

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880009440.6

[51] Int. Cl.

A61K 8/44 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A23L 1/035 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101686919A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.3.20

[21] 申请号 200880009440.6

[30] 优先权

[32] 2007.3.22 [33] FR [31] 0702090

[86] 国际申请 PCT/FR2008/000379 2008.3.20

[87] 国际公布 WO2008/135661 法 2008.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.22

[71] 申请人 笛卡尔巴黎大学

地址 法国巴黎

共同申请人 国家农艺研究院

公共救济事业局 - 巴黎医院

奥弗涅大学

克莱蒙费朗大学医疗中心

[72] 发明人 C·莫纳德 S·沃兰德 Y·伯瑞

L·希诺伯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

代理人 罗菊华

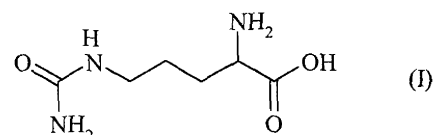
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

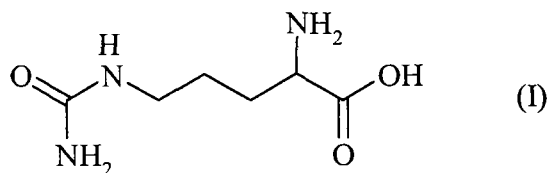
瓜氨酸用于治疗与蛋白质羰基化增加相关的
病理学状态的用途

[57] 摘要

本发明涉及式(I)的 L-瓜氨酸在制备美容组合物、食品或营养药物制品组合物、或者药物组合物中的用途,所述这些组合物用于治疗与蛋白质羰基化增加相关的病理学状态,尤其是用于治疗神经变性疾病,例如阿尔茨海默病或帕金森病。



1. 下述式 (I) 的 L-瓜氨酸:



或者其药理学上、美容学上或营养药物制品学上可接受的盐在制备组合物中的用途, 所述组合物用于抑制在某些病理学状态中观察到的相关蛋白质的羧基化的增加, 因此尤其用于治疗神经变性疾病, 例如阿尔茨海默病或帕金森病, 用于治疗视网膜病变、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肌萎缩性侧索硬化、脑缺血, 用于治疗白内障问题或全身性感染(败血症), 用于治疗与皮肤衰老相关的病理学状态, 更特别地与组织例如眼、肌肉和脑的衰老相关的病理学状态, 用于治疗与线粒体功能障碍相关的病理学状态, 即源自于线粒体病的肌病, 用于治疗与哺乳动物的营养缺乏和寿命增加相关的恶病质。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其特征在于, 所述组合物是包含 L-瓜氨酸或其药理学上可接受的盐的药物组合物, 用于美容治疗的包含 L-瓜氨酸或其美容学上可接受的盐的组合物, 包含 L-瓜氨酸的食品补充剂, 或者用于营养药物制品治疗的包含 L-瓜氨酸或其营养药物制品学上可接受的盐的组合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项的用途, 其特征在于, 如此使用 L-瓜氨酸, 从而使得对于大约 0.1 g/kg/天至大约 0.5 g/kg/天, 尤其是大约 0.25 g/kg/天的施用剂量而言, L-瓜氨酸的单位剂量为大约 2 g 至大约 20 g, 尤其是大约 10 g, 按照每日 1-3 剂, 优选以 1 剂。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途, 其特征在于, 所述组合物以干的形式、水溶液的形式、水醇性或油性形式、水包油或油包水或复合型乳剂的形式、水性或油性凝胶的形式存在。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途, 其特征在于, 所述药物组合物以通过口服、局部、经肠或肠胃外途径可施用的形式存在, 所述美容组合物以通过局部途径可施用的形式存在, 所述营养药物制品组合物和所述食品补充剂以通过口服途径可施用的形式存在。

