



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112334129 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 03

(21) 申请号 201980042577.X	(73) 专利权人 专业营养学国际有限公司
(22) 申请日 2019.04.02	地址 意大利米兰
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112334129 A	(72) 发明人 保罗·卢卡·马里亚·焦尔杰蒂
(43) 申请公布日 2021.02.05	(74) 专利代理机构 北京允天律师事务所 11697 专利代理师 董文国 高源
(30) 优先权数据 102018000006725 2018.06.27 IT	(51) Int.Cl. A61K 31/194 (2006.01) A61K 31/198 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.12.24	(56) 对比文件 W0 2016179657 A1, 2016.11.17 W0 2007049818 A1, 2007.05.03
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/IB2019/052694 2019.04.02	审查员 徐赞晟
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/003013 EN 2020.01.02	
	权利要求书2页 说明书13页 序列表3页 附图2页

(54) 发明名称
包含氨基酸的组合物用于制备预防和治疗
肝病的药物的用途

(57) 摘要

用于在哺乳动物中预防和/或治疗肝病的用
途的组合物,所述组合物包含活性剂,所述活性
剂包含氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨
酸、赖氨酸和羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸。

1. 组合物用于制备在哺乳动物中预防和/或治疗肝病的药物的用途,所述组合物包含活性剂,所述活性剂包含氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸和羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸,

其中,所述组合物避免氨基酸精氨酸、丝氨酸、脯氨酸、丙氨酸,

其中,柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总量与亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸的总量之间的重量比为0.05至0.3,

其中,所述肝病选自酒精性肝病(ALD)和非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。

2. 根据权利要求1所述的组合物的用途,其中柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总量与亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸的总量之间的重量比为0.1至0.25。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总量与亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的总量之间的重量比为0.15至0.35。

4. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中柠檬酸与苹果酸和琥珀酸的总和之间的重量比为1.0至4.0。

5. 根据权利要求4所述的组合物的用途,其中柠檬酸与苹果酸和琥珀酸二者的总和之间的重量比为1.5至2.5。

6. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中柠檬酸:苹果酸:琥珀酸重量比为10:1:1至2:1.5:1.5。

7. 根据权利要求6所述的组合物的用途,其中柠檬酸:苹果酸:琥珀酸重量比为7:1:1至1.5:1:1。

8. 根据权利要求7所述的组合物的用途,其中柠檬酸:苹果酸:琥珀酸重量比为5:1:1至3:1:1。

9. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中所述活性剂还包含选自组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸的至少一种氨基酸。

10. 根据权利要求9所述的组合物的用途,其中所述活性剂还包含组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

11. 根据权利要求9所述的组合物的用途,其中柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总摩尔量与甲硫氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和色氨酸的总摩尔量之间的比率高于1.35。

12. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中三种羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸的总摩尔量与赖氨酸和苏氨酸的总摩尔量之间的比率为0.10至0.70。

13. 根据权利要求12所述的组合物的用途,其中三种羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸的总摩尔量与赖氨酸和苏氨酸的总摩尔量之间的比率为0.15至0.55。

14. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中柠檬酸的摩尔量高于苹果酸和琥珀酸二者的总摩尔量。

15. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中亮氨酸与柠檬酸之间的重量比为5至1。

16. 根据权利要求15所述的组合物的用途,其中亮氨酸与柠檬酸之间的重量比为2.50至3.50。

17. 根据权利要求1或2所述的组合物的用途,其中所述组合物还包含一种或更多种维生素。

18. 根据权利要求17所述的组合物的用途, 其中所述一种或更多种维生素选自维生素B。

19. 根据权利要求18所述的组合物的用途, 其中所述一种或更多种维生素为维生素B1和/或维生素B6。

包含氨基酸的组合物用于制备预防和治疗肝病的药物的用途

技术领域

[0001] 本说明书总体上涉及包含氨基酸的组合物。更具体地,本说明书涉及用于预防和/或治疗肝病的包含氨基酸的组合物。

背景技术

[0002] 肝病属于由多种不利的环境条件例如如寄生虫和病毒、药物、毒性物质、酒精中毒和抽烟引起的最频繁发生的疾病。其通常是出现恶化临床特征的慢性疾病。慢性肝病的特征在于:肝实质随时间逐渐破坏,具有炎症响应和脂肪积累,具有纤维化损伤和细胞转化的活化,导致在许多情况下的癌症发生。因此,肝病可包括脂肪变性、纤维化、肝硬化和肝细胞癌作为肝的进行性临床紊乱。肝硬化是急性和慢性肝病的结果,并且特征在于:肝组织被纤维化瘢痕组织和再生性结节替代,导致肝功能的进行性丧失。纤维化和结节性再生导致肝的正常微观小叶结构丧失。纤维化代表由例如感染、炎症、损伤以及甚至愈合造成的瘢痕组织生长。随时间推移,纤维化瘢痕组织缓慢替代正常的功能性肝组织,导致流向肝的血流量降低,使得肝不能充分处理血流中存在的营养物、激素、药物和毒物。肝硬化更常见的原因包括酒精中毒、丙型肝炎病毒感染、毒素的摄入,并且还可能存在许多其他可能的原因。如下所提及的,演变为肝硬化并且可能演变为癌症的流行病学上最相关的障碍是体脂增加和相关肝脂肪积累。这种脂肪积累可归因于两种主要的临床状况:酒精滥用和肥胖。

[0003] 过量和长期饮酒可导致酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD),这是一个主要的全球健康问题。ALD的病理特征在长时间内发展,包括肝脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化直至癌症。

[0004] 乙醇发病机制是由多种因素导致的。早期事件例如线粒体损伤、活性氧物类(reactive oxygen species,ROS)生成和脂肪积累显示是乙醇代谢的直接结局,并且是ALD与非酒精性肝病或NAFLD(见下文)之间的共同特征(Mantena et al.2008)。

[0005] 尚未充分了解针对酒精有害作用的细胞防御机制。为消化细胞蛋白质和细胞器以获得能量或消除受损细胞结构的重要降解细胞途径的自噬被认为在ALD中发挥作用,但是对这些机制的了解仍然是零碎的(Lin et al.2015)。自噬显示在肝细胞和非实质细胞(即,巨噬细胞和肝干细胞)二者中均发挥关键作用,影响胰岛素敏感性、脂质积累、肝细胞损伤和固有免疫应答。

[0006] 最近对小鼠和细胞模型的研究表明,急性乙醇摄入激活了肝中的自噬(Ding et al.2010;Ni et al.2013;Lin et al.2013)。

