



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039170 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280058728. 9

(22) 申请日 2012. 11. 28

(30) 优先权数据

11191182. 2 2011. 11. 29 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/073846 2012. 11. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/079536 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 荷兰联合利华有限公司

地址 荷兰鹿特丹

(72) 发明人 M. J. 贝里 H. F. J. 布利格

M. I. 福勒 K. J. 亨特 K. 马考利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 韦欣华 万雪松

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006. 01)

A23L 1/30 (2006. 01)

A23L 1/308 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书23页 附图8页

(54) 发明名称

旨在用于人食用的膳食

(57) 摘要

本发明涉及用于饮食健康管理的多种组合物及其在心血管疾病或2型糖尿病的预防或治疗中的用途,以及在肥胖的预防和/或管理中以及一般在体重管理和减轻中的用途。因此,提供了旨在用于人食用的膳食,该膳食包含:(a) 250-650千卡(1045-4180千焦);(b) 10-50,优选20-50,更优选30-50g纤维;(c) 10-50,优选10-30,更优选10-20g蛋白质;(d) 0-5,优选少于3g淀粉;和(e) 0-2,优选0-1,最优选0-0.5g乳糖;(f) 至少20,优选至少30,最优选至少40mg任何一种黄酮苷元;和(g) 至少30,优选至少40,最优选至少50mg任何一种黄酮糖苷;其中该膳食包含75-1000mg总黄酮苷元和黄酮糖苷,其中该膳食包含不多于250mg任何一种黄酮苷元,其中该膳食包含不多于250mg任何一种黄酮糖苷。

1. 旨在用于人食用的膳食,其包含:
  - (a) 250-650 千卡(1045-4180 千焦);
  - (b) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维;
  - (c) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质;
  - (d) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉;和
  - (e) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖;
  - (f) 至少 20, 优选至少 30, 最优选至少 40 mg 任何一种黄酮苷元;和
  - (g) 至少 30, 优选至少 40, 最优选至少 50 mg 任何一种黄酮糖苷;其中所述膳食包含 75-1000 mg 总黄酮苷元和黄酮糖苷, 其中所述膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮苷元, 其中所述膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮糖苷。
2. 旨在用于人食用的膳食,当所述膳食对 650 千卡的能量含量标准化时,所述膳食包含:
  - (a) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维;
  - (b) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质;
  - (c) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉;
  - (d) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖;
  - (e) 当以没食子酸当量(GAE)表示时,至少 450, 优选至少 500, 最优选至少 700 mg 黄酮苷元和黄酮糖苷;和
  - (f) 当以没食子酸当量(GAE)表示时,任选不多于 2000, 优选 1500 mg 黄酮苷元和黄酮糖苷。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的膳食,其中所述黄酮苷元包含至少 0.05, 优选至少 0.25, 更优选至少 0.5 mg 的至少一种花色素。
4. 前述权利要求中任一项的膳食,其包含由下述组成的组中的任一种:芹菜素、木犀草素、杨梅黄酮、槲皮素、矢车菊素-3-葡萄糖苷、锦葵色素-3-葡萄糖苷、天竺葵素-3-葡萄糖苷及其混合物。
5. 前述权利要求中任一项的膳食,其中能量密度是 0.25-1, 优选 0.35-0.85 千卡(4.18 千焦)/g 膳食。
6. 前述权利要求中任一项的膳食,其用作药物。
7. 权利要求 1-5 中任一项的膳食,其用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖;以及用于体重管理和体重减轻。
8. 权利要求 1-5 中任一项的膳食用于制造药物的用途,所述药物用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖;以及用于体重管理和体重减轻。
9. 用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖;以及用于体重管理和体重减轻的方法,所述方法包括给有此需要的个人施用权利要求 1-5 中任一项的膳食的步骤。
10. 权利要求 1-5 中任一项的膳食用于预防或治疗肥胖;以及用于体重管理和体重减轻的用途。

## 旨在用于人食用的膳食

[0001] 本发明涉及用于饮食健康管理的多种组合物及其在心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖的预防或治疗中的用途；以及在体重管理和体重减轻中的用途。

[0002] 与自从新石器时代变革以后在我们饮食中相对近期的、快速改变不同，人类进化一直是非常缓慢的过程，所述新石器时代变革标志着约 10,000 年前从狩猎采集者到农业生活方式的转变。此外，我们的基因组还没有来得及以相同步伐进化，并且因此假定我们的身体将对祖先石器时代(旧石器时代)的饮食更有效工作 Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (2002 年夏天))。

[0003] Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (2002 年夏天)) 公开了在下表 1 中再现的基于旧石器时代食物组的同时代晚餐。表 2 使用美国农业部国家营养数据库参考标准 (US Department of Agriculture National Nutrient Database for Standard Reference) 和 Phenol-Explorer 数据库 (<http://www.phenol-explorer.eu>) 概括其营养分析。

[0004] Cordain 阐明了典型的西方饮食和基于旧石器时代食物组的上述饮食之间的差异在于后者具有高得多的蛋白质水平。因为蛋白质具有脂肪或碳水化合物三倍的热效应和更大的饱腹感值，所以富含蛋白质的饮食对于体重控制或减轻可以是有效的。Cordain 随后参考已显示限制卡路里的富含蛋白质的饮食在降低超重个体中的体重方面比限制卡路里的富含碳水化合物的饮食更有效的临床研究。

[0005] Törrönen 等人 (British J. Nutrition, 1-7 (2011)) 公开了饮食多酚可能影响蔗糖代谢。Törrönen 等人还阐明许多多酚已在体外抑制  $\alpha$  葡萄糖苷酶活性或葡萄糖转运，并且在葡萄糖或蔗糖在动物中的口服施用后抑制升高的血糖水平。在他们的研究中，峰毛细血管和静脉血浆葡萄糖和胰岛素浓度在摄取基于天然糖膳食的混合浆果膳食(黑醋栗、越橘、酸果蔓和草莓)后较低。

[0006] Jew 等人 (J. Medicinal Food, 12 (5), 925-934 (2009)) 公开了从高水果、蔬菜、瘦肉和海鲜的饮食到高钠和氢化脂肪以及低纤维的加工食品的转变已发生。这些饮食改变已不利地影响已知与健康有关的饮食参数，导致肥胖和慢性病包括心血管疾病、糖尿病和癌症的增加。Jew 等人进一步在表 3 中公开了基于旧石器时代食物组的现代饮食的样品菜单。使用美国农业部国家营养数据库参考标准和 Phenol-Explorer 数据库 (<http://www.phenol-explorer.eu>) 的表 3 中公开的早餐、午餐和晚餐的营养分析提供了下表 2 中概括的信息。

[0007] 表 1: 公开于 Jew 等人 (J. Medicinal Food, 12 (5), 925-934 (2009)) 的表 3 中和部分公开于 Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (2002 年夏天)) 中的早餐、午餐和晚餐。

成分	重量 (克)
早餐	
哈密瓜	276
大西洋鲑鱼 (烘烤的)	333
午餐 (含核桃的蔬菜 沙拉)	
手撕生菜	68
切片胡萝卜	61
切片黄瓜	78
切成四块的番茄	246
柠檬汁调味料	31
核桃	11
烤瘦猪肉里脊	86
晚餐 (蔬菜鳄梨/杏仁 沙拉)	
手撕混合蔬菜	112
番茄	123
鳄梨	85
切片杏仁	45
切片红洋葱	29
柠檬汁调味料	31
清蒸西兰花	468
瘦牛肉牛上腰尖烤肉	235
甜点 (草莓)	130

[0008] 表 2:如公开且针对 650 千卡标准化的,公开于 Jew 等人(J. Medicinal Food,12 (5),925-934 (2009))的表 3 中和部分公开于 Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass.,5,3, 15-24 (2002 年夏天))中的早餐、午餐和晚餐的营养值。使用美国农业部国家营养数据库参考标准和 Phenol-Explorer 数据库(<http://www.phenol-explorer.eu>) 计算值。

营养指标	营养值					
	早餐		午餐		晚餐	
		针对650 千卡标准 化		针对650 千卡标准 化		针对650 千卡标准 化
卡路里 (千卡)	780	650	272	650	1332	650
纤维 (g)	2.5	2.1	7.3	17.4	38.0	21.8
蛋白质 (g)	75.9	63.3	23.9	57.1	91.0	52.3
淀粉 (g)	0.1	0.1	1.5	3.6	0.7	0.4
乳糖 (g)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
黄酮苷元 (mg)	0.00	0.00	0.03	0.07	24.3	14.0
黄酮糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.59	1.41	82.0	47.1
花色素 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	6.22	3.57
矢车菊素(mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65	0.37
飞燕草色素 (Delphinidin)(mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
表儿茶素 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.603	0.346

山奈酚 (mg)	0.00	0.00	0.02	0.05	0.014	0.008
天竺葵素 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	5.57	3.20
槲皮素 (mg)	0.00	0.00	0.01	0.02	0.0139	0.00798 1
矢车菊素-3- 葡萄糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	3.76	2.16
天竺葵素-3- 葡萄糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	60.9	35.0
槲皮素-3,4- 二葡萄糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.897	0.515
槲皮素-3- 葡萄糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.25	0.60	8.42	4.83
槲皮素-4- 葡萄糖苷 (mg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.665	0.382
碳水化合物 (g)	24.3	20.3	25.6	61.2	113.0	64.9
能量密度 (千卡/g)	1.28	1.28	0.47	0.47	1.06	1.06

[0009] 针对每餐 650 千卡标准化,与本发明的膳食相比较,膳食是相对低纤维和类黄酮以及高蛋白质的。碳水化合物水平一般是可比较的。根据 Phenol Explorer 数据库中可获得的数据,黄酮苷元、葡萄糖苷和花色素看起来在早餐中很大程度上不存在,在午餐中低,但在晚餐中是适度高的。

[0010] Frassetto 等人(Eur. J. Clinical Nut.,63,947-955 (2009))公开了调查与由人类的农业社会前的狩猎采集者祖先食用的饮食相似的饮食是否赋予健康益处的研究。结果显示在健康久坐不动的人类中改善的动脉血压和葡萄糖耐受,减少的胰岛素分泌和增加的胰岛素敏感度,以及改善的脂质概况,而没有体重减轻。表 2 描述了在每天基础上给予测试组的膳食,但细节不足以重现。

[0011] Jonsson 等人(Cardiovascular Diabetology,8:35 (2009))公开了在未用胰岛素治疗的患有 2 型糖尿病的患者中旧石器时代和糖尿病饮食对心血管疾病危险因素的作用的研究。结果显示与患有 2 型糖尿病的患者中的糖尿病饮食相比较,旧石器时代饮食改善了血糖控制(glyceamic control)和几种心血管疾病危险因素。表 5 描述了由测试组每天进食的平均食物量,但细节不足以重现各个膳食。

[0012] Jonsson 等人(Nutrition and Metabolism,7:85 (2010))报道了与地中海饮食相比较,旧石器时代饮食对患有缺血性心脏病的患者对饱腹感的作用的研究结果。观察到旧石器时代饮食每卡路里比地中海饮食更多饱腹感。表 2 描述了在每天基础上给予测试组的

食物,但细节不足以重现各个膳食。

[0013] Lindeberg 等人(Diabetologica,50:1795-1807 (2007))描述了旧石器时代饮食和地中海饮食对患有缺血性心脏病加上葡萄糖耐受不良或 2 型糖尿病的患者们的比较研究。结论是旧石器时代饮食可改进葡萄糖耐受,不依赖于缩小的腰围。表 5 描述了平均的每天饮食组成,但细节不足以重现各个膳食。

[0014] Jew 等人已公开了旧石器时代饮食富含植物。然而,本发明人也已建立理论:在旧石器时代时期,植物自身会在营养上不同。具体地,它们会含有比现代作物更多的类黄酮和纤维。这是因为许多现代作物中的类黄酮和纤维含量已通过旨在改变风味和质地的育种程序降低(一些类黄酮尝起来很苦;一些纤维是“长丝状的(stringy)”)。因此,本发明人已选择已知相对高类黄酮和纤维的现代作物用于本专利中公开的膳食。因此设计的所得到的膳食的营养含量因而将更接近于人类已进化以食用的旧石器时代营养,且因此与人体生理学更相容,并且因此将递送如实例中举例说明的健康益处。存在提供具有改进健康和辅助益处的膳食的持续努力。

#### [0015] 发明概述

在本发明的第一个方面,提供了旨在用于人食用的膳食,该膳食包含:

- (a) 250-650 千卡(1045-4180 千焦);
  - (b) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维;
  - (c) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质;
  - (d) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉;和
  - (e) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖;
  - (f) 至少 20, 优选至少 30, 最优选至少 40 mg 任何一种黄酮苷元;和
  - (g) 至少 30, 优选至少 40, 最优选至少 50 mg 任何一种黄酮糖苷;
- 其中该膳食包含 75-1000 mg 总黄酮苷元和黄酮糖苷,  
其中该膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮苷元,  
其中该膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮糖苷。

[0016] 术语“膳食”意指完整(包括甜点的所有菜)早晨、午餐或晚餐,不包括饮料。

[0017] 在本发明的第二个方面,提供了旨在用于人食用的膳食,当该膳食具有 650 千卡的能量含量时,该膳食包含:

- (a) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维;
- (b) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质;
- (c) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉;
- (d) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖;
- (e) 当以没食子酸当量(GAE)表示时,至少 450, 优选至少 500, 最优选至少 700 mg 黄酮苷元和 / 或黄酮糖苷;和
- (f) 当以没食子酸当量(GAE)表示时,任选不多于 2000, 优选 1500 mg 黄酮苷元和 / 或黄酮糖苷。