6. 根据权利要求 5 的用途, 其特征在于, 在通过经肠或肠胃外途径可施用的形式的情况下, 它可以与经肠或肠胃外营养相混合, 或者在经肠营养的探头中以推注形式或在肠胃外营养中以 Y 形管形式进行施用。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的用途, 其特征在于, 所述组合物还包含一种或多种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物, 例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的用途, 其特征在于, L-瓜氨酸用于制备药物组合物, 所述药物组合物还包含一种或多种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物, 例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐, 这些物质单独地存在, 或者在用于肠胃外营养的营养混合物中, 或在用于经肠营养的混合物或用于口服营养的混合物中。

9. 组合物, 其包含:

- L-瓜氨酸或者其药学上或营养药物制品学上可接受的盐, 和
- 至少一种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物, 例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐, 这些物质单独地存在, 或者在用于肠胃外营养的营养混合物中, 或在用于经肠营养的混合物或用于口服营养的混合物中,

以作为用于在治疗与蛋白质羧基化增加相关的病理学状态的情况下同时、分开或在时间上错开使用的联合产品。

瓜氨酸用于治疗与蛋白质羧基化增加 相关的病理学状态的用途

本发明的目标在于瓜氨酸的新用途，即它在蛋白质羧基化增加和治疗由此引起的病理学状态方面的用途。

已明确确定，细胞外和细胞内介质的蛋白质在体内为关于活性氧种类和活性氮种类的首选的靶。估计蛋白质可以捕获高达 50-70% 的由细胞合成的自由基种类。观察到几种类型的损伤：氨基酸侧链的氧化（或硝化），或者多肽链的氧化（其中特别的情况是羧基化），随后为链间和链内键的断裂和/或形成。

蛋白质的羧基化是可以不依赖于氧化现象的现象。

蛋白质的这些修饰一起可以引起结构的修饰，其结果可以是它们的失活，后者可能对于细胞来说具有招致损害的后果。此外，在现有技术中，看起来不存在用于修复羧基化的蛋白质的系统。

“蛋白质的羧基化”这一表述是指与 CO 基团的产生相关的蛋白质的化学修饰。因此，这种羧基化（其可以是蛋白质氧化的特殊情况）引起蛋白质功能的丧失（参见 Nyström, *The EMBO Journal* (2005) 24, 1311-1317; 和 Dalle-Donne 等人, *J. Cell. Mol. Med.*, 第 10 卷, no. 2, 2006, 第 389-406 页）。尽管生物体具有一定数目的防御系统（谷胱甘肽、过氧化氢酶、SOD 等），但在某些情况下这些防御系统可以被越过且显得不足。

羧基化的化合物构成了伴随衰老和许多病理学状态的令人感兴趣的标志物。这是因为，这些生理病理学情况（神经变性疾病、炎症疾病等）的特征在于组织水平上的羧基化的蛋白质的增加。因此，必需开发旨在减少蛋白质的羧基化的策略。

瓜氨酸（或 2-氨基-5-(氨基甲酰基氨基)戊酸）是 α -氨基酸，并且首次从西瓜中分离出来。瓜氨酸是生物体从其他营养物开始产生的

非必需氨基酸。例如，瓜氨酸与鸟氨酸和精氨酸一起在尿素循环中起着特别重要的作用。最后，瓜氨酸在精氨酸和一氧化氮的体内稳态中起着主要作用。

目前，瓜氨酸在某些药物应用范围内使用。因此，欧洲专利申请 EP 1 495 755 涉及瓜氨酸在制备用于治疗与肠功能不全相关的病理学状态的药物中的用途。更具体地，这个申请中所提及的病理学状态如下：肠切除术后短肠综合征、乳糜泻、肠的慢性炎症性疾病、与衰老相关的肠功能不全和与辐射相关的肠功能不全。然而，这个申请未提及蛋白质的羧基化。

国际申请 WO 2005/115371 描述了包含与瓜氨酸相联合的抑制素的药物组合物，其用于制备在治疗原发性或继发性动脉粥样硬化中，以及治疗变性性疾病例如阿尔茨海默病中使用的药物。与包含单独的抑制素或瓜氨酸的组合物相比较而言，这些组合物的使用呈现出协同作用。

申请 FR 2691359 描述了瓜氨酸的苹果酸盐在患有慢性阻塞性支气管肺病 (BPCO) 的患者中和在患有雷-约 (REYE-JOHNSON) 肌病 (线粒体肌病) 的患者中的用途。瓜氨酸的苹果酸盐的这种有益效应可能是由于肌肉的脂肪利用变好，这导致肌肉的蛋白水解减少。