[0007] 相比之下,慢性乙醇中毒显示抑制了肝自噬(Thomes et al.2015;Cho et al.2014)。对自噬的抑制已显示加剧了小鼠中乙醇驱动的脂肪变性和肝损伤(Ding et al.2010;Ni et al.2013;Lin et al.2013)。

[0008] 相反地,自噬的药理学促进显示减轻了乙醇驱动的肝脂肪变性和肝损伤(Lin et al.2013)。作为结果,自噬被视为针对乙醇的细胞毒性作用的保护机制,并且已显现为用于开发ALD的治疗剂的靶标。

[0009] 如前所提及的,肝病的第二大主要原因是肥胖,肥胖在发达国家广泛扩散且也在发展中国家在流行病学上日益增加,并且引起所谓的非酒精性脂肪性肝病或NAFLD。向着脂肪性肝炎、肝硬化和肝癌的进展在全球范围内日益增加出现。涉及这种病症的生物化学和分子机制与ALD中通常描述的那些重叠。

[0010] 由于氨基酸代谢改变是与饮酒和肥胖发生二者相关联的肝病的一个标志,其特别地以循环支链氨基酸(branched-chain amino acid,BCAA)的水平降低为特征(Charlton, 2006),人们对开发基于氨基酸补充的新治疗方法作为肝病治疗越来越感兴趣。

发明内容

[0011] 本说明书的目的是提供在肝病的预防和治疗中有效的新的基于氨基酸的组合物。

[0012] 根据本说明书,上述目的由于在所附权利要求书中特别提及的主题而实现,所附权利要求书被理解为构成本公开内容的主要部分。

[0013] 本说明书的一个实施方案提供了用于在哺乳动物中治疗肝病的组合物,该组合物包含活性剂,所述活性剂包含氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸和羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸。

[0014] 在一个或多个实施方案中,组合物的活性剂还包含选自组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的一种或更多种氨基酸。

[0015] 在一个优选实施方案中,肝病可选自酒精性肝病(ADL)、非酒精性肝病(NAFLD)脂肪营养不良、肝炎、肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)。

[0016] 本公开内容的另一个实施方案提供了在哺乳动物中治疗肝病的方法,该方法包括:选择包含活性剂的组合物,所述活性剂包含氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸和羧酸柠檬酸、琥珀酸和苹果酸;施用组合物以在哺乳动物中治疗肝病。

附图说明

[0017] 现将参照附图仅以实例的方式描述本发明,在附图中:

[0018] -图1示出了作为用不同的基于氨基酸的组合物和乙醇(EtOH)处理9天的HepG2细胞中mRNA水平示出的基因表达(*P值<0.05和**P<0.01,相对于CTRL细胞)。

[0019] -图2示出了用不同的基于氨基酸的组合物和EtOH处理9天的HepG2细胞中的p62蛋白质水平(*P值<0.05和**P<0.01,相对于CTRL细胞;#P值<0.05,相对于经EtOH处理的细胞)。

具体实施方式

[0020] 在以下描述中,给出了许多具体细节以提供对一些实施方案的透彻理解。这些实施方案可在没有或更多个具体细节的情况下,或者用其他方法、组分、材料等来实施。在另一些情况下,未详细地示出或描述公知的结构、材料或操作以避免使实施方案的一些方面混淆。

[0021] 在本说明书通篇提及的“一个实施方案”意指与该实施方案相关描述的特定的特征、结构或特性包括在至少一个实施方案中。因此,在本说明书通篇多处出现的短语“在一个实施方案中”不一定全部是指同一个实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,可以

以任何合适的方式对特定的特征、结构或特性进行组合。本文中提供的标题仅是为了方便，并不解释实施方案的范围或含义。

[0022] 酒精性肝病 (ALD) 和非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是主要的全球健康问题,其特征在于:在长时间内的病理特征发展,包括肝脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化,直至癌症。

[0023] 乙醇发病机制中的早期事件例如如线粒体损伤、活性氧物类 (ROS) 生成和脂肪积累是ALD与NAFLD之间的共同特征。

[0024] 另外,氨基酸代谢改变已显示是肝病的一个区别性特征,其特征在于低的循环支链氨基酸 (BCAA) 水平,并且BCAA补充当被开处方为维持治疗时显示与肝硬化并发症频率降低相关(Charlton 2006)。

[0025] 本申请的发明人发现,通过向包含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸和赖氨酸的组合物添加特定的羧酸,可实现抵抗肝病例例如如ALD和NAFLD的高有效性。

[0026] 本文中公开的组合物已显示恢复了由乙醇诱导的改变的氨基酸代谢,并因此防止自噬,所述组合物包含与三种羧酸组合的氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸作为活性剂,所述三种羧酸是三羧酸循环的底物,包括特定量的柠檬酸、琥珀酸和苹果酸。在线粒体基质中进行的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TCA循环)(也称为克雷布斯循环(Krebs cycle)和柠檬酸循环)是细胞呼吸的第二阶段,细胞呼吸是通过其活细胞在存在氧的情况下分解有机燃料分子以收获其生长和分裂所需的能量的三阶段过程。

[0027] 包含上述活性剂的组合物以及包含含有另一些特定氨基酸(列于下表1中)的上述活性剂的组合物比不含这样的特定羧酸的类似氨基酸组合物显著更有效。

[0028] 在一个或更多个实施方案中,在本文中公开的组合物中,柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的总量与氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸的总量之间的重量比为0.05至0.3,优选0.1至0.25。

[0029] 在一个或更多个实施方案中,活性剂还可包含选自组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的一种或更多种氨基酸。

[0030] 在一个或更多个实施方案中,组合物中包含的羧酸由柠檬酸、琥珀酸和苹果酸组成。

[0031] 在另一个实施方案中,本文中公开的组合物的活性剂还可包括天冬氨酸和/或鸟氨酸L- α 酮戊二酸(OKG)。

[0032] 根据一个实施方案,该组合物包含活性剂,该活性剂由以下组成:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸和任选地酪氨酸,以及柠檬酸、琥珀酸、和苹果酸,所述氨基酸是组合物中包含的仅有氨基酸。柠檬酸、琥珀酸和苹果酸可以是组合物中包含的仅有羧酸。

[0033] 在另一个实施方案中,该组合物可包含相对于活性剂重量的按重量计35%至65%,优选按重量计42%至56%的量的氨基酸异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸。

