(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105008929 B
(45)授权公告日 2018.10.02

(21)申请号 201480008545.5
(22)申请日 2014.02.12
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105008929 A
(43)申请公布日 2015.10.28
(30)优先权数据
61/763,797 2013.02.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/016025 2014.02.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/127000 EN 2014.08.21

(73)专利权人 南加利福尼亚大学
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 瓦尔特·D·隆哥
塞巴斯蒂安·布兰德霍斯特
摩根·埃利塞·莱文
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 金鲜英 马铁军

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
审查员 陈伟潘

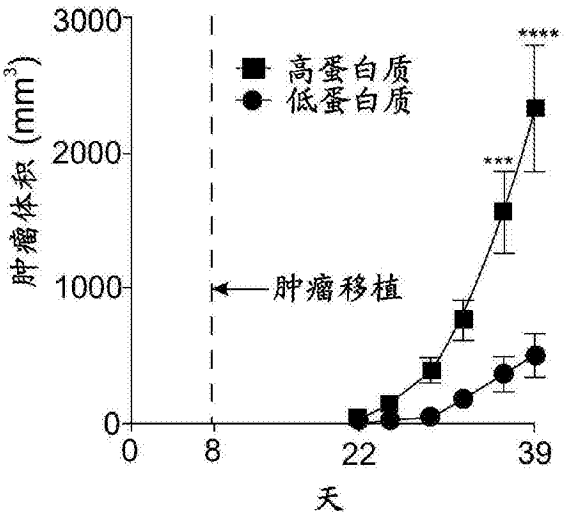
权利要求书3页 说明书28页 附图44页

(54)发明名称

预防化学毒性和与年龄相关的疾病的方法和膳食

(57)摘要

本发明提供改善长寿和/或减轻老化的症状或防止与年龄相关的疾病的方法。所述方法包括一个步骤，其中确定受试者的平均日常蛋白质摄取和类型、IGF-I和IGFBP1水平、以及全因死亡率、癌症和糖尿病的风险因子。对于蛋白质消耗，确定来自动物和植物源的蛋白质卡路里的相对量。如果受试者的平均日常蛋白质摄取水平和类型和/或IGF-I水平和/或IGFBP1水平被鉴定为大于或低于预定的临界摄取/水平，且如果受试者比预定年龄更小，则以每2周至2个月的频率提供给受试者定期的正常卡路里或低卡路里但低蛋白禁食模仿膳食。本方法还显示能减轻化学毒性的症状。



CN 105008929 B

1.一种为受试者提供合理蛋白质膳食的、用于非治疗目的的方法，所述方法包括：

鉴定所述受试者的平均日蛋白质摄取水平是否大于预定的临界蛋白质摄取水平；

测定所述受试者消耗的植物基蛋白质和动物基蛋白质的量；

如果所述受试者的平均日蛋白质水平大于所述临界蛋白质摄取水平，如果所述受试者比预定的年龄更小，则为所述受试者提供低蛋白质膳食，所述低蛋白质膳食提供的来自蛋白质的卡路里百分数小于预定的临界蛋白质摄取水平，其中所述低蛋白质膳食在所述受试者为65岁以下时提供；和

监测所述受试者的IGF-1水平，以确定膳食的频率和类型，

如果所述受试者的年龄比所述预定的年龄更大，则为所述受试者提供高蛋白质膳食且所述高蛋白质膳食在所述受试者大于65岁时提供，所述高蛋白质膳食具有的蛋白质卡路里百分数大于所述预定的临界蛋白质摄取水平，

其中所述低蛋白质膳食包括补充剂，其与非常低蛋白质量或无蛋白质膳食一起每2个周至2个月提供5至7天待消耗的额外水平的非必需氨基酸，

并且其中所述低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替，所述低蛋白质膳食提供7天和最大2个月，每2个周至2个月提供5-7天的所述补充剂，期间是1至7周的正常膳食。

2.如权利要求1所述的方法，其中为所述受试者提供所述低蛋白质膳食预定的天数。

3.如权利要求2所述的方法，其中为所述受试者提供所述低蛋白质膳食3至7天。

4.如权利要求2所述的方法，其中低蛋白质定期提供给所述受试者。

5.如权利要求2所述的方法，其中所述低蛋白质膳食是禁食模仿膳食，其提供小于10％的卡路里来自蛋白质和/或所有的蛋白质是植物基的。

6.如权利要求1所述的方法，其中所述低蛋白质膳食第一天提供4.5至7千卡每磅受试者和所述低蛋白质膳食的第二天至第五天提供每天3至5千卡每磅受试者，所述低蛋白质膳食包括：

在第一天小于30g的糖；

在第二至第五天小于20g的糖；

在第一天小于28g的蛋白质，全部为植物基的；

在第二至第五天小于18g的蛋白质，全部为植物基的；

在第一天20至30克的单不饱和脂肪；

在第二至第五天10至15克的单不饱和脂肪；

在第一天6至10克的多不饱和脂肪；

在第二至第五天3至5克的多不饱和脂肪；

在第一天小于12g的饱和脂肪；

在第二至第五天小于6克的饱和脂肪；和

在第二至第五天12至25克的丙三醇每天。

7.如权利要求6所述的方法，其进一步包括为所述受试者在第二时间段施用第二膳食，所述第二膳食在所述低蛋白质膳食之后25至26天提供的总体卡路里消耗在受试者的正常卡路里消耗的10％之内。

8.如权利要求7所述的方法，其中所述低蛋白质膳食和所述第二膳食的组合为所述受试者提供的总卡路里数量在受试者的正常卡路里摄取的10％之内。

9.如权利要求6所述的方法，其中所述低蛋白质膳食在所有天数内包括至少50％的每日推荐量的膳食纤维。

10.如权利要求6所述的方法，其中IGF-I的水平下降和IGFBP1的水平增加。

11.如权利要求1所述的方法，其中大于70％的蛋白质卡路里是植物基的。

12.如权利要求1所述的方法，其中所述补充剂提供一种或多种下述氨基酸作为氮源：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸，同时基本上不包括异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸以使得异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸组合在一起以小于受试者的膳食的总重5％的量存在。

13.如权利要求12所述的方法，其中异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸组合在一起以小于受试者的膳食的总重的3％存在。

14.如权利要求1所述的方法，其进一步包括监测受试者的IGFBP1水平。

15.如权利要求1所述的方法，其中所述预定的临界蛋白质摄取水平是20％。

16.如权利要求1所述的方法，其中所述预定的临界蛋白质摄取水平是15％。

17.如权利要求1所述的方法，其中所述预定的临界蛋白质摄取水平小于约10％。

18.如权利要求1所述的方法，其中所述预定的临界蛋白质摄取水平小于约5％。

19.如权利要求1所述的方法，其中所述低蛋白质的至少70％的蛋白质卡路里源自植物来源。

20.如权利要求19所述的方法，其中所述植物来源包括大豆。

21.蛋白质膳食在制备用于降低受试者中葡萄糖和/或IGF-1水平的试剂中的用途，所述蛋白质膳食为小于约10％的卡路里来自蛋白质来源的低蛋白质膳食，所述低蛋白质膳食用于在所述受试者为65岁以下时提供，

如果所述受试者的年龄比预定的年龄更大，则为所述受试者提供高蛋白质膳食且所述高蛋白质膳食在所述受试者大于65岁时提供，所述高蛋白质膳食具有的蛋白质卡路里百分数大于所述预定的临界蛋白质摄取水平，

其中所述低蛋白质膳食包括补充剂，其与非常低蛋白质量或无蛋白质膳食一起每2个周至2个月提供5至7天待消耗的额外水平的非必需氨基酸，

并且其中所述低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替，所述低蛋白质膳食提供7天和最大2个月，每2个周至2个月提供5-7天的所述补充剂，期间是1至7周的正常膳食。

22.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食的0至10％的卡路里来自蛋白质来源。

23.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食的0至5％卡路里来自蛋白质来源。

24.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食的约0％卡路里来自蛋白质来源。

25.如权利要求22所述的用途，其中所述低蛋白质膳食也是低卡路里膳食，其包括脂肪来源使得至少50％的来自脂肪的卡路里是来自长链不饱和脂肪酸。

26.如权利要求25所述的用途，其中所述脂肪来源包括植物油。

27.如权利要求26所述的用途，其中所述植物油是大豆油。

28.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食包括脂肪来源使得至少50％的来自脂肪的卡路里是来自具有13至28个碳原子的长链不饱和脂肪酸。

29.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食包括脂肪来源使得至少25％的来自脂肪的卡路里是具有2至7个碳原子的短链脂肪酸和/或来自具有8至12个碳原子的中链饱和脂肪酸。

30.如权利要求29所述的用途，其中所述脂肪酸是月桂酸和/或肉豆蔻酸。

31.如权利要求29所述的用途，其中脂肪酸是来自橄榄油、仁油和/或椰子油。

32.如权利要求21所述的用途，其中所述低蛋白质膳食包括来自脂肪的卡路里的量为膳食中包含的总卡路里的约0至22％。

33.低蛋白质膳食和限制卡路里的膳食在制备用于减轻受试者中的化学毒性的症状的试剂中的用途，其中，在第一时间段提供低蛋白质膳食，所述低蛋白质膳食包括小于10％的卡路里来自蛋白质且所述低蛋白质膳食用于在所述受试者为65岁以下时提供；和

在第二时间段提供限制卡路里的膳食，所述限制卡路里的膳食具有低蛋白质膳食的0至50％的卡路里，

如果所述受试者的年龄比预定的年龄更大，则为所述受试者提供高蛋白质膳食且所述高蛋白质膳食在所述受试者大于65岁时提供，所述高蛋白质膳食具有的蛋白质卡路里百分数大于所述预定的临界蛋白质摄取水平，

其中所述低蛋白质膳食包括补充剂，其与非常低蛋白质量或无蛋白质膳食一起每2个周至2个月提供5至7天待消耗的额外水平的非必需氨基酸，

并且其中所述低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替，所述低蛋白质膳食提供7天和最大2个月，每2个周至2个月提供5-7天的所述补充剂，期间是1至7周的正常膳食。

34.如权利要求33所述的用途，其中所述限制卡路里的膳食包括0至10％的卡路里来自蛋白质来源。

35.低蛋白质膳食和化疗剂在制备用于治疗受试者中的化学毒性的试剂中的用途，其中所述低蛋白质膳食包括小于10％的卡路里来自蛋白质且所述低蛋白质膳食用于在所述受试者为65岁以下时提供，

如果所述受试者的年龄比预定的年龄更大，则为所述受试者提供高蛋白质膳食且所述高蛋白质膳食在所述受试者大于65岁时提供，所述高蛋白质膳食具有的蛋白质卡路里百分数大于所述预定的临界蛋白质摄取水平，

其中所述低蛋白质膳食包括补充剂，其与非常低蛋白质量或无蛋白质膳食一起每2个周至2个月提供5至7天待消耗的额外水平的非必需氨基酸，

并且其中所述低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替，所述低蛋白质膳食提供7天和最大2个月，每2个周至2个月提供5-7天的所述补充剂，期间是1至7周的正常膳食。

36.如权利要求35所述的用途，其中所述化疗剂选自多柔比星、环磷酰胺、顺铂、5氟尿嘧啶和其组合。

预防化学毒性和与年龄相关的疾病的方法和膳食

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年2月12日提交的美国临时申请系列号61/763,797的权益，其内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究和开发的声明

[0004] 本发明在根据美国国立卫生研究院授权的合同号P01 AG034906-01的政府资助下完成。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 在至少一个方面中，本发明涉及减轻与年龄相关的疾病和化学毒性的症状的方法。

背景技术

[0006] 没有营养不良的卡路里限制(Caloric restriction,CR)已经一贯显示延长许多动物模型的寿命，包括酵母、秀丽隐杆线虫和小鼠。但是，CR对非人灵长类的寿命仍有争议，并且可受膳食成分的严重影响。认为模型生物体中与CR相关的寿命延长通过其对GH、GHR的作用而发挥作用，导致随后IGF-1和胰岛素水平和信号传导的不足。在秀丽隐杆线虫中，通过显示胰岛素/IGF-1途径中的通过营养素可用性调节的突变造成寿命的两倍增加，发现了该途径对寿命的影响。其他研究揭示了功能在于生长信号传导途径，包括Tor-S6K和Ras-cAMP-PKA的基因的直向同源基因的突变，促进多个模型生物体中的衰老，因此提供了通过促生长营养素信号传导基因保守调节衰老的证据。

[0007] 最近，已经显示患生长激素受体缺乏(GHRD)的人，展示血清IGF-1和胰岛素水平的重大缺陷，表现出无癌症死亡率，没有糖尿病，并且尽管具有更高的肥胖发病率，结合该组中来自心脏疾病和中风的死亡与它们亲属的那些类似。在调查了230例GHRD的研究中，也报道了类似的癌症的预防。

[0008] 蛋白质限制或具体氨基酸，比如甲硫氨酸和色氨酸的限制，可阐释卡路里限制(calorie restriction)对寿命和疾病风险的部分影响，因为蛋白质限制降低了IGF-1水平，可延长哺乳动物的寿命，与卡路里摄取无关，并且也已经显示降低啮齿动物模型中的癌症发病率。

[0009] 因此，需要膳食干预，其可在愿意慢慢修改他们的膳食和仅仅考虑定期干预而继续他们正常膳食的两种受试者中减轻与年龄相关的疾病的症状。

发明内容

[0010] 本发明通过提供至少一个实施方式解决了现有技术的一个或多个问题，提供了减轻衰老的症状或与年龄相关的症状的方法。该方法包括其中测定受试者的平均日蛋白质摄取水平的步骤。在一个改良中，平均日蛋白质摄取水平表达为来自受试者平均每天消耗的蛋白质的卡路里百分数。就蛋白质消耗而言，测定来自动物和植物来源的蛋白质卡路里的

相对量。如果受试者的平均日蛋白质摄取水平鉴定为大于预定的临界(cutoff)蛋白质摄取水平和如果受试者比预定的年龄更小，为受试者提供定期的低蛋白质高营养膳食代替他们的正常膳食。

[0011] 在另一方面中，提供了用于降低受试者中葡萄糖和/或IGF-1水平的方法。方法包括为受试者提供定期低卡路里和/或低蛋白质膳食的步骤，其中小于约10％的卡路里来自植物基蛋白来源。监测受试者的葡萄糖和/或IGF-1水平，以确定是否应增加或降低蛋白质摄取。

[0012] 在另一方面中，低蛋白质膳食包括补充剂，其提供额外水平的非必需氨基酸，与非常低蛋白质量或没有蛋白质的膳食一起在5至7天的时间内被消耗。在一个改良中，低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替。在这样的变型中，每2周至2月提供低蛋白质植物基膳食7天，期间是1至7周的正常膳食。典型地，补充剂提供一个或多个下述氨基酸作为氮源：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸同时基本上不包括异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸，以使得异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸的组合以小于受试者的膳食的总重5％的量存在。在进一步改良中，异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸的组合以小于受试者的膳食的总重的3％存在。

附图说明

[0013] 图1.表9显示适合人受试者的禁食模仿膳食的卡路里概述。禁食模仿膳食(fasting mimicking diet,FMD)，Prolon，在诱导禁食样应答的同时使营养最大化。显示了5天膳食每天消耗的卡路里，以及每磅和千克的体重调整的kcal。5天膳食方案期间消耗的卡路里的减少(Δ5天)显示为1)基于每天膳食2,000卡路里，或2)基于分别对于个人体重≥200、150-200和≤150磅的2,800、2,400和2,000卡路里膳食；

[0014] 图2.表10显示对于适合180-200磅的人受试者的每膳食天的限定的大量营养素含量。基于平均180-200磅的人用于5天FMD方案每天的大量营养素含量。在第1天膳食的卡路里摄取相比接下来的天(2-5)稍微下降，使得人体适应低卡路里消耗。呈现了由脂肪、碳水化合物(具体由糖)和蛋白质为Prolon方案的每天贡献的卡路里％；

[0015] 图3.表11显示在本发明的变型中对于适合180-200磅的人受试者的每一膳食天限定的微量营养素含量。基于平均180-200磅的人的5天FMD方案每天的微量营养素含量。基于2,000卡路里膳食计算每日值的百分数(％DV)。*对于一些微量营养素，DV未限定；显示的值基于参考日摄取量(RDI)；

[0016] 图4.使用Cox比例风险模型，对于全因和癌症死亡率，发现了年龄和蛋白质组之间的统计学上显著的($p<.05$)相互作用。基于这些模型，通过在基线的年龄为每个蛋白质组计算预测的剩余的预期寿命。基于结果，在66岁之前低蛋白质呈现具有针对全因和癌症死亡率的保护作用，在66岁的点其变成有害的。对于心血管疾病(CVD)和糖尿病死亡率没有发现显著的相互作用；

[0017] 图5.50-65和66+受访者中血清IGF-1水平报告低、中或高蛋白质摄取。具有低蛋白质摄取的那些50-65受访者中IGF-1当与高蛋白质摄取相比时明显更低($P=0.004$)。在66+

年龄，高和低摄取之间的区别变得边缘显著(P＝0.101)。计算IGF-1水平的群组包括2253名受试者。50-65岁的那些(n＝1,125)中，89名在低蛋白质组别，854名在中蛋白质组别，和182名在高蛋白质组别。66+年龄的那些(n＝1,128)中，80名在低蛋白质组别，867名在中蛋白质组别，和181名在高蛋白质组别。*P<0.01；

[0018] 图6.(A)移植20,000黑素瘤(B16)细胞，和进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的18周龄雄性C57BL/6小鼠中的肿瘤发病率。(B)进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的(18wk)C57BL/6雄性小鼠中的B16肿瘤体积进展。(C)在16天，进食高蛋白质(n＝5)或低蛋白质(n＝5)膳食的(18wk)雄性C57BL/6小鼠中的IGF-1。(D)在16天，进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的雄性(18wk)C57BL/6小鼠中的IGFBP-1。(E)10月龄雌性GHRKO小鼠(n＝5)对年龄一致的同窝仔畜对照(Ctrl;n＝7)的B16黑素瘤肿瘤进展。(F)移植20,000细胞乳腺癌(4T1)，进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(7％;n＝10)膳食的12周龄雌性BALB/c小鼠的肿瘤发病率。(G)进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的雌性(12wk)BALB/c小鼠中的4T1乳腺癌进展。(H)在16天，进食高酪蛋白蛋白质(n＝5)或低酪蛋白蛋白质(n＝5)膳食的雌性(12wk)BALB/c小鼠中的IGF-1。(I)在16天，进食高酪蛋白蛋白质(n＝10)或低酪蛋白蛋白质(n＝10)膳食的雌性(12wk)BALB/c小鼠中的IGFBP-1。(J)在16天，进食高大豆蛋白质(n＝5)或低大豆蛋白质(n＝5)膳食的雌性(12wk)BALB/c小鼠中的IGF-1。(K)在16天，进食高大豆蛋白质(n＝10)或低大豆蛋白质(n＝10)膳食的雌性(12wk)BALB/c小鼠中的IGFBP-1。暴露于0.5x、1x或2x浓度的标准氨基酸混合物的酵母的(L)生存和(M)DNA突变频率。(N)在仅仅包含Trp、Leu和His的培养基中生长的酵母相比在存在全氨基酸的情况下生长的那些中的PDS和STRE活性。(O)Ras2缺失避免慢性暴露于1mM H_2O_2的野生型(DBY746)和ras2Δ突变体中测量为DNA突变频率(Can^1)的氧化应激-诱导的基因组不稳定。(P)酿酒酵母(S.cerevisiae)中氨基酸对于衰老和基因组不稳定影响的模型。氨基酸激活也被葡萄糖激活的Tor-Sch9和Ras-cAMP-PKA途径，并且部分通过降低的Gis1和Msn2/4活性来促进年龄和氧化应激-依赖性基因组不稳定。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001；

[0019] 图7.蛋白质摄取对年幼和年老小鼠体重的影响。(A)进食高(18％)蛋白质膳食的年幼(18周龄)(n＝10)和年老(24月龄)(n＝6)C57BL/6小鼠。(B)进食低(4％)蛋白质膳食的年幼(18周龄)(n＝10)和年老(24月龄)(n＝6)C57BL/6小鼠；

[0020] 图8.表12:死亡率和蛋白质摄取之间的相关性；

[0021] 图9.(A)进食等卡路里但是不同的高(18％)或低(4％)蛋白质含量膳食的18周龄雄性C57BL/6小鼠的30天体重。(B)进食等卡路里但是不同的高(18％)或低(4％)蛋白质含量膳食的18周龄雄性C57BL/6小鼠的30天食物摄取，以kcal/天计。(C)在16天，进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的雄性(18wk)C57BL/6小鼠中的IGFBP-2。(D)在16天，进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的雄性(18wk)C57BL/6小鼠中的IGFBP-3。(E)进食等卡路里但是不同的高(18％>)或低(7％>)蛋白质含量膳食的12周龄雌性BALB/c小鼠的30天体重。(F)12周龄雌性BALB/c小鼠进食等卡路里但是不同的高(18％)或低(4％)蛋白质含量膳食的30天食物摄取，以kcal/天计。(G)在16天，进食高蛋白质(n＝10)或低蛋白质(n＝10)膳食的12周龄雌性BALB/c小鼠中的IGFBP-3。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001;ANOVA;

[0022] 图10.10月龄雌性GHRKO小鼠(n＝5)对年龄一致的野生型对照(Wt;n＝13)中的B16黑素瘤的肿瘤体积进展。**P<0.01;

[0023] 图11.(A)酵母时序生存和(B)减弱的年龄-依赖性基因组不稳定显示为相比ras2A突变体野生型(DBY746)中CAN1基因(测量为Can^1突变体/10^6细胞)的突变频率。(C)用1mM H_2O_2慢性处理的野生型和ras2A突变体的时序生存。(D)Ras2的缺乏避免氧化应激-诱导基因组不稳定(突变频率Can^r)。*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001;

[0024]]图12a)-f).IGF-1减轻蛋白质消耗和死亡率之间的相关性。基于来自蛋白质和对死亡率的IGF-1之间的相互作用的Cox比例风险模型的结果,通过中和高蛋白质组的IGF-1计算相对于低蛋白质组的预测的风险比。在50-65岁年龄组中,对于全因(3a)或CVD死亡率(3b)没有发现蛋白质和IGF-1之间显著的相互作用。但是,对于50-65岁受试者,对于癌症死亡率(3c)IGF-1和高对低蛋白质之间的相互作用是显著的(p＝.026)。结果显示对于IGF-1每10ng/ml的增加,高蛋白质组相对于低蛋白质组,癌症死亡率风险增加9%($HR_{高蛋白质x\ IGF\text{-}1}$:1.09;95%CI:1.01-1.17)。对于66+年龄的受访者仅仅对于CVD死亡率,蛋白质和IGF-1之间的相互作用明显。如果IGF-1也低,具有高或中蛋白质膳食的那些具有降低的CVD风险;但是,随着IGF-1增加没有好处;

[0025] 图13.表13:样品特征;

[0026] 图14.表14:蛋白质摄取和死亡率之间的相关性(N＝6,381);

[0027] 图15.表15:IGF-1对死亡率和蛋白质摄取之间的相关性(N＝2,253)的影响;

[0028] 图16.表16:蛋白质和IGF-I对死亡率之间的相互作用的风险比;

[0029] 图17.表17:动物和植物蛋白质对死亡率和蛋白质摄取之间的相关性的影响;

[0030] 图18.表18:通过年龄和蛋白质摄取调整的平均HbA1c、糖尿病患病率和平均BMI;

[0031] 图19.表19:没有糖尿病的参与者中在基线时糖尿病死亡率和蛋白质摄取之间的相关性;

[0032] 图20A-D.人受试者参与3轮低蛋白质低卡路里和高营养5天禁食模仿膳食(FMD,以绿色指示,见正文)随后约3周的正常膳食(棕色指示)(A)。在5天膳食之前和结束时(时间点A和B),而且也在完成第3个5天FMD之后5-8天(时间点C)抽血。5天膳食显著降低血糖(B)、IGF-1(c)和IGFBP-1(D)水平。葡萄糖*,p<0.05,N＝18;IGF-1,**,p<0.01,*p<0.05,N＝16;IGFBP-1,**,p<0.01,N＝17;所有的统计测试作为配对的t测试进行,两个在原始值上截尾;

[0033] 图21.由实验膳食的大量营养素提供的卡路里,以%计。AIN93G标准食物是参考膳食并且提供给所有的小鼠。在大量营养素组分(脂肪,蛋白质和碳水化合物)中改良的实验膳食都基于该膳食。低碳水化合物LCHP膳食与AIN93G配方(13%对63.9%)相比,来自碳水化合物的卡路里降低至20%,但是包含更多的蛋白质(45.2%)和脂肪(41.8%)。膳食20%P-1(大豆油作为脂肪来源)和20%P-2(椰子油作为脂肪来源)的来自蛋白质来源的卡路里降低至20%与AIN93G配方相比;0%P膳食不包含蛋白质;所有这些膳食与AIN93G标准食物是等卡路里的。设计生酮高脂肪膳食60%HF,以提供60%来自脂肪来源的消耗的卡路里,按比例降低来自蛋白质和碳水化合物的卡路里。90%HF膳食是包含90%脂肪同时仅仅提供最小碳水化合物(小于1%)和一半蛋白质含量(9%)的生酮膳食。详细的膳食组成和卡路里含量总结在表14中;

[0034] 图22.卡路里限制降低体重、葡萄糖和IGF-1。A)雌性CD-I小鼠,12-15周龄自由进

食(灰色正方形)AIN93G啮齿动物标准食物,暴露于40%、60%、80%和90%的限制卡路里的AIN93G膳食(三角形)或禁食(STS,绿色矩形),直到小鼠丢失20%它们的初始体重(点划线)。每个实验组N=5。所有的数据表示为平均数±SEM。B)线性拟合CR方案的严重程度对持续时间(天),直到达到80%的体重。C)当达到80%体重时的小鼠的血糖水平。红线表示平均数;*p<0.05,***p<0.001,ANOVA,杜克多重比较。D)当达到80%的体重时,小鼠的血清IGF-1水平。红线表示平均数;***p<0.001,ANOVA,杜克多重比较;

[0035] 图23.限定大量营养素的膳食对体重、食物摄取、葡萄糖和血清IGF-1的作用。五只雌性12-15周龄的CD-I小鼠自由进食AIN93G啮齿动物标准食物(黑圆圈)或A)两个不同低蛋白质膳食(20%P-1和20%P-2),低碳水化合物但是高蛋白质(LCHP)的膳食,缺乏蛋白质的膳食(0%P)或B)高脂肪膳食(60%HF)和生酮膳食(90%HF)。关于大量营养素的详细概述显示在表1中。C)每日自由卡路里摄取膳食AIN93G、20%P-1、20%P-2、LCHP和0%P。D)每日自由卡路里摄取膳食60%HF和90%HF;AIN93G显示为参考。所有的数据表示为平均数±SEM。E)自由进食9天之后的血清IGF-1水平。线表示平均数;*p<0.05,***p<0.001,ANOVA,与AIN93G对照相比的杜克多重比较;

[0036] 图24.A)对于限制卡路里的限定大量营养素的膳食的压力抗性测试。小鼠自由进食(AIN93G)、禁食60h(STS)或进食具有限定的大量营养素组分的限制50%卡路里的膳食(AIN93G、LCHP、0%P、60%HF、90%HF)3天(绿色盒)然后静脉内注射多柔比星(24mg/kg,红色虚线)。注射后跟踪生存25天,其后认为剩余的动物是幸存者。B)3天自由进食和CR膳食之后,以及60h STS之后的血糖水平。线表示平均数。*p<0.05,***p<0.001,ANOVA,杜克多重比较。用统计软件Prism(GraphPad Software)绘制来自配对汇集实验的生存数据;

[0037] 图25.体内GL26神经胶质瘤和4T1乳腺癌的肿瘤进展。A)通过以mm^3计总的肿瘤体积显示鼠GL26神经胶质瘤的皮下肿瘤进展。当在第10天肿瘤在皮下明显时,开始肿瘤测量。动物自由进食AIN93G(N=5)作为对照或低蛋白质膳食20%P-1(N=6)。所有的数据表示为平均数±SEM。B)通过以mm^3计总的肿瘤体积显示鼠4T1乳腺癌的皮下肿瘤进展。当在第12天肿瘤在皮下明显时开始肿瘤测量。对照动物(N=10)不接收治疗并且肿瘤快速进展,在肿瘤移植后的第54天达到2000mm^3的终点体积。动物(N=9)在第15、33和44天注射顺铂(CDDP)。以12mg/kg通过静脉内注射递送第一CDDP剂量,以8mg/kg递送两个随后的注射,以避免化学毒性。50%ICR+CDDP组中的小鼠(N=9)以间歇方案进食,AIN93G膳食降低至对照组每日卡路里摄取的50%,三天(ICR,绿色盒)然后顺铂注射。注射方案与CDDP组的相同。所有的数据表示为平均数±SEM;***p<0.001,ANOVA,与对照相比的杜克多重比较;

[0038] 图26.A)自由进食(灰色正方形)AIN93G啮齿动物标准食物、进食限制40%、60%、80%和90%卡路里的AIN93G膳食(三角形)或禁食(STS,绿色矩形)直到小鼠丢失20%它们初始体重的动物以kcal/天计的食物摄取。B)暴露于所有的实验膳食48h之后小鼠的血糖水平。线表示平均数;**p<0.01,***p<0.001,ANOVA,杜克多重比较;