该美国专利申请描述了在神经变性疾病 (痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病)、视网膜病变 (年龄相关的黄斑变性) 和肌萎缩性侧索硬化的情况下，L-瓜氨酸作为食品补充剂的口服用途。这种瓜氨酸摄取增加了精氨酸的血浆浓度，并因此增加了后者在一氧化氮的产生中的可用性。在这些适应症中，瓜氨酸与肌醇六磷酸和碳酸钙相联合。

美国专利申请 US 2004/0235953 描述并要求保护用于预防和治疗性地治疗与一氧化氮形成减少相关的病理学状态 (尤其是败血症 (全身性感染)) 的方法，所述方法包括施用一氧化氮的前体，其可以是瓜氨酸。

美国专利申请 US 2001/0056068 涉及 L-瓜氨酸用于治疗与一氧化氮缺乏相关的疾病的用途，所述疾病例如为动脉粥样硬化、脑缺血和

阿尔茨海默病。

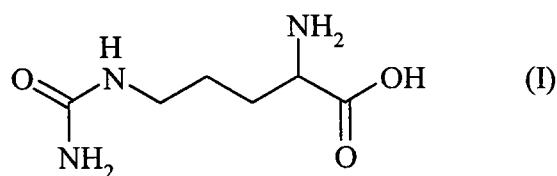
XP 00 24 56 361 公开了包含瓜氨酸的眼用制剂以及其以中医学在治疗白内障中的用途。这些制剂作用于睫状血管系统和角膜周血管网。

欧洲专利申请 EP 1752156 描述了包含含有瓜氨酸的野生西瓜提取物的氧清除试剂，以及其尤其是在阿尔茨海默型痴呆、白内障问题和皮肤损伤中的用途。

尽管这些文献描述了单独的或组合的瓜氨酸在制备在治疗神经变性疾病例如阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、白内障问题或全身性感染（败血症）和治疗线粒体肌病中有用的药物，以及适合于在神经变性疾病（痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病）、视网膜病变（年龄相关的黄斑变性）和肌萎缩性侧索硬化的情况下使用的营养药物制品（nutraceutique）组合物中的用途，但这些文献中无一描述了瓜氨酸对蛋白质的羧基化的直接影响。

如此，本发明的目的之一是提供用于预防和治疗蛋白质羧基化的增加和由此引起的病理学状态的手段。

本发明涉及下述式（I）的 L-瓜氨酸：



或其药学上可接受的盐在制备药物组合物中的用途，所述组合物用于抑制在某些病理学状态中观察到的相关蛋白质的羧基化的增加，因此尤其用于治疗神经变性疾病例如阿尔茨海默病或帕金森病，用于治疗视网膜病变、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肌萎缩性侧索硬化、脑缺血，用于治疗白内障问题或全身性感染（败血症），用于治疗与皮肤衰老相关的病理学状态例如皱纹、色素减退和色素沉着过度的斑点以及弹性的丧失，更特别地与组织例如眼、肌肉和脑的衰老相关的

病理学状态，用于治疗与线粒体功能障碍相关的病理学状态，即源自于线粒体病的肌病，用于治疗与哺乳动物（特别是伴侣动物）的营养缺乏和寿命增加相关的恶病质。

本发明的目标还在于包含 L-瓜氨酸或其美容学上可接受的盐的组合物的用途，所述用途为用于与相关蛋白质的羧基化相关的紊乱的美容治疗，尤其是在与皮肤衰老相关的病理学状态（例如皱纹、色素减退和色素沉着过度的斑点以及弹性的丧失）的情况下。