[0034] 在一个或更多个实施方案中,亮氨酸与柠檬酸之间的重量比为5至1,优选2.50至3.50。

[0035] 在另一个实施方案中,柠檬酸的重量或摩尔量高于苹果酸和琥珀酸各自的重量或摩尔量。优选地,柠檬酸的重量或摩尔量高于苹果酸加琥珀酸的重量或摩尔总量。在另一个实施方案中,柠檬酸与苹果酸和琥珀酸的总和之间的重量比为1.0至4.0,优选1.5至2.5。在

一个优选实施方案中,柠檬酸:苹果酸:琥珀酸重量比为10:1:1至2:1.5:1.5,优选7:1:1至1.5:1:1,更优选5:1:1至3:1:1。在一个优选实施方案中,柠檬酸:苹果酸:琥珀酸重量比为4:1:1。

[0036] 根据本公开内容的一些实施方案,优选的异亮氨酸:亮氨酸摩尔比为0.2至0.7,优选0.30至0.60,和/或优选的缬氨酸:亮氨酸重量比为0.2至0.70,优选0.30至0.65。

[0037] 在另一个实施方案中,苏氨酸:亮氨酸摩尔比为0.10至0.90,优选0.20至0.70,和/或赖氨酸:亮氨酸重量比为0.20至1.00,优选0.40至0.90。

[0038] 在一个优选实施方案中,柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总摩尔量与甲硫氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和色氨酸的总摩尔量之间的比率高于1.35。

[0039] 在一个或更多个实施方案中,柠檬酸、苹果酸、琥珀酸的总和与支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的总和之间的重量比为0.1至0.4,优选0.15至0.35。

[0040] 在另一个实施方案中,支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸加苏氨酸和赖氨酸的总重量量高于三种羧酸例如柠檬酸、苹果酸和琥珀酸的总重量量。优选地,单一羧酸(柠檬酸、琥珀酸或苹果酸)的重量量小于单一氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸和赖氨酸各自的重量量。

[0041] 在另一个实施方案中,赖氨酸和苏氨酸的总摩尔量高于三种羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸的总摩尔量。优选地,三种羧酸柠檬酸、琥珀酸、苹果酸的总摩尔量与赖氨酸和苏氨酸的总摩尔量之间的比率为0.1至0.7,优选0.15至0.55。

[0042] 在一个或更多个实施方案中,本文中公开的组合物还包含维生素,其优选地选自维生素B,例如为维生素B₁和/或维生素B₆。

[0043] 在本公开内容的另一个实施方案中,该组合物可包含碳水化合物、添加剂和/或矫味物质。

[0044] 在一个优选实施方案中,该组合物专用于预防和/或治疗选自以下的肝病:脂肪性肝病、脂肪营养不良、肝炎、肝硬化、肝细胞癌(HCC)。

[0045] 在一个或更多个实施方案中,肝病是脂肪性肝病。脂肪性肝病可由饮酒引起(酒精性脂肪性肝病,ALD)。

[0046] 在一个或更多个实施方案中,脂肪性肝病是非酒精性脂肪性肝病(NFLD)。

[0047] 在一个或更多个实施方案中,脂肪性肝病可由以下引起:药物或毒素,例如如胺碘酮(amiodarone)、甲氨喋呤(methotrexate)、地尔硫卓(diltiazem)、高效抗逆转录病毒治疗、糖皮质激素、他莫昔芬(tamoxifen)、蕈中毒(mushroom poisoning)。

[0048] 此外,特别是在制备根据本公开内容的组合物且特别是活性剂时,优选地避免氨基酸精氨酸。另外,本文中公开的组合物优选避免的另一些氨基酸可以是丝氨酸、脯氨酸、丙氨酸。这样的氨基酸在组合物中在一定浓度或化学计量比下可起反作用或甚至有害。

[0049] 本申请中公开的氨基酸可被相应的可药用衍生物(即,盐)替代。

[0050] 如在下文中显而易见的是,根据本公开内容的组合物的施用在预防和/或治疗肝病方面特别有效。

[0051] 在一个优选实施方案中,所公开的组合物可用于治疗酒精性肝病(ALD)。

[0052] 根据另一个实施方案,氨基酸组合物可包含可药用赋形剂,如例如蛋白质、维生素、碳水化合物、天然和人工甜味剂和/或矫味物质。在一个优选实施方案中,可药用赋形剂

可选自乳清蛋白、麦芽糊精、果糖、酪蛋白钙、鱼油、三氯蔗糖、蔗糖酯、维生素D3、B族维生素。

[0053] 对于经口使用,根据本说明书的组合物可以为片剂、胶囊剂、颗粒剂、凝胶剂、可胶凝散剂或散剂的形式。

[0054] 关于由组合物提供的多种氨基酸的量及其之间的比例的另外说明包含在所附权利要求书中,其构成本文中关于本发明提供的技术教导的主要部分。

[0055] 实施例

[0056] 表1示出了在体外对肝细胞 (HepG2细胞) 和在体内对乙醇消耗大鼠测试的两种不同的基于氨基酸的组合物,如下所公开的。

[0057] 以下称为“BCAAem”的组合物包含含有氨基酸亮氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、色氨酸的活性剂。

[0058] 称为“阿尔法5m ($\alpha 5m$)”的组合物包含含有相同氨基酸加柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的活性剂。

[0059] 表1

组合物 (% w/w)	BCAAem	$\alpha 5m$
L-亮氨酸	30.01	31.0885
L-赖氨酸HCl 盐酸盐	19.58	16.903
L-异亮氨酸	15	10.3628
L-缬氨酸	15	10.3628
L-苏氨酸	8.4	7.254
L-半胱氨酸	3.6	3.1089
L-组氨酸	3.6	3.1089
L-苯丙氨酸	2.4	2.0726
L-甲硫氨酸	1.2	1.0363
L-酪氨酸	0.72	0.6218
L-色氨酸	0.48	2.0726
OKG (鸟氨酸L- α 酮戊二酸)	-	-

[0060]

维生素B1 (硫胺素盐酸盐)	-	0.004
维生素B6 (吡哆醇盐酸盐)	-	0.0038
无水柠檬酸	-	8.0000
苹果酸	-	2.0000
L-天冬氨酸	-	-
琥珀酸	-	2.0000
亮氨酸:异亮氨酸:缬氨酸之比	2:1:1	3:1:1