[0018] 在本发明的第三个方面,提供了用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖的方法;以及用于体重管理和体重减轻的方法,该方法包括给有此需要的个人施用本发明的第一个方面的膳食的步骤。

**[0019] 附图简述**

本发明参考下述附图得到例证,所述附图显示于:

图 1 对于 0-2 小时作为浓度相对于时间曲线下的净增量面积(分钟·uIU/L)的静脉血浆胰岛素结果。该图左侧上的柱状图描述平均值  $\pm$  平均值的标准误差,右侧的柱显示与参考膳食相比较的改变(分钟·uIU/L)和  $\pm$  平均值的标准误差。数据基于如分别得自 PAL1、PAL2 和参考膳食的 18、20 和 20 胰岛素曲线;

图 2 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间从基线的静脉血浆胰岛素改变( $\mu$ IU/L);

图 3 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间从基线的静脉血浆葡萄糖改变(mmol/L);

图 4 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间从基线的 PYY 血浆水平(pmol/ml)改变;

图 5 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间从基线的 GLP-1 血浆水平(pmol/ml)改变;

图 6 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间从基线的 GIP 血浆水平(pmol/ml)改变;

图 7 在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间的“饥饿”、“吃饱(fullness)”和“想吃”(%)的平均自我评估得分;

图 8 表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的,由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 GPR14 受体的活化(40  $\mu$ g/ml 含水甲醇萃取物、8  $\mu$ g/ml 石油醚萃取物、8  $\mu$ g/ml 二氯甲烷萃取物、4  $\mu$ g/ml 乙酸乙酯萃取物、40  $\mu$ g/ml 1-丁醇萃取物和 40  $\mu$ g/ml 水萃取物);

图 9 表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的,由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 M1 毒蕈碱受体的活化(40  $\mu$ g/ml 含水甲醇萃取物、8  $\mu$ g/ml 石油醚萃取物、8  $\mu$ g/ml 二氯甲烷萃取物、4  $\mu$ g/ml 乙酸乙酯萃取物、40  $\mu$ g/ml 1-丁醇萃取物和 40  $\mu$ g/ml 水萃取物);

图 10 表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的,由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 M3 毒蕈碱受体的活化(40  $\mu$ g/ml 含水甲醇萃取物、8  $\mu$ g/ml 石油醚萃取物、8  $\mu$ g/ml 二氯甲烷萃取物、4  $\mu$ g/ml 乙酸乙酯萃取物、40  $\mu$ g/ml 1-丁醇萃取物和 40  $\mu$ g/ml 水萃取物);和

图 11 表示为相对于媒介物对照的百分比,由参考、PAL 2 和 Jew 等人晚餐的二氯甲烷萃取物(75  $\mu$ g/ml)的葡萄糖转运抑制。

**[0020] 发明详述**

在本发明的第一个方面,提供了旨在用于人食用的膳食,提议了包含下述的膳食:

- (a) 250-650 千卡(1045-4180 千焦);
- (b) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维;
- (c) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质;
- (d) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉;和
- (e) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖;

(f) 至少 20, 优选至少 30, 最优选至少 40 mg 任何一种黄酮苷元 ; 和

(g) 至少 30, 优选至少 40, 最优选至少 50 mg 任何一种黄酮糖苷 ;

其中该膳食包含 75-1000 mg 总黄酮苷元和黄酮糖苷,

其中该膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮苷元,

其中该膳食包含不多于 250 mg 任何一种黄酮糖苷。纤维上限受超过要求保护水平的肠不适风险限制。总黄酮苷元和黄酮糖苷的上限受掩蔽与黄酮苷元和黄酮糖苷相关的增加苦味的需要限制。

[0021] 在本发明的第二个方面, 提供了旨在用于人食用的膳食, 当该膳食针对 650 千卡的能量含量标准化时, 该膳食包含 :

(a) 10-50, 优选 20-50, 更优选 30-50 g 纤维 ;

(b) 10-50, 优选 10-30, 更优选 10-20 g 蛋白质 ;

(c) 0-5, 优选少于 3 g 淀粉 ;

(d) 0-2, 优选 0-1, 最优选 0-0.5 g 乳糖 ;

(e) 当以没食子酸当量(GAE)表示时, 至少 450, 优选至少 500, 最优选至少 700 mg 黄酮苷元和 / 或黄酮糖苷 ; 和

(f) 当以没食子酸当量(GAE)表示时, 任选不多于 2000, 优选 1500 mg 黄酮苷元和 / 或黄酮糖苷。

[0022] 因此, 在本发明的第二个方面, 仅当膳食针对 650 千卡的能量含量标准化时, 本发明以具有营养水平的膳食的方式来表示。因此, 权利要求的范围包括具有大于或小于 650 千卡的能量含量的膳食, 但当针对 650 千卡标准化时, 具有如功能特点(a)至(f)中所示的营养水平。

[0023] 已观察到饱腹感水平对于要求保护的膳食超过基于世界卫生组织(WHO) 饮食指南(WHO 技术报告序列号 916 “Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases” (2003)) 的参考膳食改善得多。令人惊讶的是这甚至在参考膳食中可见的蛋白质水平上实现, 即比基于旧石器时代饮食原则的膳食, 例如在之前 Cordain 和 Jew 等人中描述的膳食中可见的水平低得多。蛋白质一般由肉类提供。家畜需要显著资源, 并且因此具有较低蛋白质水平的膳食的一个优点在于它的环境可持续性更好。蛋白质还可以由大豆提供, 但这不能在全世界的所有地区生长。另一个出乎意料的结果是 : 在对于给定水平的总碳水化合物的峰葡萄糖水平没有降低的情况下, 在要求保护的膳食中高水平的黄酮(苷元和糖苷) 导致峰胰岛素水平降低。餐后胰岛素峰与增加的 2 型糖尿病和心血管疾病的风险相关。因此, 看起来要求保护的饮食提供对这样的膳食的方法, 所述膳食导致更低的餐后胰岛素峰, 具有在蛋白质和碳水化合物之间更平衡的卡路里摄取, 而不是先前用基于旧石器时代饮食原则的膳食(例如 Cordain) 观察到的具有升高蛋白质水平的膳食。

[0024] 优选地, 本发明的第二个方面的膳食的含水甲醇萃取物的石油醚(40-60°C) 萃取物具有 5-40, 优选 15-30, 更优选 20-30 mg 的没食子酸当量,

其中在含水甲醇萃取物的石油醚(40-60°C) 萃取后的含水甲醇萃取物的二氯甲烷萃取物具有 5-25, 优选 10-20, 更优选 13-18 mg 的没食子酸当量,

其中在连续石油醚(40-60°C) 和二氯甲烷萃取后的含水甲醇萃取物的乙酸乙酯萃取物具有 20-40, 优选 25-35 mg 的没食子酸当量,

其中在连续石油醚(40-60℃)、二氯甲烷和乙酸乙酯萃取后的含水甲醇萃取物的 1-丁醇萃取物具有 100-400, 优选 150-350, 最优选 200-300 mg 的没食子酸当量, 和

其中在连续石油醚(40-60℃)、二氯甲烷、乙酸乙酯和 1-丁醇萃取后的含水甲醇萃取物的水萃取物具有 400-1200, 优选 600-1000, 最优选 700-900 mg 的没食子酸当量。

[0025] 优选地, 本发明的第一个或第二个方面的黄酮苷元包含至少 0.05, 优选至少 0.25, 更优选至少 0.5 mg 的至少一种花色素。特别地, 膳食可以包含下述中的任何一种: 芹菜素、木犀草素、杨梅黄酮、槲皮素、矢车菊素-3-葡萄糖苷、锦葵色素-3-葡萄糖苷、天竺葵素-3-葡萄糖苷及其混合物。

[0026] 0.25-1 千卡(4.18 千焦)/g 膳食的能量密度已观察到对于解决饱腹感是特别有利的, 并且因此具有在肥胖预防或治疗、体重管理和体重减轻中的价值。

[0027] 在本发明的另一个方面, 要求保护的膳食可以用作药物, 特别用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖; 以及用于体重管理和体重减轻中。

[0028] 或者, 本发明的另一个方面是要求保护的膳食用于制造药物的用途, 所述药物用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖; 以及用于体重管理和体重减轻。

[0029] 本发明的进一步方面是用于预防或治疗心血管疾病、2 型糖尿病和肥胖的方法; 以及用于体重管理和体重减轻的方法, 该方法包括给有此需要的个人施用要求保护的膳食的步骤。

[0030] 本发明的再进一步方面是要求保护的膳食用于预防或治疗肥胖的用途; 以及用于体重管理和体重减轻的用途。

[0031] 下文描述了这样的研究, 其显示与根据 WHO 饮食建议构建的膳食(参考膳食)相比较, 旧石器时代型膳食(PAL1 和 PAL2)的餐后和健康益处。三种测试膳食标准化为含有 50 克可利用的碳水化合物。两种膳食是旧石器时代型膳食, 并且第三种是基于 WHO 指南的膳食。所有膳食均作为早餐食用。

[0032] 参考膳食基于 WHO 关于蛋白质、脂肪和碳水化合物的饮食指南, 并且包含日常“现代”成分例如白米。现代、更多加工的饮食已排除被认为维持健康和刺激活力的许多植物化学物(phytochemicals)。存在这样的加工食品的趋势, 所述加工食品具有由精制成分(特别是淀粉)制成的制造结构组成, 并且是高单糖而不含相关纤维和植物化学物的。旧石器时代膳食 1 (PAL 1) 基于对于狩猎采集者典型的蛋白质、脂肪和碳水化合物的估计比, 并且不由在旧石器时代时期无法获得的成分制备(例如无谷类、无乳制品)。该膳食包括大量水果和蔬菜, 高比例的蛋白质和脂肪, 但极低水平的淀粉。旧石器时代膳食 2 (PAL 2) 基于 WHO 关于蛋白质、脂肪和碳水化合物的饮食指南, 但也不由在旧石器时代时期无法获得的成分制备(例如 PAL 2 不包括谷类或乳制品)。PAL 2 还包括与 PAL 1 相似水平的水果和蔬菜。

[0033] 实施例 1

#### 1.1 膳食的制备

表 3 中概况的三种膳食如下文描述的进行制备。

[0034] 表 3: 膳食的描述。

	单位	参考	PAL 1	PAL 2
大米, 白色, 长粒, 普通的, 煮熟的	g	90	-	-
草莓, 生的	g	-	100	120
苹果, 生的, 带皮	g	-	110	110
辣椒, 甜的, 黄色, 生的	g	-	100	100
鱼, 黑线鳕, 煮熟的, 干热	g	-	90	-
洋葱, 甜的, 生的	g	-	60	60
芒果, 冷冻的	g	65	-	-
胡萝卜, 烹制的, 煮的, 沥干, 无盐	g	50	-	-
茄子, 生的	g	-	50	50
蘑菇, 白色, 生的	g	-	50	50
鱼, 三文鱼, 大西洋的, 养殖的, 烹制的, 干热	g	39	39	39
葡萄干, 无籽的	g	-	25	25
坚果, 杏仁, 脱皮的	g	-	14	-
油, 橄榄油, 色拉油或烹调油	g	4	-	-
小胡瓜	g	-	150	150
肉桂	g	-	5	5
刺山柑	g	-	5	5
亚麻籽油	g	-	4	4
所列成分的总重量	g	248	802	732

#### [0035] 1.1.1 鱼的制备

将整侧三文鱼包裹在箔中在 200 摄氏度下烘烤 40 分钟, 直至熟透。这将定义为肉很容易剥离且不再半透明时。在分成在清洁包装(有时已含有胡萝卜(R3))中的 39 克份(R2)之前, 粉红色的肉随后去皮并剥落, 并且在工作台上冷却。各个份随后在 -28 摄氏度下急速冷冻至少 2 小时, 直至冻实, 并且随后贮存于 -20 摄氏度下直至研究当天。

[0036] 将黑线鳕的片包裹在箔中且在 200 摄氏度下烘烤 30 分钟直至熟透。肉随后去除任何皮, 并分成在清洁包装中的 90 克份, 并且加入已含有三文鱼(R1)的盒中, 并且在工作台上冷却。各个份随后在 -28 摄氏度下急速冷冻至少 2 小时, 直至冻实, 并且贮存于 -20 摄氏度下直至研究当天。

#### [0037] 1.1.2 参考膳食的制备

将胡萝卜去皮且剁碎成 1 cm 切片, 并且在水中煮沸 10 分钟直至煮熟。煮熟的胡萝卜随后冷却并连同三文鱼一起作为各个份称出到如上的清洁包装内用于 R3 样品。将 4 克橄榄油也加入这些包装中, 所述包装随后在速冻冷柜中在 -28 摄氏度下冷冻至少 2 小时, 直至冻实, 并且贮存于 -20 摄氏度下直至研究当天。购买冷冻的芒果并且份根据需要在研究前夜在 4 摄氏度下解冻并且低温供应。

[0038] 研究前夜, 将所需量的芒果、三文鱼和胡萝卜(R3)在冰箱中在不多于 4 摄氏度下解冻过夜。在研究早晨, 将解冻的三文鱼和胡萝卜部分在相同包装中在 800 W 微波中微波 3 分钟(如通过温度探头测量的, 在中央 75 摄氏度)。在研究当天, 使用 350 ml 水与 265 克(2 杯)干米将米煮熟。米饭趁热并在煮熟 30 分钟内供应。将冷芒果置于盘上, 并且加入 90 克新鲜煮熟的米饭。