本发明的目标还在于包含 L-瓜氨酸或其营养药物制品学上可接受的盐的组合物的用途，所述用途为用于通过抑制相关蛋白质的羧基化的增加来对与蛋白质羧基化增加相关的紊乱进行营养药物制品治疗（traitement nutraceutique），因此尤其用于治疗神经变性疾病例如阿尔茨海默病或帕金森病，用于治疗视网膜病变、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肌萎缩性侧索硬化、脑缺血，用于治疗白内障问题或全身性感染（败血症），用于治疗与皮肤衰老相关的病理学状态例如皱纹、色素减退和色素沉着过度的斑点以及弹性的丧失，更特别地与组织例如眼、肌肉和脑的衰老相关的病理学状态，用于治疗与线粒体功能障碍相关的病理学状态，即源自于线粒体病的肌病，用于治疗与哺乳动物的营养缺乏和寿命增加相关的恶病质。

营养药物制品意指宣称健康的任何产品（健康食品、功能食品（alicament）、边缘产品（produits frontières）等）。

本发明的目标还在于包含 L-瓜氨酸的组合物的用途，所述组合物用于作为适合于在下述的情况下使用的食品补充剂：神经变性疾病例如阿尔茨海默病或帕金森病，视网膜病变，类风湿性关节炎，动脉粥样硬化，肌萎缩性侧索硬化，脑缺血，白内障问题或全身性感染（败血症），皮肤衰老例如皱纹、色素减退和色素沉着过度的斑点以及弹性的丧失，更特别地组织例如眼、肌肉和脑的衰老，与线粒体功能障碍相关的病理学状态，即源自于线粒体病的肌病，与哺乳动物（特别是伴侣动物）的营养缺乏和寿命增加相关的恶病质。

在本发明的范围内，L-瓜氨酸意指商购可得的产品，尤其是由

Sigma、Biocodex 或 Kyowa Hakko 供应的，或者源自植物（尤其是西瓜（*Citrullus lanatus*））的尤其以果汁、果肉或提取物形式存在的天然产品。

“药学上可接受的盐”、“美容学上可接受的盐”和“营养药物制品学上可接受的盐”意指诸如下列的瓜氨酸的盐：瓜氨酸的苹果酸盐、瓜氨酸的 α -酮戊二酸盐、瓜氨酸的柠檬酸盐或瓜氨酸的 α -酮异己酸盐。

在本发明的一个有利的实施方案中，如此地使用如上定义的 L-瓜氨酸来制备药物组合物、用于美容治疗的组合物、用于作为食品补充剂的组合物、和用于营养药物制品治疗的组合物或健康食品，从而使得对于大约 0.1 g/kg/天至大约 0.5 g/kg/天，尤其是大约 0.25 g/kg/天的施用剂量而言，L-瓜氨酸的单位剂量为大约 2 g 至大约 20 g，尤其是大约 10 g。

在本发明的一个有利的实施方案中，以每日 1-3 剂，优选地以 1 剂摄取 L-瓜氨酸。

根据本发明的另一个有利的实施方案，所述药物组合物和所述用于营养药物制品治疗的组合物（或健康食品）以干的形式、水溶液的形式、水醇性或油性形式、水包油或油包水或复合型乳剂的形式、水性或油性凝胶的形式存在。关于用于美容治疗的组合物，可以使用任何合适的载体，即任何美容学上，尤其是皮肤病学上可接受的赋形剂、载体或支持物。此类支持物对于本领域技术人员来说是众所周知的，并且也由具有一般应用范围的美容或皮肤病学组合物所产生。例如，可以采用混合物、配制剂、单层包囊物（微团（micelles））、双层包囊物（脂质体）、多层包囊物（球粒（sphérulites））和美容学中已知的任何其他支持物。

本发明涉及如上定义的 L-瓜氨酸在制备药物组合物中的用途，所述药物组合物以通过口服、经肠或肠胃外途径可施用的形式存在。在经肠营养或肠胃外营养的情况下，它可以与所述营养相混合，或者优选地，在经肠营养的探头中以推注形式或在肠胃外营养中以 Y 形管形

式进行施用。

本发明还涉及如上定义的 L-瓜氨酸在制备用于美容治疗的组合物中的用途，所述组合物以通过局部途径可施用的形式存在。本发明还涉及如上定义的 L-瓜氨酸在制备用于营养药物制品治疗的组合物中的用途，所述组合物以通过口服途径可施用的形式存在。