[0061] 上表1的组合物可首先通过用0.8筛筛选所有组分来制备。为了获得预混合物,将每种成分 (以按总量的重量计<10%的量) 与一部分L-赖氨酸HCl一起放入聚乙烯袋中,以获得总组合物的10%重量。然后将袋手动摇动5分钟。然后将预混合物与其余成分一起装载在混合器 (Planetaria) 中,并在120rpm下混合15分钟的时间,以获得均匀的最终组合物。

[0062] 方法

[0063] 动物与处理

[0064] 实验方案是根据1986年11月24日的欧洲共同体理事会指令 (European Communities Council Directive) (86/609/EEC) 和意大利卫生部 (Italian Ministry of Health) 批准和实施的,并且符合国家动物保护指南 (The National Animal Protection Guidelines)。

[0065] 来自Charles River (Calco, Como, Italy) 的雄性Wistar大鼠 (3月龄) 用于下文公开的实验分析。

[0066] 将动物单独圈养在干净的聚丙烯笼中,并分为六组:

[0067] 1) 配对喂养组 (配对喂养CTRL, $n=6$) 用对照流质饮食喂养,其中乙醇 (EtOH) 被等热量的麦芽糖葡聚糖替代;

[0068] 2) EtOH组 (EtOH, $n=7$) 用包含EtOH的Lieber-DeCarli流质饮食随意喂养[逐渐提高EtOH的量,在1周之后达到36%热量摄入,对应于6.2% (体积/体积) 的终浓度];

[0069] 3) BCAAm组 (BCAAm, $n=6$), 其用对照流质饮食喂养,其中EtOH被等热量的麦芽糖葡聚糖替代,并补充有提供1.5g/kg/天BCAAm的支链氨基酸组合物 (表1中的“BCAAm”);

[0070] 4) $\alpha 5$ 组 ($\alpha 5m$, $n=6$), 其用对照流质饮食喂养,其中EtOH被等热量的麦芽糖葡聚糖替代,并补充有提供1.5g/kg/天的氨基酸组合物 (表1中的“ $\alpha 5m$ ”);

[0071] 5) EtOH加BCAAm组 (EtOH+BCAAm, $n=7$), 其用包含EtOH和BCAAm组合物的Lieber-DeCarli流质饮食随意喂养;以及

[0072] 6) EtOH加 $\alpha 5m$ 组 (EtOH+ $\alpha 5m$, $n=7$), 其用包含EtOH和 $\alpha 5m$ 组合物的Lieber-DeCarli流质饮食随意喂养。

[0073] 样品制备

[0074] 对肝 ($n=4$ 只动物/组) 进行称重,在冷甲醇:水 (v/v, 1:1) 中匀化,并根据Want et al. (Want et al. 2013) 提取。将经真空干燥的样品混悬在甲醇:1mM TDFHA=1:1的120 μ l/50mg组织中,并在4 $^{\circ}$ C下以16,000g离心10分钟。将2 μ l上清液 (surnatant) 直接上样到UPLC质谱仪上,并如下报道进行分析。使用三种不同的方法对每个样品进行四个技术重复。

[0075] 色谱和肝中氨基酸定量

[0076] 标准氨基酸购自Sigma (Milan, Italy)。每种氨基酸储备溶液均在水中以1mg/ml制备,稀释至终浓度3pmol/ μ l,并通过注射器以10 μ l/分钟直接注入TripleTOF 5600+质谱仪 (AB Sciex, Milan, Italy)。因此,针对每种氨基酸优化了去簇电位 (declustering potential, DP) 和碰撞能量 (collision energy, CE)。

[0077] 接下来,基于DP和CE值制备三种氨基酸混合物:MIX 1, 包含苏氨酸、天冬酰胺、酪氨酸和丝氨酸,并用DP:30V, CE:15V进行分析;MIX 2, 包含甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和苯丙氨酸,并用DP:40V, CE:15V进行分析;以及MIX 3, 包含谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和色氨酸,并用DP:80V, CE:18V进行分析。

[0078] 源参数为:气体1:33psi, 气体2:58psi, 帘气:25psi, 温度:500 $^{\circ}$ C, 以及ISVF (离子喷雾电压浮动 (Ion Spray Voltage Floating)):5500V。

[0079] 为了获得校准曲线,将三种混合物的不同量 (10、33、50、100、200、400pmol) 的技

术一式四份物在使用UPLC 1290 (Agilent Technologies Italia, Cernusco sul Naviglio, Milan, Italy) 进行UPLC分离之后注入质谱仪中。色谱柱来自Waters, Acquity HSS T3 C18 2.1x 100mm, 1.7 μ m, 同时流动相为A:水中的1mM TDFHA(十三氟庚酸);B:乙腈中的1mM TDFHA。B在4分钟中从12.5%到26.5%随后在3.5分钟中从26.5%升至92%的梯度用于分离所有氨基酸,其中流速为0.35ml/分钟,并且柱温为65 $^{\circ}$ C,如所述(Le et al., 2014)。

[0080] 自动进样器设置为4 $^{\circ}$ C。使用色谱峰面积和加权回归(除天冬酰胺、酪氨酸、缬氨酸和谷氨酸拟合至1/x²之外所有化合物为1/x)通过MultiQuant软件2.1版(SCIEX)绘制校准曲线。通过使色谱峰面积与来源于外部运行的校准标准品的色谱峰面积相关联并针对组织(mg)进行归一化,获得大鼠肝样品中每种氨基酸的定量值(pmol)。

[0081] 细胞培养与处理

[0082] 人HCC HepG2细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (HB-8065; ATCC, Manassas, VA)。在具有5% CO₂的气氛中,在37 $^{\circ}$ C下,在补充有10%胎牛血清、青霉素(100U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)的RPMI-1640培养基中常规培养细胞。每个75cm²烧瓶(Corning Inc., Corning, NY)接种200万个HepG2细胞。

[0083] 在接种之后六小时,单独或组合添加75mM (0.34%) EtOH和1% BCAAem或 α 5m。将未经处理的细胞平板接种作为对照。每隔24小时,分别用具有或不具有EtOH和BCAAem或 α 5m的新鲜培养基替换对照烧瓶和处理烧瓶二者中的培养基。在接种之后四天,将细胞胰蛋白酶化并以每个烧瓶200万个活细胞接种到新的烧瓶中,并且每天更换培养基,如前所述(Pochareddy et al. 2012)。在分开过程之后五天(总共9天,具有或不具有EtOH、BCAAem或 α 5m、或EtOH加BCAAem或 α 5m),收获细胞如下所报道用于不同的测定。

