胶、糊剂、酏剂、糖浆、滴剂和锭剂。

6.权利要求1所述的口服制剂,其是包含140mg至200mg石榴提取物、70mg至130mg人参提取物和1800mg至2200mg冬虫夏草的剂型。

7.权利要求1所述的口服制剂,其中所述制剂有效抵抗能量代谢下降。

8.权利要求1所述的口服制剂,其中所述制剂有效抵抗性性能下降。

9.权利要求1所述的口服制剂,其中所述制剂有效抵抗基因表达中年龄相关的变化。

10.权利要求9所述的口服制剂,其中所述基因表达是针对衰老的生物标记。

11.权利要求9所述的口服制剂,其中所述基因表达发生在肌肉组织中。

12.权利要求9所述的口服制剂,其中所述基因表达发生在脑组织中。

13.权利要求1所述的口服制剂,其中所述制剂以等于或大于相同对象中热量限制的程度有效抵抗对象的基因表达中年龄相关的变化。

14.口服制剂,其包括:

石榴提取物,3wt%至20wt%;

冬虫夏草,50wt%至95wt%;和

人参提取物,1wt%至20wt%,

其中所述石榴提取物包括至少85wt%石榴多酚,并且所述人参提取物包括3:1到5:1比率的人参皂苷Rb1和人参皂苷Rg1。

15.权利要求14所述的口服制剂,其中所述石榴提取物以6.5wt%至8.0wt%存在、人参提取物以3.5wt%至5.0wt%存在和冬虫夏草以83.0wt%至89wt%存在。

16.权利要求14所述的口服制剂,其中所述口服制剂在被施用给对象时抵抗所述对象中的衰老作用。

17.权利要求16所述的口服制剂,其中所述作用是能量代谢下降。

18.权利要求16所述的口服制剂,其中所述作用是性性能下降。

19.权利要求16所述的口服制剂,其中所述作用包括基因表达中年龄相关的变化。

20.权利要求19所述的口服制剂,其中所述基因表达是针对衰老的生物标记。

21.权利要求19所述的口服制剂,其中所述基因表达发生在肌肉组织中。

22.权利要求19所述的口服制剂,其中所述基因表达发生在脑组织中。

23.权利要求16所述的口服制剂,其中所述制剂以等于或大于相同对象中热量限制的程度抵抗所述对象中的所述作用。

24. 权利要求15所述的口服制剂,其中,所述口服制剂的量以比相等量的石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草中的任意一种更大的程度抵抗对象的人骨骼肌细胞中对基因表达的衰老作用。

25. 权利要求14所述的口服制剂,其中所述冬虫夏草包括选自蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢的至少一种菌株。

26. 权利要求14所述的口服制剂,还包括选自以下的至少一种添加剂:树胶、防结块剂、卵磷脂、微晶纤维素、硅胶和调味剂。

27. 权利要求14所述的口服制剂,还包括选自以下的至少一种另外的活性剂:北五味子提取物、全葡萄提取物、辅酶Q<sub>10</sub>、红景天提取物、酸樱桃提取物和L-肉碱酒石酸盐。

28. 权利要求14所述的口服制剂,其以选自以下的剂型存在:胶囊、片剂、粉剂、饮料、薄片、糖果剂、咀嚼剂、凝胶、糊剂、酏剂、糖浆、滴剂和锭剂。

29. 包括含有至少85wt%石榴多酚的3wt%至20wt%的石榴提取物、含有3:1到5:1比率的人参皂苷Rb1和人参皂苷Rg1的1wt%至20wt%的人参提取物和50wt%至95wt%的冬虫夏草的口服制剂在制备用于抵抗对象中衰老作用的药物中的应用,其中所述制剂以包括0.15mg/kg至30.0mg/kg的石榴提取物、0.35mg/kg至15mg/kg的人参提取物和15.0mg/kg至150.0mg/kg的冬虫夏草的日剂量向所述对象施用。

30. 权利要求29所述的应用,其中所述石榴提取物以6.5wt%至8.0wt%存在、人参提取物以3.5wt%至5.0wt%存在和冬虫夏草以83.0wt%至89wt%存在。

31. 权利要求29所述的应用,其中所述对象是人。

32. 权利要求29所述的应用,其中所述冬虫夏草包括选自蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢的至少一种菌株。

33. 权利要求29所述的应用,还包括选自以下的至少一种添加剂:树胶、防结块剂、卵磷脂、微晶纤维素、硅胶和调味剂。

34. 权利要求29所述的应用,还包括选自以下的至少一种另外的活性剂:北五味子提取物、全葡萄提取物、辅酶Q<sub>10</sub>、红景天提取物、酸樱桃提取物和L-肉碱酒石酸盐。

35. 权利要求29所述的应用,其中所述口服制剂以选自以下的剂型存在:胶囊、片剂、粉剂、饮料、薄片、糖果剂、咀嚼剂、凝胶、糊剂、酏剂、糖浆、滴剂和锭剂。

36. 权利要求29所述的应用,其中所述作用是能量代谢下降。

37. 权利要求29所述的应用,其中所述作用是性性能下降。

38. 权利要求29所述的应用,其中所述作用包括基因表达中年龄相关的变化。

39. 权利要求38所述的应用,其中所述基因表达是针对衰老的生物标记。

40. 权利要求38所述的应用,其中所述基因表达发生在肌肉组织中。

41. 权利要求38所述的应用,其中所述基因表达发生在脑组织中。

42. 权利要求38所述的应用,其中所述制剂以等于或大于相同对象中热量限制的程度抵抗所述对象中的所述作用。

43. 包括83wt%至89wt%的冬虫夏草的口服制剂在制备用于抵抗对象肌肉组织中基因表达的年龄相关变化的药物中的应用,其中所述应用影响与性活力、身体能量、线粒体功能、精神活力和细胞衰老的每一种分别相关的至少一个基因群体。

44. 权利要求43所述的应用,其中所述冬虫夏草包括选自蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢

的至少一种菌株。

45. 权利要求43所述的应用, 其中所述有效量包括向所述对象递送日剂量, 其包括15.0mg/kg至150.0mg/kg的冬虫夏草。

46. 包括含有至少85wt%石榴酚的6.5wt%至8wt%的石榴提取物的口服制剂在制备抵抗对象脑组织中发现的基因的年龄相关变化的药物中的应用, 其中所述基因选自Apod、B2m、C1qa、C1qb、Cd68、Clec7a、Cst7、Ctsd、Gfap、Il33、Lgals3、Lyzs、Spp、和其组合。

47. 权利要求46所述的应用, 其中所述石榴提取物包括至少85wt%多酚。

48. 权利要求46所述的应用, 其中所述有效量包括向所述对象递送日剂量, 其包括0.15mg/kg至30.0mg/kg的石榴提取物。

49. 包括含有至少85wt%石榴酚的6.5wt%至8wt%的石榴提取物、3.5wt%至5wt%的人参提取物和83wt%至89wt%的冬虫夏草的制剂在制备用于抵抗组织中基因表达变化的药物中的应用, 其中所述基因选自Apod、B2m、C1qa、C1qb、Cd68、Clec7a、Cst7、Ctsd、Gfap、Il33、Lgals3、Lyzs、Spp、Amy1、Bdh1、C3、Ccl8、Mt2、Myot、Pah、Serpina3、C4、Cds1、Colla1、Igh6、Lpar1、Mt2、Prkcz、Syt9、和其组合。

50. 权利要求49所述的应用, 其中所述基因表达变化是获得所述组织的对象年龄的函数。

51. 权利要求49所述的应用, 其中所述冬虫夏草包括选自蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢的至少一种菌株。

52. 权利要求49所述的应用, 其中所述石榴提取物包括至少85wt%多酚。

53. 权利要求49所述的应用, 其中所述人参提取物包括3:1到5:1比率的人参皂苷Rb1和人参皂苷Rg1。

## 用于抵抗衰老作用的口服制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2010年5月24日提交的美国临时专利申请号61/347,789的权益,其以其整体通过引用被并入本文。

[0003] 背景

[0004] 衰老过程可以在生物体水平证明其本身的一种方式是在一些领域——包括性性能、代谢效率和能力、认知能力和感觉动态范围中功能下降。虽然这种下降的潜在基础没有被充分了解,但人们认识到这些常常部分归于器官和组织中的年龄相关变化。例如,人和啮齿动物心脏的年龄相关变化包括肌细胞数目的减少、肌细胞肥大、心纤维化、脂褐素色素积累、跨肌质网膜的钙运输的减少和对肾上腺素能刺激的应答变化。总之,这些变化可以促进与年龄有关的心脏病。