[0039] 图27.9天自由进食指定的实验膳食的血糖水平。线表示平均数;

[0040] 图28.A)自由进食(AIN93G)或进食用限定的大量营养素组分限制50%卡路里的膳食(60%HF、LCHP、0%P)3天(绿色盒),然后静脉内注射多柔比星(24mg/kg,红色虚线)的小鼠的体重特征。B)自由进食(AIN93G),进食用限定的大量营养素组分限制50%卡路里的膳食(AIN93G、90%HF)3天或禁食60h(绿色盒),然后静脉内注射多柔比星(24mg/kg,红色虚

线)的小鼠的体重特征;

[0041] 图29.经典生酮膳食和改良的Atkins膳食的大量营养素提供的以%计的卡路里;

[0042] 图30.表20.概述实验膳食中包含的大量营养素和卡路里;

[0043] 图31.表21.限定大量营养素的膳食的详细组分;

[0044] 图32.表22.用于限定大量营养素的膳食的调整方案;

[0045] 图33.表23.限制卡路里的膳食的组分;

[0046] 图34.表24.限制卡路里的限定大量营养素的膳食的组分。

具体实施方式

[0047] 现详细参考目前本发明优选的组合物、实施方式和方法。图没必要按照比例。公开的实施方式仅仅是本发明的例子,其可具体化为各种形式和可选的形式。所以,本文公开的具体细节不解释为限制性的,而是仅仅解释为本发明任何方面的代表性基础和/或教导本领域技术人员积极采用本发明的代表性基础。

[0048] 除非在实施例中,或以其他方式明确指出,该说明书中指示材料数量或反应和/或用途条件的所有数值数量理解为被词语“大约”修饰,以描述本发明最宽的范围。在指出的数值界限内的实践通常是优选的。而且,除非明确相反指出:百分数、“份数”和比值是按重量计的;适合或优选用于结合本发明给定目的一组或一类材料暗示任何两个或更多个该组或该类成员的混合物同样是适合的或优选的;化学术语中成分的描述指在添加至说明书中指出的任何组合时的成分,并且没必要排除混合时混合物的成分之间的化学相互作用;首字母缩写或其他缩写的第一次定义应用于本文所有的随后相同缩写的用途并且加以必要的更改至初始限定的缩写的通常的语法变型;并且,除非明确相反指出,通过如之前或稍后为相同的特性提及的相同技术测定特性的测量。

[0049] 本发明不限于下述具体的实施方式和方法,因为具体的组分和/或条件可当然被改变。此外,本文使用的术语仅仅用于描述本发明具体的实施方式并且绝不旨在是限制性的。

[0050] 如在说明书和所附的权利要求中所使用,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代物,除非上下文另外明确指出。例如,提及单数的组分旨在包括多个组分。

[0051] 术语“必需氨基酸”指不能由生物体合成的氨基酸。在人体中,必需氨基酸包括异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸。另外,在人体中,下述氨基酸在某些条件下也是必需的——组氨酸、酪氨酸和硒代半胱氨酸。

[0052] 术语“千卡”(kcal)和“卡路里(Calorie)”指食物卡路里。术语“卡路里(calorie)”指所谓的小卡路里。

[0053] 术语“受试者”指人或动物,包括所有哺乳动物,比如灵长类(尤其高级灵长类)、绵羊、狗、啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)、荷兰猪、山羊、猪、猫、兔子和母牛。

[0054] 在本发明的实施方式中,提供了减轻衰老症状或与年龄相关症状的方法。例如,本实施方式的方法可预防或治疗糖尿病或癌症,和延迟与年龄相关的死亡率和其他与年龄相关的疾病。在其他变型中,该方法用于降低受试者中葡萄糖和/或IGF-1水平。在仍其他变型中,该方法用于治疗受试者的化学毒性(例如,减轻症状)。典型地,该方法减轻这些病况的

一个或多个症状。特别地，提供了延长受试者寿命的方法。在本文中，延长寿命意思是增加受试者生活更长的机会。例如，当与受试者具有相同特征(体重、年龄、葡萄糖水平、胰岛素水平等，见下文)的许多受试者经历本发明的方法时，平均生存增加。该方法包括其中测定受试者的平均日蛋白质摄取水平的步骤。在一个改良中，平均日蛋白质摄取水平表达为来自受试者平均每天消耗的蛋白质的卡路里百分数。可通过受试者回答有关受试者每日和每周蛋白质、脂肪和碳水化合物消耗的问题或填写书面调查，评估受试者的蛋白质摄取。就蛋白质消耗而言，测定来自动物和植物来源的蛋白质卡路里的相对量。

[0055] 如果受试者的平均日蛋白质摄取水平鉴定为大于预定的临界蛋白质摄取水平和如果受试者比预定的年龄更小，为受试者提供低蛋白质膳食。典型地，预定的年龄是60至70岁。以逐渐增加的优先级，预定的年龄是60岁、61岁、62岁、63岁、64岁、66岁、67岁、68岁、69岁、70岁和65岁和更小。典型地，低蛋白质膳食提供的来自蛋白质的卡路里百分数小于预定的临界蛋白质摄取水平。典型地，预定的临界蛋白质摄取水平是来自受试者平均每天消耗的总卡路里的蛋白质的20％的卡路里。在一个改良中，预定的临界蛋白质摄取水平是来自受试者平均每天消耗的总卡路里的蛋白质的15％的卡路里。在一个改良中，预定的临界蛋白质摄取水平是来自受试者平均每天消耗的总卡路里的蛋白质的10％的卡路里。在另一改良中，预定的临界蛋白质摄取水平是来自受试者平均每天消耗的总卡路里的蛋白质的5％的卡路里。在一些改良中，以逐渐增加的优先级，低蛋白质膳食提供大于40％、50％、60％、70％、80％和90％的来自植物来源比如大豆的蛋白质的卡路里。有利地，低蛋白质膳食提供约100％的来自植物来源的蛋白质的卡路里。

[0056] 监测受试者的IGF-1和/或IGFBP1水平，以确定受试者应进行的膳食的频率和类型(例如，见下文的蛋白质量)，并且具体而言，蛋白质摄取是否应增加或降低(即，典型地，在受试者提供一轮或多轮的低蛋白质膳食之后，IGF-I的水平下降和IGFBP1水平增加。尤其，低蛋白质膳食降低IGF-I至少10％和/或升高IGFBP1水平至少50％。在另一改良中，低蛋白质膳食降低IGF-I至少20％和/或升高IGFBP1水平至少75％。在另一改良中，低蛋白质膳食降低IGF-I至少50％和/或升高IGFBP1水平至少2倍。如果测定IGF-I降低和/或IGFBP1增加不足，可调整低蛋白质膳食，以提供更少量的来自蛋白质来源的卡路里。

[0057] 在本实施方式的变型中，如果受试者的年龄比为受试者提供高蛋白质膳食的预定年龄更大，则为受试者提供高蛋白质膳食，所述高蛋白质膳食具有的蛋白质卡路里百分数大于预定的临界蛋白质摄取水平。

[0058] 在另一变型中，为受试者提供低蛋白质膳食预定的天数。例如，为受试者提供低蛋白质膳食2至10天。在另一改良中，为受试者提供低蛋白质膳食3至7天。在许多情况下，为受试者周期性提供低蛋白质。为受试者提供低蛋白质膳食的频率由受试者的胰岛素抗性水平、空腹血糖水平、IGF-I、IGFBP1、肥胖、体重指数、之前10年的体重减轻、家族癌症史、家族糖尿病史、家族早死亡率历史决定。频率可为具有高IGF-I水平(例如高于200ng/ml)、低水平的IGFBP1和/或胰岛素抗性的受试者高至每个月一次，至为具有120和200ng/ml之间IGF-I和没有胰岛素抗性的受试者3个月一次。

[0059] 在一个改良中，低蛋白质膳食是禁食模仿膳食，其提供来自蛋白质小于10％的卡路里和/或所有的蛋白质是植物基的，如国际专利申请PCT/US13/66236中阐释，该申请的全部内容通过参考并入本文。尤其，低蛋白质膳食对受试者施用第一时间段。如本文所使用，

有时该实施方式的低蛋白质膳食)。在一个改良中,低蛋白质膳食在低蛋白质膳食的第一天(第1天)提供4.5至7千卡每磅受试者并且然后第二至第五天(第2-5天)3至5千卡每磅受试者每天。第二膳食对受试者施用第二时间段。在一个改良中,在上述低蛋白质膳食后的25至26天(例如,立即),第二膳食提供总体卡路里消耗在受试者的正常卡路里消耗的20%之内。典型地,观察到IGF-I的水平下降和IGFBP1的水平增加。在一个改良中,该实施方式的方法重复1至5次。在另一改良中,该实施方式的方法重复2至3次。在仍另一改良中,该实施方式的方法重复数年的时间或受试者的整个生命,频率为每1至3月一次,这取决于受试者IGF-I和IGFBP1水平以及蛋白质摄取。对于具有高蛋白质摄取(高于15%的卡路里来自蛋白质)和/或高IGF-I水平(例如高于200ng/ml),和低水平的IGFBP1和/或胰岛素抗性的受试者,频率可高至每月一次,对于蛋白质摄取在10-15%的卡路里之间、IGF-I水平在120和200ng/ml之间,和没有胰岛素抗性的受试者频率可至每3个月一次。

[0060] 在另一改良中,低蛋白质膳食和第二膳食(例如,受试者的正常膳食和卡路里摄取)的组合为受试者提供的卡路里总量在受试者的正常卡路里摄取的10%之内。在另一改良中,低蛋白质膳食和第二膳食的组合为受试者提供的卡路里总量在受试者的正常卡路里摄取的5%之内。在仍另一改良中,低蛋白质膳食和第二膳食的组合为受试者提供的卡路里总量在受试者的正常卡路里摄取的1%之内。

[0061] 在一个改良中,禁食模仿膳食(FMD)涉及完全替代受试者的膳食5天。在该5天的时间内,受试者消耗足够的水。对于正常体重的健康的受试者(体重指数或BMI在18.5-25之间),头3个月膳食消耗每月一次(5天该膳食和25-26天他们的正常膳食),其后3个月一次(每3个月5天)。测量受试者的重量并且在开始下一轮之前受试者在膳食期间必须再次获得至少95%的丢失的重量。BMI小于18.5的受试者不应进行FMD,除非由医生推荐和监督。相同的方案(每月一次3个月,接着其后每3个月一次)可用于治疗,或支持治疗本专利申请中提到的所有病况。

[0062] FMD的消耗指南包括相对于卡路里、大量营养素和微量营养素的营养事实。根据使用者的体重消耗卡路里。总卡路里消耗是第1天4.5-7卡路里每磅(或10-16卡路里每千克)和第2至5天3-5卡路里每磅(或7-11卡路里每千克)。图1-3提供了第一天至第五天的营养素。除了大量营养素,膳食应在第1天包含小于30g的糖和在第2-5天小于20g的糖。膳食应在第1天包含小于28g的蛋白质和在第2-5天小于18g的蛋白质,大部分或全部来自植物基来源。膳食应在第1天包含20和30克之间单不饱和脂肪和在第2-5天10-15克的单不饱和脂肪。膳食应在第1天包含6和10克之间多不饱和脂肪和在第2-5天3-5克的多不饱和脂肪。膳食应在第1天包含小于12g的饱和脂肪和在第2-5天小于6克的饱和脂肪。典型地,在所有天的脂肪源自下述组合:杏仁、澳洲坚果、美洲山核桃、椰子、椰子油、橄榄油和亚麻籽。在一个改良中,在所有的天中,FMD膳食包括超过50%的推荐的每日膳食纤维值。在进一步的改良中,在所有五天中,膳食纤维的量大于15克每天。在第2-5天,膳食应包含12-25克的丙三醇每天。在一个改良中,以0.1克每磅体重/天提供丙三醇。

[0063] 在变型中,FMD包括下述微量营养素(至少95%的非动物基):超过5,000IU的维生素A每天(第1-5天);60-240mg的维生素C每天(第1-5天);400-800mg的钙每天(第1-5天);7.2-14.4mg的铁每天(第1-5天);200-400mg的镁每天(第1-5天);1-2mg的铜每天(第1-5天);1-2mg的锰每天(第1-5天);3.5-7mcg的硒每天(第1-5天);2-4mg的维生素B1每天(第1-

5天)；2-4mg的维生素B2每天(第1-5天)；20-30mg的维生素B3每天(第1-5天)；1-1.5mg的维生素B5每天(第1-5天)；2-4mg的维生素B6每天(第1-5天)；240-480mcg的维生素B9每天(第1-5天)；600-1000IU的维生素D每天(第1-5天)；14-30mg的维生素E每天(第1-5天)；超过80mcg的维生素K每天(第1-5天)；16-25mcg维生素B 12提供在整个5天时间段期间；600mg的二十二碳六烯酸(DHA，藻类衍生的)提供在整个5天时间段期间。FMD膳食提供大部分(即，大于按重量计50％)来自天然来源的高微量营养素含量，包括：羽衣甘蓝(Kale)、腰果、黄椒、洋葱、柠檬汁、酵母、姜黄、蘑菇、胡萝卜、橄榄油、甜菜汁、菠菜、西红柿、羽衣甘蓝叶(Collard)，荨麻、百里香、盐、辣椒、维生素B12(氰钴维生素)、甜菜、白胡桃泥，羽衣甘蓝叶、西红柿、牛至、西红柿汁、橘子汁、芹菜、长叶莴苣、菠菜、小茴香、橘皮、柠檬酸、肉豆蔻、丁香和其组合。表1提供了可提供在FMD膳食中另外的微量营养素补充剂的例子：

[0064] 表1.微量营养素补充剂

	补充	式	量	量范围	单位
Vit A			1250 IU	900-1600	IU
Vit C	抗坏血酸	$C_6H_8O_6$	*15.0000*	10-20	mg
Ca	碳酸钙	$CaCO_3$	*80.0000*	60-100	mg
Fe	富马酸亚铁	$C_4H_2FeO_4$	*4.5000*	3-6	mg
Vit D3	胆钙化醇	$C_{27}H_{44}O$	*0.0025*	0.001-0.005	mg
Vit E	dl-α醋酸生育酚	$C_{29}H_{50}O_2$	*5.0000*	3-7	mg
Vit K	植物甲萘醌		*0.0200*	0.1-0.04	mg
Vit B1	硝酸硫胺	$C_{12}H_{17}N_5O_4S$	*0.3750*	0.15-0.5	mg
Vit B2	核黄素5'-磷酸钠	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	*0.4250*	0.2-0.6	mg
Vit B3	烟酰胺	$C_6H_6N_2O$	*5.0000*	3-7	mg
Vit B5	泛酸钙	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	*2.5000*	1.5-4.0	mg
Vit B6	盐酸吡哆醇	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	*0.5000*	0.3-0.7	mg
Vit B7	生物素	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	*0.0150*	0.01-0.02	mg
Vit B9	叶酸	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	*0.1000*	0.07-0.14	mg
Vit B12	氰钴胺	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	*0.0015*	0.001-0.002	mg
Cr	吡啶甲酸铬	Cr(C6H4NO2)3	*0.0174*	0.014-0.022	mg
Cu	硫酸铜	CuSO4	*0.2500*	0.18-0.32	mg
I	碘化钾	KI	*0.0375*	0.03-0.045	mg
Mg	氧化镁	MgO	*26.0000*	20-32	mg
Mn	硫酸锰	$MnSO_4$	*0.5000*	0.3-0.7	mg
Mo	钼酸钠	Na_2MoO_4	*0.0188*	0.014-0.023	mg
Se	硒酸钠	Na_2O_4Se	*0.0175*	0.014-0.023	mg
Zn	氧化锌	ZnO	*3.7500*	3-5	mg

[0065] 在另一实施方式中，提供了用于执行上面阐释的膳食方案的膳食包装。膳食包装

包括用于为受试者施用第一时间段的低蛋白质膳食的第一组配给量，低蛋白质膳食第一天提供4.5至7千卡每磅的受试者和在低蛋白质膳食的第二至第五天每天提供3至5千卡每磅受试者。膳食包装包括下述配剂量，其每天提供在第一天小于30g的糖；在第二至第五天小于20g的糖；在第一天小于28g的蛋白质；在第二至第五天小于18g的蛋白质；在第一天20至30克的单不饱和脂肪；在第二至第五天10至15克的单不饱和脂肪；在第一天6至10克的多不饱和脂肪；在第二至第五天3至5克的多不饱和脂肪；在第一天小于12g的饱和脂肪；在第二至第五天小于6克的饱和脂肪；和在第二至第五天12至25克的丙三醇。在一个改良中，膳食包装进一步包括足够的配剂量，以提供上面阐释的微量营养素。在进一步改良中，膳食包装提供了指导，其提供上面阐释的方法的细节。

[0066] 在上面阐释的实施方式的改良中，5天供应的膳食包括：汤/肉汤、软饮料、坚果棒和补充剂。如下施用膳食：1)在第一天提供1000-1200kcal具有高微量营养素营养的；2)对于接下来的4天每日提供的膳食为650-800kcal加包含提供60-120kcal的葡萄糖置换碳源(丙三醇或等价物)的饮料。该置换碳源不干扰禁食对干细胞激活的作用。

[0067] 在上面阐释的实施方式的另一改良中，6天低蛋白质膳食方案包括：汤/肉汤、软饮料、坚果棒和补充剂。如下施用膳食：1)在第一天提供1000-1200kcal膳食加高微量营养素营养；2)对于接下来的3天，每日膳食为小于200kcal加包含提供60至120kcal的葡萄糖置换碳源的饮料。该置换碳源，包括丙三醇，不干扰禁食对干细胞激活的作用；3)在第5天，受试者消耗正常膳食；和4)在第6天，除了正常膳食，提供另外的补充食物，其由300kcal的高脂肪来源和微量营养素营养混合物组成，在第6天补充食物由300kcal的高脂肪来源和微量营养素营养混合物组成。

[0068] 在仍另一改良中，膳食方案包括：6天供应低蛋白质膳食包括：汤/肉汤、软饮料、坚果棒和补充剂。1)在第一天提供1000-1200kcal具有高微量营养素营养的膳食；2)对于接下来的3天，每日膳食为600至800kcal包含小于10克的蛋白质和小于200kcal来自糖；3)在第5天，受试者接收正常膳食；和4)在第6天，除了正常膳食提供另外的补充食物，其由300kcal的高脂肪来源和微量营养素营养混合物组成，在第6天，补充食物由300kcal的高脂肪来源和微量营养素营养混合物组成。

[0069] WIPO公开号WO2011/050302和本文的膳食方案提供了尤其有用的膳食方案和膳食包装。WIPO公开号WO2011/050302通过参考以其整体并入本文。尤其，为受试者在第一时间段提供低蛋白质膳食，在第二时间段的第二膳食，和任选的在第三时间段的第三膳食。低蛋白质膳食为受试者提供至多50％的受试者的正常卡路里摄取，至少50％的千卡是源自脂肪，优选地单不饱和脂肪。受试者的正常卡路里摄取是受试者消耗以维持他的/她的体重的kcal数。可通过询问受试者或通过考虑受试者的体重评估受试者的正常卡路里摄取。作为大概指导，受试者的正常卡路里摄取平均是对于男人2600kcal/天和对于女人1850kcal/天。在某些例子中，低蛋白质膳食为受试者提供700至1200kcal/天。在尤其有用的改良中，低蛋白质膳食为平均体重的男性受试者提供约1100kcal/天和为平均体重的女性受试者提供900kcal/天。典型地，第一预定的时间段是约1至5天。在某些例子中，第一预定的时间段是1天。为了是低蛋白质膳食中脂肪水平可透视，美国食物和药品管理局为典型的2000千卡天膳食推荐了下述营养配方：65克脂肪(约585千卡)、50克蛋白质(约200千卡)、300克总碳水化合物(约1200千卡)。所以，在一种形式的低蛋白质膳食中，消除了来自碳水化合物和蛋

白质的大部分卡路里。

[0070] 尽管低蛋白质膳食实际上包括任何脂肪来源，但是高不饱和脂肪的来源，包括单不饱和和多不饱和脂肪来源是尤其有用的(例如，Ω-3/6必需脂肪酸)。单不饱和的食物来源的适当例子包括但不限于花生酱、橄榄、坚果(例如杏仁、美洲山核桃、开心果、腰果)、鳄梨、种子(例如，芝麻)、油(例如，橄榄油、芝麻油、花生油、芥花籽油)等。多不饱和的食物来源的适当的例子包括但不限于核桃、种子(例如，南瓜、向日葵)、亚麻籽、鱼类(例如，鲑鱼、金枪鱼、马鲛鱼)、油(例如，红花油、大豆油、玉米油)。低蛋白质膳食也包括选自植物提取物的组分、矿物质、Ω-3/6必需脂肪酸，和其组合。在一个改良中，这样的植物提取物提供5个推荐的每日植物用量的等价物。植物提取物的适当的来源包括但不限于白菜、羽衣甘蓝、莴苣、芦笋、胡萝卜、白胡桃泥、苜蓿、绿豌豆、西红柿、卷心菜、花椰菜、甜菜。Ω-3/6必需脂肪酸的适当的来源包括鱼类，比如鲑鱼、金枪鱼、马鲛鱼、蓝鱼、旗鱼等。在进一步改良中，低蛋白质膳食包括脂肪来源使得来自脂肪的至少25％的卡路里是具有2至7个碳原子的短链脂肪酸和/或来自具有8至12个碳原子的中链饱和脂肪酸。脂肪酸的具体例子包括月桂酸和/或肉豆蔻酸和脂肪来源包括橄榄油、仁油(kernel oil)和/或椰子油。在其他改良中，其中低蛋白质膳食包含的来自脂肪的卡路里的量为膳食中包含的总卡路里的约0至22％。

[0071] 在一个改良中，然后为受试者在第二时间段提供第二膳食。第二膳食为受试者提供至多900kcal/天。在某些例子中，第二膳食为受试者提供至多200kcal/天。典型地，第二预定的时间段是约2至7天。在某些具体的例子中，第二预定的时间段是3天。在仍另一改良中，第二膳食包括选自下述的组分：植物提取物、矿物质、Ω-3/6必需脂肪酸和其组合。在一个改良中，这样的植物提取物提供5个推荐的每日植物用量的等价物。植物提取物的适当来源包括但不限于白菜、羽衣甘蓝、莴苣、芦笋、胡萝卜、白胡桃泥、苜蓿、绿豌豆、西红柿、卷心菜、花椰菜、甜菜。Ω-3/6必需脂肪酸的适当来源包括来自鲑鱼、金枪鱼、马鲛鱼、蓝鱼、旗鱼等的鱼油。

[0072] 通过测量许多受试者参数来监测本文的膳食方案的效力。例如，期望在第二膳食时间段结束时，受试者的IGF-I血清浓度降低25-90％，这取决于初始IGF-I和蛋白质摄取水平并取决于对于避免所附的公开中描述的死亡率的最佳的水平。也期望受试者中的血糖浓度在第二膳食时间段结束时降低25-75％。

[0073] 在本实施方式的另一变型中，低蛋白质膳食包括具有某些氨基酸的氨基酸特定补充剂。典型地，补充剂提供额外水平的非必需氨基酸，待与非常低蛋白质量或没有蛋白质的膳食一起消耗5至7天。在一个改良中，低蛋白质膳食与正常的蛋白质膳食交替。在这样的变型中，每2周至2月提供低蛋白质膳食7天，期间是1至7周的正常膳食。在一个改良中，氨基酸特定补充剂基本上不包括下述氨基酸：异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸。在本文中，“基本上不包括”意思是以逐渐增加的优先级，总的不包括的氨基酸小于受试者的膳食总重的按重量计5％、按重量计3％、按重量计1％和按重量计0.5％。但是，氨基酸特定膳食提供一个或多个下述氨基酸作为氮源：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸。表2至4提供了小鼠的氨基酸特定膳食的特征，其也是如下面阐释的限制蛋白质的。典型的小鼠膳食提供约19kcal每天。对于其他哺乳动物比如人，按比例放大限制蛋白质的(PR)膳食，以提供必要的卡路里。例如，在美国对于成年人典型的卡路里摄取约2200卡路里每天。表5提供了来自每个人受试

者来源的每天千卡数，同时表6提供了对于人来自每个来源的每天克数。

[0074] 表2.

[0075]

	成分 (g/kg)			大量营养素 (g/kg)	
	正常膳食	PR膳食		正常膳食	PR膳食
玉米淀粉	397.49	397.49	碳水化合物	601	617
麦芽糖糊精	132	149.88	氮源	177	183
蔗糖	100	100	脂肪	72	72
大豆油	70	72			
纤维素	50	50		卡路里密度 (kcal/g)	
矿物质	35	35			
维生素	10	10		正常膳食	PR膳食
胆碱酒石酸盐	2.5	2.5			
叔丁基氢醌	0.01	.01		3.7600	3.7673

[0076] 表3.来自每个食物来源的1kg的小鼠中的千卡。

[0077]

	正常膳食	PR
碳水化合物	2404	2468
氮源	708	732
脂肪	648	648
计算的	3760	3848

[0078] 表4.来自每个来源的卡路里百分数(小鼠)。

[0079]

	正常膳食	PR
碳水化合物	63.94	64.14
氮源	18.83	19.02
脂肪	17.23	16.84

[0080] 表5.每天来自每个来源的的卡路里(人)。

[0081]

	正常膳食	PR
碳水化合物	1406.60	1411.02
氮源	414.26	418.50
脂肪	379.15	370.48
总计(kcal)	2200.00	2200.00

[0082] 表6.每天来自每个来源的克(人)。

[0083]

	正常膳食	PR
碳水化合物	351.65	352.75
氮源	103.56	104.63
脂肪	42.13	41.16
总计(g)	497.34	498.54

[0084] 在一个改良中，小鼠的一千克的氨基酸特定膳食包括约2g至20g丙氨酸、10g至30g

天冬氨酸、2g至20g半胱氨酸、40g至80g谷氨酸、2g至20g甘氨酸、2g至20g组氨酸、15g至50g脯氨酸、5g至30g丝氨酸和5至30g酪氨酸。对于人受试者，这些范围乘以因子(即，约0.572)，以提供用于人受试者的每天膳食配方的组合物。例如，氨基酸特定膳食中用于人的每日量的具体氨基酸(2200卡路里/天膳食)是约2至12g丙氨酸、5g至30g天冬氨酸、1g至7g半胱氨酸、18g至73g谷氨酸、2g至9g甘氨酸、2g至10g组氨酸、9g至37g脯氨酸、5g至21g丝氨酸和5至21g酪氨酸。在另一改良中，氨基酸特定膳食包括约160至约240g的指定的氨基酸每千克的膳食。所以，对于人，氨基酸特定膳食使用因子(0.572)提供约80至160g的指定的氨基酸每天，以将每千克的膳食值转化成代表约2200卡路里/天的人膳食的值。在另一变型中，氨基酸特定膳食包括选自下述的至少6种氨基酸：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸，其量如上阐释。在仍另一变型中，氨基酸特定膳食提供的以克每kg人体重每天计的氨基酸的量阐释在表7中。尤其，氨基酸特定膳食提供下述克每kg人体重每天0.06g丙氨酸、0.14g天冬氨酸、0.04g半胱氨酸、0.45g谷氨酸、0.05g甘氨酸、0.06g组氨酸、0.23g脯氨酸、0.13丝氨酸和0.13g酪氨酸。在另一改良中，这些氨基酸的每一个在指定至的正负30％范围内。

[0085] 表7.人水平，为痴呆预防膳食选择的每kg的人体重每天的每种氨基酸的克数。

[0086]

配方克/kg体重			
AA	正常膳食	PR	因子
Ala	0.07	0.06	0.81
Asp	0.13	0.14	1.09
Cys	0.02	0.04	2.05
Glu	0.20	0.45	2.23
Gly	0.06	0.05	0.94
His	0.04	0.06	1.68
Pro	0.10	0.23	2.25
Ser	0.09	0.13	1.35
Tyr	0.06	0.13	2.19
总计	*0.78*	*1.30*	

[0087] 在另一变型中，方法包括在第一时间段向受试者施用限制蛋白质的(PR)膳食的步骤。在变型中，低蛋白质膳食包括特定氨基酸的营养保健品。在一个改良中，第一时间段是约5天至14天，7天是典型的。而且，低蛋白质膳食为受试者提供70至100％受试者的正常卡路里摄取。低蛋白质膳食仅仅基本上包含氨基酸作为氮源。例如，限制蛋白质的膳食小于10％的其卡路里源自蛋白质。在另一改良中，限制蛋白质的膳食小于5％的其卡路里源自蛋白质。在另一改良中，限制蛋白质的膳食零％的其卡路里源自蛋白质。尤其，限制蛋白质的膳食基本上不包括下述氨基酸异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸和精氨酸。在本文中，“基本上不包括”意思是以逐渐增加的优先级，总的不包括的氨基酸小于受试者的膳食总重的按重量计5％、按重量计3％、按重量计1％和按重量计0.5％。但是，限制蛋白质的膳食提供一个或多个下述氨基酸作为氮源：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸。表2至4提供了限制蛋白质的膳食的特征包括用于下面阐释的小鼠研究的营养保健品。典型的小鼠膳食提供约19kcal每天。对于其他哺乳动物比如人，按比例放大低蛋白质膳食，以提供必要的卡路里。例如，在美国对于成年人典型的卡路里摄取约2200卡路里每天。表5提供了来自每个人受试者来源的