[0084] 定量RT-PCR分析

[0085] 如所述(Tedesco et al. 2008)进行定量RT-PCR反应,并用iQ SybrGreen I SuperMix (Bio-Rad; Segrate, Italy)在iCycler iQ实时PCR检测系统(Bio-Rad)上运行。

[0086] 简言之,使用RNeasy[®]组织微型试剂盒(Qiagen, Milan, Italy)从组织中分离RNA。使用iScript[™] cDNA合成试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italy)合成cDNA。

[0087] 使用来自Premier Biosoft International的Beacon Designer 2.6软件设计引物(序列在下表2中报道)。将可检测到多种转录本时的循环数(阈值循环, CT)与TBP的循环数进行比较,称为 Δ CT。将基因相对水平表示为2^{-(Δ CT)},其中 Δ CT等于经EtOH-或BCAAem-或CAA混合物处理的大鼠(或处理的HepG2细胞)的 Δ CT减去对照大鼠(或未经处理的HepG2细胞)的 Δ CT。

[0088] 表2

[0089]

基因	引物	序列	SEQ ID.	T _a
PGC-1 α	正义 5'-3'	5'-GACCCCAGAGTCACCAAATGAC-3'	No.1	60
	反义 5'-3'	5'-TTGGTTGGCTTTATGAGGAGGA-3'	No.2	
Tfam	正义 5'-3'	5'-AGATTGGGGTCGGGTCAC-3'	No.3	60
	反义 5'-3'	5'-GACAACTTGCCAAGACAGATG-3'	No.4	
NRF1	正义 5'-3'	5'-ACTCGTGTGGGACAGCAAGC-3'	No.5	60
	反义 5'-3'	5'-ATGGTGAGAGGCGGCAGTTC-3'	No.6	
Cyt c	正义 5'-3'	5'-CGTTGTGCCAGCGACTAAAAA-3'	No.7	60
	反义 5'-3'	5'-TTCCGCCCAAAGAGACCA-3'	No.8	
TBP	正义 5'-3'	5'-AGGCACCACAGCTCTTCCAC-3'	No.9	60
	反义 5'-3'	5'-CCCAGAACTCTCCGAAGCTG-3'	No.10	

[0090] T_a退火温度(°C);登录号PGC-1 α :NM_013261;登录号Tfam:NM_009360.4;登录号NRF1:NM_005011;登录号Cyt c:JF919224.1;登录号TBP:NG_051572用于使基因表达归一化。

[0091] Western印迹分析

[0092] 在存在蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Sigma Aldrich,Milan,Italy)的情况下用T-PER哺乳动物蛋白质提取试剂(Pierce,ThermoScientific,Rockford,USA)如制造商所述从肝获得蛋白质提取物。通过二辛可宁酸蛋白质测定(BCA,Pierce,Euroclone,Milan,Italy)测量蛋白质含量,并在还原条件下在SDS-PAGE上运行50 μ g蛋白质。然后将分离的蛋白质电泳转移到硝酸纤维素膜(Bio-Rad Laboratories,Segrate,Italy)上。目标蛋白质用特异性抗体:抗p62和抗 α -肌动蛋白(全部均来自Cell Signaling,Euroclone,Milan,Italy)显现,每种抗体均以1:1000稀释。使用辣根过氧化物酶缀合的抗兔或抗小鼠免疫球蛋白在室温下检测免疫染色1小时。使用SuperSignal底物(Pierce,Euroclone,Milan,Italy)测量蛋白质的量,并用IMAGEJ软件图像分析仪通过密度测量法进行定量。

[0093] 统计学分析

[0094] 对于所有基因表达数据,使用双侧配对样品t检验比较对照细胞与经处理细胞之间的值。P值<0.05被认为具有统计学显著性。

[0095] 结果

[0096] 组合物 α 5m比BCAAem组合物更有效地恢复因EtOH消耗而受损的肝线粒体生物发生和功能

[0097] 评价了BCAAem和 α 5m组合物改善由于EtOH暴露而受损的线粒体生物发生和功能的能力。为了研究参与BCAAem和 α 5m组合物发挥作用的分子机制,使用了肝EtOH毒性的体外模型。

[0098] 为此,在有或没有BCAAem α 5m组合物的情况下将肝HepG2细胞暴露于75mM EtOH,持续9天。与未经处理的对照细胞中相比,增殖物激活受体 γ 辅激活子1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor-1,NRF-1)、线粒体DNA转录因子A(Tfam)和cyt c mRNA水平在暴露于75mM EtOH持续9天的HepG2细胞中不变或略微更低(图1)。

[0099] 然而,相对于未经处理细胞和经EtOH处理细胞,施用BCAAem和 α 5m组合物9天提高

了PGC-1 α 和Tfam mRNA水平(图1)。

[0100] 值得注意的是, α 5m组合物改善肝线粒体生物发生标志物的效力在统计学上高于BCAAem的效力。

[0101] 自噬分析

[0102] 自噬流可通过将数种标志物进行组合来推断,所述标志物包括p62/SQSTM1蛋白质水平以及LC3II/LC3I比、Beclin1和Atg7、以及4EBP1磷酸化(Klionsky et al.,2016)。p62/SQSTM1已显示并入自噬体中并在自溶酶体中降解。因此,降低的p62/SQSTM1蛋白质水平指示自噬提高(Klionsky et al.2016)。

[0103] 如本申请的图2中所示,p62蛋白质水平在暴露于75mM EtOH持续9天的HepG2细胞中低于未经处理的对照细胞中。

[0104] 然而,在施用BCAAem或 α 5m组合物9天之后,相对于未经处理细胞和经EtOH处理细胞的p62水平,p62蛋白质水平更高。

[0105] 同样在这种情况下, α 5m组合物的效力在统计学上高于BCAAem组合物的效力。

[0106] 肝氨基酸定量

[0107] 如上所公开的,改变的氨基酸代谢,具体地低循环BCAA水平,已显示是酒精性肝病的一个区别性特征(Charlton,2006)。

[0108] 以下提供的数据指代BCAAem或 α 5m组合物对慢性EtOH消耗大鼠的肝中氨基酸代谢的作用。

[0109] 为此目的,使用色谱分析测量消耗单独或与受试组合物组合的EtOH的大鼠的肝组织中的游离氨基酸水平。

[0110] 如表3中所报道的,补充BCAAem和 α 5m组合物对精氨酸、亮氨酸和色氨酸的水平无效。相比之下,EtOH消耗导致肝中这些氨基酸的水平降低。

[0111] 令人感兴趣的是,在EtOH消耗大鼠中施用BCAAem和 α 5m组合物防止了精氨酸、亮氨酸和色氨酸降低。

[0112] 此外,暴露于含EtOH饮食的小鼠的肝中的异亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸和缬氨酸浓度较低。