#### [0039] 1.1.3 旧石器时代(PAL)膳食的制备

将洋葱去皮,去除辣椒的心,并且去除茄子和小胡瓜的蒂,并且将苹果去核,但不去皮。去除草莓的绿叶。刺山柑用水洗涤,以去除贮存液。将所有蔬菜/水果/杏仁均沿一个长度剁碎成至少 1 cm 的大块。一旦剁碎,就称出每份的量,使得所有各个膳食均可分开烹制。将一份的油、肉桂和刺山柑加入平底锅中,并且加入剩余剁碎、称重的蔬菜/水果/杏仁。所有成分均在高热下烹制 15-20 分钟直至熟透。每个单独的份随后置于清洁未用过的可微波包装中,覆盖且在室温下冷却不多于 90 分钟。各个包装随后在 90 分钟内置于在 -28 摄氏度下的速冻冷柜中,并且放置过夜。将包装贮存于 -20 摄氏度下直至研究当天。

[0040] 研究前夜,从冷柜中取出所需翻炒蔬菜混合物(P1 和 P2)和鱼部分(R1 和 R2),并且冰箱中在不多于 4 摄氏度下放置过夜。在研究当天,从冰箱中取出一份蔬菜混合物(P1 和 P2)和一份所需的每种鱼(R2 或 R1),并且将适当的鱼部分混合到蔬菜混合物内。随后将混合物在 800 W 微波中完全(on full)微波 3 分钟,搅拌且随后完全微波另外 3 分钟。核心温度使用温度探头确定为在中心 75 摄氏度。

#### [0041] 1.2 膳食的化学分析

每一整天的膳食在液氮中冷冻,冷冻干燥,在匀浆器中磨碎,并且在氮气下贮存于 -70 摄氏度。膳食的测定在下文描述。

##### [0042] 1.2.1 各种类黄酮测定

通过 Meyer, M. D 等人(J. Agric. Food Chem., 56, 7439-7445 (2008)) 的方法从冷冻干燥的磨碎的食品中去除脂质,并且对于类黄酮如 Downes, K 等人(Postharvest Biol. Technol., 54, 80-86 (2009)) 中详述的,并且对于花色素如 Giné Bordonaba, J 等人(J. Agric. Food Chem., 56, 7422-7430 (2008)) 中详述的,通过 HPLC 测定萃取的类黄酮(flavonoids),进行芹菜素、矢车菊素-3-葡萄糖苷、飞燕草色素-3-葡萄糖苷、橙皮素、山奈酚、木犀草素、锦葵色素-3-葡萄糖苷、杨梅黄酮、柚皮素、天竺葵素-3-葡萄糖苷和槲皮素的测定。通过参考已知标准的二极管阵列检测组分且以 mg. 膳食<sup>-1</sup> 的单位表示。

[0043] 在冷冻干燥的食品的乙醇萃取后,进行飞燕草色素、表儿茶素、木犀草素-7-0-葡萄糖苷、根皮素、根皮苷和槲皮素-3-0-葡萄糖苷的测定。简言之,在室温下伴随搅拌,在含有 5 g/L 抗坏血酸的 200 ml 70% 含水乙醇中萃取 20 g 冷冻干燥的食品 2 小时。将悬浮液过滤,滤器用进一步的 50 ml 含有抗坏血酸的含水乙醇洗涤,将滤液合并并且通过在 40 摄氏度下的旋转蒸发去除乙醇。溶液用水补足至 100 ml,并且将 pH 调整至 7.0。使溶液经过 50 ml Amberchrom CG300C 柱,用 500 ml 水(pH 7.0)洗涤,并且用 750 ml 无水乙醇洗脱类黄酮。通过旋转蒸发干燥洗脱液,以去除乙醇,并且通过冷冻干燥去除残留水。使用液相层析-质谱法(LC-MS) 伴随使用已知标准品的负离子电喷射 MS 检测和定量来分析萃取物。值为并以 mg. 膳食<sup>-1</sup> 的单位表示。

##### [0044] 1.2.2 糖测定

将糖用水萃取,澄清且在具有乙腈/水流动相的胺柱上层析分离。使用蒸发光散射检测器来检测糖,并且参考校准标准品进行定量。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup>。

##### [0045] 1.2.3 淀粉测定

该方法由两次分开测定组成。样品用加温的稀盐酸处理,澄清且过滤;测定所得到的溶液的旋光。在第二测定中,样品用 40% 含水乙醇萃取且过滤。滤液用盐酸酸化,澄清且再次过滤;在 20 ± 2 摄氏度下测定所得到的溶液的旋光。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup>。

**[0046] 1.2.4 蛋白质**

使用 Kjeldahl 程序测定蛋白质。简言之,样品用浓硫酸和硫酸钾的混合物进行消化,使用硫酸铜(II)作为催化剂,将存在的有机氮转变为硫酸铵。过量氢氧化钠自动加入冷却的消化物中,以从硫酸铵中释放氨。氨自动蒸馏到过量的自动分配的指示剂硼酸溶液内,随后用标准硫酸溶液自动滴定。由产生的氨量计算样品的氮含量。使用 6.25 的换算因子测定蛋白质含量。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup>。

**[0047] 1.2.5 总脂肪和脂肪酸**

样品用盐酸酸水解,冷却,过滤且干燥。用石油醚从残余物中萃取脂肪,并且比重测定干燥脂肪。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup>。

**[0048]** 用溶剂萃取样品的脂质级分。将分离的脂肪用甲醇钠的甲醇溶液(methanolic sodium methoxide)进行酯交换,以形成脂肪酸甲酯(FAME)。使用毛细血管气相层析(GC)测定 FAME 概况。参考校准标准品实现测试材料中各种 FAME 的定量和鉴定。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup>。

**[0049] 1.2.6 纤维测定**

使用 AOAC 程序测定纤维。简言之,将样品称重且脱脂肪。随后将它凝胶化且用  $\alpha$ -淀粉酶处理,并且进一步用蛋白酶和淀粉葡萄糖苷酶酶促消化,以去除淀粉和蛋白质。将悬浮液过滤以取出不溶性纤维,将所述不溶性纤维洗涤、干燥且称重。随后比重测定不溶性纤维且就蛋白质和灰分进行校正。滤液中剩余的可溶性纤维随后用乙醇沉淀,过滤,洗涤,干燥且称重。随后比重测定可溶性纤维且就蛋白质和灰分进行校正。在去除不溶性纤维前,通过沉淀可溶性纤维测定总膳食纤维,其中将所得的沉淀物洗涤,干燥且称重。随后比重测定总膳食纤维且就蛋白质和灰分进行校正。值表示为 g. 膳食<sup>-1</sup> 的单位。

**[0050] 1.2.7 钠**

使用电感耦合等离子体分光光度法测定钠,并且值表示为 mg. 膳食<sup>-1</sup>。

**[0051] 1.2.8 结果**

表 4 概括了化学分析的结果。

**[0052]** 表 4 :膳食的化学分析。

组分	单位	参考	PAL1	PAL2
不溶性纤维	g. 膳食 <sup>-1</sup>	1.42	11.7	12.5
可溶性纤维	g. 膳食 <sup>-1</sup>	1.57	3.1	5.9
总纤维	g. 膳食 <sup>-1</sup>	2.99	14.8	17.7
果糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	2.07	21.9	22.8
葡萄糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	0.689	15.7	14.3
乳糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd
麦芽糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd
蔗糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	5.58	3.86	3.51
总糖	g. 膳食 <sup>-1</sup>	8.34	41.5	40.6
淀粉	g. 膳食 <sup>-1</sup>	41.5	nd	nd
总碳水化合物 (测定的) <sup>a</sup>	g. 膳食 <sup>-1</sup>	49.8	41.5	40.6
蛋白质	g. 膳食 <sup>-1</sup>	12.1	37.3	17.9

能量 (计算的)	kcal. 膳食 <sup>-1</sup>	331	553	378
钠	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	57.8	278	96
单不饱和脂肪酸	g. 膳食 <sup>-1</sup>	5.03	7.51	4.72
多不饱和脂肪酸	g. 膳食 <sup>-1</sup>	1.65	3.74	7.09
饱和脂肪酸	g. 膳食 <sup>-1</sup>	1.53	1.96	2.47
反式脂肪酸	g. 膳食 <sup>-1</sup>	0.009	< 0.14	< 0.11
总脂肪	g. 膳食 <sup>-1</sup>	9.04	14.0	15.4
Ω-3/Ω-6 <sup>b</sup>	比	1.22	0.61	2.18
芹菜素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	20.7	24.4
飞燕草色素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.0697	0.0718	n.a.
表儿茶素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	2.53	n.a.
橙皮素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	0.000	0.000
山奈酚	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	1.89	2.46
木犀草素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	12.7	22.5
杨梅黄酮	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	2.86	3.90
柚皮素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	0.000	0.000
根皮素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.00267	0.000	n.a.
根皮苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	1.33	n.a.
槲皮素	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	4.11	6.92
‘总’黄酮苷元	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	≥ 0.0697	≥ 44.9	≥ 60.2
矢车菊素-3-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	16.7	21.9
飞燕草色素-3-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000	0.000	0.000
木犀草素-7-O-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.000945	0.000	n.a.
锦葵色素-3-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.904	33.6	62.9
天竺葵素-3-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.566	34.6	61.4
槲皮素-3-O-葡萄糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	0.0165	1.16	n.a.
‘总’黄酮糖苷	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	≥ 1.49	≥ 86.1	≥ 146
‘总’类黄酮	mg. 膳食 <sup>-1</sup>	≥ 1.56	≥ 131	> 206

n. a. 未分析

nd 无法检测

‘总’分析的黄酮类化合物总和。根皮苷和根皮素未计算为类黄酮。

<sup>a</sup> 总碳水化合物是淀粉和总糖的总和

<sup>b</sup> 由脂肪酸测定计算。

### [0053] 1.3 临床测试

进行完全随机化交叉研究,其中二十四名男性个体食用三种测试膳食,在每次测试之间具有两周间歇期。个体用于各6个个体的四组中。两组每周参加,共六周,在探视之间具有至少两周恢复期。在6个个体的每组内使用随机化 Williams 设计来决定膳食食用的次序。因此,在每组内,2名个体在3次探视每一次时测试每类膳食,其中每次探视个体测试不同膳食。在测量第一天前退出的个体替换为预备志愿者,其接受与退出的个体相同的参数

组合。在接受至少一种研究产品后撤出研究的个体未进行替换。

#### [0054] 1.3.1 研究群体

在当地招募二十四名看起来健康的男性个体(+ 4 名预备), 年龄 18-60 岁, 具有 18-27 kg/m<sup>2</sup> 的体重指数(BMI, 计算为体重 / 身高<sup>2</sup>)。另外的入选 / 淘汰标准在下文阐述。

#### [0055] 入选标准

(a) 报告的饮食习惯: 无医学上规定的饮食, 无减肥饮食, 习惯于每天食用 3 餐, 无素食者。

(b) 报告的剧烈体育活动不多于 10 小时 / 周。

(c) 报告的饮酒不多于 21 单位 / 周。

(d) 目前不吸烟且成为非吸烟者共至少六个月, 并且未报告在研究前六个月内和在研究自身过程中使用任何含尼古丁产品。

(e) 在当地标准参考值内的空腹毛细血管血糖值(通常为由 YSI 2300 Stat Plus Glucose and Lactate Analyzer 测量的 3.5-6.5 mmol/L)。

(f) 在研究前检查之前 1 个月或在研究过程中未献血。

#### [0056] 淘汰标准

(a) 使用干扰研究测量的药物(如由研究医生判断的)。

(b) 不喜欢测试膳食, 对测试膳食过敏或厌恶。

(c) 报告的在研究前的最后六个月内的体重减轻 / 增加(多于 10%)。

(d) 报告的在研究开始前 3 个月参加另一项生物医学研究。

(e) 报告的在研究前调查之前两周或在研究过程中参加夜班工作。夜间工作定义为在午夜至 6.00 AM 之间工作。

#### [0057] 1.3.2 测试方案

志愿者得到指示使其通常生活方式的改变降到最低, 并且在测试前 24 小时过程中避免高强度体力活动和饮酒。他们被要求记录其在第一次测试前 12 小时过程中的饮食摄取, 并且在每次后续测试前重复相同饮食摄取。个体被要求从 8 PM 禁食到第二天早晨, 并且仅允许喝水。志愿者在开始测试前至少 30 分钟到达测试设施, 始终使用相同交通方式。

[0058] 参加者在 8.00 至 8.30am 之间到达测试设施。收集手指刺孔血样, 以确保每名个体是空腹的。如果使用血糖仪测量的血糖水平超过 7 mmol/L, 则该个体不允许在该次参加研究。在两个单独的手指刺孔上获得两份空腹毛细血管葡萄糖样品(T-15), 随后为空腹静脉血液样品(T-10)。在食用测试膳食之前五分钟(T-5), 参加者完成基线饱腹感评分。其后, 他们在 T0 时接受测试膳食, 并且在 10 分钟内伴随 250 ml 水将其完全食用。在测试膳食摄取后后续每一小时允许个体饮用 150 ml 水。记录第一次探视每小时过程中饮用的水体积, 并且志愿者要求在后续探视过程中重复。不允许志愿者进食或饮用其他任何东西。