每天千卡数，同时表6提供了对于人来自每个来源的每天克数。

[0088] 在一个改良中，小鼠一千克的低蛋白质膳食中的氨基酸提供在表8中。在一个改良中，小鼠一千克的低蛋白质膳食包括约2g至20g丙氨酸、10g至30g天冬氨酸、2g至20g半胱氨酸、40g至80g谷氨酸、2g至20g甘氨酸、2g至20g组氨酸、15g至50g脯氨酸、5g至30g丝氨酸和5至30g酪氨酸。对于人受试者，这些范围乘以因子(即，约0.572)，以为人受试者提供这些氨基酸每天的每日要求。例如，低蛋白质膳食中对于人每日量的指定的氨基酸(2200卡路里/天膳食)是约2至12g丙氨酸、5g至30g天冬氨酸、1g至7g半胱氨酸、18g至73g谷氨酸、2g至9g甘氨酸、2g至10g组氨酸、9g至37g脯氨酸、5g至21g丝氨酸和5至21g酪氨酸。在另一改良中，限制蛋白质的膳食包括约160至约240g的指定的氨基酸每千克的膳食。所以，对于人低蛋白质膳食提供约80至160g的指定的氨基酸每天使用因子(0.572)，以将每千克的膳食值转化成约2200卡路里/天的人膳食的代表性值。在另一变型中，限制蛋白质的膳食以上面阐释的量包含选自下述的至少6种氨基酸：丙氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸。表8提供了小鼠膳食的限制蛋白质的膳食中氨基酸含量的例子。表8也提供了一个因子，其是限制蛋白质的膳食中指定的氨基酸与对照(正常膳食)中的比例。这些比例同样适于其他哺乳动物比如人受试者。在仍另一变型中，低蛋白质膳食提供表8中阐释的每kg人体重每天计的氨基酸的以克计的量。尤其，PK膳食提供下述克每kg人体重每天的0.06g丙氨酸、0.14g天冬氨酸、0.04g半胱氨酸、0.45g谷氨酸、0.05g甘氨酸、0.06g组氨酸、0.23g脯氨酸、0.13丝氨酸和0.13g酪氨酸。在另一改良中，这些氨基酸的每一种在指定值的正负30％范围之内。

[0089] 在另一变型中，提供了降低受试者中葡萄糖和/或IGF-1水平的方法。该方法包括为受试者提供低蛋白质膳食的步骤，所述低蛋白质膳食的小于约10％的卡路里来自蛋白质来源。监测受试者的葡萄糖和/或IGF-1水平，以确定是否应增加或降低蛋白质摄取。在一个改良中，低蛋白质膳食的0至10％的卡路里来自蛋白质来源。在进一步改良中，低蛋白质膳食的0至5％的卡路里来自蛋白质来源。在另一改良中，低蛋白质膳食的通常约0％的卡路里来自蛋白质来源。在另一改良中，低蛋白质膳食也是包含脂肪来源的低卡路里膳食，使得至少50％来自脂肪的卡路里是长链不饱和脂肪酸，如上所阐释具有13至28个碳原子。典型的脂肪来源包括植物油比如大豆油。在进一步改良中，低蛋白质膳食包括脂肪来源使得至少25％来自脂肪的卡路里是具有2至7个碳原子的短链脂肪酸和/或来自具有8至12个碳原子的中链饱和脂肪酸。脂肪酸的具体例子包括肉桂酸和/或肉豆蔻酸和脂肪来源包括橄榄油、仁油和/或椰子油。在其他改良中，其中低蛋白质膳食包括来自脂肪的卡路里的量为约0至22％的膳食中包含的总卡路里。

[0090] 在另一实施方式中，提供了减轻受试者中化学毒性症状的方法。该方法包括在第一时间段提供低蛋白质膳食的步骤，低蛋白质膳食包括小于10％的卡路里来自蛋白质。为受试者提供第二时间段的限制卡路里的膳食，限制卡路里的膳食具有低蛋白质膳食的0至50％的卡路里。在一个改良中，限制卡路里的膳食包括0至10％的卡路里来自蛋白质来源。在一个改良中，化疗治疗施用至受试者。化疗剂的例子包括但不限于多柔比星、环磷酰胺、顺铂、5-氟尿嘧啶和其组合。

[0091] 下述实施例阐释本发明的各种实施方式。本领域技术人员认识到在本发明的精神和权利要求范围内的许多变型。

[0092] 低蛋白质摄取实验

[0093] 进行6,381名来自NHANES的50岁和以上的美国男人和女人的流行病学研究,与仅仅美国的全国代表性膳食研究、小鼠和细胞研究相结合来理解蛋白质和氨基酸的水平和来源、衰老、疾病和死亡率之间的关联。

[0094] 结果

[0095] 人群体

[0096] 研究群体包括来自NHANES III的6,381名50岁和更年长的成年人,全国代表性、交叉研究。我们的分析样品的平均年龄为65岁并且是美国群体种族、教育和健康特征的代表(表13)。

[0097] 平均,受试者消耗1,823卡路里,其中大部分来自碳水化合物(51%),接着是脂肪(33%),和蛋白质(16%>)——11%来自动物蛋白。来自蛋白质的卡路百分数用于将受试者分类为高蛋白质组(20%或更多的卡路里来自蛋白质)、中蛋白质组(10-19%的卡路里来自蛋白质)和低蛋白质组(小于10%的卡路里来自蛋白质)。

[0098] 通过与国家死亡指数的关系对所有NHANES参与者的死亡率随访,直到2006年(22)。这提供了死亡的时间和原因。对于死亡率的随访时间覆盖总体83,308人——年份超过18年,40%的总体死亡率,19%的心血管疾病(CVD)死亡率,10%的癌症死亡率,和约1%的糖尿病造成的死亡率。

[0099] 蛋白质和死亡率之间的相关性

[0100] 使用Cox比例风险模型,我们发现高和中蛋白质消耗与糖尿病相关的死亡率正相关,但是当考虑所有受试者大于50岁时,与全因、CVD或癌症死亡率不相关。结果显示中和高蛋白质摄取组与低蛋白质组中的参与者相比,都具有更高的糖尿病死亡率风险。尽管这些结果都指示中至高蛋白质摄取促进糖尿病死亡率,但仍需要更大的研究,以进一步测试该可能性。在更高蛋白质组中,对于升高的糖尿病死亡率的另一种解释是可能在糖尿病诊断之后,个体可能转向由更高蛋白质、更低脂肪和低碳水化合物摄取组成的膳食。为了测试这,我们检测了在基线没有糖尿病患病率的参与者中蛋白质摄取和糖尿病死亡率之间的相关性(表19)。

[0101] 在基线没有糖尿病的受试者中,高蛋白质组中的那些风险增加73倍(HR:73.52;95%CI:4.47-1209.7),而中蛋白质组别中的那些糖尿病死亡率的风险增加几乎23倍(HR:22.93;95%CI:1.31-400.7)。我们强调我们的风险比和置信区间可能由于我们的样本数量和低蛋白质组中极低的糖尿病死亡率的发病率而扩增。总体上,在基线没有糖尿病的人中仅仅有21例糖尿病死亡—仅仅其中1个来自低蛋白质组。然而,尽管样本数量小,我们的结果仍显示增加的蛋白质摄取和糖尿病相关的死亡率之间的强烈显著的相关性。

[0102] 重新运行Cox比例风险模型,测试蛋白质消耗和年龄之间的相互作用,以确定蛋白质和死亡率之间的相关性对于中年人和更年长的成年人是否不同。对于全因和癌症死亡率发现了明显的相互作用,显示低蛋白质对于中年人是有益的;但是,其益处随着年龄而降低(图4)。基于这些结果,我们将群体分成两个年龄组—50-65岁的那些(n=3,039),和66岁+的那些(n=3,342),并且重新检查蛋白质和具体原因死亡率之间的关系。在50-65岁的那些中,更高的蛋白质水平与明显增加的全因和癌症死亡率风险相关(表12)。在该年龄范围,高蛋白质组中的受试者的他们全因死亡率相关风险增加74%(HR:1.74;95%CI:1.02-2.97),

并且当与低蛋白质组的那些相比时，可能大于4倍死于癌症(HR:4.33;95%CI:1.96-9.56)。这些相关性都不显著地受到来自总脂肪的卡路里百分数或来自总碳水化合物的卡路里百分数的控制的影响。但是，当来自动物蛋白的卡路里百分数受到控制，总蛋白质和全因和癌症死亡率之间的相关性分别被消除或显著降低，表明动物蛋白介导这些关系的大部分。如果我们控制植物基蛋白的影响，蛋白质摄取和死亡率之间的相关性没有变化，指示高水平的动物蛋白促进死亡率并且不指示植物基蛋白具有保护作用(表17)。

[0103] 相比低蛋白质膳食的受试者，消耗中水平蛋白质的受试者也具有3倍更高的癌症死亡率(HR:3.06;95%CI:1.49-6.25)，不考虑来自脂肪的卡路里百分数或来自碳水化合物的卡路里百分数，但是当控制来自动物蛋白的卡路里百分数时，少量下降(HR:2.71;95%CI:1.24-5.91)。但是作用的程度不如高蛋白质组中的那些那样大。一起考虑，这些结果指示50-65岁消耗高水平动物蛋白的受访者显示大大增加总体和癌症死亡率的风险，但是，如果蛋白质不来自动物来源风险可些许下降。如果考虑45-65的群体，获得类似的结果(数据未显示)。

[0104] 与上述发现相反，在基线66岁年龄和更年长的受访者中，更高的蛋白质水平与对总体和癌症死亡率的相反作用相关，但是对糖尿病死亡率类似的作用相关(表12)。当与低蛋白质消耗的那些相比时，消耗大量蛋白质的受试者的全因死亡率下降28%(HR:0.72;95%CI:0.55-0.94)，而消耗中等量蛋白质的受试者显示全因死亡率下降21%(HR:0.78;95%CI:0.62-0.99)。此外，这不受来自脂肪、碳水化合物或动物蛋白的卡路里百分数的影响。相比低蛋白质膳食的那些，高蛋白质消耗的受试者的癌症死亡率也下降60%(HR:0.40;95%CI:0.23-0.71)，其当控制其他营养素摄取或蛋白质来源时也不受影响。

[0105] IGF-1对蛋白质和死亡率之间相关性的影响

[0106] 对于两个年龄组，调整的平均IGF-1水平与蛋白质消耗正相关(图5)。因为IGF-1仅仅对于随机选择的子样本(n＝2,253)可用，我们重新检查了该样本中蛋白质和具体原因死亡率之间的年龄特异性相关性并且发现他们与在全样本中发现的类似；尽管，具有些许更大有效大小(表15)。接下来我们检查了IGF-1是否用作蛋白质和死亡率之间相关性的缓和剂或介体。我们发现尽管IGF-1不负责蛋白质消耗和死亡率之间的相关性(表15)，但是其是相关性的重要缓和剂——如蛋白质和IGF-1水平之间统计学上显著的相互作用所指示(表16)。

[0107] 从这些模型，计算通过IGF-1和蛋白质组预测的风险比(图12)。结果显示对于IGF-1每10ng/ml的增加，高蛋白质对低蛋白质组的50-65岁受试者中癌症的死亡率风险增加另外的9%($HR_{高蛋白质 x\ IGF-1}$:1.09;95%CI:1.01-1.17)。可选地，在更年长的受试者中(66+岁)，当与低蛋白质组中的那些相比时，如果IGF-1也低，高或中蛋白质膳食的受试者的CVD死亡率风险降低；但是，随着IGF-1增加，没有发现益处。

[0108] 在小鼠中的蛋白质摄取、IGF-I和癌症

[0109] 为了验证因果关系和进一步我们的研究机制，我们研究了与NHANES研究中受试者类似的蛋质摄取范围(4-18%)对啮齿动物中循环IGF-1、癌症发病率和肿瘤进展水平的作用。18周龄雄性C57BL/6小鼠持续进食实验性、等卡路里的膳食39天，设计为提供高(18%))或低(7%)源自蛋白质的卡路里量，而不强化CR或造成营养不良(图9A、B)。

[0110] 为了理解不同水平的蛋白质和IGF-1水平可如何影响新形成的肿瘤在他们各自膳

食一周之后存活和生长的能力，两个组都皮下移植20,000同基因的、鼠黑素瘤细胞(B16)。在移植后15天开始肿瘤测量，在他们各自膳食22天，在该点发现发病率在高蛋白质水平组中是100％，但是在低蛋白质水平组中仅仅80％(图6A)。在第25天，发病率在低蛋白质组中上升至90％，并且保持直到实验结束(图6A)。从第22天直到实验结束，肿瘤尺寸在消耗更低量蛋白质的组中显著更小，指示更缓慢的肿瘤进展。在第39天，观察到平均肿瘤尺寸在高蛋白质组中大78％(第36天P＝0.0001；第39天P<0.0001)(图6B)。在第16天获得和分析血液样品，以确定蛋白质摄取对IGF-1和IGF-1抑制蛋白，IGFBP-1的作用。在低蛋白质(4％)组中，相比进食高蛋白质(18％)膳食的动物，血清IGF-1低35％(P＝0.0004)(图6C)。相反地，相比高蛋白质组，在低蛋白质组中，血清IGFBP-1高136％(P＝0.003)(图6D)。

[0111] 为了进一步测试GHR-IGF-1轴促进癌症进展的假设，我们将皮下黑素瘤(B16)移植至GHR/IGF-1缺乏GHRKO小鼠和它们各自的年龄-和性别-匹配的同窝仔畜对照(18周龄雄性C57BL/6小鼠)。在移植后10天开始肿瘤测量并且继续直到第18天。数据显示当与对照组中的进展相比时，GHRKO小鼠中的肿瘤进展明显被抑制(图6E；P<0.01)。

[0112] 我们也使用乳腺癌小鼠模型，以测试蛋白质水平、肿瘤发病率和进展之间的关系。12周龄雌性BALB/c小鼠放置在如为C57BL/6小鼠描述相同的膳食方案下，不同之处是小鼠在第一周内，必须从4％转向7％kcal来自蛋白质膳食，以便防止体重减轻(图9E、F)。进食这些膳食一周之后，小鼠被皮下移植20,000同基因的、转移鼠乳腺癌的细胞(4T1)，并且15天后评估肿瘤。在移植后18天(膳食的第25天)，高蛋白质组中肿瘤发病率是100％，但是在低蛋白质组中仅仅70％。低蛋白质组中发病率在第39天升高至80％，其保持直到实验结束(图6F)。肿瘤进展数据也显示更低蛋白质膳食组具有更小的平均肿瘤尺寸。在实验结束的第53天，相比高蛋白质组在低蛋白质组中观察到45％更小的平均肿瘤尺寸(P＝0.0038)(图6G)。如对于C57BL/6小鼠，在膳食蛋白质限制的第16天测量IGF-1。相比高水平组，在低蛋白质摄取组中IGF-1水平下降30％(P<0.0001)(图6H)。另外，低蛋白质摄取也造成IGFBP1增加84％(P＝0.001)(图6I)，与C57BL/6遗传背景中观察的类似(图6D)。类似地，当大豆蛋白质摄取从高水平下降至低水平时，我们观察到IGF-1下降30％(p<0.0001)(图6J)和IGFBP-1增加140％(p<0.0001)(图6K)。尽管用植物蛋白质替换相同水平的动物蛋白对IGF-I和IGFBP1显示有效的趋势，差异不显著。这些数据提示更低的蛋白质摄取可对降低癌症发病率和/或进展起作用，部分通过降低IGF-1和增加IGF-1抑制剂IGFBP1。另外对各种类型的动物和植物基蛋白的研究是必要的，以确定它们对IGF-I和IGFBP1的影响。

[0113] 细胞研究

[0114] 为了理解氨基酸水平和寿命之间是否存在基础关联，通过生存和突变率试验评估具体浓度的氨基酸的存在对酵母生长和发展的影响。野生型DBY746酿酒酵母菌株在存在一半(0.5X)、标准(1X)和双倍(2X)氨基酸浓度的情况下生长，所有的其他营养素保持不变。在第1、3、5和8天测量生存。在第1和3天期间，没有观察到生存差异。在第5天，2个最高氨基酸浓度显示增加的死亡率的趋势，其在第8天导致10倍降低生存的细胞(图6L)。

[0115] 为了评估氨基酸、衰老和年龄-依赖性DNA损伤之间的关系，我们使用衰老酿酒酵母测量自发突变率。相比暴露于0.5X氨基酸浓度的细胞，分别暴露于1X和2X氨基酸水平在5天衰老细胞但不是年轻细胞中突变率是3和4倍高(图6M)。这些结果指示即使在单细胞生物体中，氨基酸促进细胞衰老和年龄依赖性基因组不稳定。

[0116] 为了进一步分辨参与促进年龄-依赖性基因组不稳定的途径，我们测量了在存在或没有氨基酸的情况下，通过Ras-PKA-Msn2-4Tor-Sch9-Gisl途径调节的压力应答基因的诱导。对于在仅仅包含Trp、Leu和His的对照培养基中的细胞生长(对于在该菌株中生长是必须的)，培养基中所有氨基酸的存在降低了压力抗性基因的诱导，指示添加氨基酸足够抑制细胞保护(图6N)。

[0117] Tor-Sch9途径延长寿命但是也促进DNA突变。为了确定Ras-cAMP-PKA信号传导是否也调节年龄-依赖性基因组不稳定，我们研究了ras2缺陷突变体。我们确认ras2Δ突变体是长命的(图11A)但是也显示Ras信号传导的失活减弱了年龄-和氧化应激-依赖性基因组不稳定(图11B、11C、60、11D)。

[0118] 这些结果一起提示氨基酸能够至少部分通过激活Tor-Sch9和Ras/PKA途径和降低压力抗性，影响突变频率和因此基因组不稳定的机制(图6P)。

[0119] 年老小鼠中低蛋白质摄取和体重保持

[0120] 基于观察的在50-65岁年龄受试者对65和更年长那些的受试者中低蛋白质膳食相反作用，和65岁之后对BMI和IGF-1水平的明显下降，我们假设低蛋白质膳食的更年长的受试者可能营养不良并且不能吸收或处理足够水平的氨基酸。为了测试小鼠中的这种可能性，我们用包含18％或4％动物蛋白的等卡路里膳食饲养幼年小鼠(18周龄)和年老小鼠(24月龄)。故意选择非常低蛋白质膳食，以揭示年老生物体中对蛋白质限制的任何灵敏度。而保持高蛋白质膳食30的年老小鼠增重，低蛋白质膳食的年老而不是年幼小鼠至第15天丢失它们体重的10％(图4A、B)，与衰老将蛋白质限制对死亡率的有益作用转化成不利作用的影响一致。

[0121] 讨论

[0122] 这里，使用美国群体营养的主要全国代表性研究，我们的结果显示在45岁和以上的那些中，蛋白质摄取水平与增加的糖尿病死亡率的风险相关，但是与全因、癌症或CVD死亡率不相关。然而，我们发现了在蛋白质消耗和死亡率之间的年龄相互作用，50-65岁年龄的受试者经历来自低蛋白质摄取的益处和66+年龄的受试者经历来自低蛋白质膳食的坏处——至少对于总体死亡率和癌症。这可解释为什么先前未描述本文报道的蛋白质摄取、IGF-1和死亡率之间的强相关性。此外，在测量IGF-1水平的2253名受试者中，高蛋白质摄取的那些的全因和癌症死亡率的风险相比低蛋白质摄取组增加，甚至对也具有高水平IGF-1的那些进一步增加。这与之前将IGF-1水平与各种类型的癌症相关联的研究一致。

[0123] 注意，有证据表明消耗的蛋白质的类型可能是重要的。我们的结果显示源自动物来源的蛋白质比例负责相当比例的总体蛋白质摄取和全因和癌症死亡率之间的相关性。这些结果与对红肉消耗和由于全因、CVD和癌症的死亡之间的相关性的最近发现一致。美国之前的研究已经发现低碳水化合物膳食与总体死亡率的增加相关并且当这样的膳食伴随增加的动物基产品的消耗时，总体上的风险，以及CVD和癌症死亡率甚至进一步增加。但是，我们的研究指示动物蛋白对IGF-I、衰老、糖尿病和癌症的作用在确定蛋白质摄取的18年随访调查中可能主要促进45-65岁人们的死亡率。到那时，在调查时65的群组将会是83岁年龄，强调高蛋白质摄取可促进比65更大的受试者的死亡率。

[0124] 来自酵母和小鼠的我们的结果通过提供氨基酸、压力抗性、DNA损伤和癌症发病率/进展之间的关系也可解释蛋白质、癌症和总体死亡率之间的至少部分主要的关联。在小

鼠中，降低的蛋白质水平造成的改变具有足够有效防止10-30％的肿瘤的发生，甚至当20，000肿瘤细胞已经存在于皮下位点时。此外，黑素瘤和乳腺癌二者的进展被低蛋白质膳食强烈抑制，指示低蛋白质膳食可应用于癌症预防和治疗二者。

[0125] 尽管蛋白质摄取与在基线是中年的成年人增加的死亡率相关，也有证据表明低蛋白质膳食可能对于更年长的成年人是危险的。在老年人中高和中蛋白质摄取与相比低组的主要改善相关，提示表示至少消耗的10％的卡路里的蛋白质摄取可能在65岁或可能75岁之后是必要的，以降低年龄-依赖性的体重减轻，并且可能防止IGF-1和其他重要的因子的过度丢失。之前的研究已经注意了增加的蛋白质摄取和所得IGF-1的增加可证明在更年长的成年人中有益。事实上，低蛋白质膳食从保护作用至有害作用的突然转变与已知体重稳定并且然后下降的时间点巧合。基于之前的纵向的研究，体重趋于增加直到50-60岁，在该点稳定然后对于超过65岁的那些以平均0.5％每年开始稳定下降。我们推测这可取决于受试者的体重减轻和虚弱，所述受试者认为是已经丢失了他们体重大部分百分数并且具有低BMI的虚弱的受试者更容易遭受蛋白质营养不良。也可能的是其他因素，比如炎症或遗传因素可能造成年长受试者对蛋白质限制的敏感，与我们的小鼠研究一致。

[0126] 尽管其他研究已经注意啮齿动物中营养素吸收与年龄相关的下降，其与pH微气候的改变、受损的衰老内脏中适应性应答，和肠道形态的改变相关，但是仍不清楚形态学和衰老的适应性改变之间的相关性。在人中，一些研究已经显示膳食蛋白质消化和吸收动力学在健康的、年长男性中体内不受损，但是，这些研究也报道了增加的AA内脏提取可能导致对外周组织的下降的可用性，并且推测在低蛋白质摄取或增加的蛋白质要求的情况下，限制的全身性膳食AA的可用性可能造成下降的肌肉蛋白合成。此外，在人中其他因素，比如差的牙齿、药物和心理问题也对营养不良的速度起重要的作用。

[0127] 之前也已经显示IGF-1在更年长年龄中下降，增加虚弱的风险和死亡率。因此我们的发现可解释与IGF-I和死亡率相关的争论，表明最低水平的蛋白质和可能的IGF-1在老人中是重要的或表明低循环IGF-1反映营养不良虚弱的状态和/或发病。事实上，已知炎症和其他不适降低IGF-1水平，增加了低蛋白质和低IGF-1组可包含大量的具有或处在发展主要疾病的状态下的营养不良和虚弱个体的可能性。

[0128] 应认识到我们的研究有一些局限性。首先，如果24小时时间不是通常的天，单个24-小时膳食记忆的使用，随后多达18年死亡率评估可能使膳食实践错误分类。但是，93％的我们的样本报告24小时时间代表正常的天。我们也包括该变量作为我们分析的对照。此外，24-小时膳食记忆已经显示是鉴定受试者的“正常膳食”的非常有效的方法。尽管我们必须承认对膳食消耗的纵向数据的缺乏是我们研究的潜在局限性，六年中老年人的膳食一致性的研究揭示了膳食习惯随着时间的推移的稍微改变。在二十年中观察膳食习惯的另一研究显示尽管随着人变老，对于蛋白质、脂肪和碳水化合物的能量摄取下降，但是遍及该三个类型，下降是相同的。

[0129] 我们的研究的另一局限性是受访者分类成蛋白质组，并且然后对样本分类用于分析，产生相对小的样本数量，尤其对于涉及在基线没有糖尿病的糖尿病死亡率的分析或IGF-1子样本的参与者的分析。结果，我们的风险比和95％置信区间可明显大于用更大的样本数量所会见到的。然而，人们预期小的样本数量降低了我们的功效并且使得难以检测相关性。所以，我们检测显著性的能力指示蛋白质和死亡率之间的相关性是健壮的。此外，来

自我们死亡率分析的95％置信区间的下限也大于1.0，表示增加的风险可能大。最后，考虑这些局限性，我们的研究通过其可靠的具体原因死亡率数据的使用，以及其包括大的全国代表性样品——之前的文献通常丢失的特征而被加强。

[0130] 总体上，我们的人和动物研究显示中年期间的低蛋白质膳食可用于预防癌症和总体死亡率，其通过可至少部分参与调节循环IGF-1和可能的胰岛素水平的过程。与其他流行病学和动物研究一致，我们的发现提示其中植物基营养素占食物摄取大部分的膳食可能使健康益处最大化。但是，我们建议至多65岁和可能75岁，这取决于健康状态，医药协会食物和营养局公开的0.7至0.8克的蛋白质/kg体重/天，目前视为最低要求，相对于19-70岁成年人消耗的1-1.3g克的蛋白质/kg体重/天可能是保护性的。我们也建议在更大的年龄下，可能重要的是避免低蛋白质摄取和逐渐采用中至高蛋白质可能大部分植物基消耗，以使得保持健康的体重和避免虚弱。

[0131] 实验程序

[0132] 用于人数据的营养素摄取

[0133] 营养素摄取数据是基于24-小时期间食物和饮品摄取的报告。经基于自动、微机编码系统收集数据，关于总体八十种营养素的信息。使用该方法收集膳食数据，有数个优势。假定消耗和记忆之间过去的时间短，参与者通常能够记忆更多的信息。而且，不像报告方法，24-小时膳食记忆依赖于消耗后的数据收集，降低了评估以改变膳食习惯的可能。此外，24-小时记忆已经显示相比常用的食物频率问卷是总能量和蛋白质消耗的更强评估，并且也已经显示比区块食物-频率问卷和国家癌症协会的膳食历史问卷二者是总能量和营养素摄取的更有效测量。最后，也已经发现该方法精确评估能量、蛋白质、脂肪和碳水化合物摄取，不必考虑体重指数。

[0134] 流行病学死亡率随访

[0135] 死亡率数据可获得自国家死亡指数。对于113种潜在的根本死亡原因的信息(UCOD-113)用于确定全因死亡率、心血管(CVD)死亡率、癌症死亡率和糖尿病死亡率。

[0136] 用于人数据的统计分析

[0137] Cox比例风险模型用于评估来自蛋白质的卡路里摄取对随后全因、CVD、癌症和糖尿病死亡率之间的相关性——后面三个使用竞争风险结构进行。接下来，我们测试年龄和蛋白质消耗对死亡率的相关性之间的相互作用。基于这些结果，我们将受试者分成两个年龄组(50-65岁和66+岁)，其用于剩余的分析。年龄分层的比例风险模型用于评估两个年龄组中来自蛋白质的卡路里百分数与死亡率的相关性，并且检查关系是否受到来自脂肪的卡路里百分数、来自碳水化合物或动物蛋白的卡路里百分数的影响。对于IGF-1子样本，重新评估风险模型，以确定是否包括IGF-1改变蛋白质摄取和死亡率之间的相关性。最后，比例风险模型用于检查蛋白质和IGF-1之间的相互作用，并且用于计算每个蛋白质组在各个IGF-1水平的预测的风险比，以确定是否蛋白质摄取基于IGF-1水平不同地影响死亡率。使用样本权重、考虑采样设计和控制年龄、民族/种族、教育、性别、疾病状态、抽烟、膳食改变和总卡路里消耗进行所有的分析。

[0138] 用于酵母和小鼠实验的材料和方法

[0139] 使用Cox比例风险模型我们发现蛋白质消耗和全因、CVD或癌症死亡率之间没有相关性(表14)。但是，高和中蛋白质消耗可能与糖尿病相关的死亡率相关。一种解释是糖尿病

可能在这些组中更流行，可能因为在糖尿病诊断之后转向更高的蛋白质、更低的脂肪和更低的碳水化合物摄取。

[0140] 最后，发现高和低蛋白质消耗与66岁和更年长受试者的糖尿病死亡率风险增加超过十倍相关。但是，高蛋白质组中的具有糖尿病历史的更高患病率的受试者和低蛋白质组中少量的死于糖尿病受试者可能造成了这一结果，因此强调需要另外的研究，以确定蛋白质摄取对糖尿病发病率和死亡率的作用(HR:10.64;95%CI:1.85-61.31)。

[0141] 补充的材料和方法

[0142] 人数据中的IGF-I

[0143] 随机选择NHANES III中一半的受试者，在推荐的九小时禁食后，参与早上检查。该子样本中，包括在我们的研究中的2,253名受试者同意并已经测量IGF-I的禁食血清数据。通过Diagnostic System Laboratories Inc.，使用标准实验室方案测量IGF-I并且以ng/ml计报告。