[0113] 尽管BCAAem补充不能阻止其下降,但 α 5m补充反而也能有效防止EtOH诱导的异亮氨酸和缬氨酸降低。

[0114] 其余氨基酸的浓度在各组之间不具有统计学差异。

[0115] 这些结果与 α 5m组合物与BCAAem组合物相比在使EtOH消耗大鼠的肝样品中BCAA水平重新正常化方面的特定能力相一致。

[0116] 表3

[0117]

	CTRL	BCAAem	$\alpha 5m$	EtOH	EtOH + BCAAem	EtOH + $\alpha 5m$
丙氨酸	670.1 $\pm$ 65.7	832.0 $\pm$ 25.0	932.0 $\pm$ 34.0	691.2 $\pm$ 128.0	679.0 $\pm$ 110.0	703.0 $\pm$ 90.0
精氨酸	6.6 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 0.7	2.46 $\pm$ 0.5*	4.3 $\pm$ 0.7#	4.6 $\pm$ 0.5#
天冬酰胺	8.9 $\pm$ 2.4	7.9 $\pm$ 2.7	9.1 $\pm$ 1.7	8.1 $\pm$ 2.1	6.9 $\pm$ 2.8	7.8 $\pm$ 2.3
甘氨酸	409.8 $\pm$ 78.2	479.8 $\pm$ 32.0	442.8 $\pm$ 54.0	424.1 $\pm$ 52.0	440.7 $\pm$ 67.2	416.7 $\pm$ 59.2
谷氨酸	5232.0 $\pm$ 430.0	5394.0 $\pm$ 438.0	5193.0 $\pm$ 328.0	5970.5 $\pm$ 832.0	4717.70 $\pm$ 850	4928.67 $\pm$ 550
组氨酸	527.9 $\cdot 10^3 \pm$ 80.3 $\cdot 10^3$	606.8 $\cdot 10^3$ $\pm 10.8 \cdot 10^3$	705.8 $\cdot 10^3$ $\pm 10.5 \cdot 10^3$	461.1 $\cdot 10^3$ $\pm 44.6 \cdot 10^3$	406.0 $\times 10^3$ $\pm 19.3 \cdot 10^3$	606.0 $\times 10^3$ $\pm 11.3 \cdot 10^3$
异亮氨酸	141.9 $\pm$ 29.7	144.4 $\pm$ 4.5	153.4 $\pm$ 3.4	92.9 $\pm$ 16.6*	93.2 $\pm$ 17.9*	143.1 $\pm$ 16.4#
亮氨酸	195.0 $\pm$ 56.4	189.1 $\pm$ 81.9	197.1 $\pm$ 71.6	110.2 $\pm$ 18.8 *	188.9 $\pm$ 92.4#	195.8 $\pm$ 82.3#
赖氨酸	72.2 $\pm$ 16.8	90.5 $\pm$ 19.7	87.5 $\pm$ 17.8	62.3 $\pm$ 9.6	53.3 $\pm$ 6.4	67.2 $\pm$ 7.3
甲硫氨酸	12.9 $\pm$ 5.5	17.9 $\pm$ 5.3	16.5 $\pm$ 3.9	11.9 $\pm$ 3.9	17.8 $\pm$ 4.7	15.9 $\pm$ 5.1
苯丙氨酸	32.0 $\pm$ 13.2	36.4 $\pm$ 4.8	39.2 $\pm$ 3.3	27.7 $\pm$ 10.2	28.8 $\pm$ 5.2	35.6 $\pm$ 4.5

脯氨酸	33.7 $\pm$ 5.2	33.5 $\pm$ 1.3	33.9 $\pm$ 2.3	27.2 $\pm$ 8.7	24.6 $\pm$ 4.2	31.7 $\pm$ 3.9
丝氨酸	348.7 $\pm$ 33.9	362.4 $\pm$ 9.9	385.4 $\pm$ 10.9	220.7 $\pm$ 58.4*	215.4 $\pm$ 43.0*	342.4 $\pm$ 39.1*
苏氨酸	55.5 $\pm$ 2.41	52.2 $\pm$ 2.0	51.2 $\pm$ 1.7	52.9 $\pm$ 2.5	51.5 $\pm$ 2.2	53.5 $\pm$ 1.7
色氨酸	1252.8 $\cdot 10^3$ $\pm$ 226.4 $\cdot 10^3$	1350.4 $\cdot 10^3$ $\pm$ 74.54 $\cdot 10^3$	1299.4 $\cdot 10^3$ $\pm 99.4 \cdot 10^3$	787.1 $\cdot 10^3$ $\pm$ 112.7 $\cdot 10^3$ *	1038.2 $\cdot 10^3$ $\pm$ 169.9 $\cdot 10^3$ #	1178.2 $\cdot 10^3$ $\pm$ 178.9 $\cdot 10^3$ #
酪氨酸	514.5 $\pm$ 63.3	382.6 $\pm$ 19.7	472.6 $\pm$ 29.7	311.7 $\pm$ 71.89 *	274.6 $\pm$ 39.7*	354.8 $\pm$ 35.6*
缬氨酸	429.9 $\pm$ 46.7	455.3 $\pm$ 17.7	564.3 $\pm$ 20.7	291.9 $\pm$ 61.1	290.8 $\pm$ 48.9	450.8 $\pm$ 62.7#

[0118] 值被报道为平均值 $\pm$ SD (pmol/mg组织), n=4只动物/组; *相对于CTRL组, P<0.05;

[0119] #相对于EtOH组, P值<0.05。

[0120] 总之,体外和体内结果表明,饮食补充包含活性剂的组合物在预防暴露于EtOH的肝细胞的线粒体损伤方面是显著有效的,该活性剂包含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸、柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的组合。

[0121] 这种作用还伴随着通过EtOH暴露而提高(即,p62蛋白质水平降低)的自噬降低(即,p62蛋白质水平提高)。

[0122] EtOH本身可增强自噬以补偿EtOH毒性以及特别是线粒体损伤,线粒体损伤在暴露于酒精的肝细胞中和消耗酒精的动物的肝中明显。

[0123] 事实上,自噬是旨在消除功能异常细胞器(包括线粒体)的细胞机制。当肝细胞暴露于酒精并且线粒体功能降低时,提高的自噬,如本申请中也公开的,可用于消除功能异常的线粒体。