通过经肠途径的施用尤其相应于通过鼻胃管或鼻肠管、通过胃切术或空肠造口术来进行的施用；通过肠胃外途径的施用尤其相应于通过中央、外周或皮下静脉内灌注来进行的施用。

根据一个优选的实施方案，在本发明的范围内使用 L-瓜氨酸来制备药物组合物、用于美容治疗的组合物、用于食品补充剂的组合物或用于营养药物制品治疗的健康食品，所述组合物还包含一种或多种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物，例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐。

在用于营养药物制品治疗的组合物的情况下，可以单独地或者在用于口服营养的营养混合物中使用所述化合物。

根据一个优选的实施方案，在本发明的范围内使用 L-瓜氨酸来制备药物组合物、用于美容治疗的组合物、食品补充剂或用于营养药物制品治疗的组合物（健康食品），所述组合物还包含一种或多种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物，例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐，这些物质单独地存在或者在用于口服营养的营养混合物中。

根据另一个实施方案，本发明涉及这样的产品，其包含：

- L-瓜氨酸或者其药学上或营养药物制品学上可接受的盐，和
- 至少一种用于治疗与营养缺乏相关的恶病质的其他化合物，例如亮氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸以及它们的各种可使用的盐例如 α -酮戊二酸盐或 α -酮异己酸盐，这些物质单独地存在，或者在用于肠胃外营养的营养混合物中，或在用于经肠营养的混合物或用于口

服营养的混合物中，

以作为用于在治疗与蛋白质羧基化增加相关的病理学状态的情况下同时、分开或在时间上错开使用的联合产品 (produit de combinaison)，所述病理学状态如上定义。

下文的实施例 1 和 2 以及图 1 举例说明了本发明。

图 1 显示了在大鼠中的肌蛋白质的羧基化。纵坐标轴相应于以 $\mu\text{mol/g}$ 表示的羧基化的蛋白质的量。柱“1”相应于健康的大鼠；柱“2”相应于营养缺乏的大鼠；柱“3”相应于用标准饮食制度 (régime) 再饲喂的大鼠；和柱“4”相应于用富含瓜氨酸的饮食制度再饲喂的大鼠。

实施例 1: 瓜氨酸在营养缺乏-再饲喂的大鼠中的影响

材料和方法

I - 材料

所使用的所有化学试剂来自 Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France)。L-瓜氨酸由 Laboratoires Biocodex (Compiègne, France) 无偿提供。

II - 动物的维持

将年龄为 19 个月的 Sprague-Dawley 雄性大鼠 (Charles River Laboratories, L'arbresles, France) 在恒温环境 ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 下置于单个的笼中，并经历 12 小时的光照/黑暗 (8 点至 20 点为黑暗) 循环。该计划的负责人被农业和林业部 (Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) 批准 (编号 75,522) 可以施行这种类型的实验。此外，实验室动物的使用和维持是遵守法规的 (D2001-486)，并且与欧洲法律 (Journal Officiel de la Communauté Européenne L358 12/18/1986) 一致。

将大鼠驯化 2 周，在此期间测量自发的饮食消费。用含有 17% 的

蛋白质，3%的脂质，59%的糖类以及21%的水、纤维、维生素和矿物质的标准饮食制度（A04，UAR，Villemoisson-sur-Orge，France）来饲喂大鼠。在该时间段期间的平均饮食摄入量为34.4 g/天。

III - 实验方案

在驯化期后，将大鼠随机分为4组：由随意（*ad libitum*，AL）饲喂12周的大鼠（ $n=10$ ）组成的对照组，和在同一时间段期间经历饮食限制的另外3个组：用仅50%的自发摄入物（即17.2 g），用标准饮食制度（UAR A04）进行饲喂。在限制期结束时，将一个组的动物（ $n=10$ ）处死（R组），并且将其余2个组的大鼠用90%的自发摄入物（即30.9 g），即用富含非必需氨基酸的饮食制度（AANE组：以等摩尔方式提供的丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、丝氨酸、组氨酸和脯氨酸）或富含瓜氨酸的饮食制度（5 g/kg/天）（瓜氨酸组）再饲喂1周。这2个组的摄取是等氮的和等热量的。限制于90%的自发摄取使得能够确保大鼠消费掉提供给它们的所有食物。