[0144] 人数据的潜在混杂者

[0145] 年龄、民族/种族、教育、性别、疾病状态、抽烟、膳食改变和总卡路里消耗包括在分析中作为潜在的混杂者。年龄以岁报告并且通过NHANES在数据集中上限是90，以避免受访者的保密。产生虚变量，以将受试者分成三个民族/种族类别：非西班牙白人、非西班牙黑人和西班牙人，教育通过上学的年数表示。为自报告的抽烟状态产生虚变量——从不、之前和现在。也要求受试者报告他们的疾病历史，以疑问短语，如“医生是否曾告诉你患……”并且用于产生三个癌症、心肌梗死和糖尿病历史存在的虚变量。使用对三个问题的回答评估最近的膳食摄取改变——1)“在过去的12个月期间，你是否尝试减肥?”；2)“在过去的12个月期间，你因为任何医学原因或健康条件而改变了你的饮食?”；和3)(24-小时膳食记忆之后)“比较昨天消耗的食物与正常的”。从身体右侧开始在髂嵴测量相比BMI优选作为肥胖指示的腰围至最接近0.1cm。

[0146] 小鼠中的癌症模型

[0147] 根据USC的动物护理和使用委员会协会程序进行所有的动物实验。为了建立皮下癌症小鼠模型，我们用B16黑素瘤细胞注射18周龄，雄性C57BL/6小鼠以及10月龄GHRKO小鼠，年龄一致的同窝仔畜对照小鼠，和野生型同窝仔畜，以及用4T1乳腺癌细胞注射12周龄雌性BALB/c。在注射之前，收获在对数生长期的细胞并且悬浮在无血清高葡萄糖Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)，以2x 10^5细胞或2x10^6，并且随后在下背皮下注射100ul(2x 10^4细胞每只C57BL/6或BALB/c小鼠；2x10^5细胞每只GHRKO小鼠)。在皮下肿瘤注射之前，所有的小鼠剃毛。通过切诊注射区域测定肿瘤发病率并且在移植后10-15天开始使用数字Vernier测径器测量肿瘤尺寸。用于C57BL/6和BALB/c的实验在不同的时间点结束，这基于USC IACUC批准的肿瘤尺寸和溃疡的人道终点标准。GHRKO(C57BL/6背景)小鼠由J.J.Kopchick(Ohio University,Athens)慷慨提供。

[0148] 小鼠中的蛋白质限制

[0149] AIN-93G标准食物用作基于酪蛋白的高蛋白质参考膳食(18%kcal来自蛋白质和低蛋白质膳食1,0用作基于酪蛋白的低蛋白质膳食(4%kcal来自蛋白质)(Harlan Laboratories,WI)。膳食是等卡路里的并且来自脂肪或碳水化合物的kcal发生的改变与来自蛋白质的kcal的改变成比例。在开始实验1周前开始日摄取量测量，以便确定基线摄取

量。在实验期间每日饲养所有的动物，并且提供超过它们基线摄取的50％的食物，以便使得自由的、非卡路里限制的饲养。在肿瘤移植之前，为BALB/c小鼠指定来自蛋白质组2个不同kcal的一种并且提前饲养1周。在如上述相同地在整个实验期间继续饲养这些小鼠。为了确定低蛋白质对年老小鼠的作用，24月龄C57BL/6小鼠放置为18％或4％kcal来自蛋白质组并且如上述地进食持续膳食。每日测定体重和摄取。动物随时用水。

[0150] 小鼠中的血清mIGF-I和mIGFBP-1测量

[0151] 用3％吸入异氟烷麻醉小鼠，稍微加热以使静脉膨胀，并且从尾静脉收集血液，以每周获得血清。如先前描述使用内部ELISA试验使用来自R&D系统(Minneapolis,MN)的重组小鼠IGF-I或IGFBP-1蛋白质和多克隆抗体，进行血清mIGF-I和mIGFBP-1试验(Hwang等，2008)。

[0152] 用于小鼠数据的统计分析

[0153] 使用Student t检验进行组之间的IGF-I比较，通过Student t检验和ANOVA进行IGFBP-1组比较，和用双因素ANOVA使用GraphPad Prism v.6进行肿瘤体积进展组比较。所有的统计分析是双面的并且<0.05的P值认为是显著的。

[0154] 酵母生存和突变频率测量

[0155] 通过用相应的质粒转化，广泛使用的DBY746酵母菌株的细胞(MATα leu2-3，l12his3-Δl trpl-289,ura3-52GAL+)为原养型的，接种在1ml的完全合成培养基(SDC)上并且在30℃下在轨道摇床上以200RPM生长过夜。

[0156] 该起始培养物然后分离(1:100)在新鲜合成SDC培养基上，其包含0.5X、1X或2X的标氨基酸浓度(Hu等，2013)，以5:1的烧瓶体积与培养基体积比并且以非常相同的条件放回培养箱。每隔一天收获每个培养物的等分试样并且适当的稀释物平铺在富含YPD的板上。生长两天之后计数菌落形成单位(C.F.U.)。考虑在第3天的CFU为100％的生存，评估生存的百分数。所有的实验一式三份进行并且显示标准偏差。对于突变频率计算，在每个生存时间点收集10^7细胞，用水冲洗并且平铺在缺少精氨酸并且补充60liq-l刀豆氨酸(Can)的合成完全的(SDC)培养基上。在30℃下生长二至三天之后测量Can抗性克隆并且表达为10^6活力CFU中的Can抗性克隆的数量。

[0157] Ras2实验生长条件

[0158] 通过每48h测量菌落形成单位(CFU)，在失效的SDC培养基中监测酵母时序寿命。在第1天CFU的数量视为初始生存(100％)并且用于测定年龄-依赖性死亡率。

[0159] Ras2实验Can1突变频率测量

[0160] 通过测量CAN1(YEL063)基因的突变频率评估自发突变频率。简言之，在液体SDC培养基中稀释过夜接种并且在30℃下温育。在第1天开始通过将适当的稀释平铺在酵母提取物蛋白胨右旋糖(YPD)培养基板上并且计数CFU来每2d测量细胞的活力。为了鉴定液体培养物中的刀豆氨酸抗性突变体(Can^r)，通过离心收获适当数量的细胞(开始量为2x 10^7细胞)，用无菌水冲洗一次，并且平铺在选择性培养基(补充60μg/ml l-硫酸刀豆氨酸的SDC-Arg)上。3-4d之后计数突变体克隆。突变频率表达为Can^r与总活力细胞之比。

[0161] 人低蛋白质摄取研究

[0162] 人受试者参与3轮低蛋白质低卡路里和高营养5天禁食模仿膳食(FMD，以绿色指示，见正文)随后约3周的正常膳食(棕色指示)(a)。在5天膳食开始和结束时抽血(时间点A

和B)，并且也在完成第3个5天FMD之后的5-8天抽血(时间点C)。5天膳食显著降低血糖(b)、IGF-1(c)和IGFBP-1(d)水平。葡萄糖*，p<0.05，N＝18；IGF-1，**，p<0.01，*p<0.05，N＝16；IGFBP-1，**，p<0.01，N＝17；所有的统计检验作为配对的t检验进行，在两个原始值上截尾。该研究的结果见图20。

[0163] 用于化学毒性实验的材料和方法

[0164] 2.1.小鼠

[0165] 所有的动物方案由南加州大学的动物护理和使用委员会协会(IACUC)批准。在整个实验中，12-15周龄雌性CD-1、BalB/C或C57BL/6N小鼠(Charles River)保持在无病原体环境中。

[0166] 2.2.限定大量营养素的膳食

[0167] AIN93G标准食物(Harlan)用作参考膳食并且如果不另外指出提供给所有的小鼠。大量营养素组分(脂肪、蛋白质和碳水化合物)改良的膳食都基于AIN93G(图21和表20)。膳食20％P-1(大豆油作为脂肪来源)和20％P-2(椰子油作为脂肪来源)与AIN93G配方相比来自蛋白质来源的卡路里降低至20％；0％P膳食不包含蛋白质；所有这些膳食与AIN93G标准食物是等卡路里的。低碳水化合物LCHP膳食与AIN93G配方相比来自碳水化合物的卡路里降低至20％(13％对63.9％)但是包含更多的蛋白质(45.2％)和脂肪(41.8％)。生酮高脂肪膳食60％HF设计为提供60％消耗的卡路里来自脂肪来源，来自蛋白质和碳水化合物的卡路里成比例下降。90％HF膳食是生酮膳食，其包含90％的脂肪，同时提供仅仅最小的碳水化合物(小于1％)和一半的蛋白质含量(9％)。详细的膳食组成和卡路里含量总结在表S2中。在开始实验之前小鼠进食AIN93G对照膳食并且基于它们的初始体重分成实验组(N＝5/组)。使小鼠适应测试膳食一周然后实验(调整方案显示在表22中)。除非另外指出，自由供应所有的膳食。

[0168] 2.3.卡路里限制(CR)和短期饥饿(STS)

[0169] 为了使用AIN93G膳食的卡路里限制，标准食物碾碎成粉末并且以必要的量混合在水凝胶(清澈(Clear)H_2O)中，以实现60％、50％、40％、20％、10％卡路里密度的AIN93G(表23)。类似地制备限制卡路里的大量营养素改良的膳食(表24)。为了避免营养不良，所有的膳食补充与AIN93G中那些匹配的维生素、矿物质、纤维和必需脂肪酸。在实验之前(数据未显示)用AIN93G饲养测定基线食物摄取(3.7g或14kcal/天)。对于短期饥饿(STS)方案，小鼠不能进食多达60小时。

[0170] 对于所有的CR和STS实验，小鼠单个关在标准鞋盒笼中，每日清理笼子，以避免食粪性或进食残留食物。动物随时可饮并且提供水凝胶以确保足够的水合。在CR或STS方案期间常规测量每个个体动物的体重。

[0171] 2.4.用于葡萄糖和IGF-1测量的血液收集

[0172] 用2％吸入异氟烷麻醉小鼠并且提供左心室心脏穿刺收集血液。血液收集在包被用于血清制备(BD)的K^2-EDTA的管中。用Precision Xtra血糖监测系统(Abbott Laboratories)测量血糖。使用小鼠特异性ELIS试剂盒(R&D System)测量IGF-1。

[0173] 2.5.对高剂量化疗的抗性

[0174] 使称重25-32g的12-15周-龄雌性CD-1小鼠饿多达60h(STS)或进食大量营养素改良的50％CR膳食3天，随后静脉内注射24mg/kg多柔比星(DXR，Bedford Laboratories)。在

所有实验中，在化学药物注射之后为小鼠提供AIN93G标准食物并且每日监测。显示严重压力和/或恶化的健康状态的动物指定为垂危的并且安乐死。

[0175] 2.6.皮下肿瘤模型

[0176] 鼠4T1乳腺癌和GL26神经胶质瘤细胞在37℃5％CO_2下保持在补充10％胎牛血清(FBS)的DMEM(Invitrogen)中。冲洗对数生长期的细胞并且以$2x10^6$细胞/mL悬浮在PBS中以及皮下注射(s.c，100μLPBS中$2x10^5$细胞/小鼠)小鼠的下背区域。使用测径器测量肿瘤尺寸。为了模拟人中的多轮处理，用顺铂(Teva parenteral Medicines Inc.)静脉内(i.v.，侧尾静脉)在分别以12、8和8mg/kg体重肿瘤接种之后第15、33和44天处理小鼠三次。监测每日小鼠并且显示严重压力、恶化健康状态或过度肿瘤负荷(2000mm)的动物指定为垂危的并且安乐死。

[0177] 2.7.统计分析

[0178] 组之间葡萄糖和IGF-1测量的比较用ANOVA进行，随后使用GraphPad Prism v.5杜克多重比较。所有的统计分析是两侧的并且<0.05的P值认为是显著的。

[0179] 3.结果

[0180] 3.1.卡路里限制对葡萄糖和IGF-1水平的作用

[0181] 短期饥饿(STS)降低葡萄糖和IGF-1的血清水平，增加细胞对高剂量化学疗法的保护，并且使恶性的细胞对化疗药物敏感。一旦动物丢失约20％体重，通常实现STS对葡萄糖和IGF-1的作用。因此，20％体重减轻用作比较限制卡路里的膳食的葡萄糖和IGF-1水平与从60h STS方案获得的那些的标准。

[0182] 对于90％的CR在第4天，对于80％CR在第6天，对于60％的CR在第9天，或对于40％的CR在第13天达到20％体重减轻阈值(图22A和图26A)。实现20％体重减轻的时间强烈取决于卡路里限制的严格程度(用r^2＝0.9976的线性拟合；图22B)。在48小时，血糖水平的下降与卡路里限制的严格程度相关(用r^2＝0.7931的线性拟合；补充图26B)。相比自由进食小鼠，60h禁食方案(STS)使血糖水平降低70％(图22C，P<0.001)。4天90％的CR方案使血糖下降约40％，显著小于STS(P<0.05)。另外，观察到CR降低血糖的作用取决于CR进食长度的趋势：13天40％CR进食的葡萄糖水平显著(P<0.05)小于4天长90％CR组。但是，没有限制卡路里的组产生的血糖水平小于60h禁食组；并且需要9或更多天的CR，以在禁食组的那些中获得葡萄糖降低作用(图22C)。所有实验CR组的小鼠，不依赖于限制的严格程度，当达到20％体重减轻边际时达到类似的血清IGF-1水平并且比自由对照组中小鼠具有显著(P<0.001)更低的IGF-1水平(图22D)。

[0183] 3.2.限定大量营养素的膳食对葡萄糖和IGF-1水平的作用

[0184] 基于AIN93G啮齿动物食物设计一组限定大量营养素的膳食(图21和表20)，以确定具体膳食成分的限制是否可模拟STS或短期CR对血糖和/或血清IGF-1的作用。相比初始AIN93G配方，低蛋白质膳食20％P-1(大豆油作为脂肪来源)和20％P-2(椰子油作为脂肪来源)的来自蛋白质来源的卡路里降低至20％，同时增加碳水化合物和脂肪，以维持与AIN93G的膳食等卡路里。0％P膳食不包含蛋白质；碳水化合物以及脂肪按比例增加以保持与标准食物的膳食等卡路里。相比初始AIN93G配方，LCHP膳食来自碳水化合物来源的卡路里降低至20％(13％对63.9％)，但是供应更多的蛋白质和脂肪。高脂肪生酮膳食60％HF设计为供应60％的消耗的卡路里来自脂肪来源，来自蛋白质和碳水化合物的卡路里按比例降低。

90％HF膳食是生酮膳食，其包含90％的卡路里来自脂肪，而仅仅供应最低(小于1％)碳水化合物并且9％的卡路里来自蛋白质。由于更高的脂肪比例，相比AIN93G标准食物，LCHP、60％HF和90％HF膳食具有高卡路里密度。详细的膳食组分和卡路里含量总结在表21中。

[0185] 雌性CD-1小鼠自由进食实验膳食连续的九天，以确定体重特征(图23A、B)并且检测卡路里摄取(图23C、D)。未观察到明显的厌食，但是注意到进食完全缺少蛋白质膳食(0％P)的小鼠在6天之后降低食物消耗(图23C)。降低的卡路里摄取造成该实验组动物的体重减轻(图23A)。生酮高脂肪组(60％HF和90％HF)的小鼠在进食的9天期间比进食AIN93G标准食物的小鼠消耗更多的卡路里(图23D)并且自由进食生酮90％HF膳食小鼠在4-5天之后快速增重(图23B)。进食膳食20％P和LCHP的实验组中的CD-1小鼠相比进食AIN93G对照膳食的小鼠未显示卡路里摄取或体重的差异(图23A、C)。

[0186] 来自大量营养素改良膳食的小鼠在第2天、第5天和第9天的血糖水平与标准食物膳食的那些没有不同(图27并且数据未显示)。相反，生酮60％HF膳食9天的小鼠中血清IGF-1水平明显上升($P<0.05$)但是进食生酮90％HF膳食的小鼠则没有(图23E)。有趣地，不仅仅大量营养素组分(例如蛋白质含量)而且脂肪酸来源都不同地调节循环IGF-1水平：低蛋白质膳食20％P-1(包含大豆油作为唯一脂肪来源)不降低IGF-1水平但是低蛋白质膳食20％P-2(椰子油作为唯一脂肪来源)显著($P<0.05$)降低IGF-1水平并且这些膳食除了脂肪来源没有区别。对血清IGF-1最值得注意的作用是在进食蛋白质不足膳食0％P 9天的小鼠。循环IGF-1下降到标准食物的小鼠的约30％(图23E)。蛋白质不足膳食0％P是唯一的使血清IGF-1水平降低到与60h短期饥饿相当的膳食。

[0187] 3.3.短期卡路里限制和禁食改善压力抗性

[0188] 在小鼠中，降低的血清IGF-1和血糖水平促进处理高剂量化疗剂诱导的毒性的能力。因为短期卡路里限制，而不是限定大量营养素的膳食(除了完全的蛋白质去除)降低IGF-1和葡萄糖水平，组合方法用于测试具有以50％常规每日卡路里摄取进食限定大量营养素不足的膳食是否可产生增强的化学毒性保护。20％P膳食未包括在压力抗性实验中，原因是膳食0％P显示对血清IGF-1更显著的作用。

[0189] 在自由进食AIN93G标准食物或降低至50％正常卡路里摄取的限定大量营养素的膳食三天的CD-I小鼠中测试压力抗性，然后多柔比星(DXR，24mg/kg，i.v.)处理(图24A)。在限制50％卡路里的组中，3天之后小鼠减轻它们的初始体重12-15％，而在STS组小鼠中，在60h之后，它们的体重减轻20％。DXR处理之后，AIN93G食物自由提供给所有的动物并且小鼠再次增重直到化学毒性诱导体重减轻开始(图28A、B)。体重减轻在所有实验组中继续直到注射后第8天，其后许多动物缓慢恢复。进食限制卡路里的0％P和LCHP膳食的小鼠从未完全恢复它们的初始体重(图28A)。注射后9-18天动物开始死于化学毒性(图24A)，与报道的DXR处理之后骨髓抑制出现和最低天数一致(http://dailymed.nlm.nih.gov)。如果它们DXR注射后25天存活，认为小鼠是幸存者。自由进食AIN93G膳食3天然后DXR注射的小鼠显示最差的结果，在第25天仅仅16％存活(图24A)。与自由进食的小鼠相反，大部分(89％)禁食(60小时)小鼠在高剂量化学治疗中存活下来。用DXR处理的对照小鼠显示中毒症状包括降低的移动性，竖起的毛发和隆起后背姿势，而STS组中的小鼠在处理之后未显示可见的压力或疼痛的症状(数据未显示)。在DXR注射前三天进食50％CR与大量营养素改良的组合提高了小鼠的压力抗性并且产生45-55％的生存(图24A)。没有迹象表明脂肪或碳水化合物含量影响结

果，因为所有的膳食实现类似的保护程度。数据指示短期CR，而不是膳食的脂肪或碳水化合物组分，赋予部分化学保护，其不如禁食引起的那些有力。进食50％CR LCHP膳食的小鼠比所有其他CR进食组表现差，推测因为该膳食的高蛋白质含量对IGF-1的影响。

[0190] 血糖测量揭示三天进食限制卡路里的改良膳食不足以明显降低葡萄糖水平，50％CR生酮90％HF膳食除外(图24B)。生酮组的葡萄糖水平的降低不呈现增加压力抗性。STS组中的小鼠具有比所有其他实验组明显更低的血糖水平(图24B)。

[0191] 3.4.低蛋白质膳食不呈现对GL26神经胶质瘤进展的延迟

[0192] 已经显示低蛋白质膳食降低癌症风险，而高卡路里和高蛋白质膳食与肥胖相关并且促进调节癌变的激素、代谢和炎症改变。为了测试低蛋白质膳食在神经胶质瘤模型中的作用，在移植GL26细胞之后，当肿瘤明显时，小鼠从标准食物(18.8％的卡路里来自蛋白质，表1)转向低蛋白质的膳食(20％P-1，3.9％的卡路里来自蛋白质)10天(图25A)。进食低蛋白质膳食的小鼠显示的肿瘤进展无法与自由进食AIN93G膳食的小鼠的区分开(图25A)。这些结果指示一旦肿瘤形成，肿瘤进展可能不被蛋白质限制延迟。

[0193] 3.5.短时间段(short-term intermittent)卡路里限制不增强针对乳腺癌的化疗的效力

[0194] STS在增加各种癌症治疗中的效力是双重的：其避免对正常细胞/组织的化学疗法诱导的毒性并使恶性细胞对化疗剂敏感。然而，即使短时间的禁食(例如4天)可对于大部分人是个挑战并且因此“更温和”限制卡路里的方法可能是更可行的方案。为了检测短时间段50％CR(ICR)膳食是否可产生与确立的禁食方案类似的有益效果，将鼠4T1乳腺癌细胞皮下移植至雌性BalB/C小鼠并且监测肿瘤进展。肿瘤移植之后十二天，测量肿瘤体积并且小鼠指定为未处理的对照组(AIN93G)，用顺铂(CDDP)治疗的组或间歇进食50％CR(ICR)三天然后顺铂治疗的组。未处理的对照组中的肿瘤进展快速并且在肿瘤移植之后54天达到2000mm的实验终点体积(图25B，黑圆圈)。三轮顺铂治疗延迟肿瘤进展；这些小鼠的肿瘤体积是未处理的小鼠中的尺寸的约一半(图25B，蓝色方形)。与STS相反，间歇的限制50％卡路里的AIN93G进食方案饲养小鼠三天然后顺铂注射不产生肿瘤的敏化并且不增强化疗(图25B，橙色三角形)。该实验组中的肿瘤体积与单独用顺铂处理的小鼠的肿瘤体积并无明显不同。

[0195] 4.讨论

[0196] 先前显示血糖和IGF-1水平的主要降低是部分由于动物癌症模型中2-3天禁食的有益作用。在小鼠中，60h短期禁食降低体重20％或更多，血清IGF-1多达75％，和葡萄糖多达70％。在这些条件下，动物是高度压力抗性的，与酵母中的结果一致，并且各种肿瘤对化学疗法和放射疗法敏感。当20％体重减轻用作终点时，如预期的，各种程度的CR方案产生积极更快的体重减轻同时也降低IGF-1和葡萄糖。但是，也观察到相当更短的STS方案对葡萄糖比大部分CR膳食具有更显著的作用，即使当CR膳食维持9-13天并且造成同样20％的体重减轻。当与短期饥饿相比，限制卡路里的膳食的较不显著的作用可解释为在完全缺少营养素的条件下独有的独特的生理学应答(Lee和Longo，2011)。例如，在该研究中，短期禁食造成的血糖的降低是70％并且在60h内出现相比于90％CR膳食96h之后造成的40％的葡萄糖降低。

[0197] 当缺少食物时，哺乳动物一般经历三个代谢阶段：1)吸收后阶段，食物吞咽之后持续10个或更多个小时，其涉及使用糖原作为主要储存能源，2)一旦肝糖原储存耗尽，通过糖

异生的氨基酸依赖性葡萄糖产生，和3)其中当丙三醇和脂肪酸从脂肪组织释放并且成为主要能源时，剩余的葡萄糖主要被脑消耗的阶段。在禁食的数天，源自脂肪的酮体成为主要的碳源。在体内，这些改变触发细胞应答，包括下调与增殖、细胞生长相关的途径和降低活性氧物质的产生，同时增加基因组稳定性和细胞压力抗性。葡萄糖是用于增生细胞比如恶性细胞的主要能源并且升高的血糖已经与增加的癌症风险相关联。许多癌症细胞具有升高的葡萄糖吸收速度并且依赖于糖酵解随后乳酸发酵，甚至在存在氧的情况下，代替丙酮酸盐氧化之后的糖酵解，称为Warburg效应的现象(Oudard等，1997；Warburg，1956)。在正常细胞中，血糖以及IGF-1的下降可能有助于激活压力抗性转录因子的差别调节，所述转录因子被营养素感知途径和细胞周期进展负调节。在癌症细胞中，低葡萄糖反而存在具体的和主要挑战；尤其当也存在化疗药物时。

[0198] 与对血糖和IGF-1的部分作用一致，本公开的结果指示72小时的50％CR，同时以及限制碳水化合物或蛋白质的膳食，仅仅对压力抗性具有部分作用。短时间段50％CR方案和顺铂治疗的组合与STS和化学疗法的组合相反，不呈现增强化疗效力。本公开提示三天的50％ICR不明显降低血糖水平并且因此可能在该时间段不足以降低鼠乳腺癌细胞的碳源代谢。进食3天限制50％的膳食和限定大量营养素的膳食，生酮90％HF膳食除外，都不降低血糖水平，其已经显示促进宿主保护和肿瘤敏化。有趣地，生酮膳食50％降低卡路里消耗三天进食之后导致血糖水平30％下降，推测由于该膳食非常低的碳水化合物含量(小于1％)的作用。但是，本公开的压力抗性实验指示该降低不改善生存。另外，没有来自任何CR膳食的小鼠实现与本文呈现的实验中60h禁食(STS)引起的等同保护。需要用扩展进食方案和更大实验组大小的另外的研究来理解具体的膳食是否可足以实现由于禁食周期造成的那些类似的DSR和DSS作用。进一步的研究可也评估各种限定大量营养素的和CR膳食对ROS产生、肿瘤进展和压力抗性的作用。

[0199] 膳食蛋白质和所得的氨基酸含量看起来影响寿命和健康衰老。限制性蛋白质摄取共享CR的一些生理学效果，包括降低的代谢速度、降低的氧化损伤、增强的肝脏抗毒性和致癌损害，降低的肿瘤病变前损害和肿瘤。此外，CR和蛋白质限制都降低血清IGF-1水平，其可能是寿命延长的贡献者之一，由于IGF-1样信号传导途径调节各种模型生物体比如秀丽隐杆线虫、D.果蝇和小鼠的寿命。IGF-1途径显示为影响动物寿命和对氧化应激的敏感性，与缺少IGF-1受体的小鼠中对氧化应激具有较高抗性相一致。叉头盒蛋白质O1(FOXO1)，即IGF-1/AKT信号传导的下游靶，在IGF-1/AKT信号传导缺失/降低的情况下可进入核，其中它可调节涉及氧化应激抗性、寿命和代谢的各种各样的基因，并且因此它是涉及针对压力和疾病发展相关的衰老的保护的关键机制。先前提示，IGF-1的降低产生对高剂量化疗以及肿瘤敏化的改善的压力抗性。IGF-I通过增加其增生率和抑制细胞凋亡对各种癌症细胞发挥有效的致癌效果。在缺乏IGF-R信号传导的下游效应器的小鼠的研究中，包括通过雷帕霉素和S6K1的mTOR抑制，表明IGF-I的细胞内有丝分裂途径下游在调节寿命和压力抗性，而同时降低肿瘤生长的中心作用。另外，患有生长激素受体缺乏的人具有显著较低的循环IGF-1水平，并且也展示癌症和糖尿病急剧降低的发病率，这在具有完整的生长激素受体的年龄匹配的相对者中更常见。

[0200] 与对照组中的小鼠的生存率相比，用限制卡路里的低碳水化合物膳食(LCHP)供应的组中的小鼠在所有CR组中具有最差的生存率。在该组中的小鼠在三天喂养期间消耗相似

或更大量的脂肪源性卡路里(50％CR LCHP中的20.9％对17.2％自由AIN93G)和更重要地蛋白质源性卡路里(50％CR LCHP中的22.6％对18.8％自由AIN93G)的事实可能解释保护的缺乏。值得注意地是在压力抗性的引导上提出的结果为基于相对短的(72h)喂养期,因此如果不能被排除,具有改变的卡路里和/或大量营养素限制的较长的CR方案可产生改进的压力抗性。

[0201] 生酮膳食被广泛用于治疗儿童中的顽固性癫痫,但是也在癌症治疗中被研究。为了确定该方法是如何与我们的压力抗性和潜在地肿瘤敏化实验相比,设计了两种生酮膳食:我们的90％HF膳食(脂肪:碳水化合物:蛋白质的％卡路里比为90％:1％:9％;图21)与具有脂肪:碳水化合物:蛋白质分别为90％:1.4％:8.6％的比的经典生酮膳食接近相同(±0.5％变化)(图29)。高脂肪膳食60％HF(脂肪:碳水化合物:蛋白质的％卡路里比为60％:31％:9％)包含与用于改进的Atkins膳食(脂肪:碳水化合物:蛋白质的％的卡路里比为60％:5％:35％;图29)的脂肪比相似的脂肪比,但是蛋白质含量降低,因为之前的工作确立了蛋白质,并且不是碳水化合物,调节人的IGF-1水平。此处描述的结果表明在连续喂养两种生酮膳食9天后葡萄糖和IGF-1水平都不显著降低。

[0202] 为了评估饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸,以及中链脂肪酸与长链脂肪酸在癌症治疗中的效果,设计了与对照膳食等卡路里的两种膳食,其采用大豆油或椰子油作为脂肪来源但是具有低蛋白质含量。长链不饱和脂肪酸发现于最常用的膳食脂肪和植物油比如大豆油,而短链和中链饱和脂肪酸(例如月桂酸和肉豆蔻酸)以相对高丰度发现于棕榈仁油和椰子油。中链甘油三酯(MCT)在胃肠道中可容易被水解,并且通过门静脉系统可被运输向肝细胞,而大部分长链脂肪酸作为淋巴腺系统中的乳糜微粒被运输,并包装成肝中的甘油三酯。MCT可容易被供应至线粒体β-氧化内,而LCT依赖于转运蛋白,比如肉碱,进入肝细胞中的线粒体基质。来自人研究的数据表明MCT的消耗或具有较高的不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比的膳食与降低血糖、改善脂质分布和降低肥胖相关。在具有腹部肥胖的女人中生物化学和人体测量学曲线的研究中,用椰子油营养补充促进腹部肥胖的降低。