[0124] 本文中公开的氨基酸组合物能够防止线粒体损伤,使得细胞不需要自噬来维持其活力功能,所述组合物包含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸与柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的组合。因此,自噬降低(如由本申请中所示的p62蛋白质水平提高所示)。

[0125] 此外,并且最重要的是,已发现所公开的组合物在恢复EtOH消耗大鼠的肝中的游离BCAA、精氨酸和色氨酸浓度方面非常有效。

[0126] 值得注意的是,初步结果表明,本文中公开的包含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸与柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的组合的氨基酸组合物还能够减小暴露于高脂肪饮食(high-fat diet,HFD,60%热量来自脂肪)6个月的小鼠的肝细胞中脂滴的直径,该小鼠是广泛使用的NAFLD小鼠模型。总而言之,这些结果强烈支持以下观点:本文中公开且在酒精依赖性肝毒性方面具有活性的氨基酸组合物可在预防NAFLD发生和恶化方面是健康的。

[0127] 由前述内容显而易见的是,根据本公开内容的组合物可用于预防和/或治疗在全球范围内影响大量成年人群且增加社会成本的肝病。

[0128] 参考文献

[0129] Charlton M. (2006) 作为用于肝病的治疗的富含支链氨基酸的补充剂(Branched-Chain Amino Acid Enriched Supplements as Therapy for Liver Disease).J Nutr 136:295S-298S.

[0130] Cho HI,Choi JW,Lee SM(2014) 自噬体-溶酶体融合受损导致慢性乙醇诱导性肝损伤(Impairment of autophagosome-lysosome fusion contributes to chronic ethanol-induced liver injury).Alcohol 48:717-725.

[0131] Cooper GM和Hausman RE(2009) 细胞.分子方法.生物能和代谢.线粒体、叶绿体和过氧化物酶体(La cellula.Un approccio molecolare.Bioenergetica e metabolismo.Mitocondri,cloroplasti e perossisomi).Piccin 11:432-468.

[0132] Ding WX,Li M,Chen X,Ni HM,Lin CW,Gao W,Lu B,Stolz DB,Clemens DL,Yin XM(2010) 自噬降低了小鼠中急性乙醇诱导性肝毒性和脂肪变性(Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice).Gastroenterology 139:1740-1752.

[0133] Jung CH,Ro S-H,Cao J,Otto NM,Kim D-H(2010) 自噬的mTOR调节(mTOR regulation of autophagy).FEBS Lett 584:1287-1295.

[0134] Klionsky DJ等(2016) 用于监测自噬的测定的使用和说明指南(第3版)

(Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)).Autophagy 12:1-222.

[0135] Lin CW,Zhang H,Li M,Xiong X,Chen X,Chen X,Dong XC,Yin XM(2013) 自噬的药理学促进减轻了小鼠的酒精性和非酒精性脂肪性肝病中的脂肪变性和损伤 (Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice).J Hepatol 58:993-999.

[0136] Lin Wang,Bilon Khambu,Hao Zhang,Xiao-Ming Yin(2015) 酒精性肝病中的自噬,由饮酒触发的自食 (Autophagy in alcoholic liver disease,self-eating triggered by drinking).Clinics and research in hepatology and gastroenterology 39,S2-S6.

[0137] Le A,Ng A,Kwan T,Cusmano-Ozog K,Cowan TM. (2014) 用于通过液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 定量分析未衍生化氨基酸的迅速、灵敏方法 (A rapid,sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)).J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 944:166-174.

[0138] Mantena SK,King AL,Andringa KK,Eccleston HB和Bailey SM(2008) 酒精和肥胖诱导的脂肪性肝病的发病机制中的线粒体功能障碍和氧化应激 (Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-and obesity-induced fatty liver diseases).Free Radical Biology and Medicine 44:1259-1272.

[0139] Ni H-M,Du K,You M,Ding W-X(2013) FoxO3a在酒精诱导的自噬和肝毒性中的关键作用 (Critical role of FoxO3a in alcohol-induced autophagy and hepatotoxicity).Am J Pathol 183:1815-1825.

[0140] Pochareddy S,Edenberg HJ. (2012) 慢性酒精暴露改变了HepG2细胞中的基因表达 (Chronic alcohol exposure alters gene expression in HepG2 cells).Alcohol Clin Exp Res 36:1021-1033.

[0141] Tedesco L,Valerio A,Cervino C,Cardile A,Pagano C,Vettor R,Pasquali R,Carruba MO,Marsicano G,Lutz B,Pagotto U,和Nisoli E. (2008) 大麻素1型受体阻断在白色脂肪细胞中通过内皮型一氧化氮合酶表达促进线粒体生物发生 (Cannabinoid type 1receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes).Diabetes 57:2028-2036.

[0142] Thomes PG,Trambly CS,Fox HS,Tuma DJ,Donohue TM Jr(2015) 急性和慢性乙醇施用以不同方式调节肝自噬和转录因子EB (Acute and chronic ethanol administration differentially modulate hepatic autophagy and transcription factor EB).Alcohol Clin Exp Res 39:2354-2363.<https://doi.org/10.1111/acer.12904>.

[0143] Valerio A,D'Antona G,Nisoli E. (2011) 支链氨基酸、线粒体生物发生和健康跨度:演变观点 (Branched-chain amino acids,mitochondrial biogenesis,and healthspan:an evolutionary perspective).Aging 3:464-478.

[0144] Want EJ,Masson P,Michopoulos F,Wilson ID,Theodoridis G,Plumb RS,

Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. (2013) 通过UPLC-MS的动物和人组织的全局代谢谱分析 (Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS). Nat Protoc 8:17-32.