III.1 蛋白质的羧基化水平的评估

影响构成蛋白质的氨基酸的结构蛋白质氧化过程是复杂的，并且全部引起羧基的形成。这就是为什么，选择通过从300 mg胫骨前肌样品中定量羧基化的衍生物来总体地评估肌蛋白质的氧化。因此，所使用的方法是非特异于氨基酸类型的技术，其基于采用分光光度测定法对通过称为二硝基苯肼（DNPH）的化合物结合在羧基上而形成的复合物进行含量测定。分离肌蛋白质。将蛋白质粒状沉淀接纳在600 μ l SET缓冲液中。将溶解的蛋白质分成2个相等的级分，以便具有2个包含相同量的蛋白质（1-1.5 mg/ml）的杯子（cupule）。一杯充当空白，而另一杯用于定量羧基。将500 μ l 12.5 mM DNPH加入到测量杯中，和将500 μ l 2M HCl加入到空白杯中。在环境温度下温育15分钟后，用500 μ l 30% TCA使样品进行沉淀，并且在15000 rpm下离心10分钟。将粒状沉淀接纳在1 ml 10% TCA中，并且在15000 rpm下再次离心10分钟。然后，用乙醇 乙酸乙酯相继洗涤4次。将最后的粒状沉淀在50℃的水浴中加热30分钟。在15000 rpm下再次离心5

分钟后, 在 280 nm 处 (蛋白质的含量测定) 和在 380 nm 处 (DNPH 的含量测定) 对 800 μ l 上清液施行分光光度测定法的阅读。以 “nmol/mg 蛋白质” 来表示羰基含量。

III.2 结果

所获得的结果显示在图 1 中。

清楚地显示, 与健康大鼠相比较, 营养缺乏导致蛋白质的羰基化增加 (柱 2 对柱 1)。再饲喂仍增加这个现象, 并且营养缺乏-再饲喂的事件伴随着肌蛋白质的羰基化的剧烈增加 (柱 3 对柱 2)。相反地, 当饮食富含瓜氨酸时, 这个现象被完全消除 (柱 4 对柱 3), 其中蛋白质的羰基化类似于在健康大鼠中所观察到的。

实施例 2: 瓜氨酸在老年大鼠中的影响

材料和方法

I - 材料

所使用的所有化学试剂来自 Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France)。L-瓜氨酸由 Laboratoires Biocodex (Compiègne, France) 无偿提供。

II - 动物的维持

将年龄为 25 个月的 Sprague-Dawley 雄性大鼠 (Charles River Laboratories, L'arbresles, France) 在恒温环境 ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 下置于单个的笼中, 并经历 12 小时的光照/黑暗 (8 点至 20 点为黑暗) 循环。该计划的负责人被农业和林业部 (Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) 批准 (编号 75,522) 可以施行这种类型的实验。此外, 实验室动物的使用和维持是遵守法规的 (D2001-486), 并且与欧洲法律 (Journal Officiel de la Communauté Européenne L358 12/18/1986) 一致。

将大鼠驯化 2 周, 在此期间测量自发的饮食消费。用含有 17% 的蛋白质, 3% 的脂质, 59% 的糖类以及 21% 的水、纤维、维生素和矿物质

的标准饮食制度 (A04, UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) 来饲养大鼠。在该时间段期间的平均饮食摄入量为 34.4 g/天。

III - 实验方案

在驯化期后, 将大鼠随机分为 2 组:

CIT 组 (n=5): 在 1 个月期间, 动物接受富含 CIT (1 g/kg/天) 的标准饮食。

AANE 组 (n=4): 在 1 个月期间, 动物接受通过添加非必需氨基酸 (以等摩尔方式提供的丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、丝氨酸、组氨酸和脯氨酸) 而变得与 CIT 组等氮的标准饮食。