[0203] 现在已知延长的CR的有益效果超过一个世纪。与转化CR为任何临床应用相关的问题是长期CR延迟但是不停止许多恶性的疾病的进展,并且与可能对恶病质癌症患者有害的慢性减重状态相关,或处于患恶病质的风险的患者,但是也可能慢性降低脂肪和其他储备,其尤其在老年患者中可增加虚弱。事实上,延长的CR可延迟创伤愈合和免疫功能,其可能对接收化疗或经历外科手术的大部分患者呈现另外的障碍。此外,通过小鼠和人2-5天绝食引起的血清IGF-1的75％降低不能通过更适合的CR实现,其不降低人的IGF-1水平,除非蛋白质摄取也被限制。甚至当结合蛋白质限制时,慢性CR仅引起人的IGF-1的30％降低。因为对葡萄糖和IGF-1的一致效果,以及随之而来的对包含正常细胞和敏化癌症细胞而没有慢性减重的效果,定期禁食循环看上去最可能保护用各种化疗药物治疗的患者同时增强治疗许多肿瘤的效力。

[0204] 虽然以上描述了示例性实施方式,但是这并不旨在这些实施方式描述了本发明的所有可能的形式。而是,用于说明书的词是描述性词而不是限制性词,并且应理解,可做出各种改变,而不背离本发明的精神和范围。另外,各种实施实施方式的特征可被结合以形成本发明的进一步实施方式。

体重	1天	2天	3天	4天	5天	Δ5天 [1]	Δ5天 [2]
	kcal/天						
>200 lbs	1170	828	768	810	833	-5591	-9591
151-200 lbs	1134	790	737	774	795	-5772	-7772
≤150 lbs	1098	751	706	738	756	-5952	-5952
	kcal/lb						
250 lbs	4.7	3.3	3.1	3.2	3.3		
200 lbs	5.7	3.9	3.7	3.9	4.0		
150 lbs	7.3	5.0	4.7	4.9	5.0		
	kcal/kg						
113 kg	10.3	7.3	6.8	7.1	7.3		
91 kg	12.5	8.7	8.1	8.5	8.8		
68 kg	16.1	11.0	10.4	10.8	11.1		

[1] 基于每天膳食2,000卡路里

[2] 基于分别对于个人体重≥200、150-200和≤150 磅的2,800、2,400和2,000卡路里膳食

表9. 禁食模仿膳食(FMD)，Proton，由L-Nutra开发，以诱导禁食样应答同时使营养最大化。

图1

	1天	2、3、4、5天
总卡路里	1152	809
脂肪	56%	46%
碳水化合物	34%	46%
糖	10%	9%
蛋白质	10%	9%

表10. 基于平均180-200 磅人用于5天FMD方案每天的大量营养素含量。

图2

	单位	1天	%DV*	2、3、4、5天	%DV*	平均%DV*
蛋白质	g	29		18		
脂肪	g	72		41		
碳水化合物(根据差别)	g	98		91		
来自糖	g	29		17.6		
膳食纤维	g	22	86%	14	56%	62%
钙	mg	604	60%	426	43%	46%
铁	mg	13	77%	10	55%	60%
镁	mg	387	97%	230	58%	65%
磷	mg	390	39%	276	28%	30%
钾(K)	mg	2519	72%	1795	51%	55%
钠(Na)	mg	2427	101%	1750	73%	79%
锌	mg	7	46%	4.2	28%	32%
铜	mg	1.5	76%	1.2	59%	63%
锰	mg	3	148%	1.9	95%	105%
硒	mcg	7	10%	5.3	8%	8%
维生素A	IU	39254	785%	27549	551%	598%
维生素C	mcg	236	393%	137	229%	261%
维生素B1硫胺	mg	4	209%	2.2	113%	132%
维生素B2核黄素B2	mg	3.8	191%	2	109%	126%
维生素B3 烟酸	mg	28.5	143%	18	92%	102%
维生素B5 泛酸	mg	1.2	12%	1.0	10%	10%
维生素B6 磷酸吡哆醛	mg	4.0	200%	2.2	111%	129%
维生素B9 叶酸	mg	479	120%	317	79%	87%
B12钴胺素	mcg	16	227%	16	227%	227%
维生素D	IU	952	238%	952	238%	238%
维生素E	mcg	25	127%	16	80%	89%
维生素K	mg	1795	2243%	1110	1387%	1559%

表11. 基于平均180~200 磅人的5天FMD方案每天的微量营养素含量。

图3

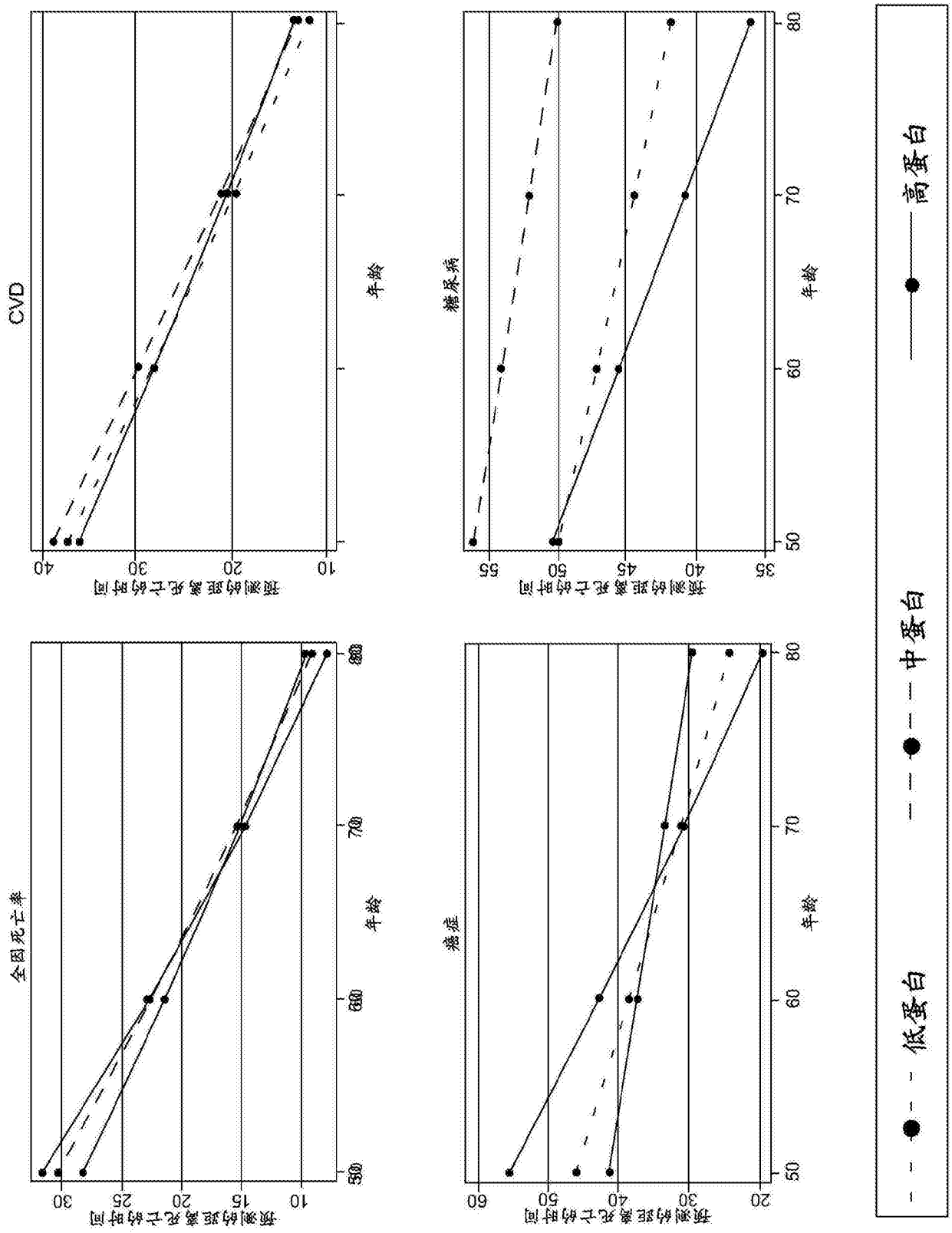


图4

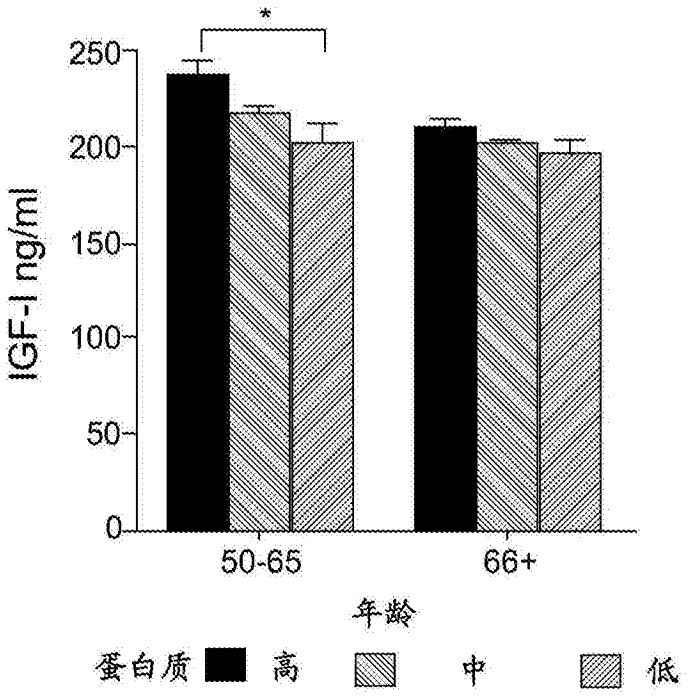

*
250
200
150
100
50
0
IGF-I ng/ml
50-65
66+
年龄
蛋白质
高
中
低

图5

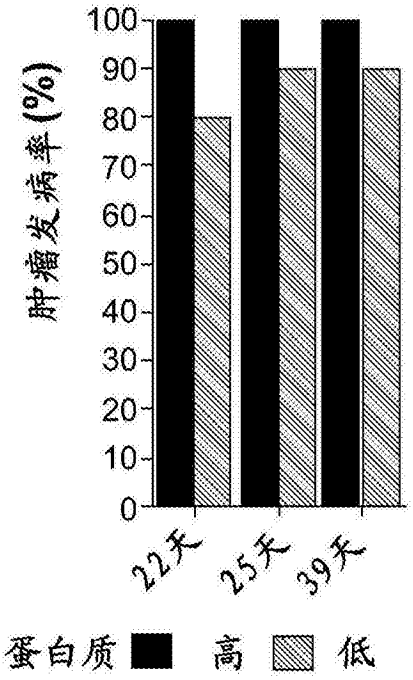

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
肿瘤发病率(%)
22天
25天
39天
蛋白质
高
低

图6A

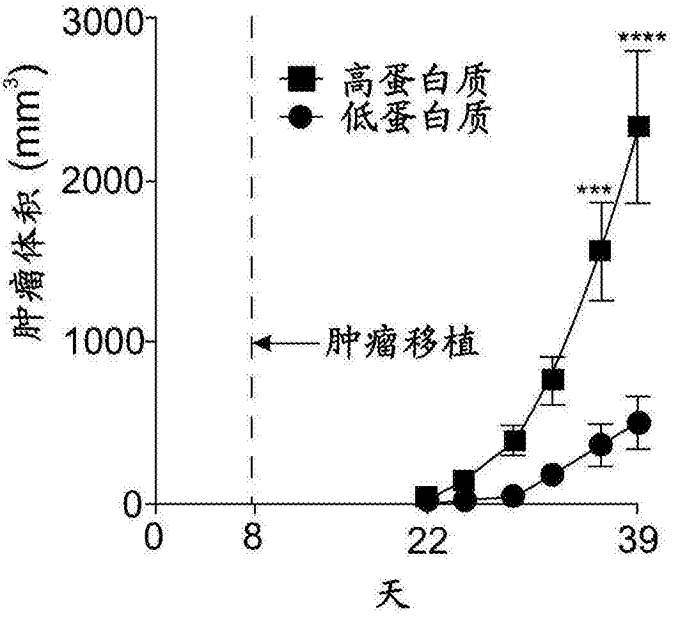

3000
2000
1000
0
肿瘤体积 (mm3)
高蛋白质
低蛋白质
肿瘤移植
****
***
0
8
22
39
天

图6B

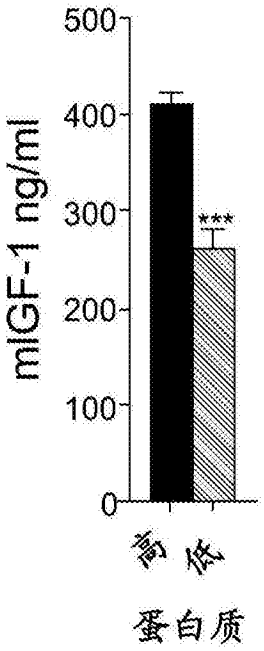

500
400
300
200
100
0
mIGF-1 ng/ml
***
高
低
蛋白质

图6C

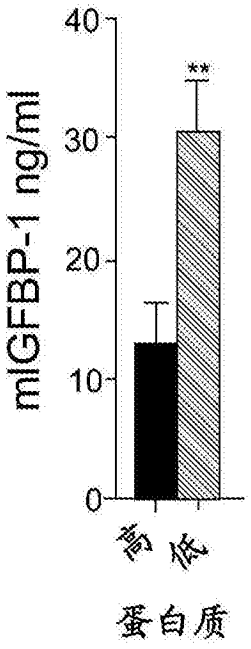

40
30
20
10
0
**
mIGFBP-1 ng/ml
高
低
蛋白质

图6D

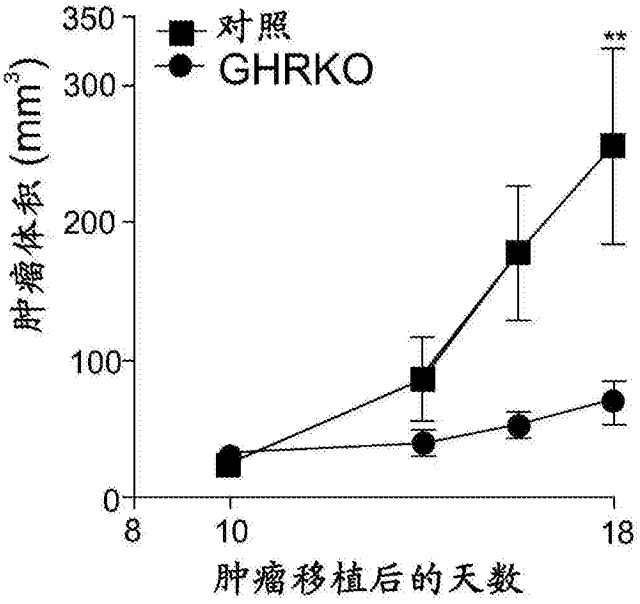

350
300
200
100
0
对照
GHRKO
**
肿瘤体积 (mm3)
8
10
18
肿瘤移植后的天数

图6E

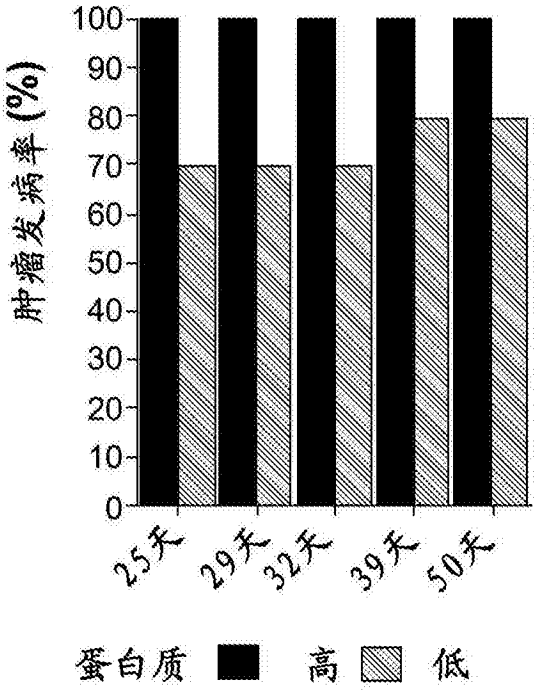

肿瘤发病率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
25天
29天
32天
39天
50天
蛋白质
高
低

图6F

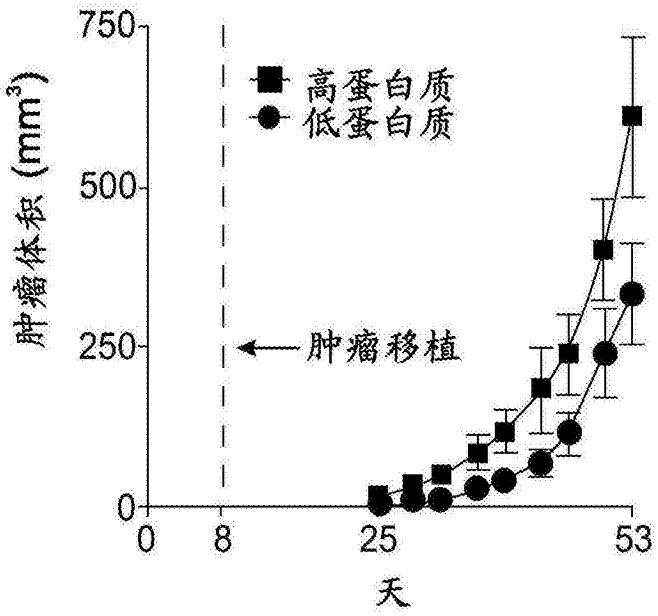

肿瘤体积 (mm³)
750
500
250
0
高蛋白质
低蛋白质
肿瘤移植
0
8
25
53
天

图6G

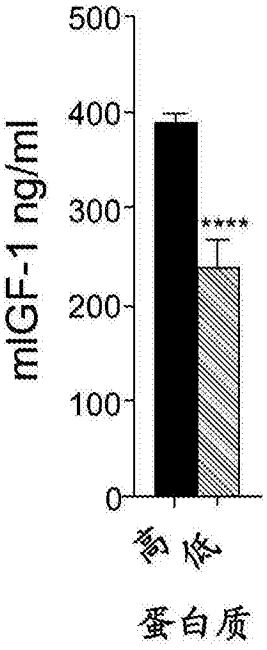

500
400
300
200
100
0
mIGF-1 ng/ml
****
高
低
蛋白质

图6H

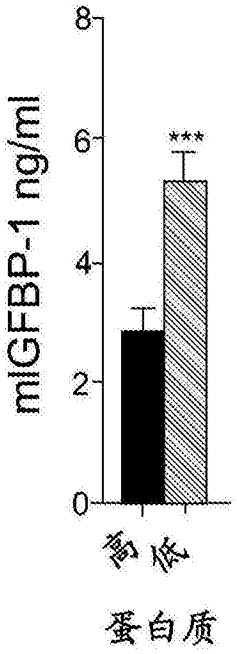

8
6
4
2
0
mIGFBP-1 ng/ml
***
高
低
蛋白质

图6I

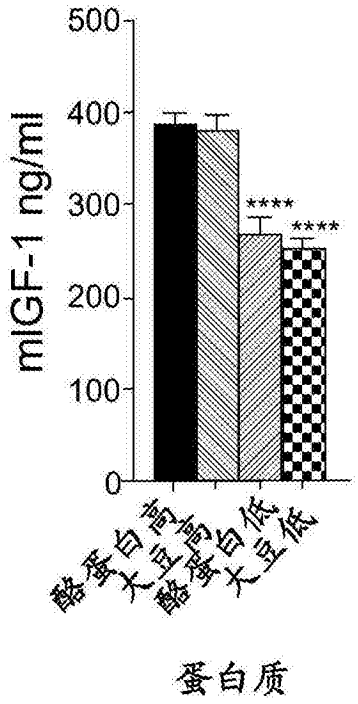

500
400
300
200
100
0
mIGF-1 ng/ml
****
****
酪蛋白高
大豆高
酪蛋白低
大豆低
蛋白质

图6J

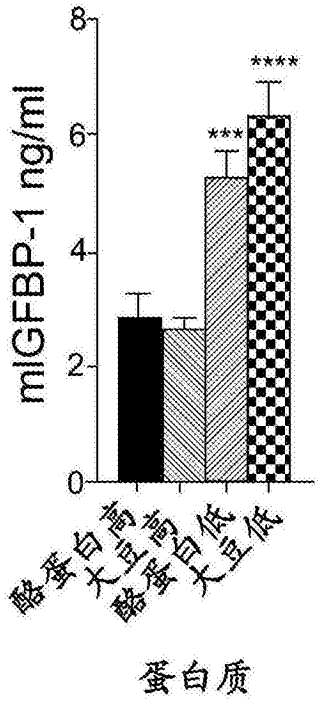

8
6
4
2
0
mIGFBP-1 ng/ml
***
****
酪蛋白高
大豆高
酪蛋白低
大豆低
蛋白质

图6K

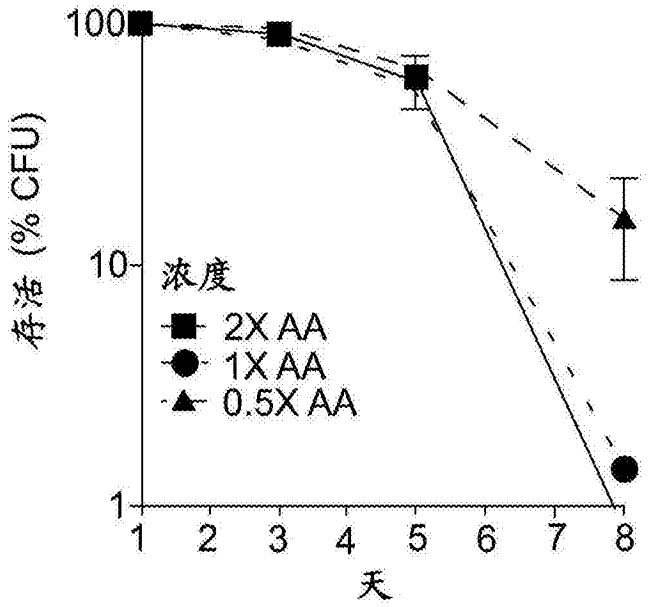

100
10
1
存活 (% CFU)
浓度
2X AA
1X AA
0.5X AA
1 2 3 4 5 6 7 8
天

图6L

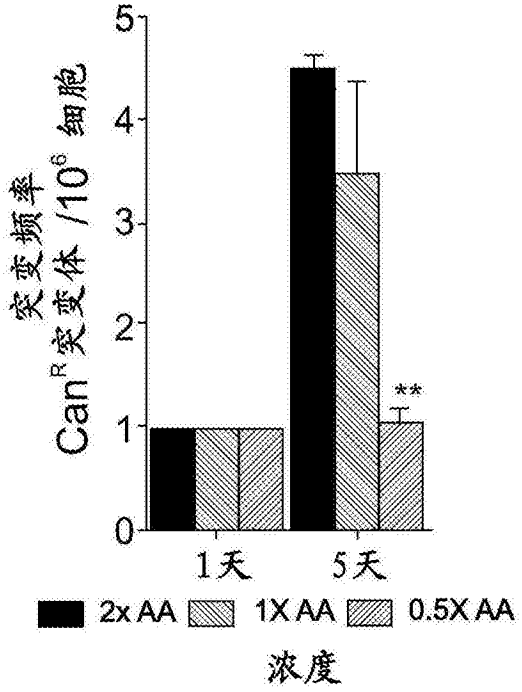

5
4
3
2
1
0
突变频率
CanR突变体 /10^6 细胞
**
1天
5天
2x AA
1X AA
0.5X AA
浓度

图6M

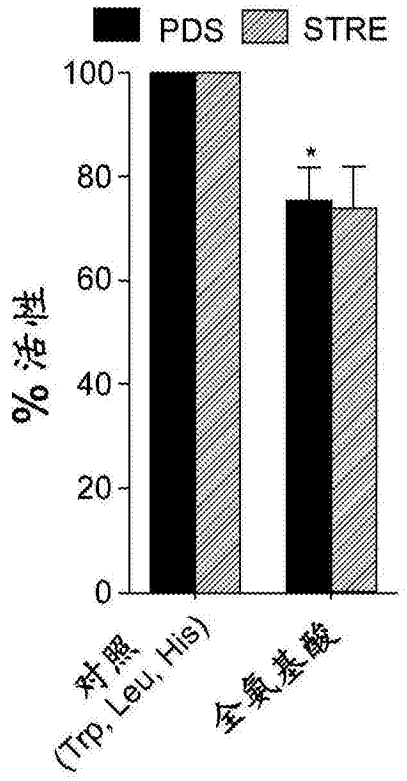

PDS
STRE
100
80
60
40
20
0
% 活性
*
对照
(Trp, Leu, His)
全氧基酸

图6N

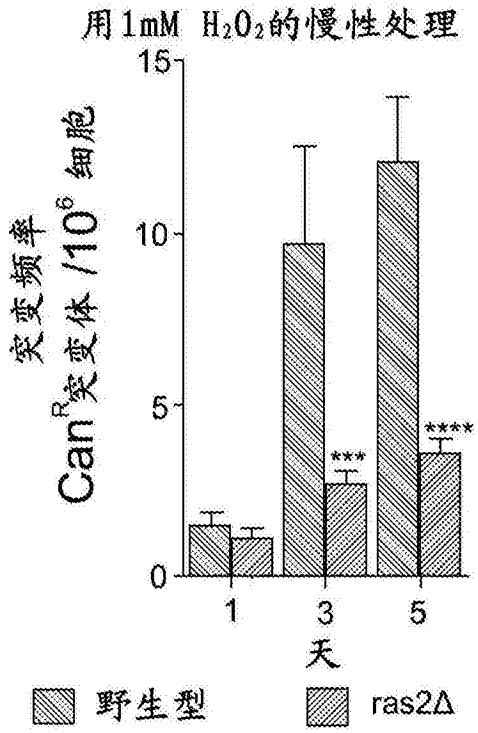

用1mM H_2O_2的慢性处理
15
10
5
0
突变频率
Can^R突变体 /10^6 细胞
***
****
1
3
5
天
野生型
ras2Δ

图60

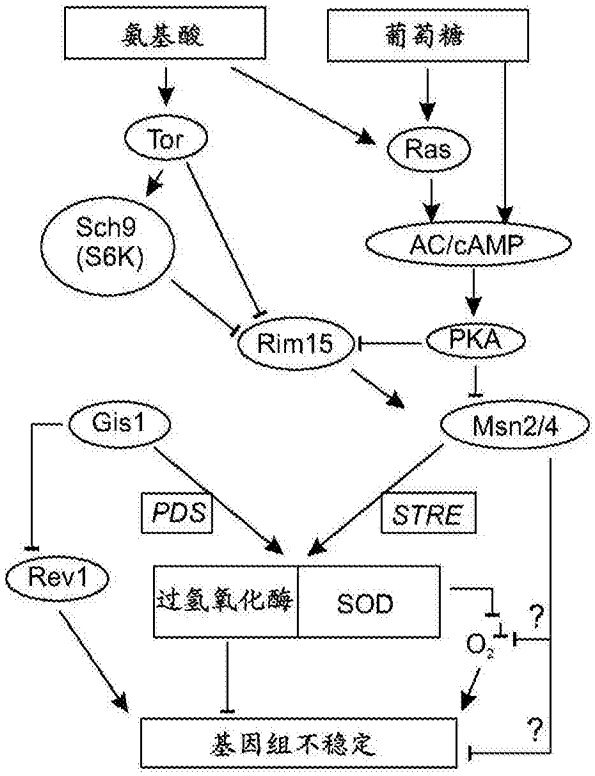

氨基酸
葡萄糖
Tor
Ras
Sch9
(S6K)
AC/cAMP
Rim15
PKA
Gis1
Msn2/4
PDS
STRE
Rev1
过氧氧化酶
SOD
?
O_2
?
基因组不稳定