[0005] 这种变化反过来可以是构成组织的各种细胞类型变化的作用,并促进它们在器官系统中的作用。细胞的活性、结构和同一性源于其特定的蛋白质补充,如由基因表达调节的。因此,细胞结构和功能的年龄相关变化很可能在遗传表达的变化中找到基础。因此,衰老可以反映在遗传功能中。

[0006] 通过越来越复杂的测量基因表达的方法,有可能鉴定衰老的遗传相关性。例如,全基因组转录概况分析、DNA微阵列和定量PCR(qPCR)的应用,有可能鉴定衰老的转录生物标记并量化衰老对其表达的作用。阻碍或抵抗(counteract)这些作用的干预因而在抵抗生物体衰老中是有益的。

[0007] 发明概述

[0008] 根据实施方式,口服制剂可以包括石榴提取物、人参(*panax ginseng*)提取物和冬虫夏草(*c. sinensis*),其中每一种在被施用给对象时以有效抵抗所述对象中衰老作用的量存在。在实施方式的一个方面,所述制剂比石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草中的任何一种以更大的程度更有效地抵抗对象中的所述作用。在另一实施方式中,口服制剂可以包括石榴提取物,约0.09wt%至约80.32wt%;冬虫夏草,约13.46wt%至约99.67wt%;和人参提取物,约0.19wt%至约67.72wt%。

[0009] 根据实施方式,抵抗对象中衰老作用的方法包括给所述对象施用有效量的口服制剂,所述口服制剂包括石榴提取物、人参提取物和/或冬虫夏草。在方法的一个方面,施用有效量的制剂比施用相等量的石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草中的任意一种更有效地抵抗对象中的所述作用。

[0010] 在另一实施方式中,抵抗对象肌肉组织中基因表达的年龄相关变化的方法包括给所述对象施用有效量的口服制剂,所述口服制剂包括冬虫夏草。

[0011] 在再一实施方式中,抵抗对象脑组织中基因表达的年龄相关变化的方法包括给所述对象施用有效量的口服制剂,所述口服制剂包括石榴提取物。

[0012] 附图简述

[0013] 图1是直方图,其比较接受根据实施方式的制剂的小鼠与仅接受载体的小鼠的耐力;

[0014] 图2是直方图,其比较接受根据实施方式的制剂的小鼠与仅接受载体的小鼠的肝糖原含量;

[0015] 图3是直方图,其比较图2所示出的小鼠组中的骨骼肌糖原含量;

[0016] 图4是直方图,其比较图2所示出的小鼠组中的骨骼肌超氧化物含量;和

[0017] 图5是直方图,其比较图2所示出的小鼠组中骨骼肌的线粒体氧化磷酸化蛋白质水平。

[0018] 示例性实施方式的详述

[0019] 在描述和主张本发明的过程中,将应用以下术语。

[0020] 单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“运载体”包括涉及一个或多个这种运载体,提及“赋形剂”包括涉及一个或多个这种赋形剂。

[0021] 如本文中所使用的,“衰老”和“老化”对于活生物体中随时间发生的变化的积累可以互换使用。这种变化的范围可以从影响遗传和细胞功能的变化到影响器官、器官系统或整个生物体功能的那些变化。老化尤其指这样的变化,其在生物体已经达到生物学成熟后发生并且可以发展直到生物体最终死亡。术语“衰老作用”在本文中尤其指基因功能的年龄相关变化,如单个基因转录以及基因群体转录概况的变化。

[0022] 如本文中所使用的,术语“衰老的生物标记”一般指这样的基因或基因群体,其表达一直被发现随着年龄和其转录产物而变化。这种基因和基因群体可以被称为“遗传生物标记”,而转录产物可以被称为“转录生物标记”。

[0023] 如本文中所使用的,“上调”和“下调”分别指通常在响应一些信号或状况时一个或多个基因的提高了的或降低的表达,以及因此由这些基因编码的蛋白质的提高了的或降低的表达。尤其在涉及衰老的生物标记时,上调和下调分别指响应年龄的这种提高或降低。

[0024] 如本文中所使用的,“制剂”和“组合物”可以互换使用,并且指代两种或多种成分或物质的组合。在一些实施方式中,组合物可以包括与运载体或其赋形剂、佐剂等组合的活性剂。

[0025] 如本文中所使用的,“有效量”是指在被包含到组合物中时成分的量,其足以获得预期的组合或生理作用。因此,“治疗有效量”是指活性剂的非毒性、但足够的量,以在治疗或预防已知该活性剂对其有效的状况中实现治疗结果。应该理解,各种生物因子可影响物质执行其预期任务的能力。因此,“有效量”或“治疗有效量”在一些情况下可以取决于这样的生物因子。此外,虽然治疗效果的实现可以通过医师或其他有资格的医务人员利用本领域中已知的评价方法来测量,但是人们认识到个体差异和对治疗的响应可能使得治疗效果的实现成为一种主观决策。有效量的测定为药学和医学领域中的普通技术人员所悉知。

[0026] 如本文中所使用的,“药学上可接受的载体”和“载体”可互换使用,并指代任何惰性和药学上可接受的材料,其可以与生物活性剂或营养剂组合以获得特定的剂量制剂用于递送给对象。作为一般的原则,载体必须不与生物活性剂以充分降解或以另外不利地影响生物活性剂的方式进行反应。

[0027] 如本文中所使用的,“冬虫草属真菌”或“冬虫夏草”是指真菌物种冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*),包括所有无性型、菌株及其杂种。

[0028] 如本文中所使用的,“蝙蝠蛾拟青霉(p.hepialid)”或“蝙蝠蛾拟青霉(hepialid)”

是指真菌蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepialid*),包括所有菌株及其杂种。

[0029] 如本文中所使用的,“中国被毛孢(*H. sinensis*)”或“中国被毛孢(*hirsutella*)”是指真菌中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*),包括所有菌株及其杂种。

[0030] 如本文中所使用的,“赋形剂”是指基本上惰性的物质,其可以与活性剂和载体组合,以获得特定的剂量制剂,用于递送给对象,或提供具有特定性能特点的剂型。例如,赋形剂可以包括粘合剂、润滑剂等,但特别排除活性剂和载体。

[0031] 如本文中所使用的,“对象”是指哺乳动物,其可以得益于本文所述的组合物或方法的施用。该对象常常是人。

[0032] 如本文中所使用的,“施用(administration)”和“施用(administering)”是指将活性剂或含有其的组合物给予对象的方式。施用可以通过本领域中悉知的各种途径诸如口服和非口服方法来完成。

[0033] 如本文中所使用的,“口服施用”是指施用途径,其可以通过吞咽、咀嚼或吸吮包含药物的口服剂型来实现。悉知的口服剂型的实例包括片剂、胶囊、囊片(*caplets*)、粉剂、颗粒剂、饮料、糖浆、酏剂、糖果剂(*confection*)或其他食品等。

[0034] 浓度、量、溶解度和其他数字数据在本文中可以以范围的形式呈现。应该理解,这种范围形式仅为了方便和简洁的目的而使用,并且应该被灵活地解释为不仅包括作为范围的界限被明确叙述的数值,而且还包括包含在该范围内的所有单个数值或亚范围,如同每一数值和亚范围均被明确叙述一样。

[0035] 例如,0.5到400的浓度范围应该被解释为不仅包括明确叙述的浓度界限0.5和400,而且还包括该范围内的单个浓度,如0.5、0.7、1.0、5.2、8.4、11.6、14.2、100、200、300和亚范围如0.5-2.5、4.8-7.2、6-14.9、55、85、100-200、117、175、200-300、225、250和300-400等。这种解释应该适应而不考虑范围的宽度或被描述的特点。

[0036] 如本文中所使用的,术语“约”意为尺寸、配方、参数以及其他量和特点不是而且不必是确切的,但如所期望地,可以是接近的和/或更大或更小,反映公差、转换系数、四舍五入、测量误差等等和技术人员已知的其他因素。此外,除非另有说明,术语“约”将明确包括“准确地(*exactly*)”,这与上面关于范围和数字数据的论述一致。

[0037] 如本文中所使用的,多个项目(*item*)、结构元件、组合元件和/或材料为了方便可以呈现在共同的列表中。然而,这些列表应该被解释为如同列表的每一成员被单独识别为独立的和唯一的成员。因此,这种列表中的单个成员均不应该仅基于它们呈现在相同组中而没有相反说明被解释为相同列表的任意其他成员的事实上的等同物。

[0038] 抵抗对象中衰老作用的方法可以包括给所述对象施用有效量的口服制剂,所述口服制剂包括有效提供这种结果的活性剂。尤其地,抵抗或阻碍对象中衰老作用的口服制剂可以包括一个或多个活性剂,其有效阻碍或抵抗基因表达中年龄相关变化。根据实施方式,这种口服制剂可以包括石榴提取物,和任选地,人参提取物和/或冬虫夏草,每一种在被施用给对象时均以有效抵抗所述对象中衰老作用的量存在。