在研究结束时, 对动物实施安乐死, 并且将脑取出, 称重, 在液氮中冷冻并贮存于 -80°C, 直至进行分析。

蛋白质的羰基化水平的评估

影响构成蛋白质的氨基酸的结构的蛋白质氧化过程是复杂的, 并且全部引起羰基的形成。这就是为什么, 选择通过从 1 g 脑样品中定量羰基化的衍生物来总体地评估肌蛋白质的氧化。因此, 所使用的方法是非特异于氨基酸类型的技术, 其基于采用分光光度测定法对通过二硝基苯肼 (DNPH) 结合在羰基上而形成的复合物进行含量测定。分离脑蛋白质。将蛋白质粒状沉淀接纳在 600 μ l SET 缓冲液中。将溶解的蛋白质分成 2 个相等的级分, 以便具有 2 个包含相同量的蛋白质 (1-1.5 mg/ml) 的杯子 (cupule)。一杯充当空白, 而另一杯用于定量羰基。将 500 μ l 12.5 mM DNPH 加入到测量杯中, 和将 500 μ l 2M HCl 加入到空白杯中。在环境温度下温育 15 分钟后, 用 500 μ l 30% TCA 使样品进行沉淀, 并且在 15000 rpm 下离心 10 分钟。将粒状沉淀接纳在 1 ml 10% TCA 中, 并且在 15000 rpm 下再次离心 10 分钟。然后, 用乙醇 乙酸乙酯相继洗涤 4 次。将最后的粒状沉淀在 50°C 的水浴中加热 30 分钟。在 15000 rpm 下再次离心 5 分钟后, 在 280 nm 处 (蛋白质的含量测定) 和在 380 nm 处 (DNPH 的含量测定) 对 800 μ l 上清液施行分光光度测定法的阅读。以 “ μ mol/g 器官” 来表示羰基含量。

IV - 结果

羧基化的蛋白质	
(μ mol/g)	
AANE	180 ± 28
CIT	164 ± 12
平均值 ± SEM	

所获得的结果显示在上表中。显然地，在老年健康大鼠中富含 CIT 的营养供给引起脑蛋白质的羧基化减少了大约 10%。

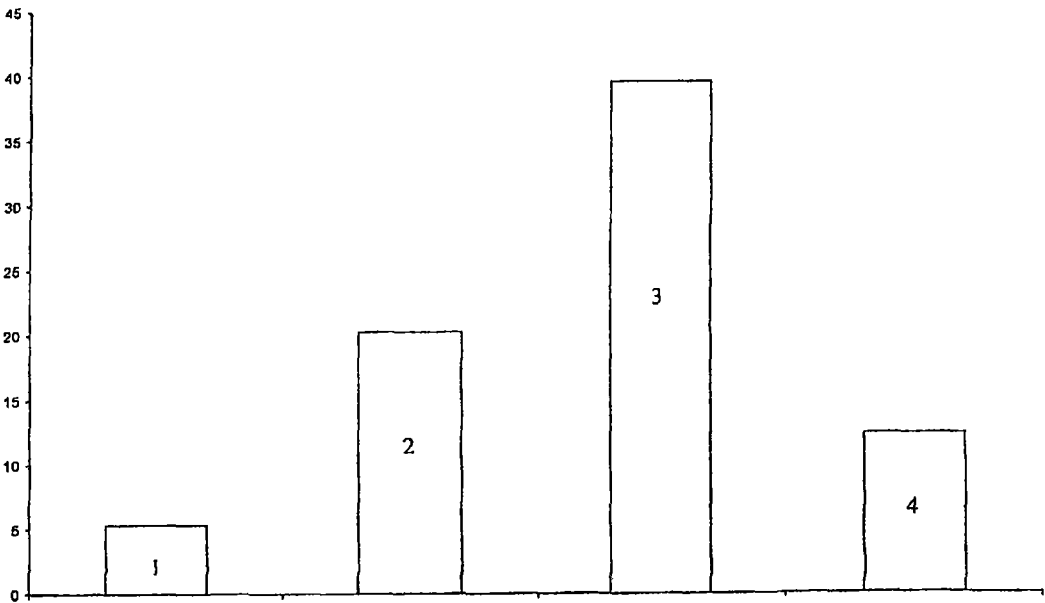


图1