图6P

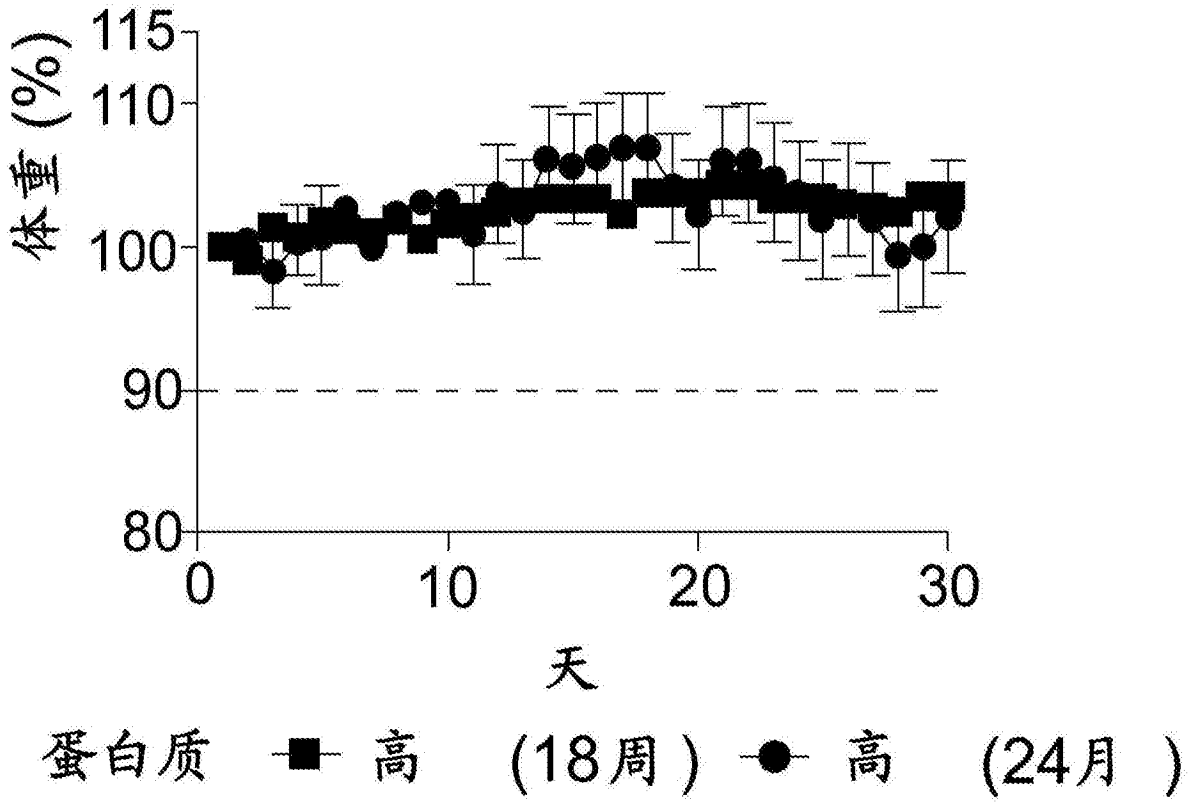

体重(%)
115
110
100
90
80
0
10
20
30
天
蛋白质
高 (18周)
高 (24月)

图7A

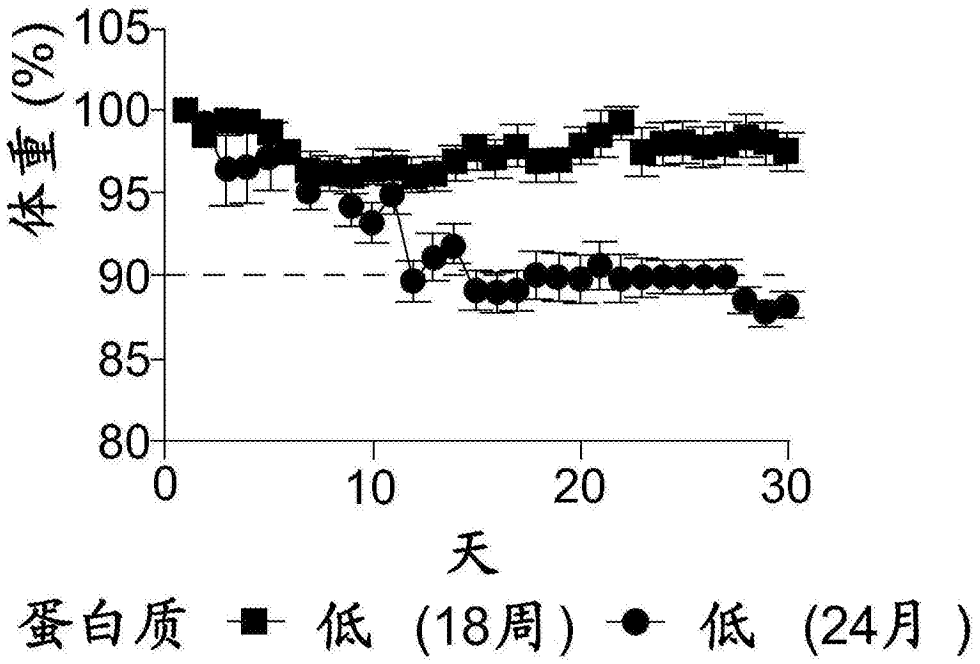


图7B

表12.死亡率和蛋白质摄取之间的相关性

	危险比 (95% CI)							
	年龄 50-65 (N=3,039)				年龄 66+ (N=3,342)			
	模型1	模型2	模型3	模型4	模型1	模型2	模型3	模型4
全因死亡率								
中蛋白质 (n=4,798)	1.34 (0.81-2.23)	1.37 (0.82-2.27)	1.35 (0.80-2.29)	1.15 (0.67-1.96)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.61-1.01)
高蛋白质 (n=1,146)	1.74 (1.02-2.97)	1.77 (1.03-3.03)	1.74 (0.99-3.05)	1.18 (0.66-2.11)	0.72 (0.55-0.94)	0.73 (0.56-0.95)	0.72 (0.55-0.94)	0.72 (0.56-1.02)
% kcal脂肪		0.99 (0.98-1.01)				1.00 (0.99-1.01)		
% kcal碳水化合物			1.00 (0.99-1.01)				1.00 (0.99-1.00)	
% kcal动物蛋白				1.03 (1.00-1.06)				1.00 (0.98-1.02)
CVD死亡率								
中蛋白质 (n=4,798)	0.79 (0.40-1.54)	0.83 (0.43-1.60)	0.81 (0.41-1.62)	0.61 (0.29-1.29)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.57-1.12)	0.80 (0.57-1.13)	0.80 (0.56-1.14)
高蛋白质 (n=1,146)	1.03 (0.51-2.09)	1.08 (0.54-2.15)	1.10 (0.52-2.31)	0.55 (0.19-1.62)	0.78 (0.54-1.14)	0.79 (0.54-1.15)	0.78 (0.53-1.15)	0.77 (0.48-1.25)
% kcal脂肪		0.99 (0.97-1.01)				1.00 (0.99-1.01)		
% kcal碳水化合物			1.00 (0.99-1.02)				1.00 (0.99-1.01)	
% kcal动物蛋白				1.04 (0.99-1.11)				1.00 (0.98-1.02)
癌症死亡率								
中蛋白质 (n=4,798)	3.06 (1.49-6.25)	3.13 (1.52-6.44)	3.56 (1.65-7.65)	2.71 (1.34-5.91)	0.67 (0.43-1.06)	0.67 (0.43-1.06)	0.67 (0.42-1.05)	0.66 (0.40-1.07)
高蛋白质 (n=1,146)	4.33 (1.96-9.56)	4.42 (2.01-9.74)	4.98 (2.13-11.66)	3.19 (1.21-8.35)	0.40 (0.23-0.71)	0.41 (0.23-0.73)	0.39 (0.22-0.69)	0.38 (0.17-0.82)
% kcal脂肪		0.99 (0.98-1.01)				1.02 (1.01-1.03)		
% kcal碳水化合物			1.00 (0.98-1.01)				1.00 (0.99-1.01)	
% kcal动物蛋白				1.02 (0.97-1.07)				1.00 (0.97-1.04)
糖尿病死亡率								
中蛋白质 (n=4,798)	3.43 (0.69-17.02)	3.36 (0.67-16.96)	3.41 (0.67-17.36)	2.99 (0.58-15.31)	5.38 (0.95-30.49)	5.05 (0.93-27.34)	4.93 (0.89-27.35)	6.26 (0.95-37.01)
高蛋白质 (n=1,146)	3.93 (0.73-21.07)	3.88 (0.71-21.17)	3.90 (0.67-22.84)	2.77 (0.24-31.73)	10.64 (1.85-61.31)	10.42 (1.88-57.87)	9.07 (1.49-55.30)	15.16 (1.95-118.9)
% kcal脂肪		1.01 (0.97-1.05)						
% kcal碳水化合物			1.00 (0.96-1.04)					
% kcal动物蛋白				1.02 (0.92-1.14)				

参考=低蛋白质(在两个年龄组中都是n=437)

模型1：（基线模型）为年龄、性别、民族/种族、教育，腰围、抽烟、慢性病况(糖尿病、癌症，MI)、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里调整。