[0001]	序列表	
[0002]	<110> Professional Dietetics	
[0003]	<120> 用于治疗肝病的组合物	
[0004]	<130> BW021147	
[0005]	<160> 10	
[0006]	<170> BiSSAP 1.3.6	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 22	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
[0012]	<223> PGC1 α 正义5' - 3'	
[0013]	<400> 1	
[0014]	gaccccagag tcaccaaag ac	22
[0015]	<210> 2	
[0016]	<211> 22	
[0017]	<212> DNA	
[0018]	<213> 人工序列	
[0019]	<220>	
[0020]	<223> PGC1 α 反义5' - 3'	
[0021]	<400> 2	
[0022]	ttggttggt ttatgaggag ga	22
[0023]	<210> 3	
[0024]	<211> 18	
[0025]	<212> DNA	
[0026]	<213> 人工序列	
[0027]	<220>	
[0028]	<223> Tfam正义5' - 3'	
[0029]	<400> 3	
[0030]	agattggggt cgggtcac	18
[0031]	<210> 4	
[0032]	<211> 21	
[0033]	<212> DNA	
[0034]	<213> 人工序列	
[0035]	<220>	
[0036]	<223> Tfam反义5' - 3'	
[0037]	<400> 4	
[0038]	gacaacttgc caagacagat g	21

[0039]	<210> 5	
[0040]	<211> 20	
[0041]	<212> DNA	
[0042]	<213> 人工序列	
[0043]	<220>	
[0044]	<223> NRF1正义5' - 3'	
[0045]	<400> 5	
[0046]	actcgtgtgg gacagcaagc	20
[0047]	<210> 6	
[0048]	<211> 20	
[0049]	<212> DNA	
[0050]	<213> 人工序列	
[0051]	<220>	
[0052]	<223> NRF1反义5' - 3'	
[0053]	<400> 6	
[0054]	atggtgagag gcggcagttc	20
[0055]	<210> 7	
[0056]	<211> 21	
[0057]	<212> DNA	
[0058]	<213> 人工序列	
[0059]	<220>	
[0060]	<223> Cytc正义5'-3'	
[0061]	<400> 7	
[0062]	cgttgtgcca gcgactaaaa a	21
[0063]	<210> 8	
[0064]	<211> 18	
[0065]	<212> DNA	
[0066]	<213> 人工序列	
[0067]	<220>	
[0068]	<223> Cytc反义3'-5'	
[0069]	<400> 8	
[0070]	ttccgccc aa agagacca	18
[0071]	<210> 9	
[0072]	<211> 20	
[0073]	<212> DNA	
[0074]	<213> 人工序列	
[0075]	<220>	
[0076]	<223> TBP正义5'-3'	
[0077]	<400> 9	

[0078]	aggcaccaca gctcttccac	20
[0079]	<210> 10	
[0080]	<211> 20	
[0081]	<212> DNA	
[0082]	<213> 人工序列	
[0083]	<220>	
[0084]	<223> TBP反义5'-3'	
[0085]	<400> 10	
[0086]	cccagaactc tccgaagctg	20

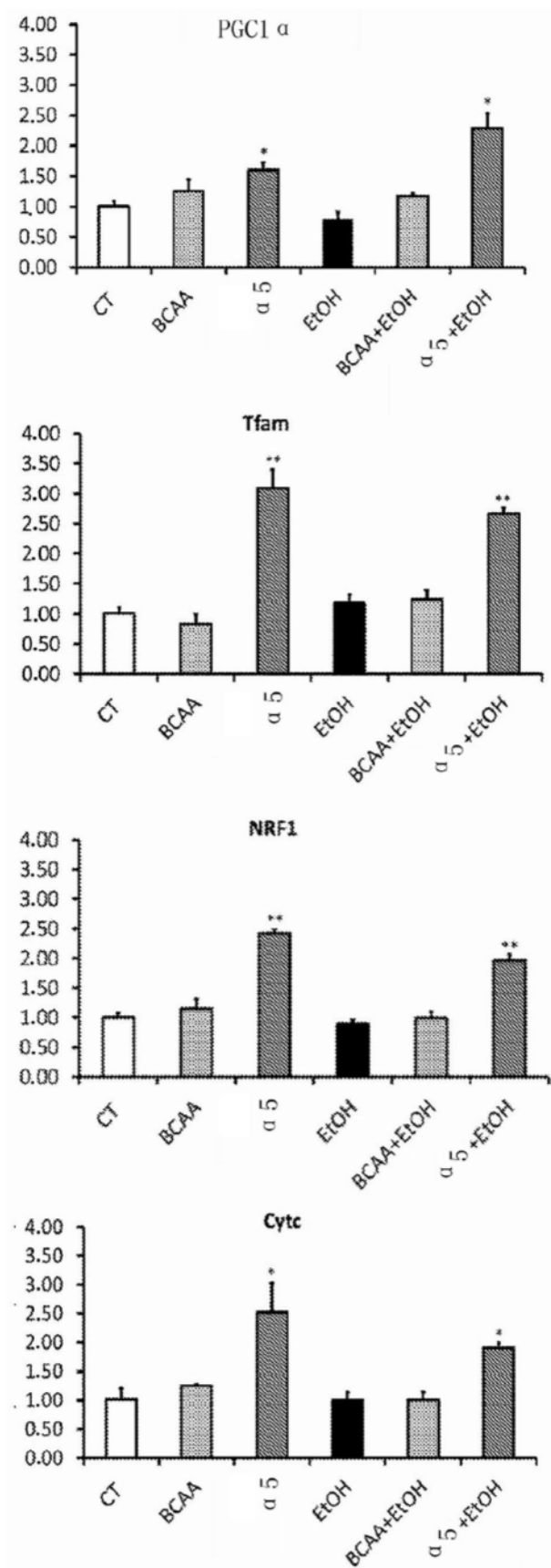


图1

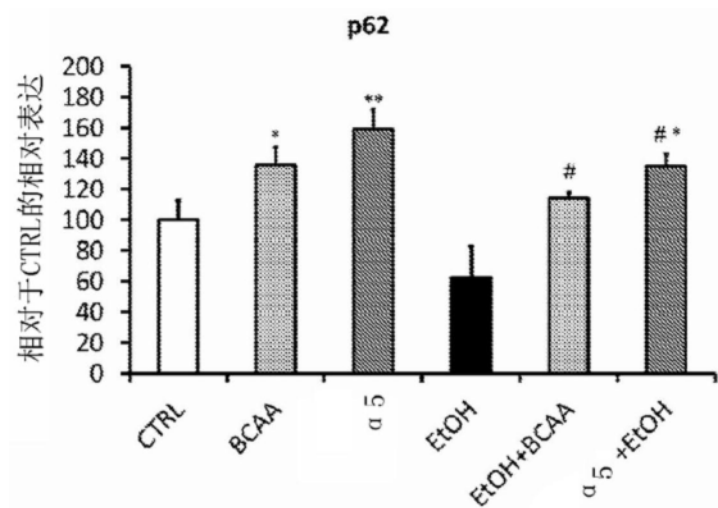


图2