[0039] 在给定生物体中,可以鉴定充当衰老生物标记的基因和基因产物。特定基因和基因群体的表达有时被发现随生物体年龄而显著改变。这些基因可以通过可用的方法测定其转录产物而被鉴定。衰老的特定生物标记可以取决于生物体。即,显示年龄相关作用基因的鉴定根据物种而不同。另外,生物标记的鉴定和对每一生物标记表达的年龄相关作用的程

度在生物体的组织类型中可以不同。例如,基因或基因群体在肌肉组织中可以一直是衰老的生物标记而在脑组织中显示较少的年龄相关作用,并且在其它组织中根本不显示年龄相关作用。

[0040] 衰老对基因表达的作用部分取决于基因本身,尤其取决于与基因有关的功能。因此,在一些基因中,发现表达随着年龄而上调,而在其它基因中,表达随年龄下调。另外,观察到的上调或下调的程度根据基因可以不同,其中一些显示剧烈的变化,而其它的显示更细微、但仍显著的变化。基因表达可以根据组织而不同。例如,基因诸如PPAR $\alpha$ 在肝中可以随着年龄被上调,但在骨骼肌中可以随着年龄被下调。

[0041] 发明人已经发现,根据本文实施方式的制剂在衰老的遗传生物标记之间在抵抗年龄相关变化中是有效的。在具体方面,在显示年龄相关上调的基因中,制剂可以降低或逆转所述上调。在另一方面,制剂可以在显示这样的下调的基因中降低或逆转这种下调。在具体实施方式中,口服制剂可以包括多种不同的活性剂,其被选择,以抵抗一些不同组织中的年龄相关作用。在另一实施方式中,用于抵抗与对象衰老有关的基因表达变化的方法可以包括给所述对象施用有效量的制剂,所述制剂包括石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草。在具体实施方式中,这种变化可以发生在体外。在一些方面,人参提取物和冬虫夏草成分是任选的,并且,任意之一或另一种或者两种均可以被加入,以实现期望的结果。

[0042] 本文描述的成分在以组合提供时可以显示增强的效力。在具体方面,含有石榴提取物、人参提取物和冬虫夏草的组合的制剂比根据所述成分的单独功效期望地更有效抵抗衰老相关基因表达变化。例如,制剂的量可以比相等量的石榴提取物、人参提取物或冬虫夏草中的任意一种更有效抵抗基因表达的衰老相关变化。在另一实例中,制剂的量可以比相等量的这些成分中的任意两种更有效。

[0043] 为了确定生物体中衰老的生物标记,可以利用高密度寡核苷酸阵列通过监测多个基因的mRNA水平来获得总的基因表达概况分析。更具体而言,寡核苷酸阵列可被用于分析年龄不断增长的对象的样本,并且,所得信号被比较,以查明哪一个检测的基因显示随年龄而改变的表达。利用该方法,可以鉴定遗传生物标记以及量化年龄相关作用。还可以查明各种治疗如何可以修改这些年龄相关作用。例如,已发现在不同物种中增加最大寿命并减缓衰老过程的多个方面的一种治疗是饮食热量限制。然而,坚持低热量饮食常常困难,并且出现维生素缺乏和营养不良的危险,致使其不能成为广泛可用的方法来抵抗衰老。已经发现本文描述的剂在降低对基因表达的年龄相关作用中与热量限制一样有效或者甚至超过热量限制。包括这些剂的口服制剂可以提供抗衰老措施,其可用于各种对象。

[0044] 口服制剂可以包括有效量的石榴提取物。在具体实施方式中,石榴提取物可以以总制剂的约0.09wt%至约80.32wt%存在。在更具体的实施方式中,石榴提取物可以以约3.0wt%至约20.0wt%存在。在仍然更具体的实施方式中,石榴提取物以约6.5wt%至约8.0wt%存在。制剂中应用的石榴提取物可以通过已知的提取方法获自石榴果实。在具体实例中,石榴提取物提取自用水新鲜压榨的全石榴果实固体(石榴(*Punica granatum*),神奇的栽培种)。发明人已经发现,石榴中存在的多酚可以提供许多健康的益处,包括有效抵抗对基因表达的年龄相关作用。在具体实施方式中,口服制剂包含至少85%石榴多酚。

[0045] 口服制剂也可以包括有效量的真菌冬虫夏草。在具体实施方式中,冬虫夏草以总制剂的约13.46wt%至约99.67wt%存在于制剂中。在更具体的实施方式中,冬虫夏草以约

50.0wt%至约95.0wt%存在。在仍然更具体的实施方式中,冬虫夏草以约83.0wt%至约89.0wt%存在。发明人已经发现,冬虫夏草也可以抵抗对基因表达的年龄相关作用。在冬虫夏草属真菌的菌丝体中发现的两种无性型菌株——中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepialid*) 在提供与冬虫夏草属真菌有关的有益结果中是有效的,并且可以获自人工培养的菌丝体。在具体实施方式中,口服制剂可以包括蝙蝠蛾拟青霉和/或中国被毛孢中的任意一种,或者可选地,其提取物。

[0046] 口服制剂还可以包括人参提取物。在具体实施方式中,人参提取物以总制剂的约0.19wt%至约67.72wt%存在于制剂中。在更具体的实施方式中,人参提取物以约1.0wt%至约20.0wt%存在。在仍然更具体的实施方式中,人参提取物以约3.5wt%至约5.0wt%存在。人参包括介导其在施用其的对象中的作用的活性人参皂苷水平。在一个方面中,提取物可以来自人参根的一个或多个部分。自然地,人参主根包含1.0的Rg1皂苷(原人参萜三醇)与皂苷Rb1(原人参萜二醇)的人参皂苷比率。相反地,较不丰富的人参根毛具有较高浓度的Rb1,导致约4.6的Rb1/Rg1。人参皂苷Rb1可以提供益处诸如镇静、焦虑减少、身体性能和精神集中,而过量水平的Rg1被认为促进较少的积极副作用。在具体实施方式中,可以混合主根提取物和根毛提取物,以控制Rg1的水平同时提高Rb1的水平,以便维持期望的Rb1/Rg1比。结果是具有这种比率的生物活性人参皂苷Rb1和Rg1的人参提取物,该比率支持智力和身体性能并提供抗应激益处而没有副作用。在具体实施方式中,存在于口服制剂中的人参提取物包括约3:1到约5:1比率的人参皂苷Rb1和人参皂苷Rg1。在更具体的实施方式中,Rb1与Rg1比率为约4.5:1至约4.7:1。

[0047] 口服制剂可以被配制,以根据具体剂量方案提供有效量的活性剂。本文的口服制剂可以根据期望的日剂量提供活性剂中的每一种。在具体实施方式中,口服制剂被提供在剂型中,所述剂型包含约140mg至约200mg石榴提取物、约70mg至约130mg人参提取物和约1800mg至约2200mg冬虫夏草。在其它方面,口服制剂可以给对象施用,以递送以每一体重基计期望量的活性剂。施用可以根据对象的种类(例如,哺乳动物对象,或更具体地,人对象)以及其它因素诸如性别、年龄、医学状况等等来设置。在具体实施方式中,有效量的口服制剂向所述对象递送日剂量,其包括约0.15mg/kg至约30.0mg/kg石榴提取物、约0.35mg/kg至约15mg/kg人参提取物和约15.0mg/kg至约150.0mg/kg冬虫夏草。

[0048] 除了主要的剂诸如石榴提取物、人参和冬虫夏草之外,制剂还可包括另外的活性剂。这些可以包括尤其还有效抵抗衰老的剂以及在施用给对象时提供其它健康益处的剂。在具体实施方式中,口服制剂可以包括北五味子(*Schizandra berry*)提取物、全葡萄提取物、辅酶Q<sub>10</sub>、红景天(*Rhodiola rosacea*)提取物、酸樱桃(*Tart cherry*)提取物和L-肉碱酒石酸盐中的至少一种。这些剂每一种均具有有益特性,这使得它们一般适于包含在健康补充剂中,并且,作为具体实例,适于包含在抗衰老制剂中。然而,列举并不意图是穷尽性的,而且本领域中已知的其它药学上可接受的添加剂被考虑包含在制剂中。在具体实例中,另外的活性剂被选择,以提供有助于抵抗衰老作用的效果。