模型2：为协变量和来自总脂肪的% kcal调整

模型3：为协变量和来自总碳水化合物的% kcal调整

模型4：为协变量和来自动物蛋白质的% kcal调整

图8

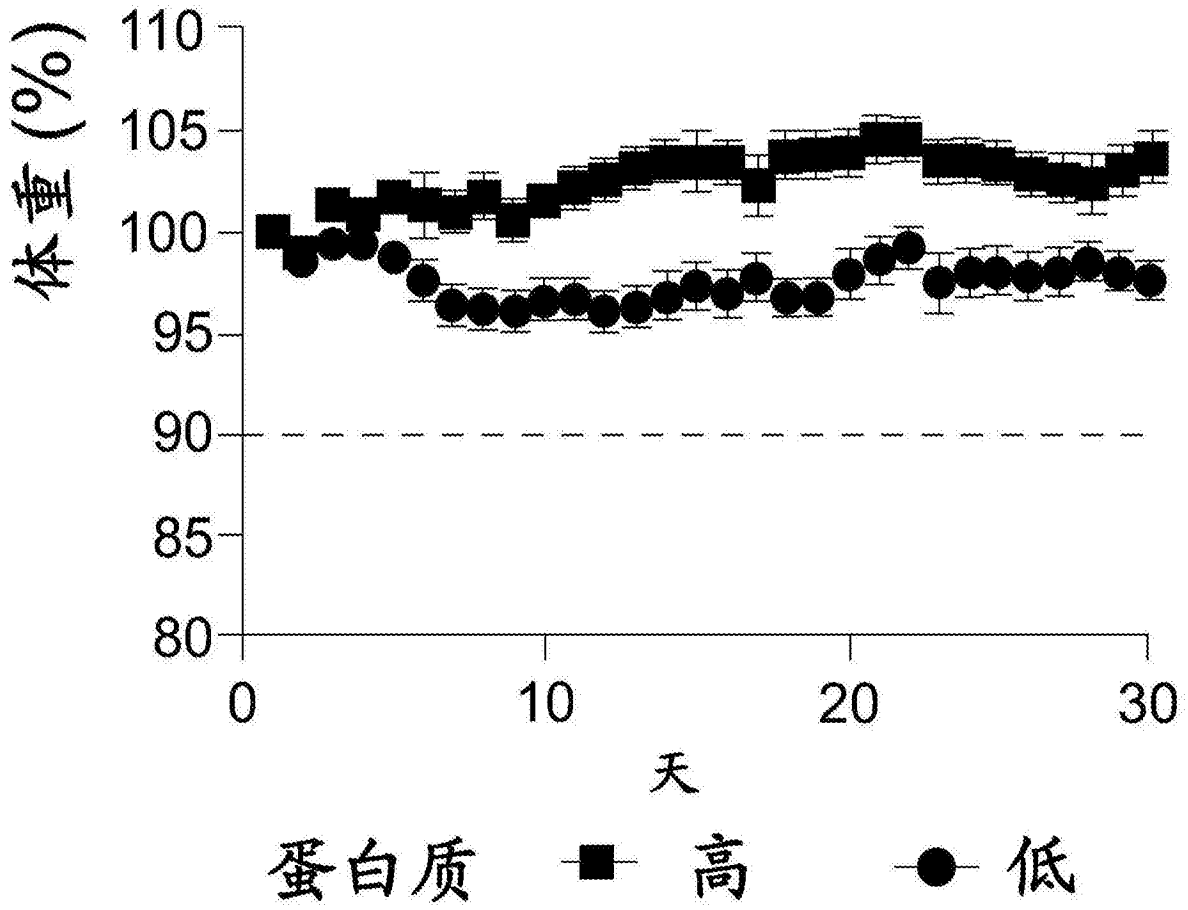


图9A

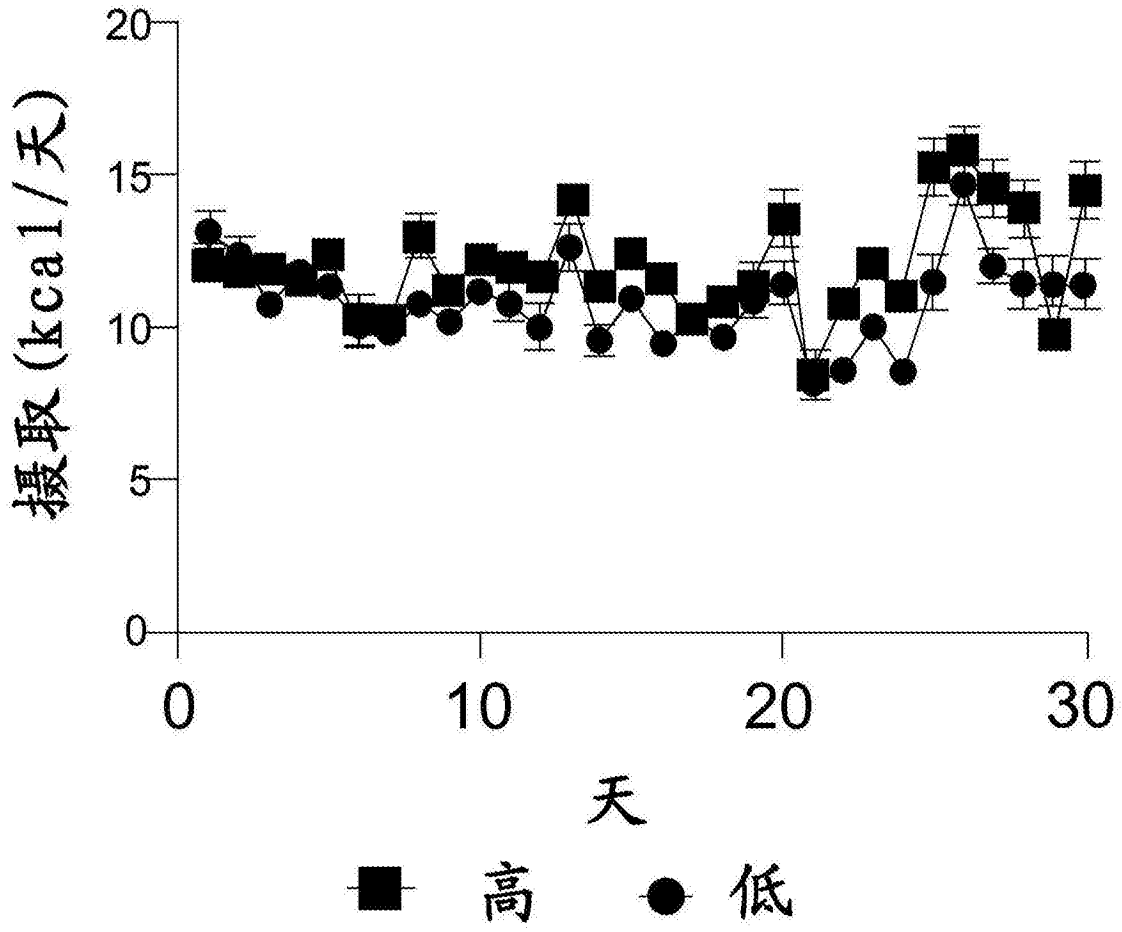


图9B

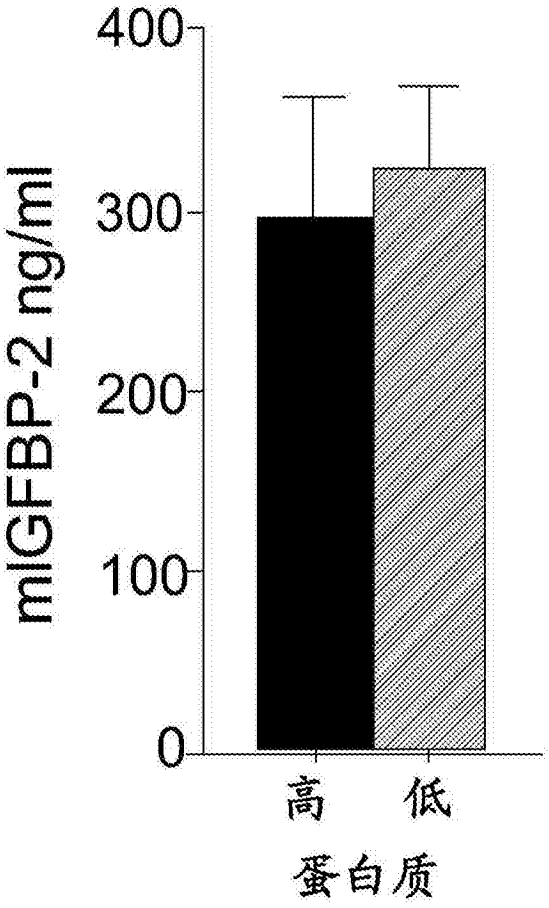


图9C

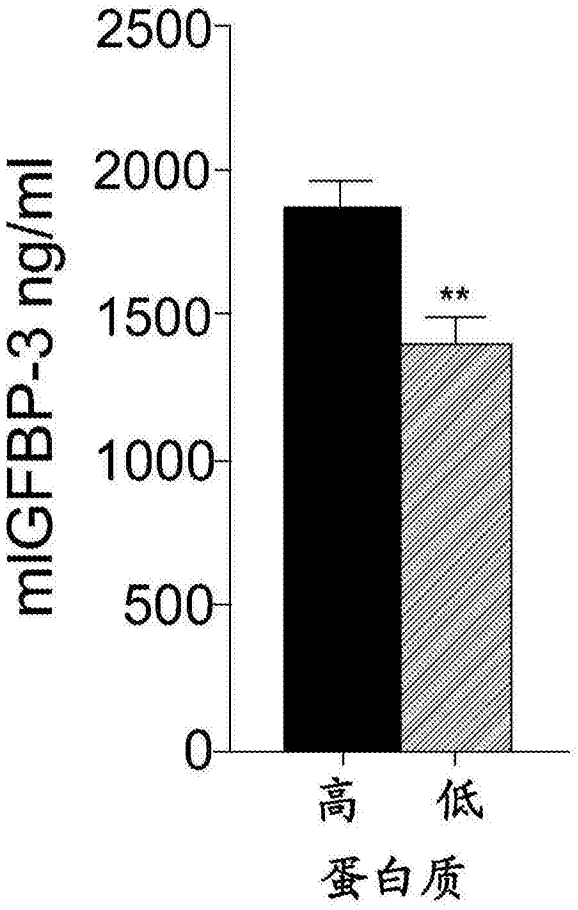


图9D

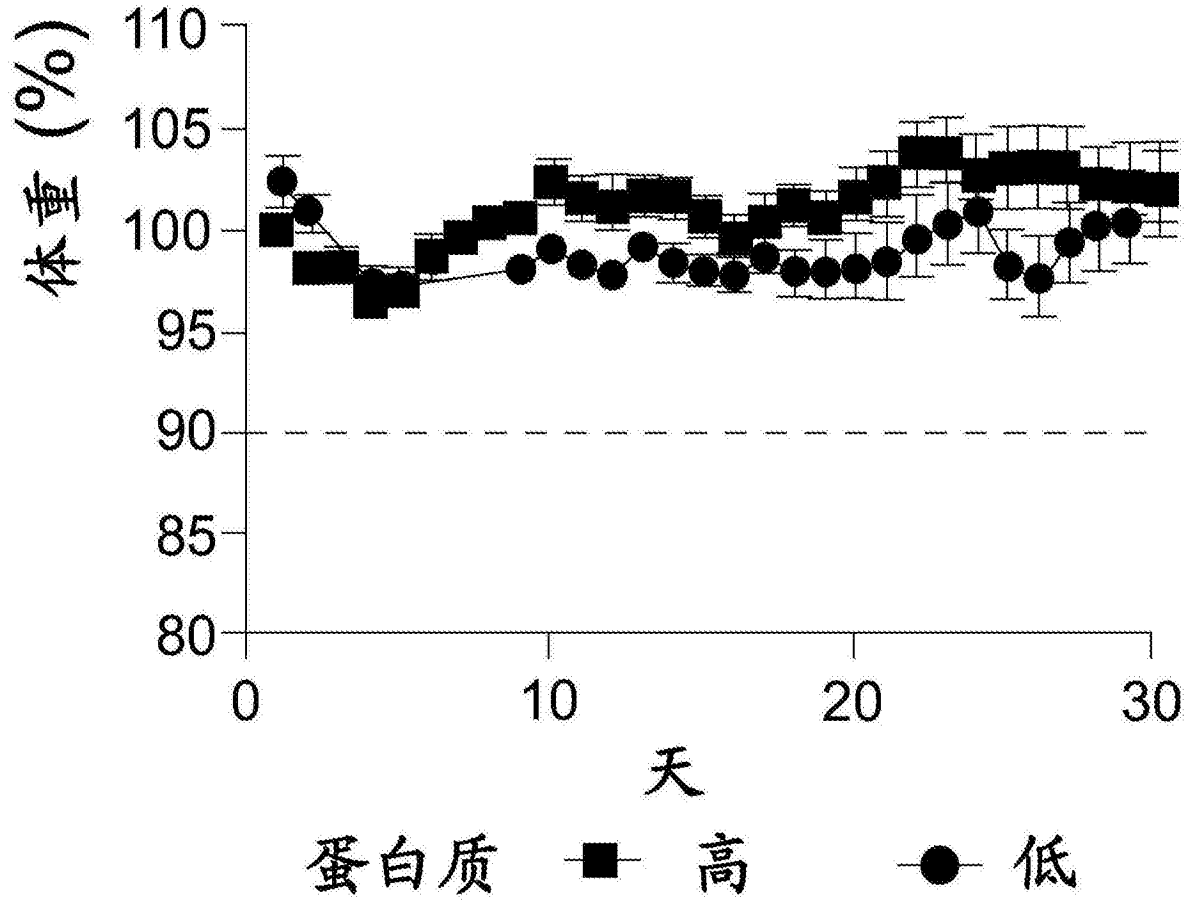


图9E

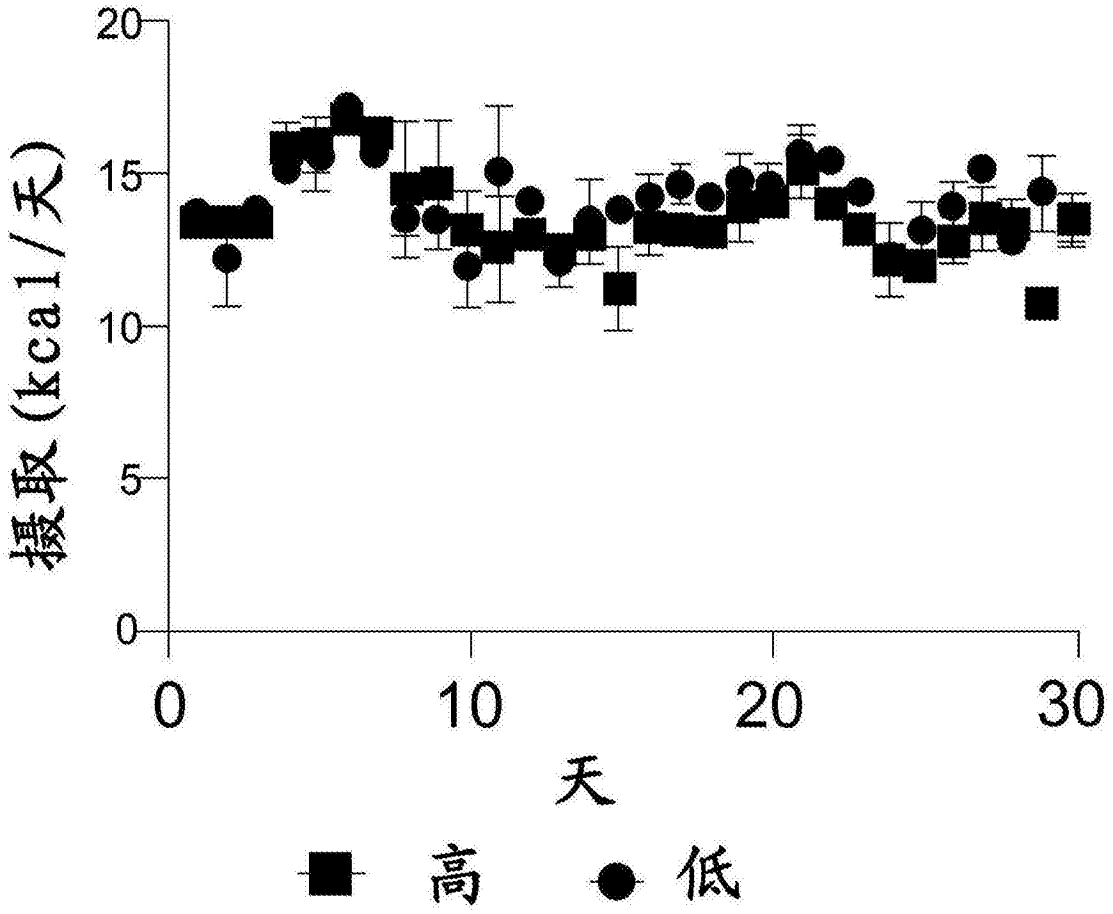


图9F

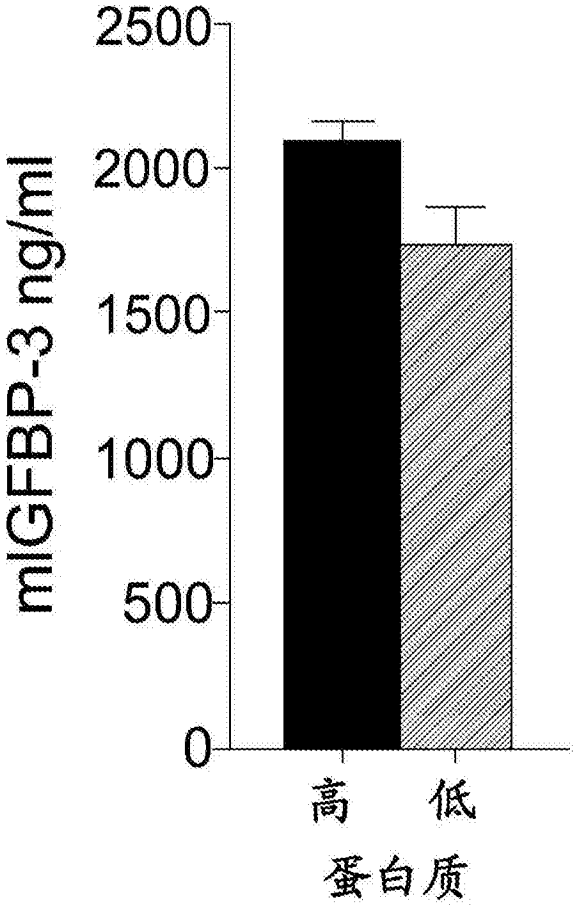

2500
2000
1500
1000
500
0
mIGFBP-3 ng/ml
高
低
蛋白质

图9G

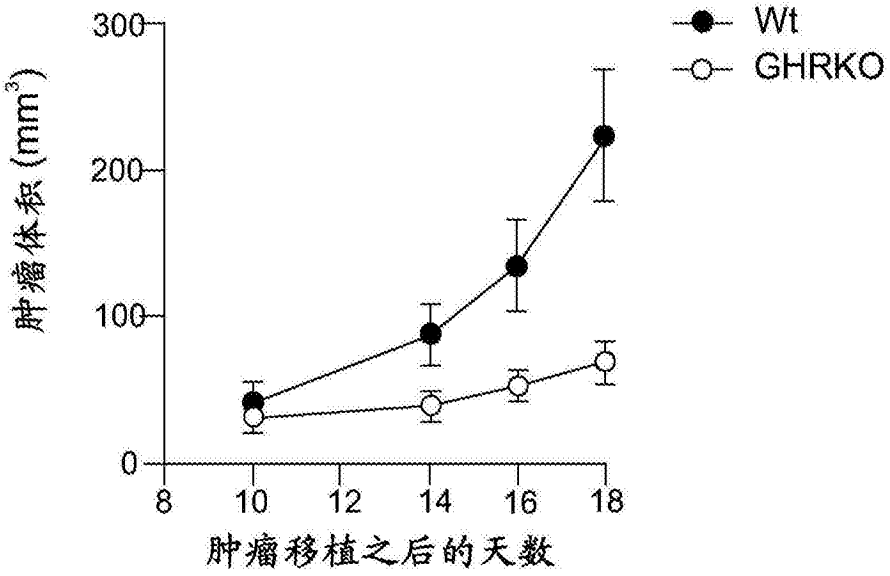

300
200
100
0
肿瘤体积 (mm3)
8
10
12
14
16
18
肿瘤移植之后的天数
Wt
GHRKO

图10

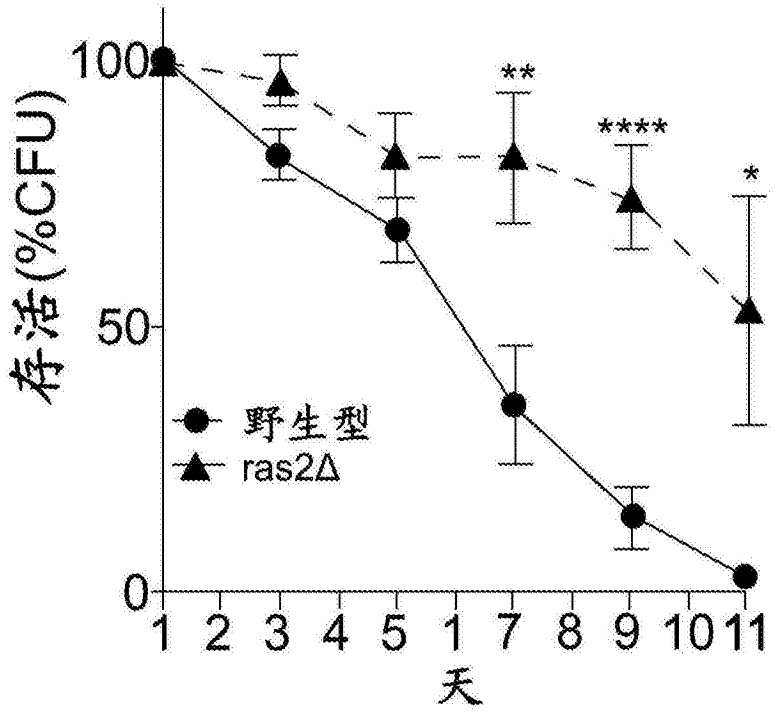

存活(%CFU)
100
50
0
野生型
ras2Δ
**
****
*
1 2 3 4 5 1 7 8 9 10 11
天

图11A

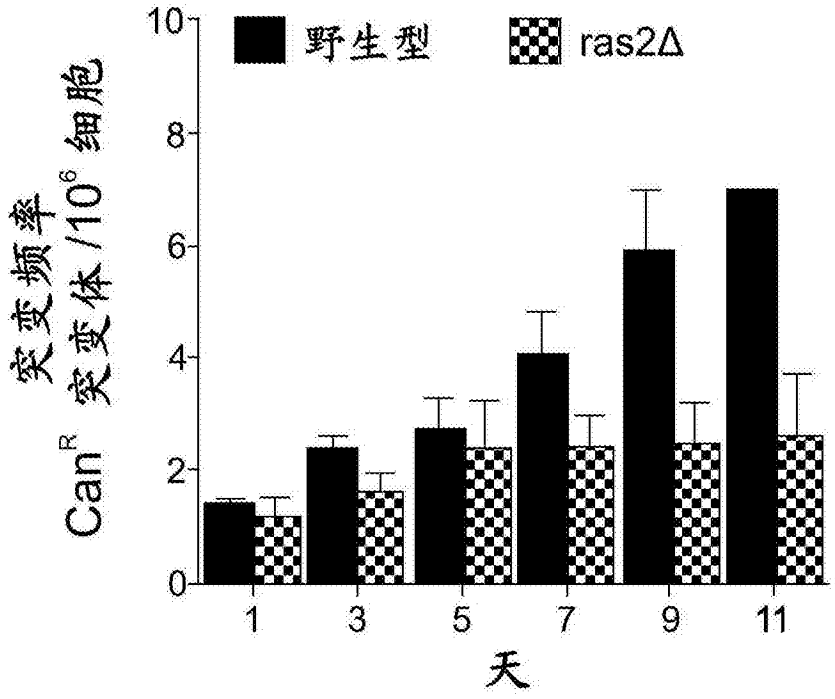

突变频率
CanR 突变体 /10^6 细胞
10
8
6
4
2
0
野生型
ras2Δ
1 3 5 7 9 11
天

图11B

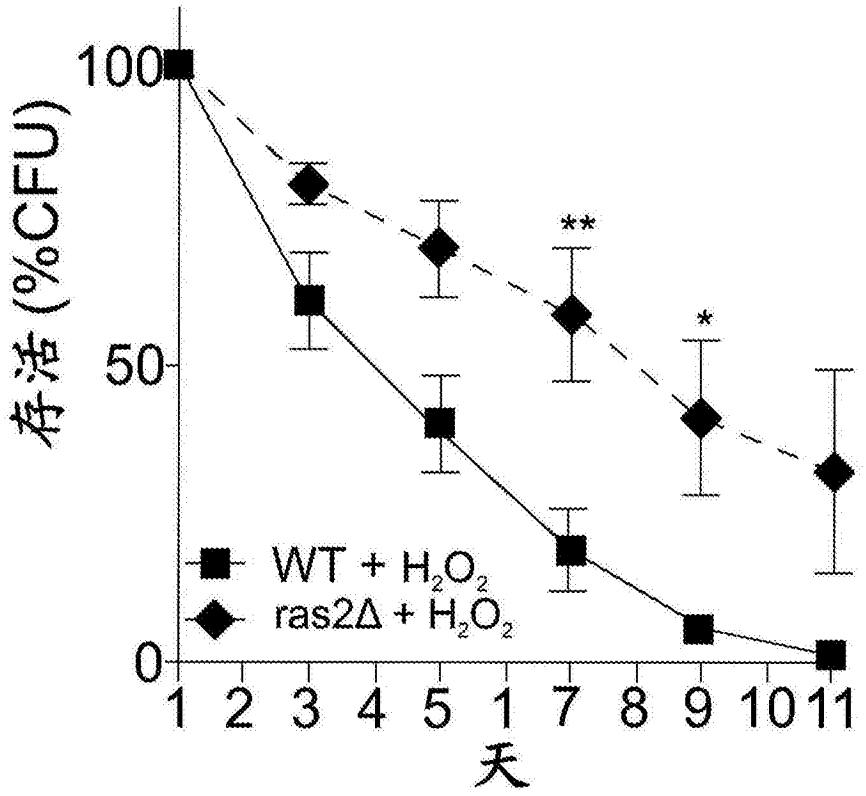


图11C

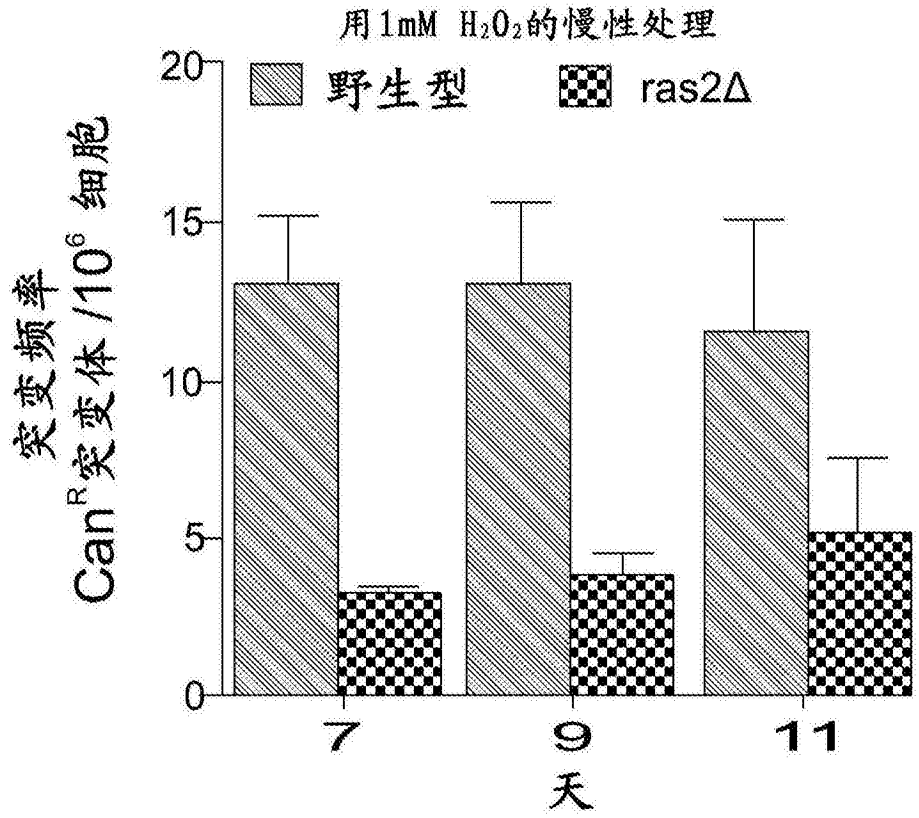

用1mM H_2O_2的慢性处理
野生型
ras2Δ
突变频率
Can^R突变体 /10^6 细胞
20
15
10
5
0
7
9
11
天

图11D

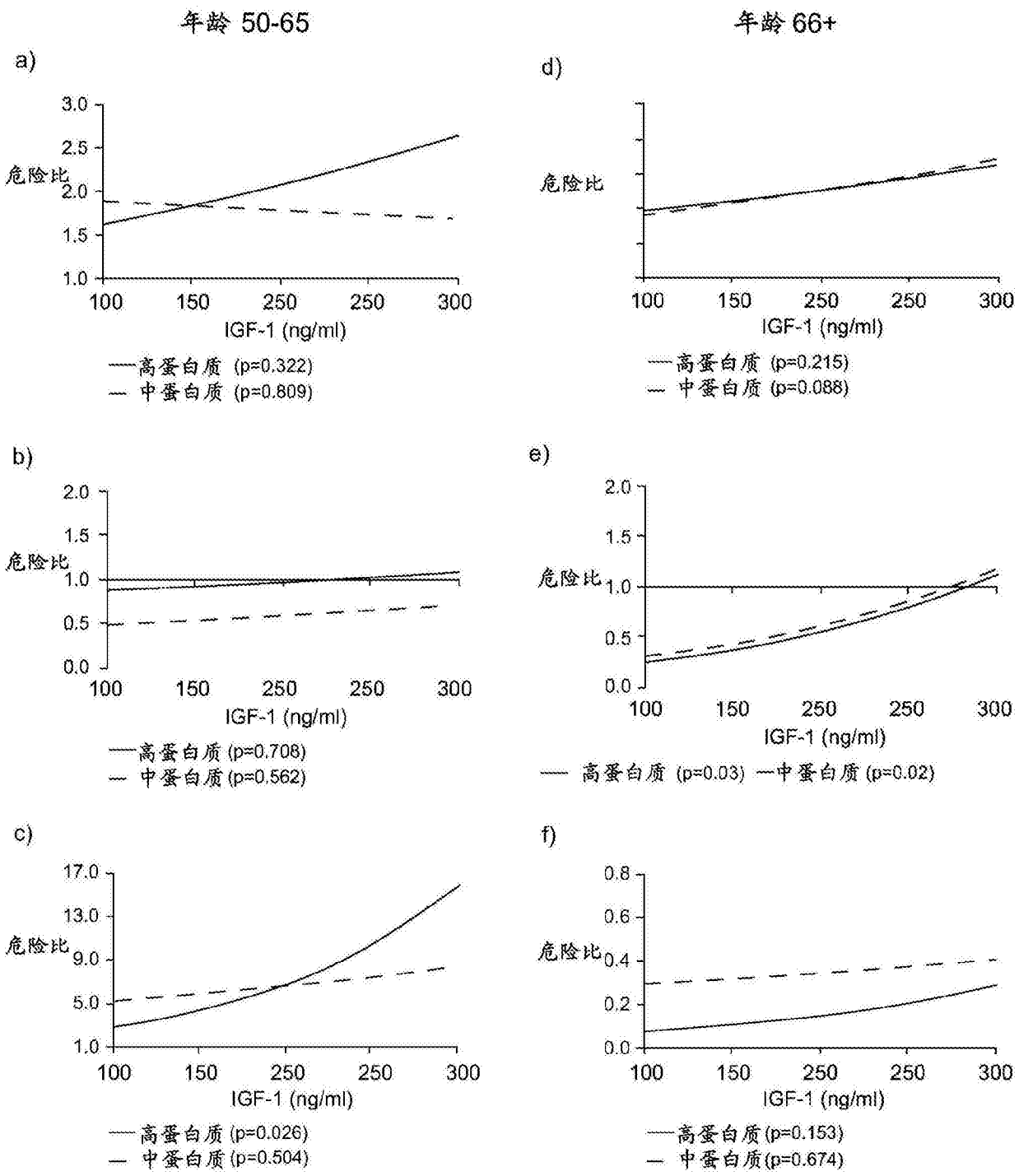

年龄 50-65
年龄 66+
a)
d)
危险比
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
100 150 250 250 300
IGF-1 (ng/ml)
高蛋白质 (p=0.322)
中蛋白质 (p=0.809)
高蛋白质 (p=0.215)
中蛋白质 (p=0.088)
b)
e)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
高蛋白质 (p=0.708)
中蛋白质 (p=0.562)
高蛋白质 (p=0.03)
中蛋白质 (p=0.02)
c)
f)
17.0
13.0
9.0
5.0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
高蛋白质 (p=0.026)
中蛋白质 (p=0.504)
高蛋白质 (p=0.153)
中蛋白质 (p=0.674)

图12

表13. 样品特征

	全样品 N=6,381)	低蛋白质 (N=437)	中蛋白质 (N=4,798)	高蛋白质 (N=1,146)
年龄	64.8 (10.0)	65.3 (10.1)	64.8 (10.0)	64.5 (9.8)
男性	55.4	56.3	55.0	57.0
白人	85.1	81.6	86.5	80.3
黑人	8.7	12.3	7.9	10.9
西班牙人	6.2	6.1	5.6	8.8
教育	11.5 (3.6)	11.1 (3.3)	11.6 (3.5)	11.0 (3.8)
腰围 (cm)	96.9 (13.2)	96.5 (13.5)	96.8 (13.2)	97.5 (13.0)
目前抽烟者	19.1	21.8	19.1	18.2
之前抽烟者	38.0	39.8	37.9	37.8
MI历史	9.1	7.9	8.9	10.2
癌症历史	7.3	11.7	7.5	5.0
糖尿病历史	10.9	2.6	10.3	17.0
尝试减肥	38.2	37.5	37.0	43.9
改变膳食(健康原因)	23.1	15.0	22.4	29.3
来自动物蛋白质的卡路里%	10.6 (5.1)	4.1 (1.8)	9.5 (3.1)	18.3 (4.9)
来自蛋白质的卡路里%	16.0 (4.8)	8.5 (1.4)	14.9 (2.6)	23.7 (4.1)
来自脂肪的卡路里%	33.0 (9.6)	31.9 (11.2)	33.6(9.3)	31.0 (10.2)
来自碳水化合物的卡路里%	50.7 (11.6)	56.6 (13.5)	51.3 (11.0)	45.4 (11.4)
总卡路里	1,822.9 (832.2)	1965.6 (1072.8)	1862.5 (807.4)	1593.6 (796.2)
24-hr回忆多	1.6	1.8	1.4	2.1
24-hr回忆正常	93.3	83.0	93.9	94.6
24-hr回忆少	5.1	15.2	4.7	3.3
死亡(全因)	40.4	42.9	39.6	42.9
死亡(CVD)	18.7	21.3	18.0	20.7
死亡(癌症)	9.9	9.8	10.1	9.0
死亡(糖尿病)	1.0	0.2	0.9	2.0
人年龄	83,308	5,183	63,661	14,464

BMI: 身体质量指数 MI: 心肌梗死 24-hr回忆(多/正常/少):
在24-hr回忆期间报道的食品比受试者的正常膳食(更多/相同/更少) CVD: 冠心病

图13

表14: 蛋白质摄取和死亡率之间的相关性(N=6,381)

	危险比 (95% CI)			
	全因死亡率	CVD死亡率	癌症死亡率	糖尿病死亡率
蛋白质(% kcal)				
<10 (n=436)	参考	参考	参考	参考
10-19.9 (n=4,800)	0.90 (0.74-1.11)	0.82 (0.61-1.11)	0.98 (0.66-1.45)	3.23 (1.02-10.29)
20+ (n=1,145)	0.93 (0.74-1.19)	0.88 (0.63-1.22)	0.89 (0.56-1.44)	5.51 (1.69-17.99)

协变量 年龄、性别、民族/种族、教育、腰围、抽烟、慢性病况(糖尿病、癌症、MI)、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里

图14

表15：IGF-1对死亡率和蛋白质摄取之间相关性的影响
(N=2,283)

	危险比 (95% CI)			
	年龄50-65 (N=1,125)		年龄66+ (N=1,128)	
	模型1	模型2	模型1	模型1
全因死亡率				
低蛋白质	参考	参考	参考	参考
中蛋白质	1.73 (0.91-3.30)	1.69 (0.90-3.20)	0.62 (0.41-0.94)	0.62 (0.40-0.98)
高蛋白质	2.83 (1.30-5.76)	2.71 (1.34-5.47)	0.59 (0.36-0.95)	0.59 (0.37-0.95)
IGF-1 (10 ng/ml)		1.01 (0.99-1.04)		1.00 (0.98-1.01)
CVD死亡率				
低蛋白质	参考	参考	参考	参考
中蛋白质	0.76 (0.33-1.74)	0.71 (0.33-1.54)	0.77 (0.43-1.38)	0.77 (0.43-1.37)
高蛋白质	1.29 (0.49-3.40)	1.03 (0.39-2.75)	0.69 (0.36-1.34)	0.70 (0.36-1.35)
IGF-1 (10 ng/ml)		1.04 (1.01-1.07)		0.99 (0.97-1.00)
癌症死亡率				
低蛋白质	参考	参考	参考	参考
中蛋白质	6.91 (1.56-30.68)	6.91 (1.56-30.72)	0.41 (0.18-0.92)	0.39 (0.18-0.86)
高蛋白质	13.05 (2.77-61.40)	13.00 (2.80-61.13)	0.24 (0.08-0.68)	0.23 (0.08-0.67)
IGF-1 (10 ng/ml)		1.00 (0.96-1.05)		0.97 (0.94-0.99)

模型1：(基线模型)为年龄、性别、民族/种族、教育、腰围、抽烟、慢性病况(糖尿病、癌症、MI)、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里调整。
模型2：为协变量和IGF-1调整。

图15

表16：蛋白质和IGF-1对死亡率相互作用之间相关性的危险比

	年龄50-65		年龄66+	
	危险比	P值	危险比	P值
全因				
中	2.03	0.349	0.27	0.008
高	1.30	0.722	0.30	0.040
IGF-1	1.01	0.738	0.97	0.077
中蛋白质 X IGF-1	0.99	0.809	1.03	0.088
高蛋白质 x IGF-1	1.02	0.322	1.03	0.215
CVD				
中	0.39	0.379	0.16	0.008
高	0.77	0.802	0.13	0.020
IGF-1	1.02	0.520	0.93	0.007
中蛋白质 x IGF-1	1.02	0.562	1.07	0.020
高蛋白质 x IGF-1	1.01	0.708	1.07	0.031
癌症				
中	4.08	0.264	0.25	0.201
高	1.27	0.858	0.04	0.018
IGF-1	0.96	0.194	0.96	0.243
中蛋白质X IGF-1	1.02	0.804	1.02	0.674
高蛋白质 x IGF-1	1.09	0.026	1.06	0.153

所有的模型包括年龄、性别、民族/种族、教育、腰围、抽烟、慢性病况(糖尿病、癌症、MI)、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里。

图16

表17.动物和植物蛋白质对死亡率和蛋白质摄取之间的相关性的影响

	危险比 (95% CI)					
	年龄50-65 (N=3,039)			年龄66+ (N=3,342)		
	模型1	模型4	模型5	模型1	模型4	模型5
全因死亡率						
中蛋白质	1.34 (0.81-2.22)	1.15 (0.67-1.96)	1.33 (0.80-2.21)	0.79 (0.62-0.99)	0.79 (0.61-1.01)	0.80 (0.63-1.01)
高蛋白质	1.74 (1.02-2.97)	1.18 (0.66-2.11)	1.73 (0.96-2.96)	0.72 (0.55-0.94)	0.72 (0.50-1.02)	0.73 (0.50-0.96)
动物蛋白质kcal%		1.03 (1.00-1.06)			1.00 (0.98-1.02)	
植物蛋白质kcal%			1.01 (0.98-1.06)			0.98 (0.95-1.01)
CVD死亡率						
中蛋白质	0.79 (0.40-1.54)	0.61 (0.29-1.29)	0.77 (0.40-1.51)	0.89 (0.57-1.12)	0.80 (0.50-1.14)	0.82 (0.58-1.14)
高蛋白质	1.03 (0.51-2.09)	0.55 (0.19-1.62)	1.02 (0.50-2.06)	0.78 (0.54-1.14)	0.77 (0.48-1.25)	0.79 (0.54-1.16)
动物蛋白质kcal%		1.04 (0.99-1.11)			1.00 (0.98-1.02)	
植物蛋白质kcal%			1.03 (0.96-1.10)			0.98 (0.94-1.02)
癌症死亡率						
中蛋白质	3.06 (1.49-6.25)	2.71 (1.24-5.91)	3.03 (1.48-6.19)	0.67 (0.43-1.06)	0.66 (0.40-1.07)	0.68 (0.43-1.09)
高蛋白质	4.33 (1.98-9.56)	3.19 (1.21-8.35)	4.30 (1.93-9.59)	0.40 (0.23-0.71)	0.38 (0.17-0.82)	0.41 (0.23-0.72)
动物蛋白质kcal%		1.02 (0.97-1.07)			1.00 (0.97-1.04)	
植物蛋白质kcal%			1.01 (0.91-1.12)			0.99 (0.92-1.06)
糖尿病死亡率						
中蛋白质	3.43 (0.69-17.02)	2.99 (0.58-15.31)	3.64 (0.76-17.55)	5.38 (0.95-30.45)	6.20 (0.85-37.01)	5.50 (0.96-31.50)
高蛋白质	3.93 (0.73-21.07)	2.77 (0.24-31.73)	3.97 (0.75-21.11)	10.64 (1.85-61.31)	15.16 (1.93-118.9)	10.71 (1.87-61.28)
动物蛋白质kcal%		1.02 (0.92-1.14)			0.98 (0.90-1.06)	
植物蛋白质kcal%			0.90 (0.75-1.07)			0.98 (0.84-1.14)

模型1：（基线模型）为年龄、性别、民族/种族、教育、腰围、抽烟、慢性病况（糖尿病、癌症、MI）、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里调整

模型4：为协变量和来自动物蛋白质的% kcal调整

模型5：为协变量和来自植物蛋白质的% kcal调整

参考=低蛋白质

50-65岁：低蛋白质（N=219），中蛋白质（N=2,277），高蛋白质（N=543）

66+年龄：低蛋白质（N=218），中蛋白质（N=2,521），高蛋白质（N=603）

图17

表18:通过年龄和蛋白质摄取调整的平均HbA1c、糖尿病发病率和平均BMI

	HbA1c	糖尿病(%)	BMI
50-65岁			
低蛋白质摄取	5.52	2.8	27.65
中蛋白质摄取	5.65	9.8	27.93
高蛋白质摄取	5.90	10.7	27.98
P-值	<.001	<.001	.834
66+年龄			
低蛋白质摄取	5.52	5.0	26.19
中蛋白质摄取	5.81	11.6	26.70
高蛋白质摄取	6.03	20.4	26.50
P-值	<.001	<.001	.401

从控制年龄、性别、民族/种族、教育、抽烟、疾病、总卡路里摄取和膳食的模型评估

图18

表19:在基线没有糖尿病的参与者中,糖尿病死亡率和蛋白质摄取之间的相关性

	危险比(95%置信区间)
高蛋白质(n=930)	73.52(4.47-1209.7)
中蛋白质(n=4,443)	22.93(1.31-400.7)

参考=低蛋白质(在两个年龄中都是n=449)

Cox比例风险模型:为年龄、性别、民族/种族、教育、腰围、抽烟、其他慢性病况(癌症、MI)、上一年尝试减肥、上一年改变膳食、报告摄取代表性典型膳食、总卡路里调整

图19

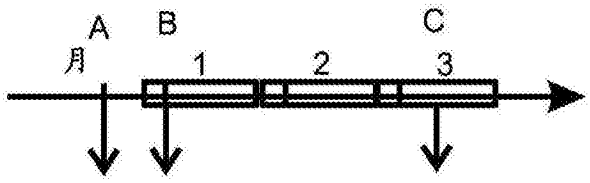


图20A

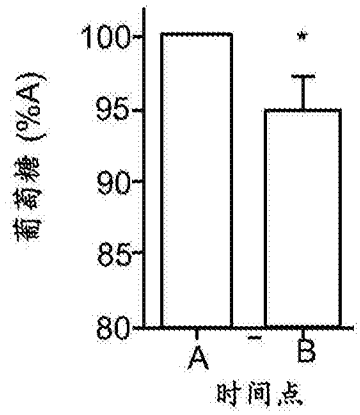


图20B

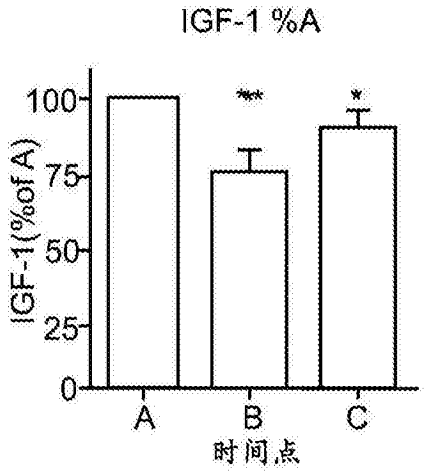


图20C

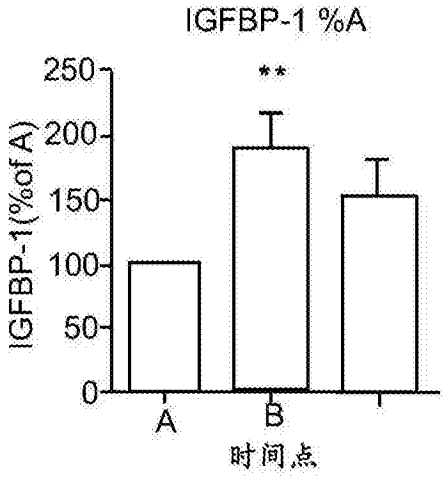


图20D

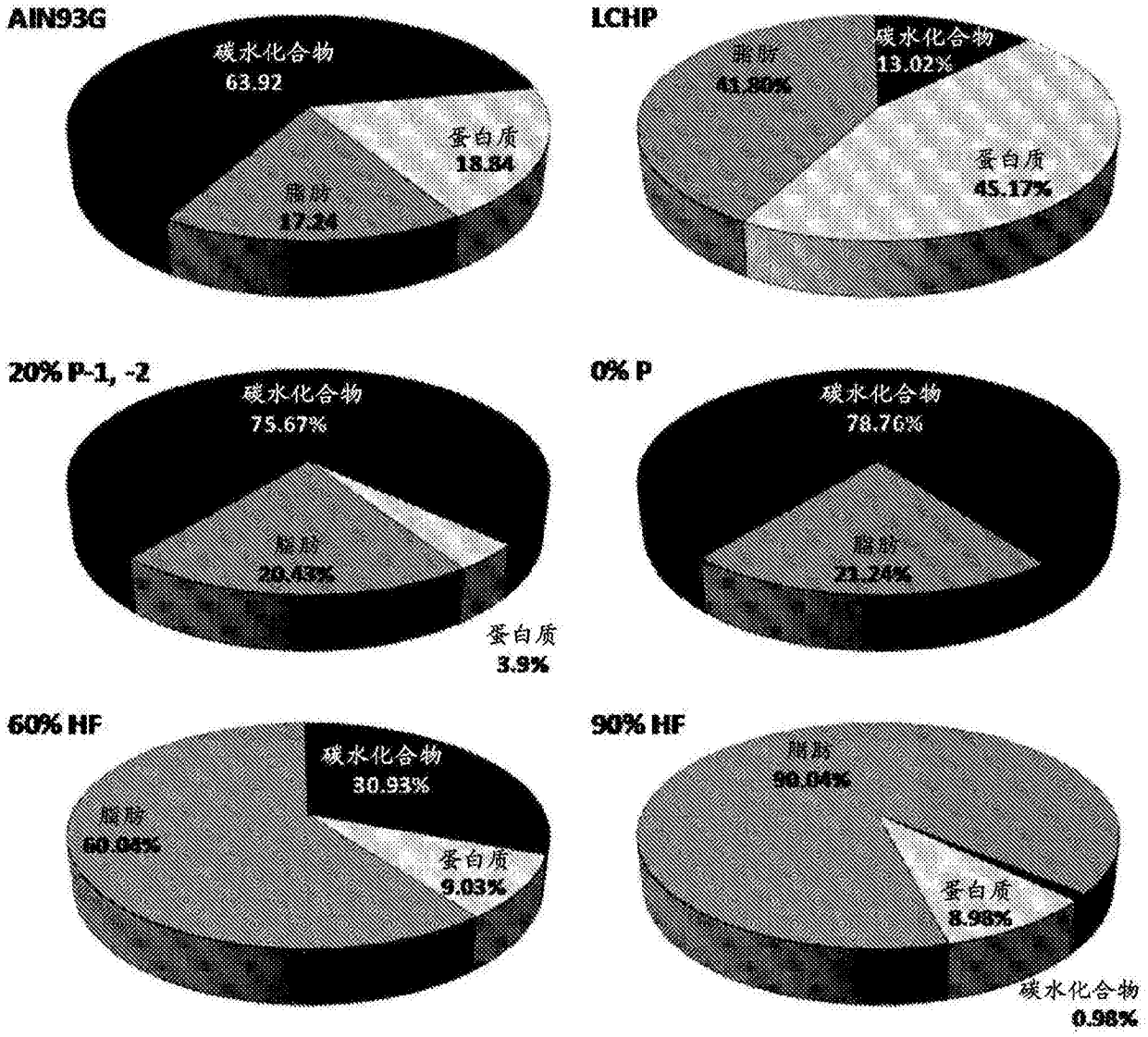

AIN93G
碳水化合物
63.92
蛋白质
18.84
脂肪
17.24
LCHP
碳水化合物
13.02%
蛋白质
45.17%
20% P-1, -2
碳水化合物
75.67%
脂肪
20.43%
蛋白质
3.9%
0% P
碳水化合物
78.76%
脂肪
21.24%
60% HF
碳水化合物
30.93%
脂肪
60.04%
蛋白质
9.03%
90% HF
脂肪
90.04%
蛋白质
8.98%
碳水化合物
0.98%