[0059] 食用后立即和其后以定期间隔, 完成关于饱腹感的问卷。还获得定期静脉血样。

[0060] 在干预前一晚时志愿者对饮食限制的顺应性是有限的。24 名个体中的三名退出, 并且来自另外 3 名个体的数据必须从每一方案(per protocol)分析(PP)中排除, 因为他们不能完成至少一餐。志愿者具有食用膳食的问题, 并且在 11 次干预过程中, 志愿者需要多于 15 分钟来吃完所有食物(最多 28 分钟)。

#### [0061] 1.3.3 样品收集

在三次干预每一次的过程中,收集 16 份静脉血样:3-5ml 的 8 份样品进入含有乙二胺四乙酸(EDTA)(胃肠激素)的管内和 3-5ml 的 8 份样品进入含有肝素(胰岛素)的管内,高度硫酸化的糖胺聚糖广泛用作可注射抗凝血剂。在收集后立即将所有血样管均置于冰水中。向 EDTA 血样中加入以 1% 体积 / 体积的蛋白酶抑制剂混合物(Set III ;EMD Chemical),并且通过倒转将管轻轻混合。

[0062] 血样在 4 摄氏度下离心,并且两份多于 500  $\mu$ l 的 EDTA 血浆样品和两份多于 500  $\mu$ l 的肝素血浆样品冷冻且贮藏于 -70 摄氏度下,直至分析时。

[0063] 1.3.4 测定和问卷

静脉血浆葡萄糖分析在 Horiba ABX Clinical Chemistry 分析仪上进行,使用来自 ABX Pentra 的商购可得的 Glucose PAP CP 试剂盒(参考 A11A01668)。

[0064] 基于固相酶标记化学发光免疫测定,使用 IMMULITE 2000 Systems 分析仪进行血浆胰岛素分析,需要 100  $\mu$ l 肝素化血浆。它的可报告范围为 2-300  $\mu$  IU/ml,并且分析灵敏度为 2  $\mu$  IU/ml。

[0065] 使用由 Millipore 制造且在 Luminex® xMAP® 平台上运行的 MILLIPEX MAP Human Gut Hormone Panel 产品号 HGT-68K,对静脉血浆进行肽 YY (PYY)、胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 和抑胃多肽(GIP) 胃肠激素的分析。这是用于测量人血浆中的胃饥饿素(Ghrelin)、瘦素(Leptin)、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)、胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1)、胰淀素(Amylin) (有活性的和总的)、胰多肽(PP)、肽 YY (PYY)和胰岛素的多重免疫测定阵列试剂盒。

[0066] 饱腹感的分级(你有多饿、你有多饱和你想吃的欲望有多强)使用可重现的和有效的量表进行评分(Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. “Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies”, International Journal Of Obesity, 24, 38-48 (2000); Stubbs RJ, Hughes DA, Johnstone AM 等人“The use of visual analogue scales to assess motivation to eat in human subjects: a review of their reliability and validity with an evaluation of new hand-held computerized systems for temporal tracking of appetite ratings”, British Journal of Nutrition, 84, 405-15 (2000)), 并且借助于 1-100 (%) 量表的视觉模拟量表进行测量,使用 EVAS (电子视觉模拟量表, iPAQ) (Stratton RJ, Stubbs RJ, Hughes D, King N, Blundell JE, Elia M. “Comparison of the traditional paper visual analogue scale questionnaire with an Apple Newton electronic appetite rating system (EARS) in free living subjects feeding ad libitum”, European Journal Of Clinical Nutrition, 52, 737-41 (1998)), 其位于下端时具有最负面或最低强度的感觉(例如完全不),并且在上端时具有相对项(例如非常高的,极度的)。志愿者被要求在该时刻最佳反映其感觉的置于量表上的线上标明。收集评分,使得它们不能用作以后评分的进一步参考。志愿者在食用前和食用后的定期间隔(-5、10、25、40、55、85、115、175 分钟)完成问卷。

[0067] 1.3.5 结果

PP 群体的结果在下文报告。

[0068] 使用方差混合模型分析评估膳食类型对峰葡萄糖应答、在血浆浓度相对于时间曲线下的胰岛素增量面积、峰胰岛素应答和饱腹感得分的作用,其中个体作为随机效应、产品

作为固定效应并且基线(空腹评分)作为协变量。产品测试的次序、性别和 BMI/ 体重(在研究的开始)也最初作为协变量拟合,并且如果需要则保留在模型中。对于多重测试不作出调整。

[0069] 图 1 显示对于胰岛素结果给出的 0-2 小时的浓度相对于时间曲线下的净增量面积还给出关于所有三次干预的相似图片。关于胰岛素的 0-2 小时的浓度相对于时间曲线下的净增量面积, PAL1 和 PAL2 (分别为 2420 和 1950 分钟 .mIU/L)与对于参考膳食获得的 2141 分钟 .mIU/L 值并无显著不同(在 95% 置信限度时, PAL1 和 PAL2 相对于参考膳食分别为 P = 0.35 和 P = 0.52)。

[0070] 然而,表 5 显示在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间,三种膳食的峰胰岛素值( $\mu$ IU/L)的确显示与 PAL2 的差异,其显示出统计上显著不同的值(PAL2 的 38  $\mu$ IU/L 相对于参考膳食的 49.3  $\mu$ IU/L,在 95% 置信限度时, P = 0.024)。

[0071] 表 5 :在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间的峰胰岛素值( $\mu$ IU/L)。P 在 95% 置信限度时进行计算。

膳食	n	平均值 ( $\mu$ IU/L)	平均值 的标准 误差 ( $\mu$ IU/L)	与参考 的平均 值改变 ( $\mu$ IU/L)	改变的 标准误 差 ( $\mu$ IU/L)	改变的 下置信 间隔 ( $\mu$ IU/L)	改变的 上置信 间隔 ( $\mu$ IU/L)	与对 照的 %改 变	P-值
PAL1	18	44.2	4.56	-5.1	4.77	-14.8	4.6	-10.3	0.29
PAL2	20	38.0	4.45	-11.4	4.80	-21.1	-1.6	-23.0	0.02
参考	20	49.3	4.29						

[0072] 胰岛素从峰的下降还显示更缓的斜率,如图 2 中对于 PAL1 和 PAL2 显示的,证实这两种膳食就参考(Ref)膳食而言更受控制的胰岛素应答。这种峰的较不陡峭的下降是对于胰岛素的 0-2 小时的浓度相对于时间曲线下的净增量面积, PAL1 和 PAL2 与参考膳食并无不同的原因(参见图 1),并且曲线形状显示 PAL1 和 PAL2 膳食的总体胰岛素控制益处更清晰图片。

[0073] 图 3 显示从初始基线经过 180 分钟在静脉葡萄糖水平(mmol/l)中的改变,并且表 6 显示在所有三种膳食之间在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间,三种膳食的峰葡萄糖值(mmol/L)中的差异并不显著(关于 PAL1 的 6.2 mmol/L 和关于 PAL2 的 6.4 mmol/L,相对于关于参考膳食的 6.5 mmol/L,在 95% 置信限度时,分别为 P = 0.0596 和 0.5297)。

[0074] 表 6 :在开始膳食食用后的 0 (膳食前的基线)和 180 分钟之间的峰静脉血糖值

(mmol/L)。P 在 95% 置信限度时进行计算。

膳食	N	平均值 (mmol/L)	平均值的 标准 误差 (mmol/L)	与参考 的平均 值改变 (mmol/L)	改变的 标准误差 (mmol/L)	改变的 下置信 间隔 (mmol/L)	改变的 上置信 间隔 (mmol/L)	与对照 的% 改变	P-值
PAL 1	1 8	6.2	0.11	-0.3	0.13	-0.5	0.0	-3.9	0.059 6
PAL 2	2 0	6.4	0.11	-0.1	0.13	-0.3	0.2	-1.2	0.529 7
Ref	2 0	6.5	0.10						

[0075] 虽然静脉葡萄糖的峰静脉血糖值在 PAL 膳食和参考之间并无显著不同,但 PAL 2 葡萄糖曲线显示在 30-60 分钟之间比 PAL 1 和参考平缓得多的下降,并且此外,与另外两条曲线不同,从未显著降至基线下,以显示餐后“微降(dip)”。这可能与图 1 中所示的较低胰岛素峰有关。

[0076] 图 4 显示经过 180 分钟与初始基线的静脉 PYY 水平(pg/ml) 中的改变。根据 Pedersen-Bjergaard 等人(Scand J Clin Lab Invest,56,497 - 503 (1996)), PYY 在餐后与卡路里摄取成比例释放。尽管不受胃扩张影响,但根据 Batterham 等人(Nature,418,650-654 (2002)),它已显示在饱腹感和食欲降低中起作用。更低的 PYY 水平看起来与糖尿病患者的无糖尿病亲属中的胰岛素抗性联系。对于两种 PAL 膳食可见的相对更高水平的 PYY 与图 7 中再现的结果关联,其将预期产生 PYY 在饱腹感中的作用。然而,关于 PAL 1 和 PAL 2 在应答中的相似性提示卡路里和蛋白质差异对该差异没有影响,如由引用的参考文献预期的。这与 PAL 2 和参考之间的卡路里匹配组合提示 PAL 膳食的一些特点可能是影响 PYY 应答。

[0077] 图 5 显示 GLP-1 数据,并且显示两种 PAL 膳食均给出超过参考膳食增加的应答。Neff 等人(Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 3, 263 - 273 (2010)) 公开了 GLP-1 在饱腹感中具有次级作用,因为它反馈给回肠制动机制,减慢蠕动并且将饱腹感信号传递给脑。关于两种 PAL 膳食的更高水平的 GLP-1 在饱腹感中的作用在图 7 中再现的结果中反映。根据 Nauck 等人(Diabetologia,54,10 - 18 (2011)),GLP-1 作为 2 型糖尿病的生理病理学部分逐渐降低,并且根据 le Roux 等人(Ann Surg,243:108-14 (2006)),在已经历 Roux-en-Y 胃绕道手术(bariatric surgery)的患者中,GLP-1 中的增加连同改善的葡萄糖耐受也是注意到的首批效应之一,提示 PAL 膳食诱导 GLP-1 的能力将对于糖尿病患者以及显示出早期的差葡萄糖控制的那些人的益处。

[0078] 图 6 显示关于三种膳食的 GIP 应答,并且出乎意料地显示在两种 PAL 膳食中相当大的 GIP 压制。根据 [06] Drucker (J of Clin Inv,117,24-32 (2007)),GIP 由小肠的 K 细胞产生,并且被认为由葡萄糖进入 K 细胞内的转运触发,它从其中转运至胰腺且诱导胰岛素作为肠促胰岛素应答的部分。与 GLP-1 和 PYY 不同,GIP 并不认为在饱腹感信号传递或回肠制动机制中起作用。尽管存在将预期诱导 GIP 的高水平的游离葡萄糖,但 GIP 应答在

两种 PAL 膳食中的降低提示通过这些膳食中的其他成分抑制在 K 细胞上的葡萄糖转运蛋白可能是导致这种抑制的机制。Gorboulev 等人 (Diabetes, 61, 187 - 196 (2012)) 报道葡萄糖饲喂的钠 - 葡萄糖联系的转运蛋白 1 (SGLT-1) 敲除小鼠中降低水平的 GIP, 其可能提示 GIP 降低的一种可能机制。Miyawaki, K 等人 (Nature Medicine, 8, 738-742 (2002)) 报道在脂肪组织中的 GIP 受体的存在。因此, GIP 可促进饮食脂质和糖从血液进入脂肪组织内的摄取且促进体重增加。这种降低的 GIP、以及升高的 PYY 和 GLP-1 模式类似于在 Roux-en-Y 胃绕道手术患者中观察到的那种, 其中 Korner J 等人 (Surg Obes Relat Dis, 3, 597 - 560 (2007)) 显示与改善的糖尿病症状和体重减轻的相关。

[0079] 图 7 显示饱腹感结果指示在参考膳食以及 PAL1 和 PAL2 两者之间的显著差异。当与参考膳食 (Ref) 相比较时, 对于 PAL1 和 PAL2 “饥饿”和“想吃”自我评估评分降低 (参见图 7A 和 7C) 以及“吃饱”自我评估评分 (参见图 7B) 提高显著得多。平均评分保持明显不同直至膳食开始后 3 小时测量结束时。在 2 小时以及 3 小时, 当与 PAL1 和 PAL2 两者相比较时, 三种评分 (饥饿、吃饱、想吃) 的曲线下面积对于参考显著不同 (在 95% 置信限度下, 所有  $P < 0.0001$ )。

#### [0080] 1.3.6 讨论

就参考膳食而言, 在 30 分钟时的胰岛素峰在 PAL2 中显著更低, 因为这两种膳食对于蛋白质和能量以及碳水化合物都是最匹配的, 所以这提示 PAL 2 膳食的强烈健康益处。对于 PAL 1 和 PAL 2 两者, 在研究的整个 180 分钟上, 胰岛素水平在稳定下降方面也是控制更好的, 再次, 显示出在胰岛素代谢控制方面的益处。