[0049] 口服制剂可以以适于口服施用的任意递送型或剂型被制备。例如,制剂中的活性剂可以与液态载体组合,然后被浓缩或稀释,以制备液态型。可选地,活性剂可以被干燥、加工并与适当的材料诸如填料、压片剂、增塑剂等组合,以制备固态剂型。在食品和药学领域中已知的固态和液态剂型被考虑使用,诸如胶囊、片剂、粉剂、饮料、薄片(wafer)、糖果剂

(confectionaries)、咀嚼剂、凝胶、糊剂、酏剂、糖浆、滴剂、锭剂等。在具体实施方式中,口服制剂被加工成粉剂,其可以任选地包括增甜剂和香料,并且在水中或其它液体中可溶,以生成饮料。在另一个具体实施方式中,口服制剂被加工并置入胶囊诸如明胶胶囊中。

[0050] 口服制剂还可以包括制备递送型所需的一种或多种赋形剂。可以使用用于制备各种剂型的药物和食品工业中通常已知的各种赋形剂。这些包括例如,液态载体、溶剂、填料、粘合剂、润滑剂、助流剂、调味剂和染料(coloring)。在具体实施方式中,口服制剂包括食品级树胶、防结块剂、卵磷脂、微晶纤维素、硅胶、调味剂和增甜剂中的一种或多种。食品级树胶包括黄单胞菌胶(xanthar gum)和瓜尔胶。防结块剂包括但不限于二氧化硅、硬脂酸、磷酸三钙、硅酸钙、硅铝酸钠、碳酸镁、滑石、皂土、亚铁氰化钠、亚铁氰化钾和骨质磷酸盐。

[0051] 虽然不期望被具体理论所束缚,但预期衰老对特定基因表达的作用与老化在生物体水平的表现有关。换言之,据信衰老的遗传生物标记的转录产物涉及随年龄退化的生理功能。因此,通过施用制剂给对象而获得的衰老对基因表达的作用的阻碍也可以在对象中以生理结果实现。在具体实施方式中,口服制剂抵抗衰老作用诸如身体活力和耐力、性性能、性能力、能量代谢、认知功能、睡眠时间和质量、记忆形成和保持等的年龄相关的下降。

[0052] 在实施方式中,如本文所述的口服制剂可以抵抗对象特定组织中或多个组织中的衰老作用。在一方面,所述制剂可以减轻或逆转在特定组织中发现的衰老的生物标记的基因表达中年龄的作用。这种作用可以通过施用制剂给对象,或者可选地,通过直接用制剂处理组织来产生。在另一方面,制剂可以抵抗在特定组织中出现的对生理功能的年龄相关作用。在再一方面,通过作用于有助于功能的一个或多个组织,制剂可以在生物体水平抵抗年龄对所述功能的作用。不同类型的功能衰退可以与特定组织或系统的退化有关。例如,降低的体力和耐力可部分由于肌肉组织和总体代谢能力中的年龄相关作用,而降低的认知功能可以与脑中相关区域中的变化有关。本文描述的口服制剂可以包括在特定组织中提供特定抗衰老作用的剂,所述特定组织包括但不限于脑、骨骼肌、心肌、性腺组织、结缔组织、皮肤、消化系统和内分泌腺。

[0053] 通过以下示例性实施方式,本发明的方面将进一步被阐释。这些实施例不应该被认为是对本公开内容的限制,而是仅仅准备指示本领域的技术人员实施本发明。可以对实施的形式、用法和细节进行各种修改而不运用发明创造才能并且不背离本发明的原理和概念,这对于本领域的技术人员来说将是显而易见的。因此,并不意图限制本发明,除非由下面示出的权利要求限定。

## 实施例

[0054] 实施例1-检测冬虫夏草属(*Cordyceps*)施用对骨骼肌(腓肠肌)中基因表达的作用,一般方案

[0055] 获得18月龄大的C57BL/6J小鼠,单独安置于鞋盒式笼具中并每周提供24克(~84kcal)的AIN-93M饮食(周一和周三,7克,周五,10克)。从21月龄开始并继续到25月龄,小鼠或者以AIN93M饮食供养(老年对照,OC)或被配给补充有冬虫夏草的AIN93M饮食(酶千克饮食3.063克)。获得六周龄的年轻对照C57BL/6J小鼠(YC),并以AIN93M饮食供养直到5月龄。在特定的年龄,从小鼠的腓肠骨骼肌采集组织,迅速冰冻在液氮中并储存于-80°C用于稍后分析。

[0056] 基因表达概况分析被用于鉴定随年龄和/或冬虫夏草属处理而改变的单独的基因和基因的功能类别。

[0057] 总RNA通过利用TRIZOL™试剂(LifeTechnologies,Grand Island,NY)提取自冰冻组织。聚腺苷酰化[聚(A)+]RNA通过寡(dT)-连接的oligotex树脂(Qiagen,Valencia,CA)纯化自总RNA。通过利用SuperScript Choice System™(LifeTechnologies),用含有T7RNA聚合酶启动子(Genset,La Jolla,CA)的寡(dT)引物将一微克聚(A)+RNA转换成双链cDNA(dscDNA)。dscDNA用酚氯仿-异戊基醇提取,并利用沉淀涂料共沉淀剂(pellet paint coprecipitant)(Novagen)进行沉淀。通过利用BioArray™High Yield RNA转录标记试剂盒(Enzo,Farmingdale,NY),在体外合成生物素标记的RNA。利用RNeasy亲和层析柱(Qiagen)纯化生物素标记的反义cRNA,并将其随机片段化。将含有10μg片段化cRNA的杂交混合物(200μl)注入Mouse1.0GeneST™阵列(Affymetrix,Santa Clara,CA)。将基因芯片放入45°C烤箱中,60rpm,16h。杂交后,洗涤基因芯片,并利用抗体用信号扩增方案将其在流体站(fluidic station)(Model800101,Affymetrix)中染色。通过利用Hewlett-Packard GeneArray™Scanner(Model900154,Affymetrix)以3μm分辨率扫描DNA芯片两次,并将平均化的图像用于进一步分析。

[0058] Affymetrix Algorithm™软件被用于确定mRNA在样本中的存在,并计算探针组的信号。为了鉴定随年龄发生的表达变化,将OC样本的平均值与YC的平均值进行比较;为了测定用冬虫夏草属处理的表达变化,将冬虫夏草属处理的样本的平均值与年龄匹配的OC样本的平均值进行比较。双尾t-检验(假设方差相等)被用于确定是否单个基因的表达变化是统计学上显著的。表达变化的大小被报告为“倍数变化”(FC)值,其是log<sub>2</sub>调节的以拟合统计学分析的正态性假定。

[0059] 为了鉴定随年龄和/或冬虫夏草属而变化的基因的功能类别,使用Parametric Analysis of Gene set Enrichment(PAGE),如Kim和Volsky(2005),PAGE:Parametric Analysis of Gene Set Enrichment,BMC Bioinformatics,6:144中所述。当基因表达改变适度但稳定时,该方法对于鉴定由处理调节的路径是有用的。来自基因本体论(GO)协会(Gene Ontology(GO)consortium)(<http://www.geneontology.org>)的注释被用于联系单个基因与其功能,尽管仅限于“等级3”或更高的那些注释,并且,其由10个以上但1000个以下的基因表示。在分析时,存在符合这些标准的2,884个GO项(term)。PAGE技术也计算每一GO项的z-分数,其中正值表示GO项随着处理被上调,负值表示通过处理下调GO项。

[0060] 实施例2-冬虫夏草属施用对抗与行为和性活力有关的骨骼肌基因群体的年龄相关变化的作用

[0061] 利用实施例1的方案检测冬虫夏草属施用对与性活力有关的骨骼肌中功能基因群体的表达的作用。结果(年龄和处理的z-分数、统计学显著性和由于处理而年龄相关作用的变化)显示在表1中:

[0062] 表1

[0063]

| GO 项和 ID                        | 基因<br>编号 | z-分数,<br>年龄 | z-分数,<br>冬虫夏草属 | P 值,<br>年龄 | P 值,<br>冬虫夏草属 | 差异,<br>年老对<br>冬虫夏草属 |
|---------------------------------|----------|-------------|----------------|------------|---------------|---------------------|
| 内分泌系统发育 GO:0035270              | 67       | -3.135      | 2.795          | 0.002      | 0.005         | <b>-5.93</b>        |
| 激素活性 GO:0005179                 | 103      | -3.937      | 1.370          | 0.000      | 0.171         | <b>-5.31</b>        |
| 神经肽激素活性 GO:0005184              | 15       | -3.176      | 2.067          | 0.001      | 0.039         | <b>-5.24</b>        |
| 行为调节 GO:0050795                 | 13       | -1.863      | 3.284          | 0.062      | 0.001         | <b>-5.15</b>        |
| 行为 GO:0007610                   | 339      | -0.942      | 3.962          | 0.346      | 0.000         | <b>-4.90</b>        |
| 激素水平调节 GO:0010817               | 113      | -1.676      | 2.818          | 0.094      | 0.005         | <b>-4.49</b>        |
| 类固醇激素受体<br>信号转导路径的调节 GO:0033143 | 11       | -1.274      | 3.114          | 0.203      | 0.002         | <b>-4.39</b>        |
| 生殖行为 GO:0019098                 | 15       | -1.621      | 2.658          | 0.105      | 0.008         | <b>-4.28</b>        |
| 信息素受体活性 GO:0016503              | 94       | 0.501       | -5.301         | 0.616      | 0.000         | <b>5.80</b>         |
| 对信息素的应答 GO:0019236              | 97       | 0.511       | -5.510         | 0.609      | 0.000         | <b>6.02</b>         |