图21

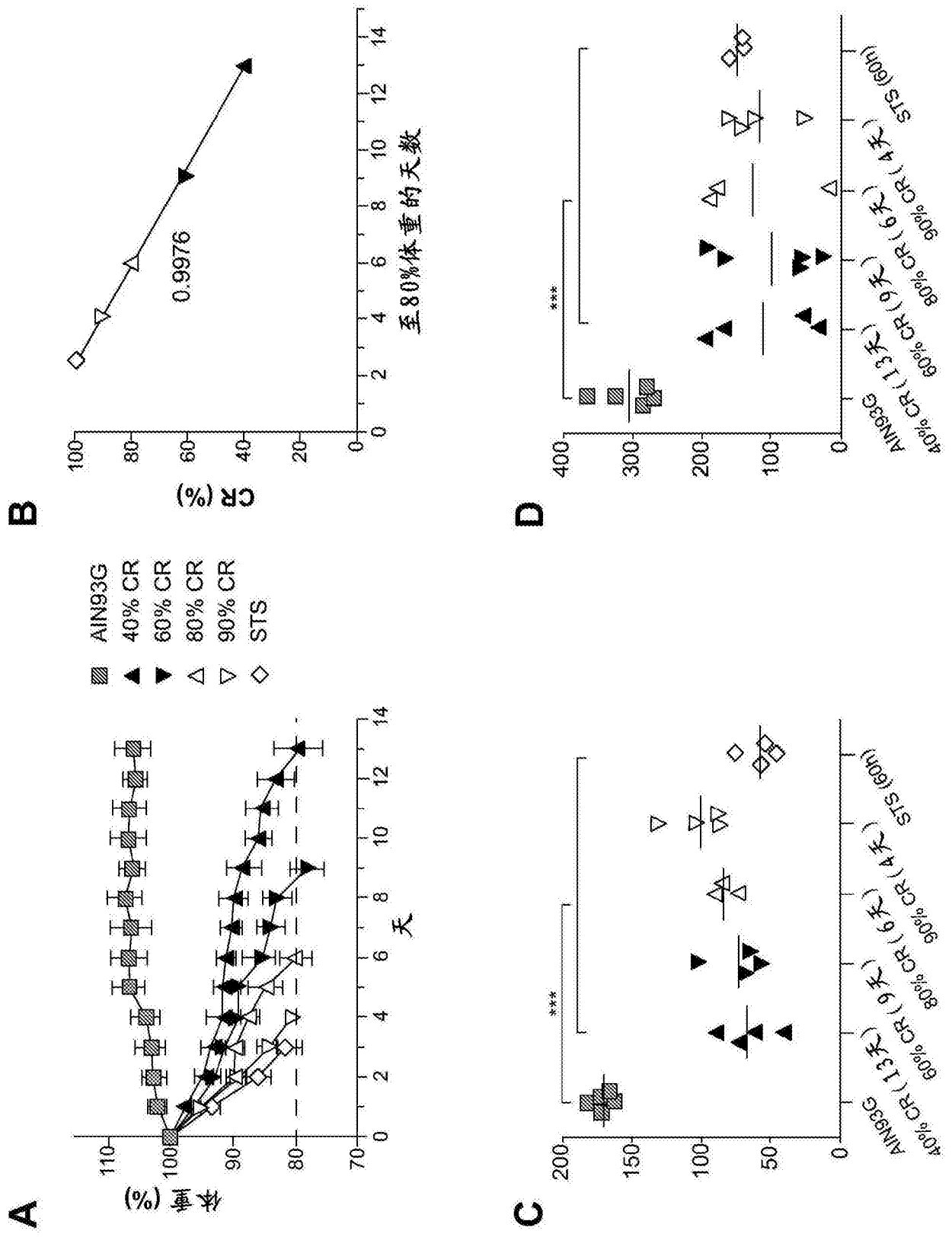

A
体重 (%)
天
AIN93G
40% CR
60% CR
80% CR
90% CR
STS
B
CR (%)
至80%体重的天数
0.9976
C
D
***
AIN93G
40% CR (13天)
60% CR (9天)
80% CR (6天)
90% CR (4天)
STS (60h)

图22

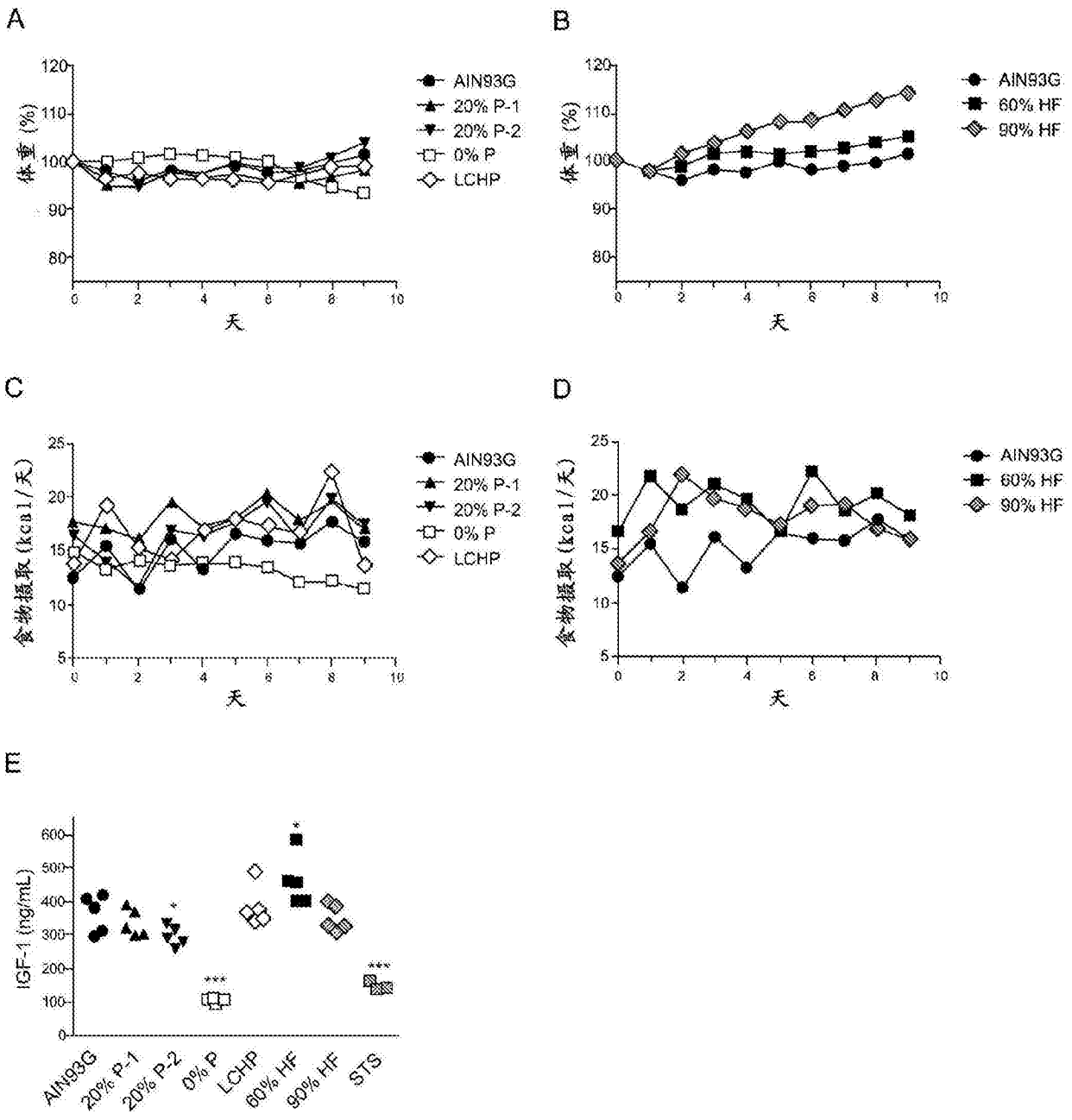

A
体重 (%)
天
AIN93G
20% P-1
20% P-2
0% P
LCHP
B
体重 (%)
天
AIN93G
60% HF
90% HF
C
食物摄取 (kcal/天)
天
AIN93G
20% P-1
20% P-2
0% P
LCHP
D
食物摄取 (kcal/天)
天
AIN93G
60% HF
90% HF
E
IGF-1 (ng/mL)
AIN93G
20% P-1
20% P-2
0% P
LCHP
60% HF
90% HF
STS

图23

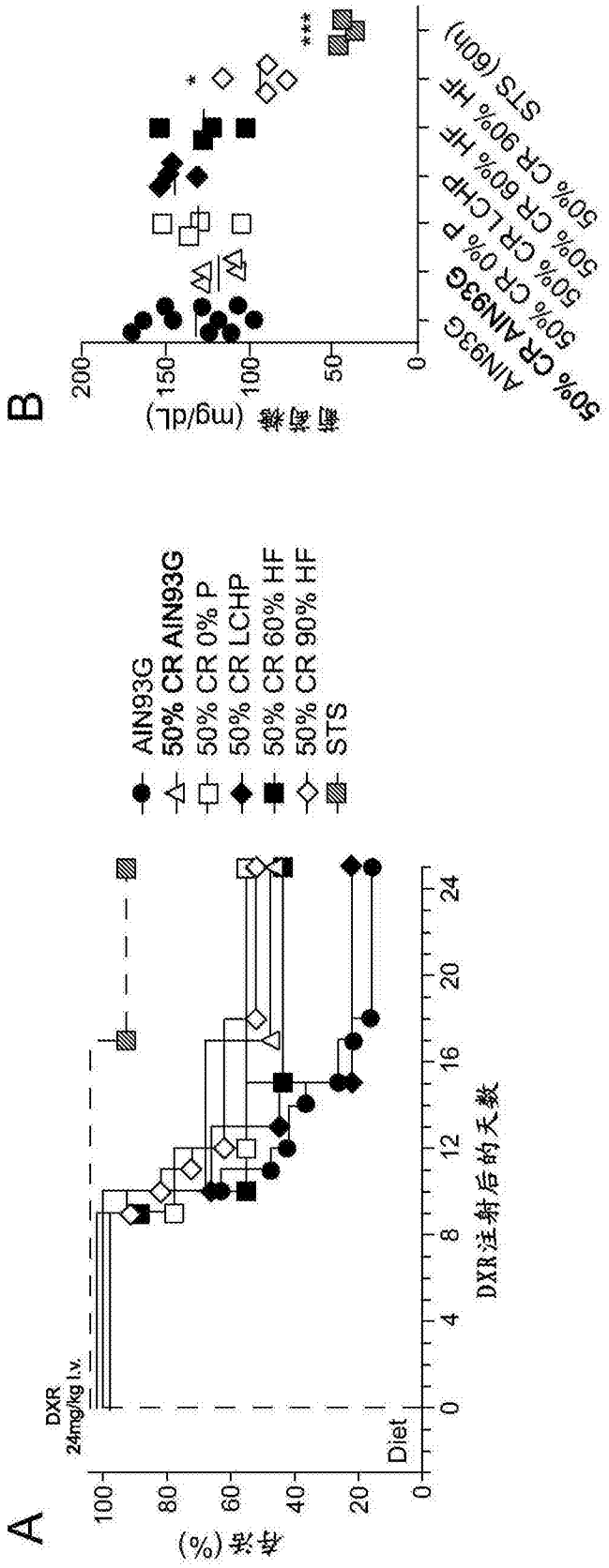

A
存活(%)
100
80
60
40
20
0
DXR
24mg/kg i.v.
Diet
0
4
8
12
16
20
24
DXR注射后的天数
AIN93G
50% CR AIN93G
50% CR 0% P
50% CR LCHP
50% CR 60% HF
50% CR 90% HF
STS
B
葡萄糖 (mg/dL)
200
150
100
50
0
AIN93G
50% CR AIN93G
50% CR 0% P
50% CR LCHP
50% CR 60% HF
50% CR 90% HF
STS (60h)
*
***

图24

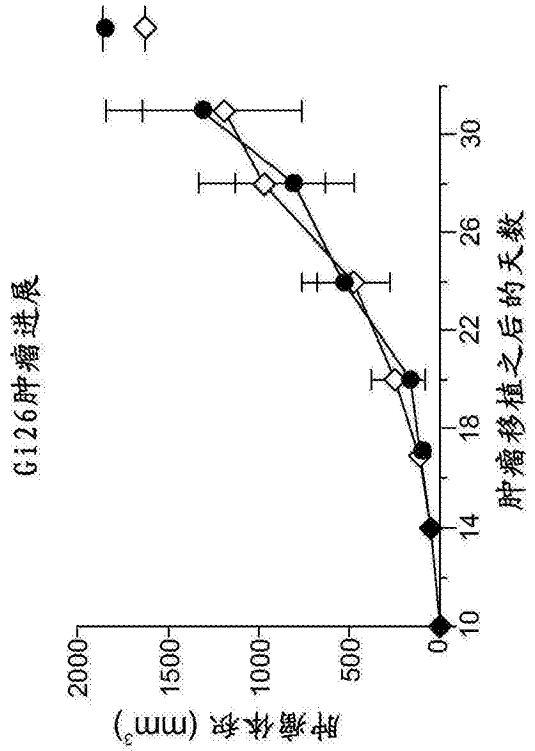

G126肿瘤进展
肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
10
14
18
22
26
30
肿瘤移植之后的天数

图25A

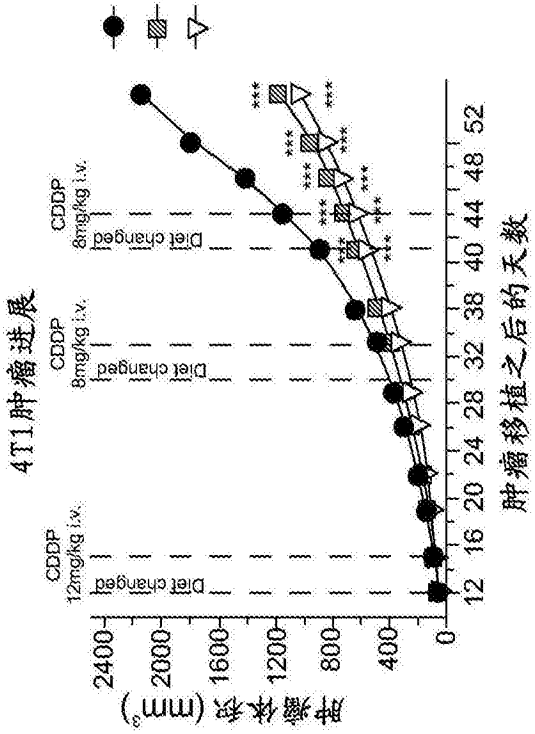

4T1肿瘤进展
肿瘤体积 (mm³)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
12
16
20
24
28
32
38
40
44
48
52
肿瘤移植之后的天数
CDDP
12mg/kg i.v.
Diet changed
CDDP
8mg/kg i.v.
Diet changed
CDDP
8mg/kg i.v.
Diet changed
***

图25B

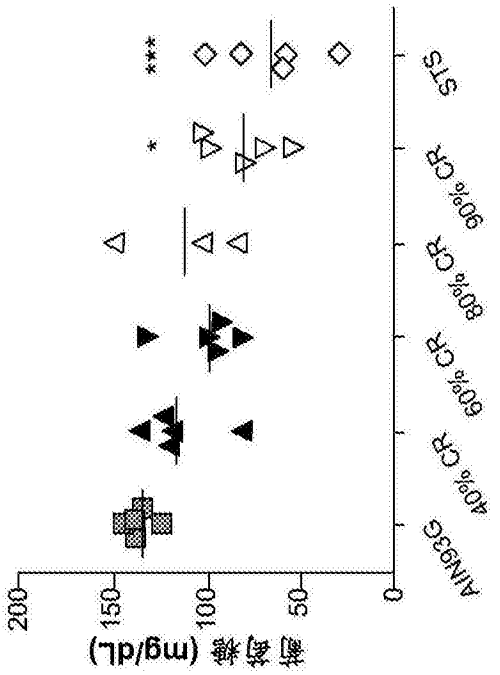

葡萄糖 (mg/dL)
200
150
100
50
0
AIN93G
40% CR
60% CR
80% CR
90% CR
STS
*
***

图 26B

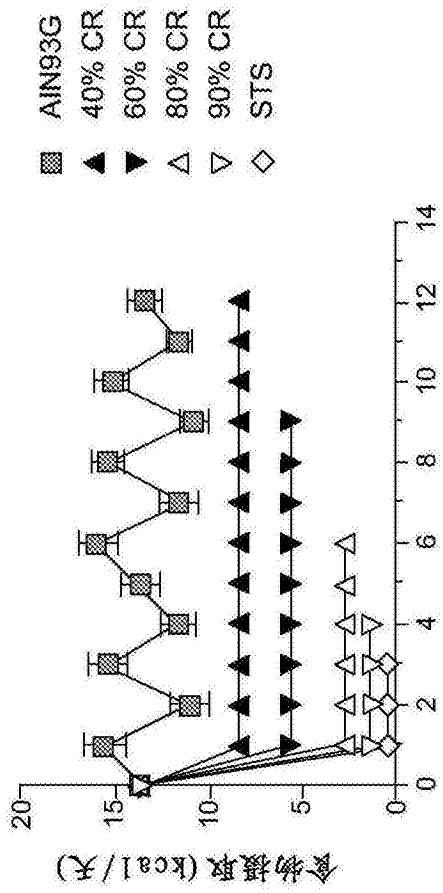

AIN93G
40% CR
60% CR
80% CR
90% CR
STS
食物摄取 (kcal/天)
20
15
10
5
0
0
2
4
6
8
10
12
14

图 26A

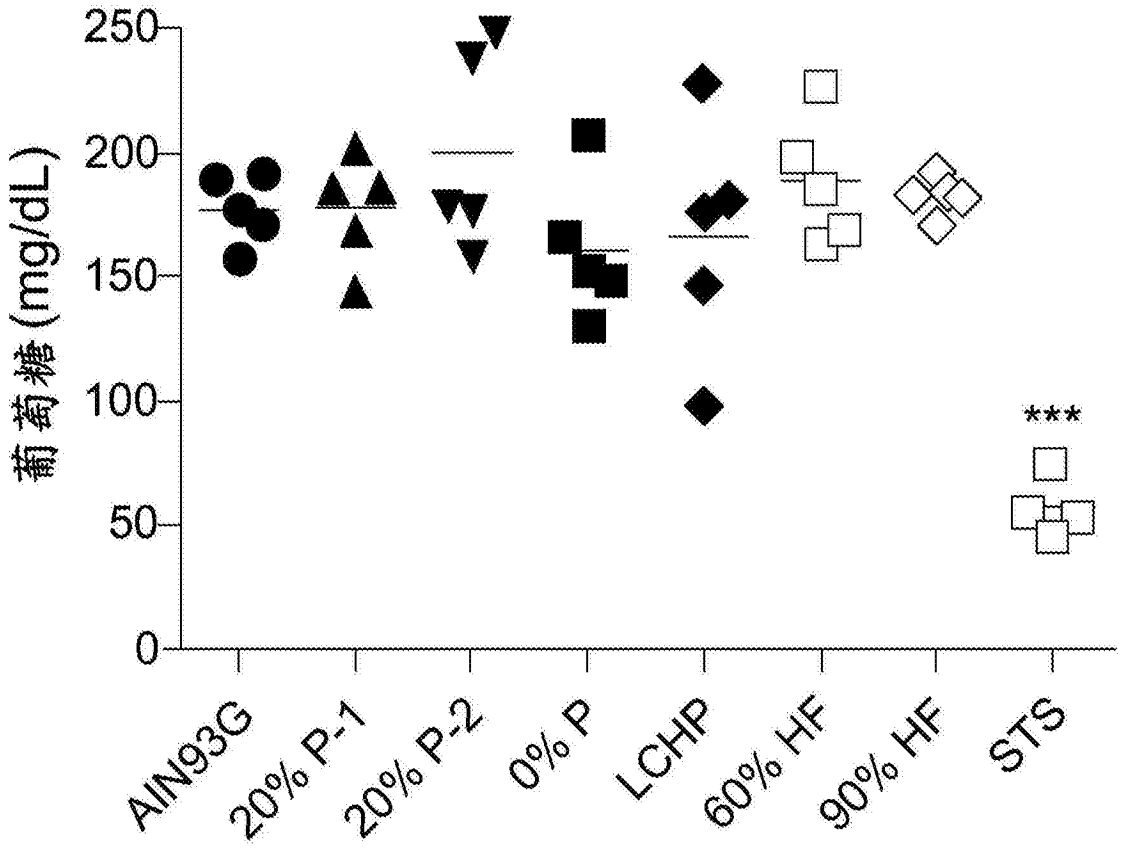

250
200
150
100
50
0
葡萄糖 (mg/dL)
***
AIN93G
20% P-1
20% P-2
0% P
LCHP
60% HF
90% HF
STS

图27

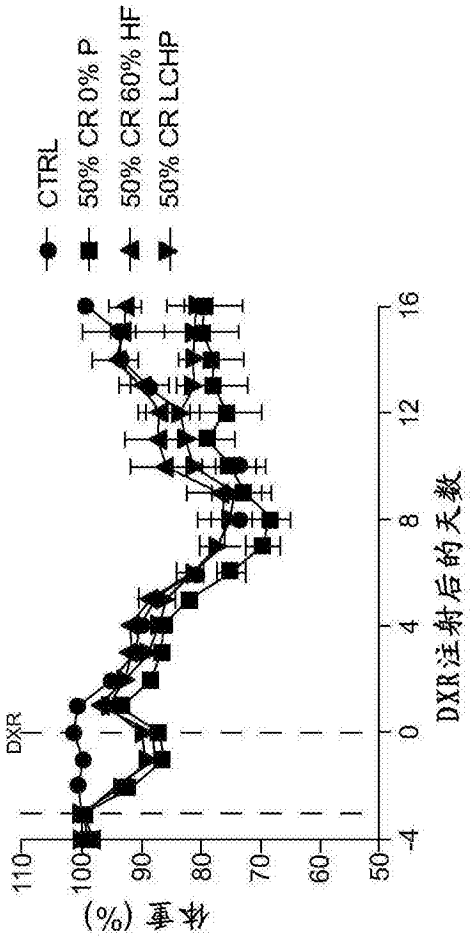

CTRL
50% CR 0% P
50% CR 60% HF
50% CR LCHP
DXR
体重 (%)
110
100
90
80
70
60
50
-4
0
4
8
12
16
DXR注射后的天数

图28A

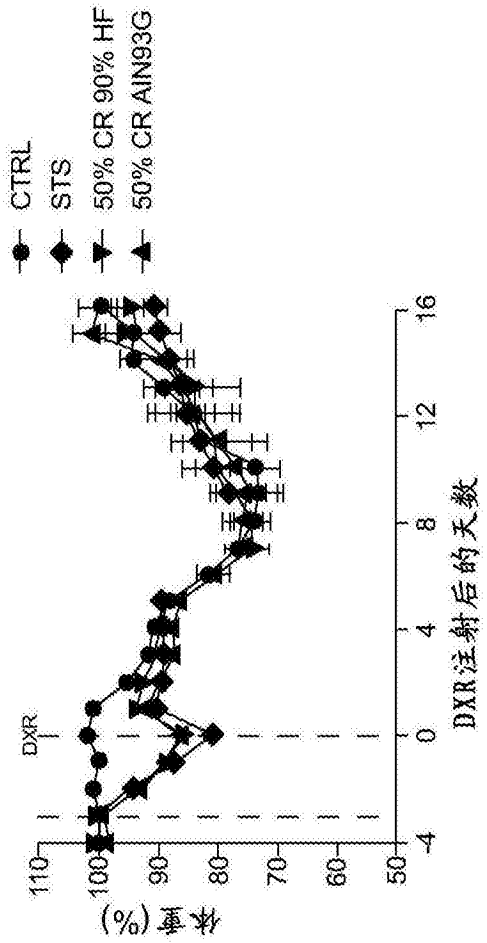

CTRL
STS
50% CR 90% HF
50% CR AIN93G
DXR
体重(%)
DXR注射后的天数
110
100
90
80
70
60
50
-4
0
4
8
12
16

图28B

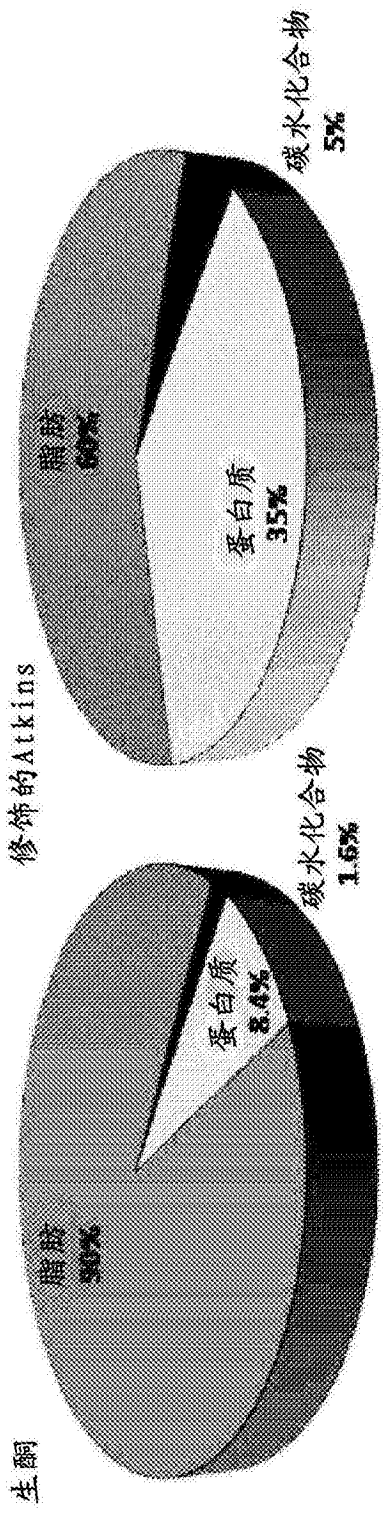


图29

来自下述膳食的卡路里%

膳食	蛋白质	碳水化合物	脂肪	kcal/g
AIN93G	18.8	63.9	17.2	3.8
*20% P-1	3.9	75.7	20.4	3.9
*20% P-2	3.9	75.7	20.4	3.9
0% P	0	78.8	21.2	3.9
LCHP	45.2	13	41.8	4.4
60% HF	9	30.9	60	5.3
90% HF	9	0.99	90.1	7.1

*大豆油作为脂肪来源
※椰子油作为脂肪来源

图30

g/kg膳食	AIN93G	20% P-1	20% P-2	0% P	LCHP	60% HF	90% HF
玉米淀粉	397.486	467.232	467.232	511.836	85.405	179.886	
糊精化玉米淀粉	132.000	181.994	181.994	170.000	28.380	170.000	
来源	100.000	122.700	122.700	129.700	21.500	86.200	
酪蛋白	200.000	40.000	40.000		666.000	133.200	180
脂肪	70.000	67.500	67.500	92.050	186.100	350.000	709.37
纤维素	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	80
矿物质(AIN-93G-MX)	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
维生素 (AIN-93-VX)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
L-胱氨酸	3.000	3.000	3.000		3.000	3.000	3
胆碱酒石酸盐	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
叔丁基氢醌	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.130
磷酸钙	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
食物卡路里		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
总计(g)	1000.00	1000.00	1000.00	1000.000	1000.00	1000.00	1000.000

图31

膳食	NEW	AIN93G	NEW	NEW	AIN93G	AIN93G	AIN93G
天	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
小鼠/笼	5	5	5	5	1	1	1

图32

对于总膳食(kg) 0.2

	40% CR	50% CR	60% CR	80% CR	90%CR	STS
AIN-93G (g)	118.20	95.60	74.80	33.40	12.60	0.00
必需FA (ml)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
纤维 (g)	4.19	5.22	6.26	8.33	9.37	10.00
AIN-93G-MX (g)	2.93	3.65	4.38	5.83	6.56	7.00
AIN-93-VX (g)	0.84	1.04	1.25	1.67	1.87	2.00
水凝胶 (g)	75.44	94.08	112.91	150.37	169.20	180.60

图33

基于下述的50%CR:

	AIN93G	0% P	LPHC	60% HF	90% HF
kcal/g	3.76	3.90	4.29	5.25	7.11
膳食 (g)	95.6	92.1	81.9	68.5	50.5
必需FA (ml)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
纤维 (g)	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22
AIN-93G-MX (g)	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
AIN-93-VX (g)	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04
水凝胶 (g)	94.1	97.6	107.8	121.2	139.1
Sum (g)	200	200	200	200	200

图34