[0081] 当与参考膳食相比较时, PAL 1 和 PAL 2 两者均显示在关于“饥饿”和“想吃”的平均自我评估评分中的显著减少和“吃饱”中的增加。改变在膳食已摄取后立即可见, 并且在膳食后的整个 180 分钟时期自始至终保持存在。应当指出虽然 PAL 1 和 PAL 2 两者均具有更高的烹制重量 (对于 PAL 1 和 PAL 2 分别为 680 克和 580 克, 相对于参考膳食的 250 g), 关于 PAL2 和参考膳食的能量含量却非常相似。PAL1/PAL2 和参考膳食之间的这种差异很可能显著下降至膳食之间的卡路里密度差异 (对于 PAL 1 和 PAL 2 分别为 0.8 和 0.65 Kcal/g, 并且对于参考膳食 1.3 Kcal/g), 但 PAL1 和 PAL2 之间的相似性提示蛋白质具有更少的影响, 并且也可能高植物化学物含量在下述事实中具有作用: 饱腹感水平甚至在 180 分钟后仍很高。

[0082] 参考膳食以及 PAL1 和 PAL2 之间的差异包含: 与其他两种相比较, 在参考膳食中更低的纤维和类黄酮以及更高的淀粉。淀粉很可能被快速消化为糖, 并且作为可利用的碳水化合物在所有三种膳食中都是非常相似的, 不太可能这种差异将引起对于 PAL2 在 30 分钟时更低的胰岛素峰, 或对于 PAL1 和 PAL2 在前 30 分钟观察到的更高的 PYY 数值。纤维可能视为一种因素, 然而, Jonsson 等人 (2010) 的数据提示纤维在具有高水果和蔬菜含量的饮食中观察到的饱腹感增加中并不是因素。

[0083] 类似地, 当与参考膳食相比较时, PAL 1 和 PAL 2 两者均显示 PYY、GLP-1 中的增加和 GIP 中的减少。这些结果中的所有三个均可视为有利的健康结果。虽然不希望受任何具体理论束缚, 但本发明人认为可能解释是在 PAL 1 和 PAL 2 中的类黄酮或其他酚类化合物活化肠中的受体, 并且这些负责血液激素中的改变。

#### [0084] 1.3.7 结论

虽然关于参考膳食,如通过 0-2 小时的浓度相对于时间曲线下的净增量面积表示的总体胰岛素水平对于 PAL 1 或 PAL 2 不是显著的,但如由图 2 中的图形状限定的胰岛素释放显示就参考膳食而言的,对于 PAL 1 和 PAL 2 改善的胰岛素控制。这也在对于 PAL 2 的 30 分钟时显著更低的峰胰岛素中反映。

[0085] 观察到在饱腹感评分的时间段 0-120 分钟的曲线下面积中的高度显著差异,其保持显著直到在 180 分钟的测量结束时。

[0086] Cordain 已提示旧石器时代型饮食的高蛋白质含量负责饱腹感效应,然而,迄今为止不存在高蛋白质相对于低蛋白质的旧石器时代膳食例如 PAL 1 和 PAL 2 的研究,并且尽管 PAL 1 更高的蛋白质和卡路里含量,但 PYY 数据和饱腹感结果两者的相似性提示这种假设是错误的。这使得我们得出结论,即关键差异是类黄酮。

[0087] 实施例 2

### 2.1 膳食的制备

参考和 PAL 2 膳食如先前描述的进行制备。制备来自上文参考的 Jew 等人的表 3 的晚餐。

[0088] 2.2 有机萃取

通过 Tumbas 等人的方法(Acta Periodica Technologica 35 265-273(2004))制备膳食的级分。简言之,将冷冻干燥的膳食样品在研棒和研钵中磨碎,并且将 10 g 加入 250 ml 70% (v/v)含水甲醇中,并且在室温下在氮气下黑暗中贮存 24 小时。移出上清液且贮存于 -20°C 下在氮气下黑暗中。萃取用进一步的 250 ml 的含水甲醇重复,并且合并上清液。

[0089] 通过在 40°C 下在真空下的旋转蒸发从 20% 的萃取物中去除甲醇,而残留水通过冷冻干燥去除。将冻干的萃取物贮存于 -20°C 下在氮气下黑暗中,标记为‘含水甲醇萃取物’。

[0090] 通过在 40°C 下在真空下的旋转蒸发从剩余 80% 的萃取物中去除甲醇,并且这个含水萃取物用 2 × 10 ml 体积的石油醚(40-60°C)、二氯甲烷、乙酸乙酯和 1-丁醇连续萃取。将有机萃取物在 40°C 下在氮气流下干燥,并且将冻干样品相应标记,并且贮存于 -20°C 下在氮气下黑暗中。

[0091] 通过旋转蒸发从剩余未萃取的部分中去除残留溶剂,并且将水溶液冷冻干燥。将冻干样品标记为‘水萃取物’,并且贮存于 -20°C 下在氮气下黑暗中。

[0092] 萃取产生表 7 中所示的材料量。

[0093] 表 7:参考和 PAL2 膳食以及公开于 Jew 等人的表 3 中的晚餐的溶剂萃取物。

溶剂	重量 (mg)		
	参考	PAL2	Jew
含水甲醇	284.6	1216.6	402.1
石油醚 (40-60 °C)	12.2	30.1	10.9
二氯甲烷	19.6	6.7	18.4
乙酸乙酯	3.1	8.5	32.0
1-丁醇	28.9	141.5	40.3
水	1021.3	4291.3	1868.0

[0094] 2.3 级分的类黄酮含量

通过 Velioglu 等人的方法(J. of Agricultural and Food Chem. ,46,4113-4117 (1998))测定类黄酮含量。虽然这种方法测定萃取物的酚类化合物含量,但由于使用的非酸

化的、室温、含水甲醇萃取,结合的多酚类和高度亲脂抗氧化剂未被萃取,并且获得的值将反映膳食的类黄酮含量。将样品以  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  再溶解于 70% 含水甲醇中,并且将  $200 \mu\text{l}$  加入 1.5 ml 新鲜制备的 10% 含水 Folin-Ciocalteu 试剂,混合且允许在室温下静置确切 5 分钟。加入 1.5 ml 6% (w/v) 碳酸氢钠溶液,混合且允许在室温下静置 90 分钟。在 765 nm 下的吸光度与 70% 含水甲醇中的  $0-0.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  没食子酸标准品相比较,并且表示为没食子酸当量。

[0095] 表 8:参考和 PAL2 膳食以及公开于 Jew 等人的表 3 中的晚餐的溶剂萃取的类黄酮含量。

样品	溶剂	GAE ( $\text{mg} \cdot \text{膳食}^{-1}$ )	GAE ( $\text{mg} \cdot 650 \text{ 千卡膳食}^{-1}$ )
参考	含水甲醇	78	156
	石油醚 (40-60 °C)	1	2
	二氯甲烷	4	7
	乙酸乙酯	2	3
	1-丁醇	5	10
	水	48	95
PAL2	含水甲醇	658	1132
	石油醚 (40-60 °C)	14	24
	二氯甲烷	9	15
	乙酸乙酯	17	29
	1-丁醇	145	249
	水	467	802
Jew	含水甲醇	641	404
	石油醚 (40-60 °C)	5	3
	二氯甲烷	9	5
	乙酸乙酯	31	19
	1-丁醇	89	56
	水	500	315

[0096] 2.4 膳食的类黄酮含量

样品通过基于 Velioglu 等人的方法进行测定。简言之,将冷冻干燥的样品在研棒和研钵中磨碎,并且将 2.5 g 加入 25 ml 70% 含水甲醇中,并且在密封离心管中在室温下振荡 2 小时。将悬浮液以  $13,000 \times g$  离心 1 分钟,并且取出上清液。如对于级分测定  $200 \mu\text{l}$  上清液。值表示为 650 卡路里膳食中的量。

[0097] 表 9:参考和 PAL2 膳食以及公开于 Jew 等人的表 3 中的晚餐的类黄酮含量。

膳食	GAE ( $\text{mg} \cdot 650 \text{ 千卡膳食}^{-1}$ )
参考	54.8
PAL1	504
PAL2	803
Jew	320

[0098] 表 10:对于参考、PAL 1 和 PAL2 膳食以及公开于 Jew 等人的表 3 中的晚餐,对 650

千卡标准化的测定的营养水平。

组分	分析			
	参考	PAL1	PAL2	Jew
纤维 (g 650千卡膳食 <sup>-1</sup> )	6.4 ± 1.2	20.9 ± 2.0	26.0 ± 7.4	10.1 ± 7.8
蛋白质 (g 650千卡膳食 <sup>-1</sup> )	23.3 ± 1.8	51.8 ± 2.9	29.1 ± 2.1	65.5 ± 1.1
淀粉 (g 650千卡膳食 <sup>-1</sup> )	74.0 ± 7.8	< 3.6	< 4.0	< 3.0
乳糖 (g 650千卡膳食 <sup>-1</sup> )	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.1
类黄酮 (mgGAE, 650千卡膳食 <sup>-1</sup> )	54.8	504	803	320

#### [0099] 2.5 GPCR

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 活化已证实诱导胃肠道中的许多物质的分泌。特别地, Suzuki (Peptides, 25 (10), 1803-8 (2004)) 和 Renuka (Neurochem Res, 31 (3), 313-20 (2006)) 公开了 GPR14 以及 M1 和 M3 毒蕈碱受体已经由肠促胰岛素和胃肠激素 (PYY、GLP-1 和 GIP) 分泌的调节以及葡萄糖刺激的胰岛素分泌的增强而牵涉血糖控制, 因此提示导致这些受体活化的化合物是作为糖尿病的治疗剂的目标。

[0100] 商业 GPCR 筛选通过 EMD Millipore Corporation 进行。萃取物在 DMSO 中制备, 并且最终在 EMD Millipore's GPCRProfiler® 测定缓冲液中制备至比最终测定浓度高三倍的浓度。类似地, 制备媒介物对照和阳性对照, 以确保所有测定均适当受控制。所有孔均使用 EMD Millipore's GPCRProfiler® 测定缓冲液进行制备。GPCRProfiler® 测定缓冲液是经修饰的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS), 其中 HBSS 补充为在 pH 7.4 下含有 20 mM HEPES 和 2.5 mM 丙磺舒。测定使用 Millipore 的稳定 Chemiscreen™ GPCR 细胞系进行, 所述细胞系被验证在高达 0.5%DMSO 的存在下工作, 以使媒介物应答降到最低且使结果一致性达到最大。

[0101] 对于测定的每个浓度, 将萃取物一式两份铺平板。对于测定的每种 GPCR 的标准参考激动剂 (人尾加压素 II 用于 GPR14, 以及乙酰胆碱用于 M1 和 M3 毒蕈碱受体) 以相似方式制备, 以充当测定对照。每种 GPCR 的参考激动剂以 Emax (其中参考激动剂引发最大应答的浓度) 包括。激动剂测定在 FLIPRTETRA 仪器上进行, 其中在建立荧光基线后, 将测试萃取物、媒介物对照和 Emax 的参考激动剂加入测定平板。激动剂测定总共为 180 秒, 并且用于评估每种萃取物活化 GPR14、M1 和 M3 毒蕈碱受体的能力。在完成激动剂测定后, 从 FLIPRTETRA 中取出测定平板, 并且在 25°C 下温育两分钟。

[0102] 对所有测定平板数据实施适当的基线校正。在应用基线校正后, 输出最大荧光值, 并且处理数据以计算活化百分比 (相对于 Emax 参考激动剂和媒介物对照值), 并且计算另外的统计值 (即 Z', 重复数据值之间的变化百分比), 以评估每块平板的质量。当拒绝测定平板数据时, 进行另外的实验。

[0103] 图 8 显示表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的, 由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 GPR14 报道分子活化 (40 μg/ml 含水甲醇萃取物、8 μg/ml 石油醚萃取物、8 μg/ml 二氯甲烷萃取物、4 μg/ml 乙酸乙酯萃取物、40 μg/ml 1-丁醇萃取物和 40 μg/ml 水萃取物)。可见与参考和 Jew 等人晚餐的相同萃取物相比较, PAL 2 的含水甲醇、石油醚和二氯甲烷萃取物显示针对 GPR14 受体更高的激动剂活性。PAL 2 和 Jew 等人晚餐的乙酸乙酯和 1-丁醇萃取物证实针对 GPR14 受体可比较的激动剂活性, 并且比参考萃取

物更有效力。仅在水萃取物中, Jew 等人晚餐的确证实比 PAL 2 萃取物更高的激动剂活性。

[0104] 图 9 显示表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的, 由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 M1 毒蕈碱受体活化 (40  $\mu$ g/ml 含水甲醇萃取物、8  $\mu$ g/ml 石油醚萃取物、8  $\mu$ g/ml 二氯甲烷萃取物、4  $\mu$ g/ml 乙酸乙酯萃取物、40  $\mu$ g/ml 1-丁醇萃取物和 40  $\mu$ g/ml 水萃取物)。可见除了其中对 M1 毒蕈碱受体的激动剂活性是可比较的二氯甲烷萃取物之外的所有萃取物, PAL 2 萃取物展示比 Jew 等人晚餐萃取物更高的激动剂活性。

[0105] 图 10 显示表示为相对于参考激动剂的 EC80 浓度活化的百分比的, 由参考、PAL 2 和 Jew 等人的晚餐萃取物的 M3 毒蕈碱受体活化 (40  $\mu$ g/ml 含水甲醇萃取物、8  $\mu$ g/ml 石油醚萃取物、8  $\mu$ g/ml 二氯甲烷萃取物、4  $\mu$ g/ml 乙酸乙酯萃取物、40  $\mu$ g/ml 1-丁醇萃取物和 40  $\mu$ g/ml 水萃取物)。可见所有 PAL 2 萃取物均展示比 Jew 等人晚餐萃取物更高的对 M3 毒蕈碱受体的激动剂活性。在除了含水甲醇萃取物之外的所有萃取物中, PAL 2 还显示出比参考膳食萃取物更高的对 M3 毒蕈碱受体的活性。