[0064] 实施例3-冬虫夏草属施用对抗与能量代谢和身体能量有关的骨骼肌基因群体中的年龄相关变化的作用

[0065] 利用实施例1的方案检测冬虫夏草属施用对与身体能量和线粒体功能有关的功能骨骼肌基因群体中表达的作用。结果显示在表2中:

[0066] 表2

[0067]

| GO 项和 ID                  | 基因<br>编号 | z-分数,<br>年龄 | z-分数,<br>冬虫夏草<br>属 | P 值,<br>年龄 | P 值,<br>冬虫夏草属 | 差异,<br>年老对<br>冬虫夏草属 |
|---------------------------|----------|-------------|--------------------|------------|---------------|---------------------|
| cAMP 生物合成过程的调节 GO:0030817 | 52       | -3.173      | 2.486              | 0.002      | 0.013         | <b>-5.659</b>       |
| 骨骼系统形态发生 GO:0048705       | 117      | -2.832      | 2.690              | 0.005      | 0.007         | <b>-5.523</b>       |
| 骨骼系统发育 GO:0001501         | 252      | -2.603      | 2.707              | 0.009      | 0.007         | <b>-5.310</b>       |
| 肌肉细胞分化<br>GO:0042692      | 67       | -1.669      | 3.636              | 0.095      | 0.000         | <b>-5.305</b>       |

[0068]

|                             |     |        |        |       |       |               |
|-----------------------------|-----|--------|--------|-------|-------|---------------|
| 腺苷酸环化酶活性的活化 GO:0007190      | 35  | -3.054 | 2.022  | 0.002 | 0.043 | <b>-5.076</b> |
| 碳水化合物分解代谢过程 GO:0016052      | 70  | -2.475 | 2.599  | 0.013 | 0.009 | <b>-5.074</b> |
| 葡萄糖代谢过程 GO:0006006          | 97  | -2.634 | 2.002  | 0.008 | 0.045 | <b>-4.636</b> |
| 运动行为 GO:0007626             | 208 | 0.300  | 4.516  | 0.764 | 0.000 | <b>-4.216</b> |
| 糖异生 GO:0006094              | 16  | -2.287 | 1.721  | 0.022 | 0.085 | <b>-4.008</b> |
| 线粒体膜间隙 GO:0005758           | 13  | 1.452  | -2.737 | 0.146 | 0.006 | <b>4.190</b>  |
| 线粒体核糖体大亚基 GO:0005762        | 16  | 1.777  | -3.110 | 0.076 | 0.002 | <b>4.887</b>  |
| 线粒体部分 GO:0044429            | 369 | 0.019  | -5.794 | 0.985 | 0.000 | <b>5.813</b>  |
| 线粒体基质<br>GO:0005759         | 42  | 1.413  | -4.588 | 0.158 | 0.000 | <b>6.001</b>  |
| 腺苷三磷酸酶活性, 结合的<br>GO:0042623 | 173 | 4.219  | -2.050 | 0.000 | 0.040 | <b>6.269</b>  |
| 线粒体的核糖体<br>GO:0005761       | 31  | 1.739  | -4.566 | 0.082 | 0.000 | <b>6.305</b>  |
| 腺苷三磷酸酶活性<br>GO:0016887      | 215 | 4.839  | -2.122 | 0.000 | 0.034 | <b>6.961</b>  |

[0069] 实施例4-冬虫夏草属施用对抗与精神活力有关的骨骼肌基因群体中的年龄相关变化的作用

[0070] 利用实施例1的方案检测冬虫夏草属施用对与精神活力有关的功能骨骼肌基因群体中表达的作用。结果显示在表3中：

[0071] 表3

[0072]

| GO 项和 ID                | 基因<br>编号 | z-分数,<br>年龄 | z-分数,<br>冬虫夏草属 | P 值,<br>年龄 | P 值,<br>冬虫夏草属 | 差异,<br>年老对<br>冬虫夏草属 |
|-------------------------|----------|-------------|----------------|------------|---------------|---------------------|
| 神经发生 GO:0022008         | 465      | -5.670      | 5.832          | 0.000      | 0.000         | <b>-11.502</b>      |
| 神经肽信号转导路径<br>GO:0007218 | 70       | -3.563      | 2.965          | 0.000      | 0.003         | <b>-6.528</b>       |
| 神经肽激素活性<br>GO:0005184   | 15       | -3.176      | 2.067          | 0.001      | 0.039         | <b>-5.243</b>       |
| 行为<br>GO:0007610        | 339      | -0.942      | 3.962          | 0.346      | 0.000         | <b>-4.905</b>       |
| 记忆<br>GO:0007613        | 25       | -2.175      | 2.660          | 0.030      | 0.008         | <b>-4.835</b>       |
| 学习或记忆<br>GO:0007611     | 76       | -2.556      | 2.278          | 0.011      | 0.023         | <b>-4.834</b>       |
| 结合学习 GO:0008306         | 15       | -2.650      | 2.068          | 0.008      | 0.039         | <b>-4.718</b>       |

[0073]

|                    |    |        |       |       |       |               |
|--------------------|----|--------|-------|-------|-------|---------------|
| 视觉学习<br>GO:0008542 | 26 | -1.801 | 2.329 | 0.072 | 0.020 | <b>-4.130</b> |
|--------------------|----|--------|-------|-------|-------|---------------|

[0074] 实施例5-冬虫夏草属施用对抗与细胞衰老有关的骨骼肌基因群体中的年龄相关变化的作用

[0075] 利用实施例1的方案检测冬虫夏草属施用对与细胞和遗传维持过程(maintenance processes)有关的功能骨骼肌基因群体中的表达的作用。结果显示在表4中:

[0076] 表4

[0077]

| GO 项和 ID                      | 基因<br>编号 | z-分数,<br>年龄 | z-分数,<br>冬虫夏草属 | P 值,<br>年龄 | P 值,<br>冬虫夏草属 | 差异,<br>年老对<br>冬虫夏草属 |
|-------------------------------|----------|-------------|----------------|------------|---------------|---------------------|
| 生长因子活性 GO:0008083             | 130      | -2.838      | 3.703          | 0.005      | 0.000         | <b>-6.542</b>       |
| 对应激的多细胞生物体应答<br>GO:0033555    | 34       | -2.319      | 3.140          | 0.020      | 0.002         | <b>-5.459</b>       |
| 端粒维持 GO:0000723               | 17       | 2.238       | -1.963         | 0.025      | 0.050         | <b>4.201</b>        |
| 端粒结构 GO:0032200               | 17       | 2.238       | -1.963         | 0.025      | 0.050         | <b>4.201</b>        |
| 细胞氧化还原稳态 GO:0045454           | 53       | 2.673       | -1.680         | 0.008      | 0.093         | <b>4.352</b>        |
| 对应激的细胞应答 GO:0033554           | 322      | 3.818       | -1.849         | 0.000      | 0.065         | <b>5.666</b>        |
| 对 DNA 损伤刺激的细胞应答<br>GO:0034984 | 225      | 3.800       | -2.739         | 0.000      | 0.006         | <b>6.539</b>        |
| DNA 修复 GO:0006281             | 200      | 3.653       | -2.901         | 0.000      | 0.004         | <b>6.554</b>        |
| 对 DNA 损伤刺激的应答<br>GO:0006974   | 254      | 4.250       | -3.207         | 0.000      | 0.001         | <b>7.457</b>        |

[0078] 实施例6-热量限制和石榴提取物施用对衰老的基因表达生物标记的作用的比较

[0079] 获得B6C3F1杂种小鼠,并单独安置到鞋盒式笼具中,并且,每周提供24克(~84kcal)AIN-93M饮食(周一和周三,7克,周五,10克)。在14月龄时,将小鼠分配到三个处理组中之一直到30月龄:老年对照(OC),以AIN93M饮食供养;热量限制的(CR),被提供63kcal/周的改良的AIN93M制剂;石榴(POM),每千克饮食补充有128毫克石榴提取物的AIN93M制剂(POM Wonderful LLC, Los Angeles, CA)。还购买六周龄的年轻对照(YC)小鼠,并以AIN93M饮食供养直到5月龄。在特定的年龄,从小鼠采集组织,快速冰冻在液氮中并存储于-80°C用于稍后分析。

[0080] 已经鉴定年龄的组织特异性基因表达生物标记的组(panel),其可用于量化干预在转录水平减缓衰老的程度。为了确定CR或POM是否对抗衰老过程,我们进行分离自所有小鼠组的整个心脏、大脑皮质和腓肠骨骼肌的RNA的实时定量PCR(RT-qPCR)分析。CR在该试验中被用作阳性对照,因为热量限制被广泛公认是在各种不同物种中阻碍生物衰老的唯一营养干预。简言之,针对每一基因(OC对YC)测定年龄相关变化的大小,并且,CR或POM对抗衰老变化的程度被计算作为“预防衰老的百分比”(即,100%预防衰老表示干预使基因表达水平返回到YC组中观察到的水平)。对于每一组织,“预防衰老的百分比”值在所有基因中取平均值,以计算“衰老预防指数”(API)。因此,API给出处理对抗衰老的能力的所有测量。

[0081] 表5-大脑皮质

|        | 基因          | 通过 CR 预防  | 通过 POM 预防  |
|--------|-------------|-----------|------------|
|        |             |           |            |
| [0082] | Apod        | -1%       | 44%        |
|        | B2m         | 23%       | 50%        |
|        | C1qa        | -17%      | 46%        |
|        | C1qb        | 6%        | 34%        |
|        | Cd68        | 2%        | 71%        |
|        | Clec7a      | 17%       | 83%        |
|        | Cst7        | 19%       | 65%        |
|        | Ctsd        | -16%      | 231%       |
|        | Gfap        | -9%       | 33%        |
|        | Il33        | -22%      | 114%       |
|        | Lgals3      | 16%       | 61%        |
|        | Lyzs        | 19%       | 8%         |
|        | Spp         | 7%        | 10%        |
|        | 衰老预防指数(API) | <b>3%</b> | <b>65%</b> |

[0083] 表6-心肌

|        | 基因          | 通过 CR 预防   | 通过 POM 预防  |
|--------|-------------|------------|------------|
|        |             |            |            |
| [0084] | Amyl        | 44%        | 117%       |
|        | Apod        | -9%        | -25%       |
|        | Bdh1        | 6%         | 274%       |
|        | C3          | 31%        | 1%         |
|        | Ccl8        | 35%        | 4%         |
|        | Mt2         | 100%       | 33%        |
|        | Myot        | -15%       | 115%       |
|        | Pah         | 8%         | 19%        |
|        | Prkeq       | -13%       | -15%       |
|        | Scap2       | 5%         | -1%        |
|        | Serpina3    | 73%        | 39%        |
|        | Vgl12       | 28%        | -42%       |
|        | 衰老预防指数(API) | <b>24%</b> | <b>43%</b> |

[0085] 表7-腓肠肌骨骼肌

|        | 基因          | 通过 CR 预防 | 通过 POM 预防 |
|--------|-------------|----------|-----------|
|        |             |          |           |
| [0086] | Amyl        | -15%     | -89%      |
|        | Apod        | -41%     | 153%      |
|        | C4          | 51%      | 124%      |
|        | Cds1        | -3%      | 199%      |
|        | Coll1a1     | 19%      | 10%       |
|        | Coll1a2     | 22%      | -14%      |
|        | Col3a1      | 19%      | -29%      |
|        | Gadd45a     | -27%     | -16%      |
|        | Igh6        | -17%     | 3%        |
|        | Lpar1       | 69%      | 64%       |
|        | Mt2         | 69%      | 3%        |
|        | Prkecz      | -22%     | 30%       |
|        | Rhpn2       | 28%      | -2%       |
|        | Syt9        | -12%     | 14%       |
|        | 衰老预防指数(API) | 10%      | 32%       |

[0087] 如数据中所显示的,石榴提取物的施用产生年龄生物标记中看到的衰老作用的至少部分逆转。同样地,石榴提取物的总体作用一直大于由热量限制产生的总体作用,所述热量限制是被广泛公认为阻碍生物衰老的干预。

[0088] 实施例7-石榴-冬虫夏草属-人参制剂对中年雌性小鼠中耐力的作用

[0089] 将57只18个月大的雌性小鼠随机分配给两个组之一。第1组(n=29)被喂养常规饮食(“载体”),而第2组(n=28)被喂养常规饮食和石榴提取物、人参和冬虫夏草的掺和物(800mg/kg饮食,通过管饲法递送)。喂养持续7周。始终调节热量摄取,以在研究中维持稳定的体重。成对喂养小鼠,以在两个组中维持相似的热量摄取。在7周结束时,通过5%负重力竭游泳试验挑战小鼠。

[0090] 如图1所示,观察到第2组的小鼠比非处理组的小鼠游泳平均长22%(p=0.024)。这表明营养掺和物提高中年雌性小鼠的耐力能力。

[0091] 实施例8-石榴-冬虫夏草属-人参制剂对中年雄性小鼠中对训练的生理应答的作用

[0092] 将32只18个月大的雄鼠随机分配给两个组之一第1组(n=16)被喂养常规饮食,而第2组(n=16)被喂养常规饮食和石榴提取物、人参和冬虫夏草的掺和物(800mg/kg饮食,通过管饲法递送)。喂养持续两周。始终调节热量摄取,以在研究中维持稳定的体重。成对喂养小鼠,以在两个组中维持相似的热量摄取。在两周结束时,通过力竭功率脚踏车试验挑战小鼠。在功率脚踏车试验后立即处死小鼠;采集组织并冰冻存储用于生物化学分析。

[0093] 在力竭训练结束时,处理组中的小鼠比非处理组具有更多的肝糖原(p<0.05)和骨骼肌糖原(p<0.05)储存。如图2和3所示,在力竭训练之后,处理的小鼠已经消耗其33%的肝糖原和其6%的肌肉糖原。相反地,未处理组已经消耗其66%的肝糖原和其28%的肌肉糖原。这些结果表明,处理在力竭耐力训练过程中有效地节约肝和肌肉糖原。另外,图4显示处理的小鼠显示对训练引起的氧化应激更大的抵抗,在训练之后,其在肌肉中具有与非处理组相比比其低36%的超氧化物水平(p<0.005)。最后,如图5所示,处理的组显示骨骼肌中比对照

组高71%的线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)蛋白质水平的浓度( $p=0.03$ )。

[0094] 结果表明,营养掺合物提高进行力竭功率脚踏车试验的中年雄性小鼠中代谢效率和对氧化应激的抵抗。提高的代谢效率通过与氧化磷酸化和糖原节约增加有关的耐力训练过程中替代葡萄糖的脂肪酸利用而被证明。

[0095] 实施例9-施用石榴-冬虫夏草属-人参制剂对人对象中抗氧化活性的作用

[0096] 征募47个对象(21个男性,26个女性)参与该研究。对象的年龄范围为40-68岁。将对象随机分成两个测试组:实验组( $n=24$ )——接受石榴-冬虫夏草属-人参制剂——和安慰剂组( $n=23$ )。实验制剂和安慰剂的形式和日剂量与上面实施例9中的相同。继续补充达8周。

[0097] 利用Pharmanex®Biophotonic Scanner(Nu Skin Co,Provo,UT)测量每一对象的皮肤类胡萝卜素水平,以检验处理对抗氧化活性的作用。在处理开始前(第0天)进行的测量提供基线,并且,随后在4周(第28天)进行测量。在第28天总结拉曼强度分数并在组之间进行比较并比较第0天到第28天的变化。

[0098] 表8通过研究天数和组总结拉曼强度分数。分数的变化在实验组中比安慰剂组中明显高,其中实验组显示595的分数平均增加,而安慰剂组为1777的平均增加。

[0099] 表8-人对象中生物光子扫描仪测量的结果

[0100]

|        | 产物          |        |       |             |        |        |                       |
|--------|-------------|--------|-------|-------------|--------|--------|-----------------------|
|        | 实验的, $n=24$ |        |       | 安慰剂, $n=23$ |        |        | P 值, 平均 X 对 Y         |
| 拉曼强度分数 | 第 0 天       | 第 28 天 | 变化    | 第 0 天       | 第 28 天 | 变化     |                       |
| 平均值    | 21613       | 22208  | +595  | 21684       | 19907  | -1777  | D28, X 对 Y            |
| SD     | 7598        | 7421   | 2983  | 10481       | 9185   | 995    | P=0.3488 <sup>†</sup> |
| 最小值    | 4995        | 7230   | -4447 | 2643        | 2629   | -14016 | Δ, X 对 Y              |
| 最大值    | 38024       | 40477  | +6134 | 40068       | 35454  | 7007   | P=0.0460 <sup>†</sup> |