## [0106] 2.6 葡萄糖转运抑制

### 2.6.1 常规细胞培养

人上皮结肠直肠癌 (Caco-2) 细胞得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 并且在由下述组成的生长培养基中培养: 达尔贝科改良伊格尔培养基 (含有 Glutamax-1, 4.5 g/L D-葡萄糖和 25 mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (Hepes) (Invitrogen)), 10% 胎牛血清 (Sigma)、1% 非必需氨基酸 (Invitrogen) 和 1 mM 丙酮酸钠 (Sigma)。细胞常规以大约 80% 汇合进行传代, 使用 TrypLE™ Express Stable Trypsin-Like Enzyme (Invitrogen) 解离细胞, 并且以大约 114 个细胞 / mm<sup>2</sup> 接种到新的组织培养瓶中。仅传代次数在 45 和 49 之间的细胞用于实验。

### [0107] 2.6.2 分化的 Caco-2 细胞单层的制备

Corning® HTS Transwell® 96 孔可透过插入支持物 (Sigma) 用在 0.02 M 乙酸中的 40  $\mu$ l 的 50  $\mu$ g/ml 大鼠尾胶原 I 型 (BD Biosciences) 在室温下在无菌条件下进行胶原包被一小时。将插入物在磷酸盐缓冲盐水 (PBS (Invitrogen)) 中洗涤两次, 并且将 Caco-2 细胞以在生长培养基中的  $9.6 \times 10^5$  细胞 / ml (75  $\mu$ l / 插入物) 接种到插入物内, 并且将 30 ml 生长培养基加入下面的给料平板中。放置细胞以附着至胶原基质, 并且在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下经过 48 小时形成单层。插入物和给料平板两者在 PBS 中洗涤, 并且细胞与含有 MITO+™ Serum Extender 溶液的 BD Entero-STIM™ Enterocyte Differentiation Medium (两者均为 BD Biosciences)、75  $\mu$ l / 插入物和给料平板中的 30 ml, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下温育进一步 48 小时。

### [0108] 2.6.3 葡萄糖转运抑制测定

将分化的细胞单层在含有 CaCl<sub>2</sub> 和 MgCl<sub>2</sub> 的达尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (PBS (+) (Invitrogen)) 中轻轻洗涤, 并且将插入物转移至新的 Corning® HTS Transwell®-96 孔接受平板 (Sigma)。将细胞与新鲜 PBS (+) (75  $\mu$ l / 插入物和 225  $\mu$ l / 孔) 一起在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下温育 60 分钟。轻轻抽吸 PBS (+), 且一式三份替换为 75  $\mu$ l / 插入物的 5 mM D-葡萄糖 (Sigma) 测试活性的 (test active), 并且将 225  $\mu$ l / 孔的 PBS (+) 快速加入每个孔中。使 5 mM 葡萄糖孔在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下温育 15 分钟。将细胞插入物转移至新的接受平板, 从细胞中轻轻抽吸上清液, 并且替换为 100  $\mu$ l 100  $\mu$ M 荧光黄 (Sigma) 溶液, 以证实单层的完整

性。将 225  $\mu$ l PBS (+) 加入每个孔中,并且在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下温育 1 小时。随后弃去细胞插入物,并且通过在 Spectramax Gemini EM 荧光微板阅读器上,在 485 nm (激发) 和 530 nm (发射) 处测量样品的荧光来检查膜对荧光黄的通透性。

#### [0109] 2.6.4 葡萄糖测定

使用基于 Invitrogen's Amplex Red Glucose/Glucose oxidase Assay Kit 的葡萄糖测定,测量穿过细胞单层转运的葡萄糖量。简言之,将 50  $\mu$ l 每种测试样品转移至黑侧/透明底部 96 孔板 (Greiner Bio-One),向其中加入 100  $\mu$ l 反应缓冲液 (0.5  $\mu$ l 10 mM Ampliflu Red、1  $\mu$ l 10U/ml 辣根过氧化物酶、1  $\mu$ l 100 U/ml 葡萄糖氧化酶和 97.5  $\mu$ l PBS (均为 Sigma))。在室温下 10 分钟温育后,在 Spectramax Gemini EM 荧光微板阅读器上,在 530 nm (激发) 和 590 nm (发射) 处测量样品的荧光,并且由标准曲线外推葡萄糖浓度。

#### [0110] 2.6.5 结果

图 11 表示为相对于媒介物对照的百分比的,由参考、PAL 2 和 Jew 等人晚餐的二氯甲烷萃取物 (75  $\mu$ g/ml) 的葡萄糖转运抑制,并且表 11 概括表示为相对于媒介物对照的百分比的,通过参考、PAL 2 和 Jew 等人晚餐的含水甲醇、石油醚、二氯甲烷和 1-丁醇萃取物 (均为 75  $\mu$ g/ml) 的葡萄糖转运抑制结果。萃取物如先前所述进行制备。

[0111] 表 11:表示为相对于媒介物对照的百分比的,通过参考、PAL 2 和 Jew 等人晚餐的含水甲醇、石油醚、二氯甲烷和 1-丁醇萃取物 (均为 75  $\mu$ g/ml) 的葡萄糖转运抑制。

萃取物	膳食	葡萄糖转运抑制 (对照%)
含水甲醇	参考	-2.77% ( $\pm$ 0.60%)
	PAL2	4.77% ( $\pm$ 3.63%)
	Jew 等人.	2.04% ( $\pm$ 4.07%)
石油醚 (40-60 °C)	参考	0.35% ( $\pm$ 3.52%)
	PAL2	0.05% ( $\pm$ 3.26%)
	Jew 等人.	-4.25% ( $\pm$ 5.55%)
二氯甲烷	参考	-3.10% ( $\pm$ 2.71%)
	PAL2	8.79% ( $\pm$ 1.45%)
	Jew 等人.	0.48% ( $\pm$ 1.78%)
1-丁醇	参考	-3.23% ( $\pm$ 1.26%)
	PAL2	0.39% ( $\pm$ 2.46%)
	Jew 等人.	-0.99% ( $\pm$ 0.87%)

[0112] 可见来自 PAL 2 膳食的二氯甲烷萃取物证实葡萄糖转运抑制 (8.8%)。相反,来自参考或 Jew 等人晚餐的二氯甲烷萃取物均不具有基本上的葡萄糖转运抑制活性 (分别为 -3.0% 和 0.5%)。

#### [0113] 2.7 结论

PAL 2 膳食和 Jew 等人晚餐的萃取物展示 GPCR 和肠葡萄糖转运蛋白的差异活化。来自 PAL 2 和 Jew 等人晚餐的乙酸乙酯萃取级分显示针对 GPR14 可比较的活性,然而,尽管来自 PAL 2 膳食的含水甲醇、石油醚和二氯甲烷膳食萃取物显示针对 GPR14 的激动剂活性,但来自 Jew 等人的这些相同级分显示没有 GPR14 的阳性受体活化。相反,PAL 2 膳食的水萃取物未活化 GPR14,而 Jew 等人的水萃取物显示出激动剂活性。另外,与 Jew 等人膳食萃取物相比较,排除二氯甲烷萃取级分,来自 PAL 2 膳食的所有萃取物均显示针对 M1 和 M3 毒蕈碱

受体基本上更高的激动剂活性。此外,当测定肠葡萄糖转运蛋白抑制活性时,来自 PAL 2 膳食的二氯甲烷萃取物证实基本抑制,而来自 Jew 等人膳食的二氯甲烷萃取物具有针对肠葡萄糖转运蛋白的可忽略不计的抑制。综上,这些数据证实在 PAL 2 膳食和 Jew 等人膳食之间观察到差异生理效应。因为这些 GPCR 已知分泌胃肠激素,包括 PYY、GLP-1 和 GIP,所以不受理论束缚,本发明人认为在本发明膳食中增加数量和不同类型的类黄酮是图 4-6 中可见的胃肠激素释放中的差异的原因。

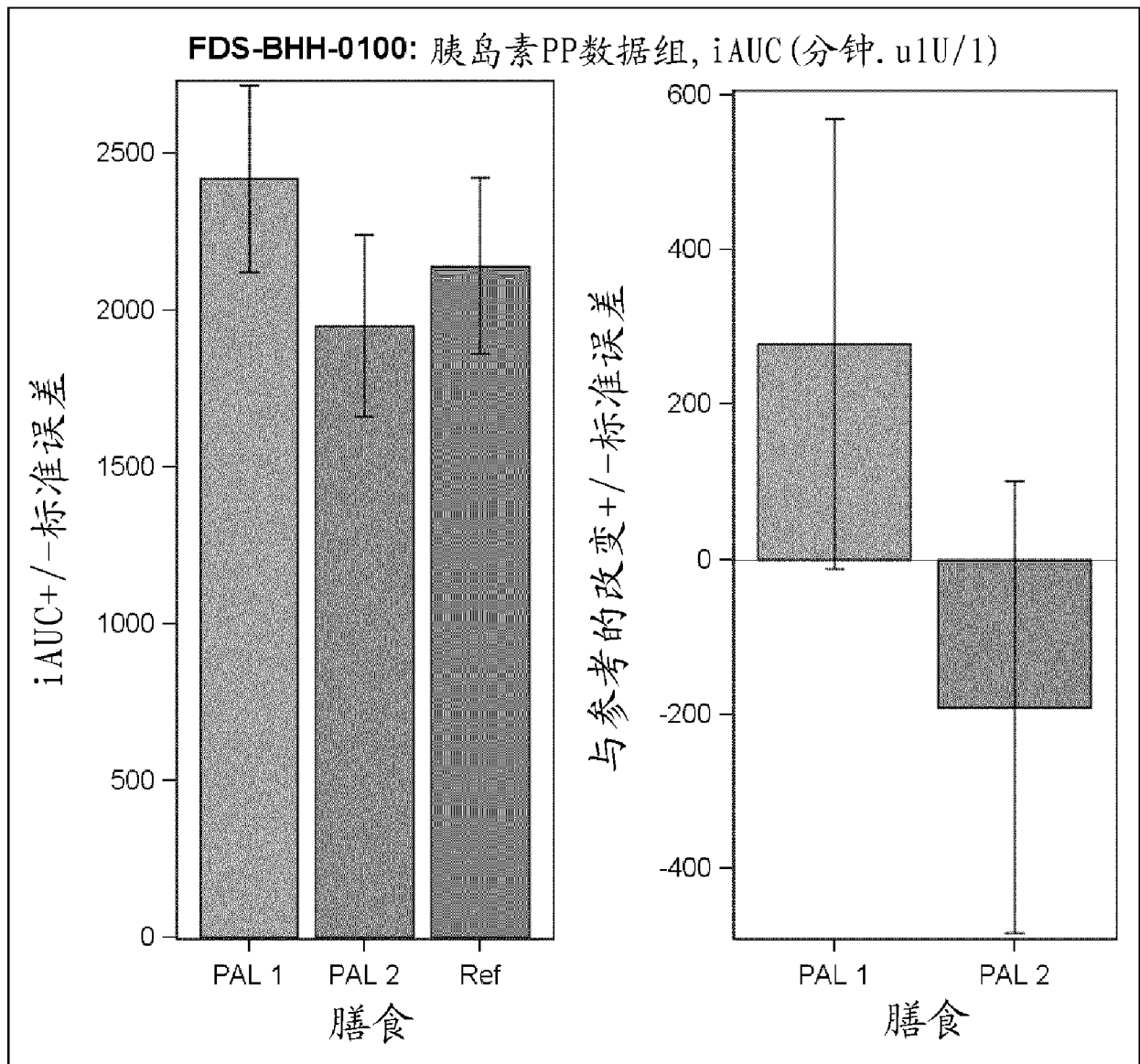


图 1

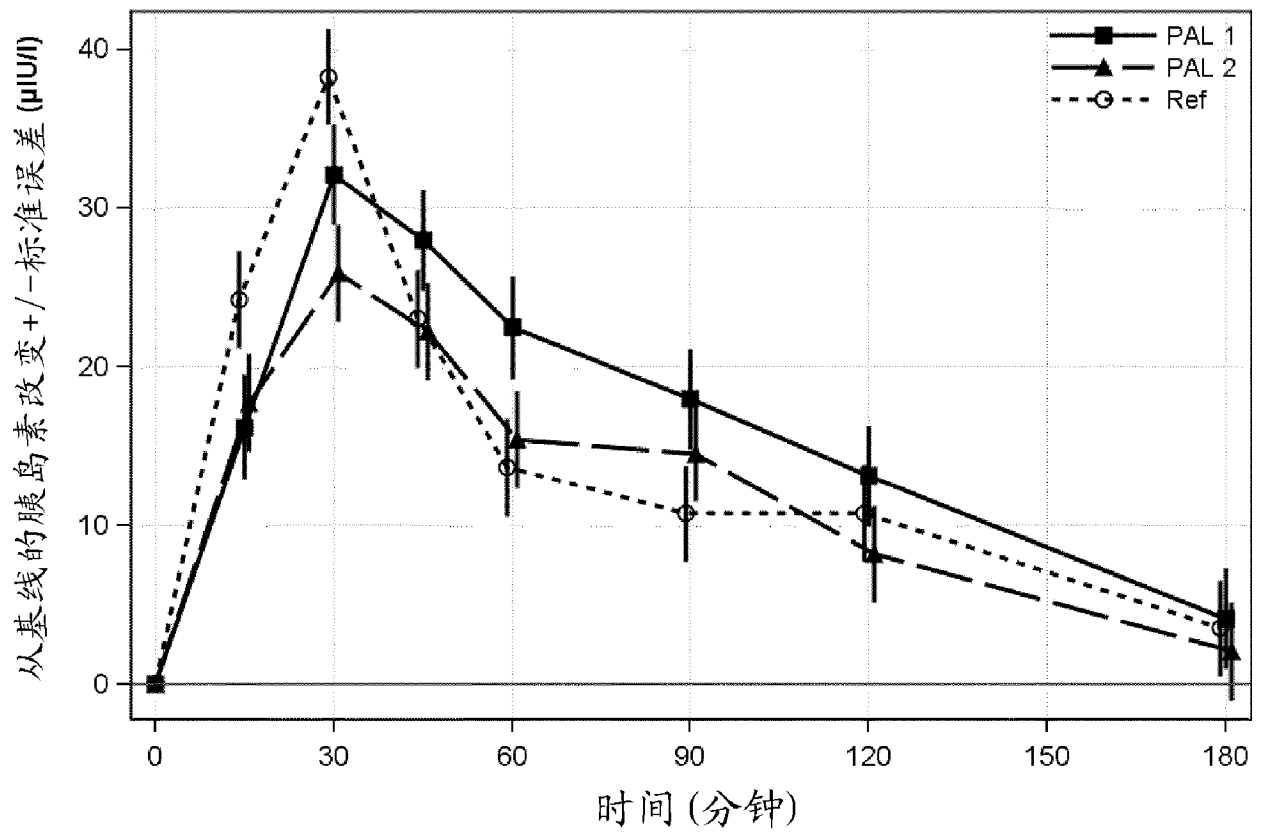


图 2

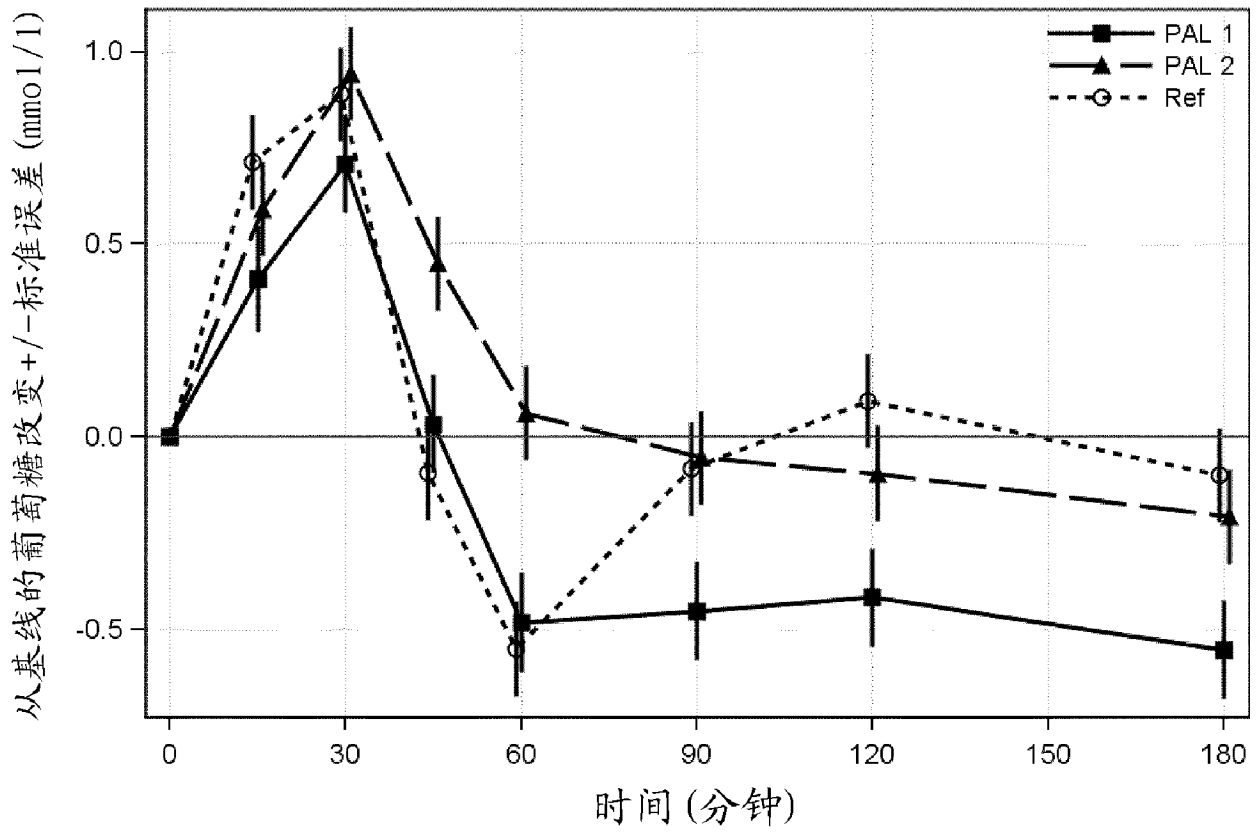


图 3

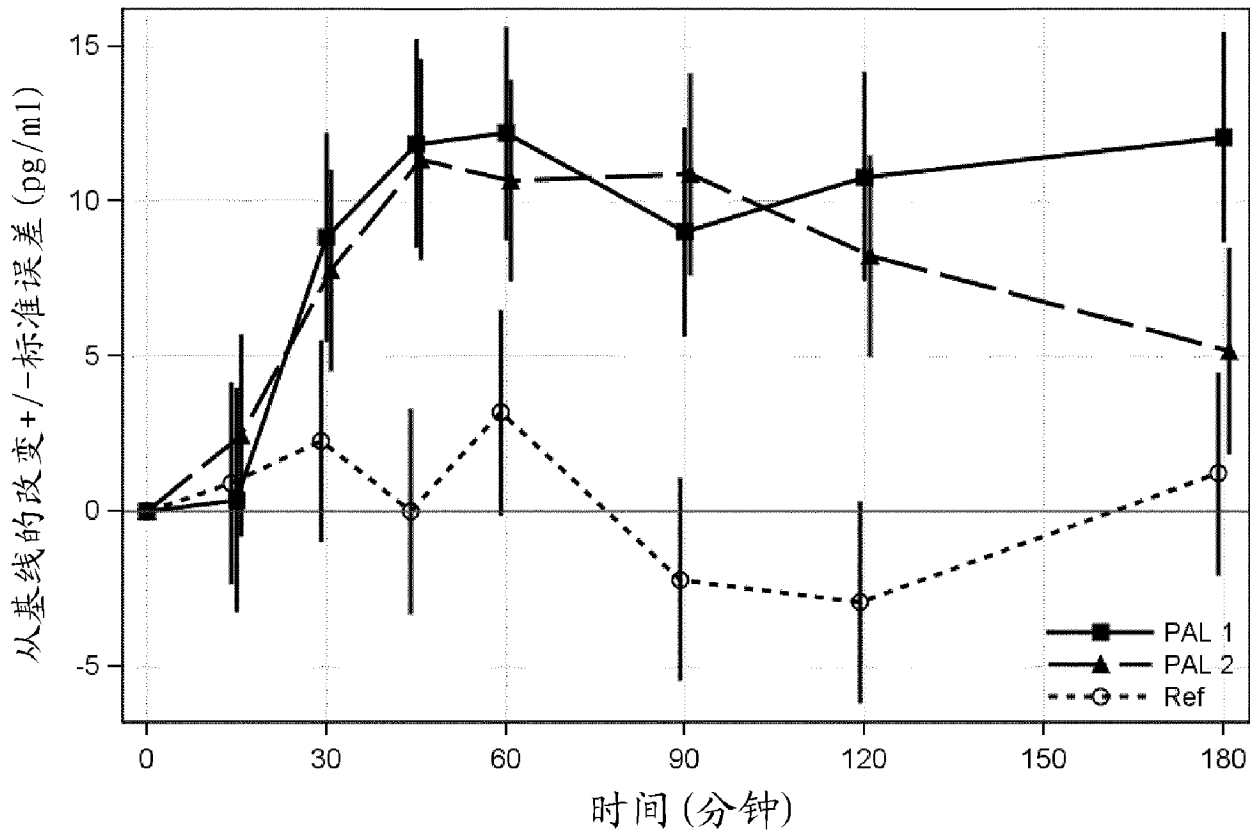


图 4

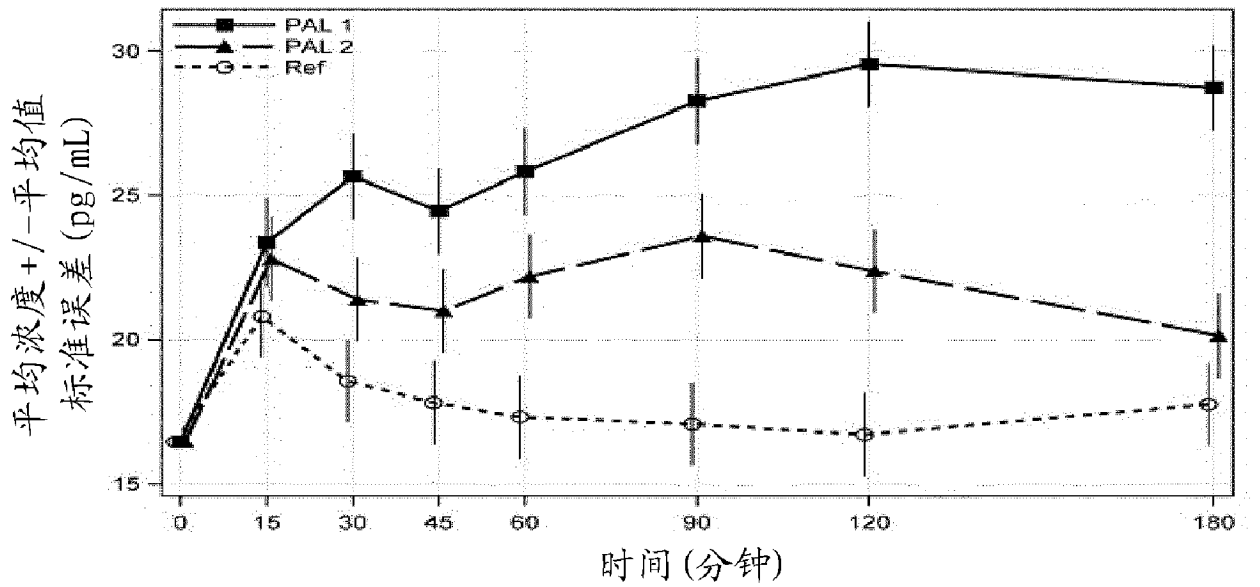


图 5

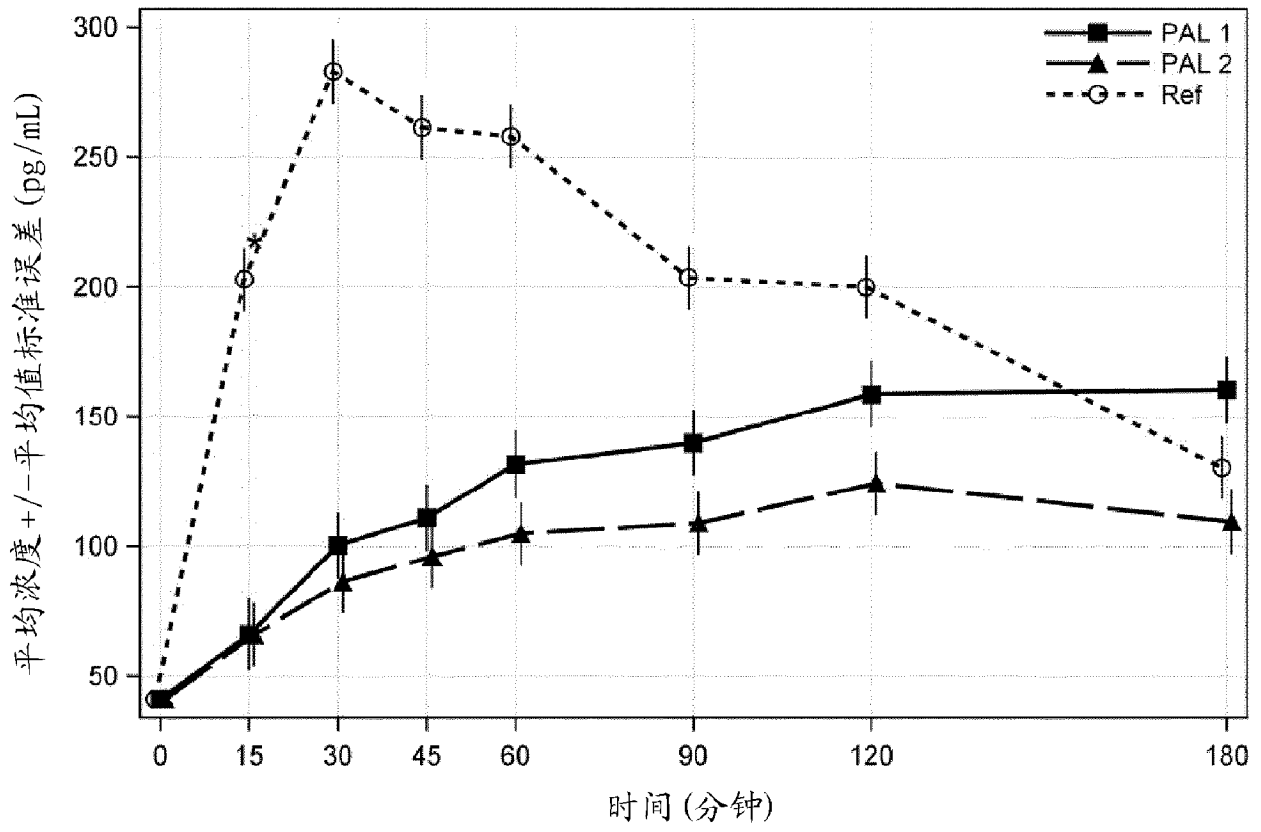