[0101] <sup>†</sup>非配对t检验

[0102] 实施例10-制剂成分对人骨骼肌细胞的体外基因表达的评价

[0103] 将Clonetics®初级骨骼肌细胞(cat.#CC-2561)用培养基(cat.#CC-3160)和试剂包(胰蛋白酶、胰蛋白酶中和溶液和HEPES缓冲盐水,cat.#CC-5034,均来自LonzaAG,Cologne)涂覆到384孔板中,在37°C温育过夜,然后,用石榴提取物(水溶液,5mcg/mL)、冬虫夏草(水溶液,5mcg/mL)、人参提取物(水溶液,5mcg/mL)处理或用88.1%冬虫夏草、4.4%人参提取物和7.5%石榴提取物在水溶液中的掺和物(浓度=5mcg/mL)处理。然后,温育细胞24小时。

[0104] RNA分离自骨骼肌细胞,并且,利用Affymetrix®Microarrays进行基因表达概况分析分析,以测量基因表达中的总的变化。分离RNA,并利用分光光度计评估浓度和纯度。利用Affymetrix3'IVT标记试剂盒和方案标记RNA样本,用于微阵列分析。人HG U133Plus2.0微阵列——含约45,000个转录物——被用于该研究。根据Affymetrix推荐的方案完成所有过程。

[0105] 利用GeneSpring微阵列软件分析数据。进行t检验,以获得包含以统计学上显著的水平被调节的基因的数据集。有241个基因显示明显倍数变化(即,大于两倍)。在这241个基