图 6

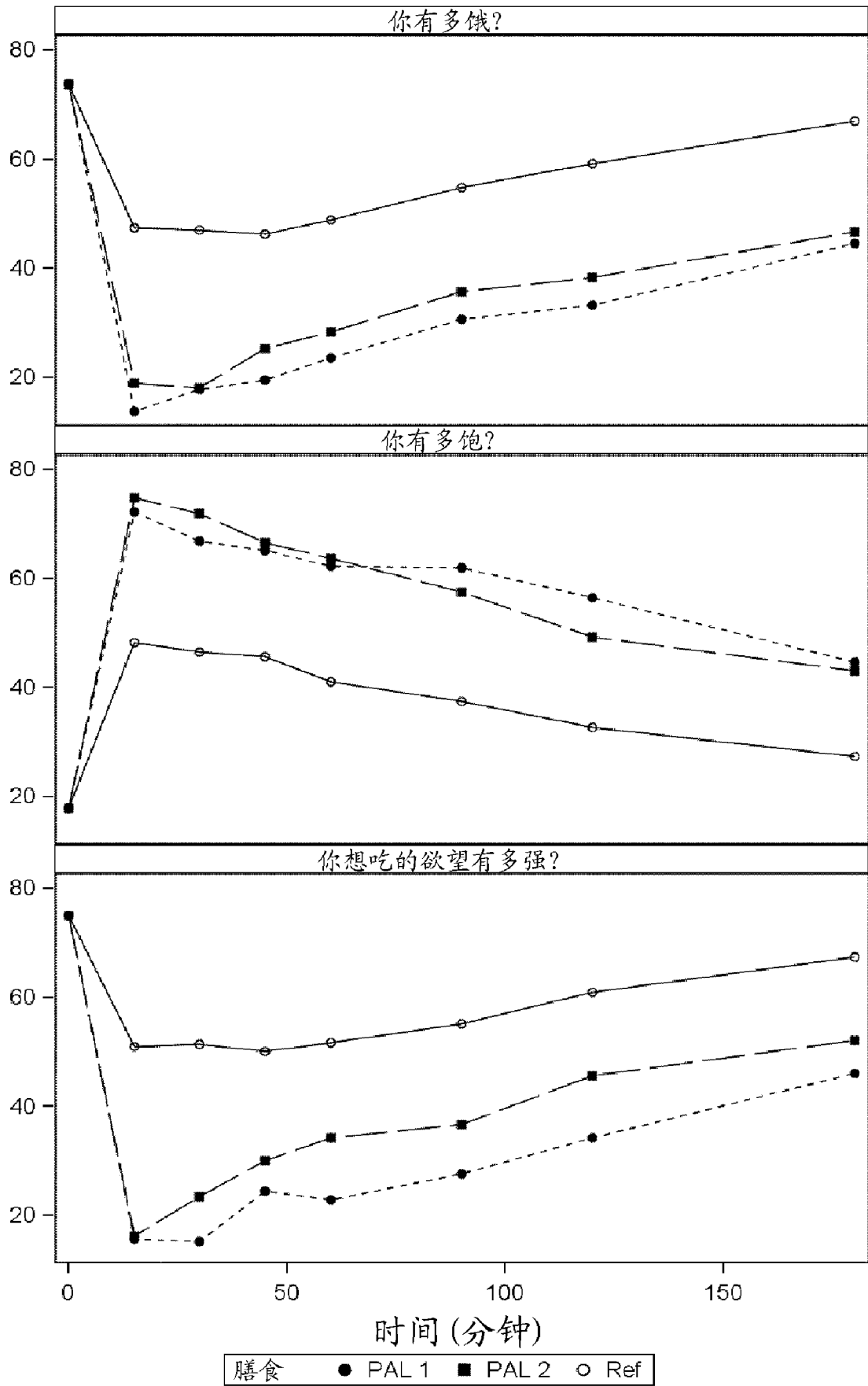


图 7

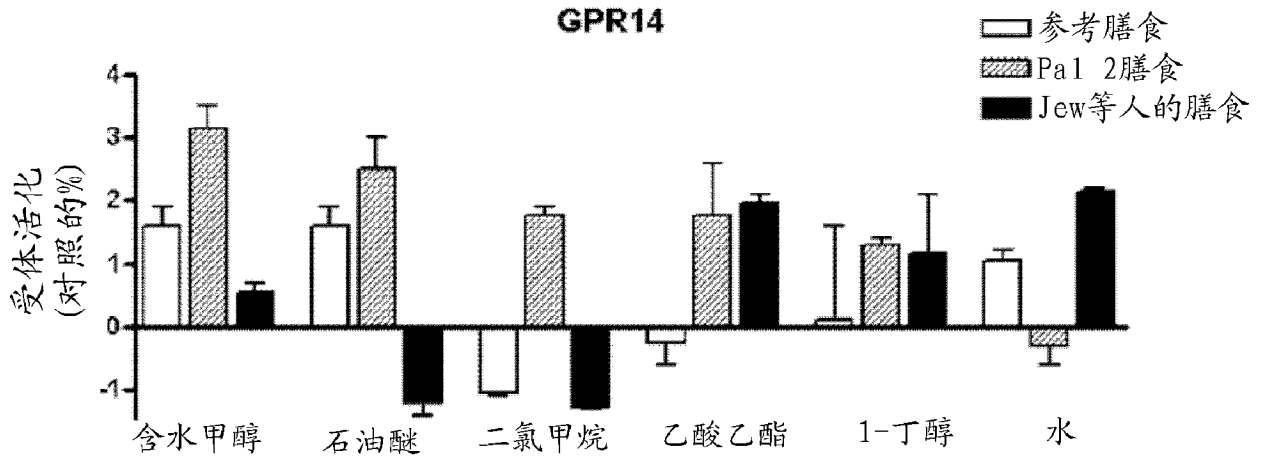


图 8

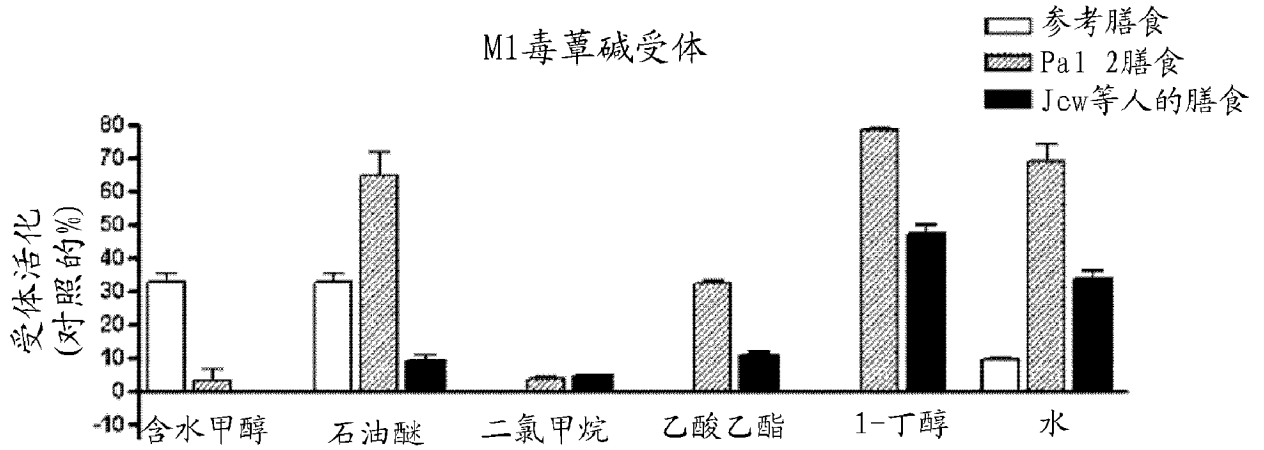


图 9

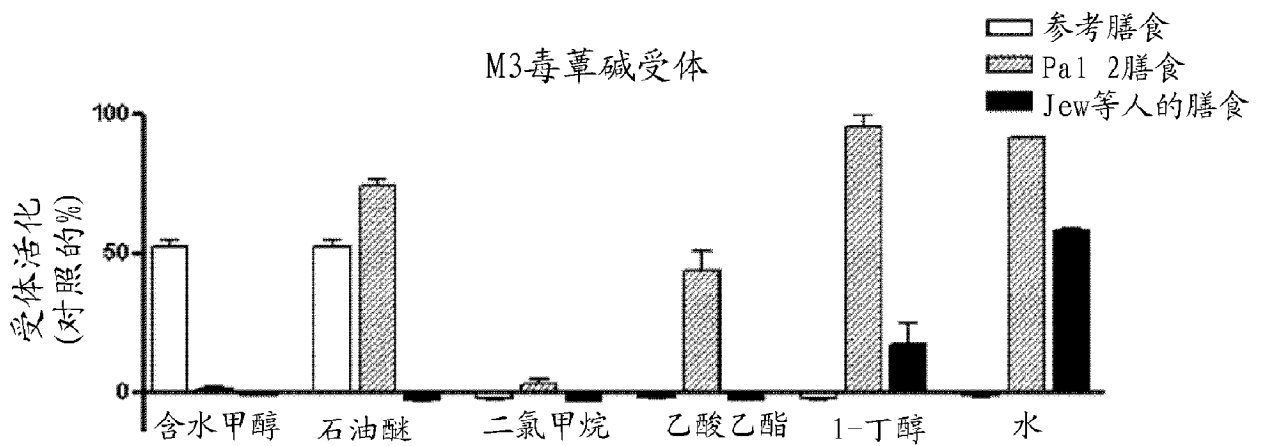


图 10

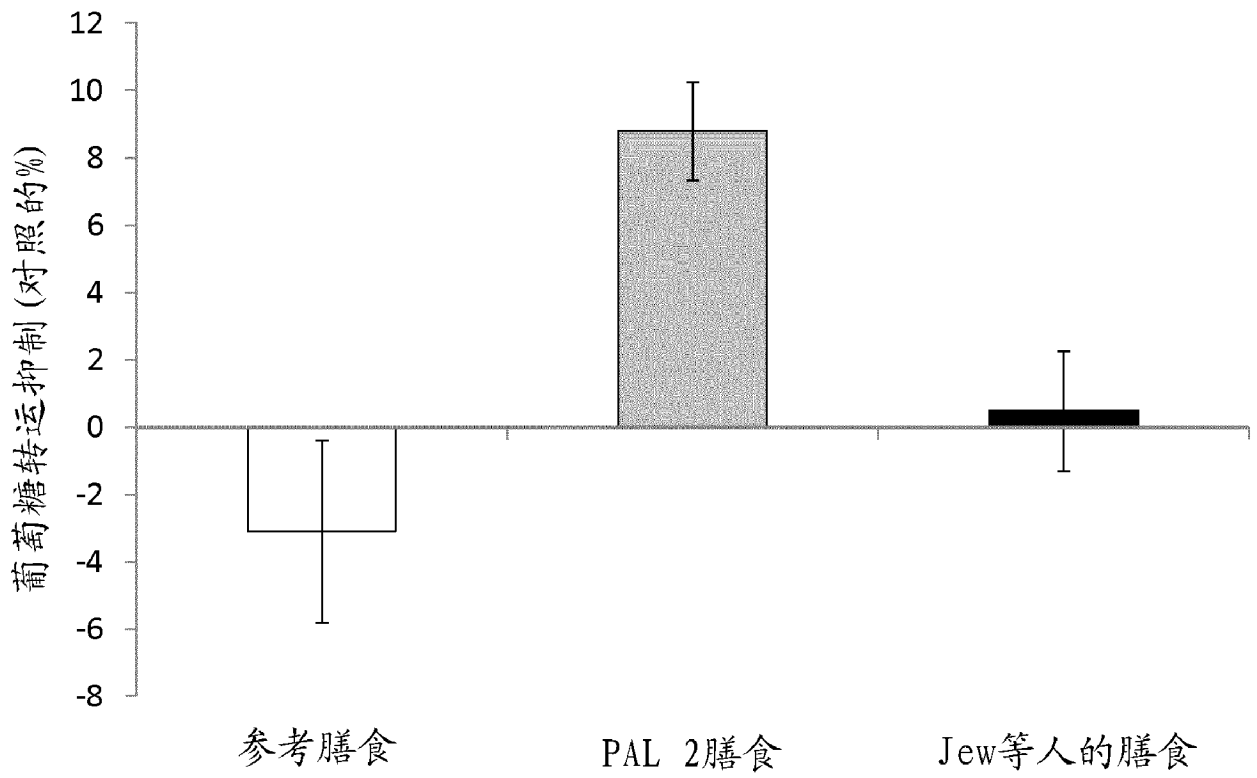


图 11