因中,有187个基因没有随着一种或多种单独成分的处理而显示明显的变化。这些结果表明,相互作用是由于所有三种成分的组合。

## 力竭游泳试验

对照对处理

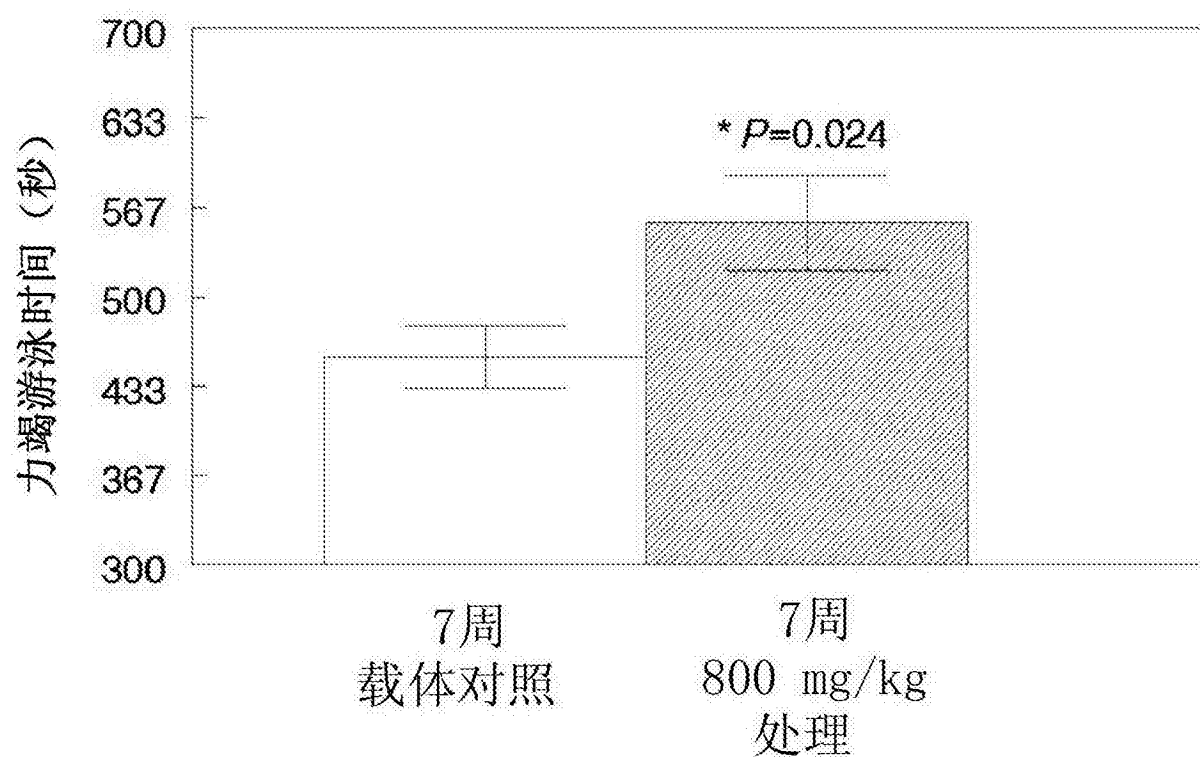


图1

## 力竭训练后的肝糖原含量

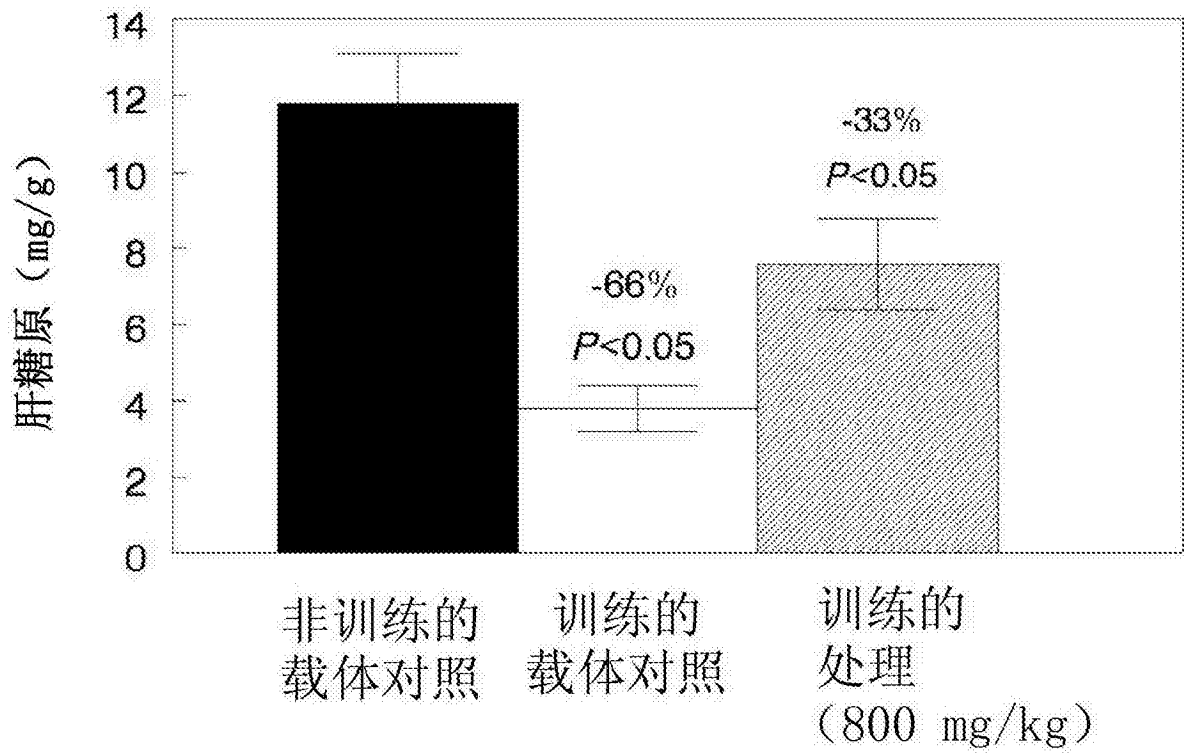


图2

## 力竭训练后的骨骼肌糖原含量

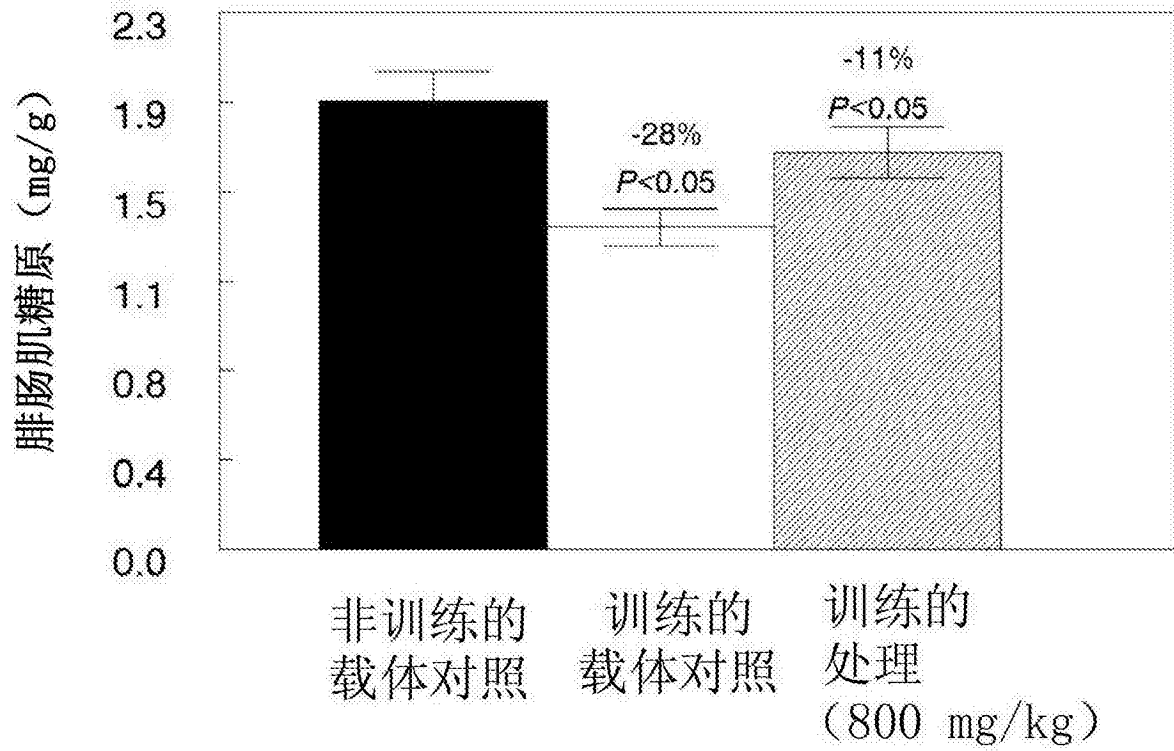


图3

## 力竭训练后的骨骼肌超氧化物含量

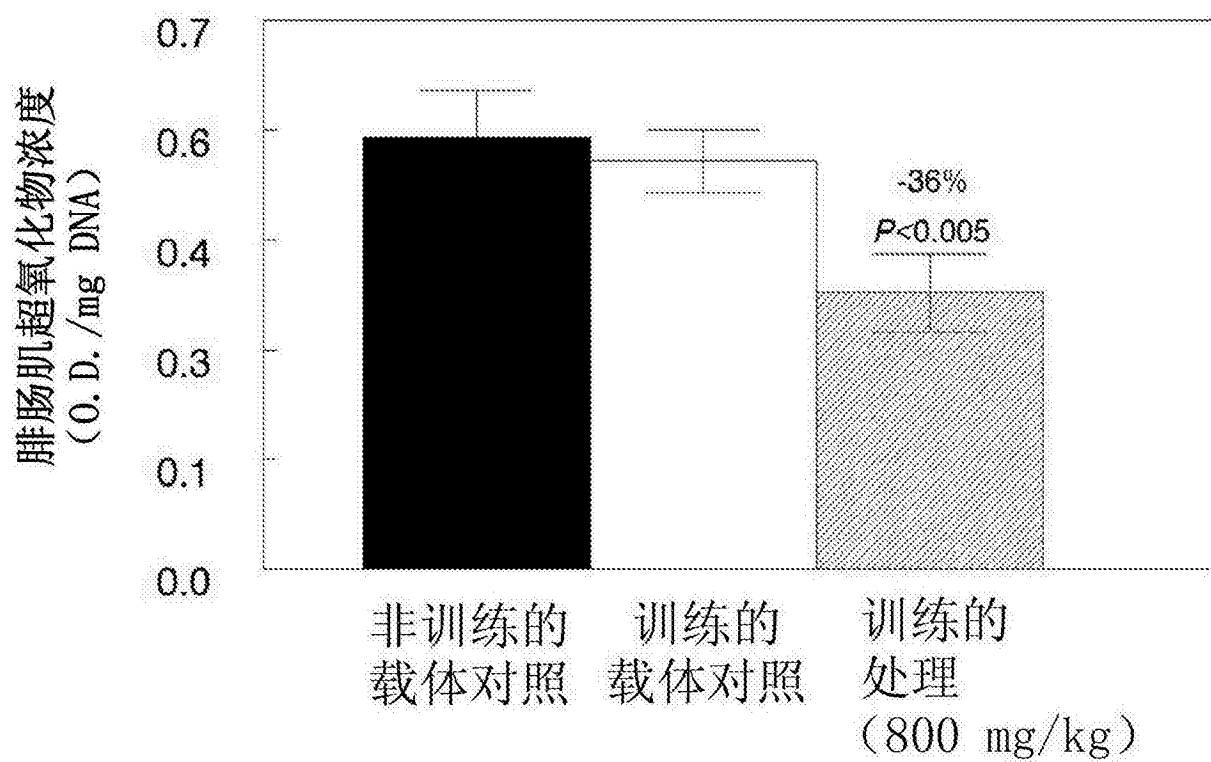


图4

## 肌肉线粒体OXPHOS蛋白质

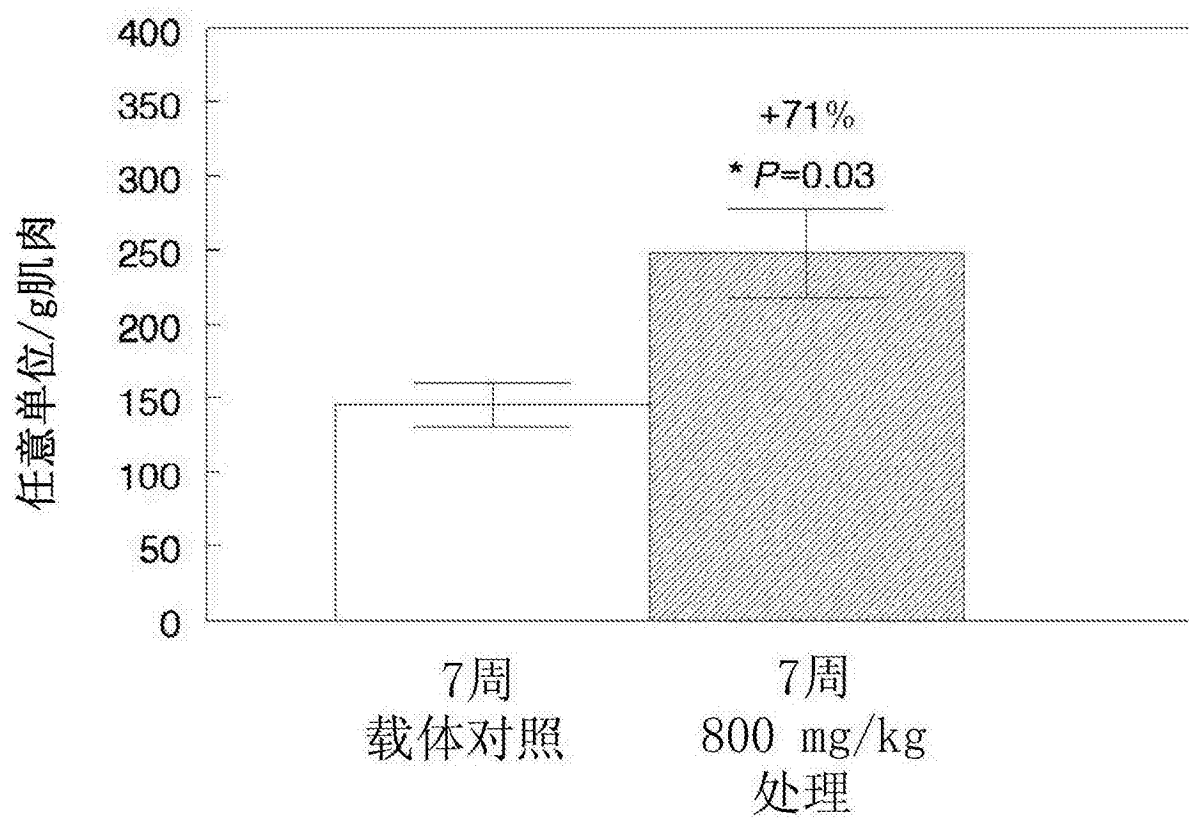


图5