(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116098942 A
(43)申请公布日 2023.05.12

(21)申请号 202310130296.8
(22)申请日 2019.05.27
(30)优先权数据
15/989,704 2018.05.25 US
(62)分案原申请数据
201910447131.7 2019.05.27
(71)申请人 仲华国际美国公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 郭家骅 吴金富 王长友
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟
(51)Int.Cl.
A61K 36/738(2006.01)
A23L 33/105(2016.01)
A61P 39/06(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

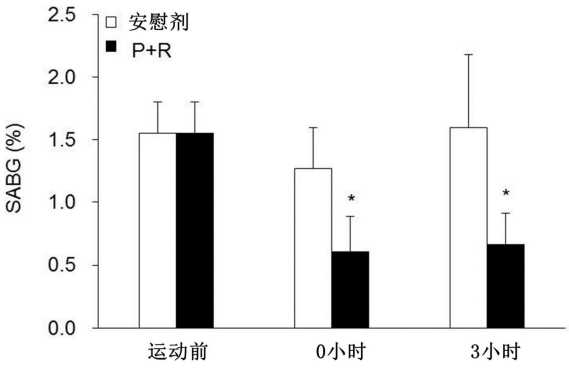
权利要求书1页 说明书8页 附图7页

(54)发明名称

抗老化的方法及组合物

(57)摘要

本发明涉及抗老化的方法及组合物。本发明的公开内容涉及一种草药组合物,其包含(1)人参提取物(Panax ginseng)或三七提取物(Panax notoginseng)和(2)刺梨(Rosa roxburghii)提取物,其量可激活吞噬巨噬细胞,其与完成急性有氧运动后的一人类对象的衰老细胞清除有关。还提供了该草药组合物用于制备抗老化药剂或饮食品组合物的用途。



CN 116098942 A

1.一种草药组合物用于制备急性有氧运动前使用可增强体能的组合物的用途,其中所述草药组合物包含(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物,并且标准化为含有30%至40%的总皂苷、0.6%至2.0%的维生素C和2.0%至4.0%的多酚,和人参皂苷Rg1(Rg1)作为一种指标成分,一份剂量范围为5毫克至50毫克。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述草药组合物包含(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物,比例为4:1～1:4。

3.根据权利要求2所述的用途,其中所述比例为1:1。

4.根据权利要求1所述的用途,其中所述草药组合物基本上由(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物以4:1～1:4的比例组成。

5.根据权利要求4所述的用途,其中所述比例为1:1。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述草药组合物由(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物以4:1～1:4的比例组成。

7.根据权利要求6所述的用途,其中所述比例为1:1。

8.根据权利要求1所述的用途,其中所述人参提取物是人参根的水提取物。

9.根据权利要求1所述的用途,其中所述三七提取物是三七根的水提取物。

10.根据权利要求1所述的用途,其中所述刺梨提取物是刺梨果实的水提取物。

抗老化的方法及组合物

[0001] 本发明是中国专利申请号为201910447131.7,发明名称为“抗老化的方法及组合物”,申请日为2019年5月27日的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及通过在一急性有氧运动前补充一种(1)人参提取物(Panax ginseng)或三七提取物(Panax notoginseng)和(2)刺梨(Rosa roxburghii)提取物的组合物的抗老化方法。

背景技术

[0003] 人体中的细胞不断老化,死亡和再生以进化具有广泛细胞年龄的多细胞系统(Spalding等人,Retrospective birth dating of cells in humans.Cell.2005;122(1):133-43)。在骨骼肌中,细胞寿命在不同细胞类型之间变化很大。例如,肌纤维是长寿的,但毛细血管内皮细胞半衰期约2周(Spalding等人,Retrospective birth dating of cells in humans.Cell.2005;122(1):133-43;和Erben等人,Histological assessment of cellular half-life in tissues in vivo.Histochem Cell Biol.2008;130(5):1041-6)。老化过程中组织中衰老细胞的累积涉及动物和人类的功能衰退(Baker等人,Clearance of $p16^{Ink4a}$-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.Nature.2011;479(7372):232-6),其主要与具有抑制细胞更新能力有关(Kuilman等人,The essence of senescence.Genes Dev.2010;24(22):2463-79)。衰老细胞的数量可以通过pH 6.0的衰老相关β-半乳糖苷酶反映出来(Kurz等人,Senescence-associated(beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.J Cell Sci.2000;113(20):3613-22)。然而,很少报导正常人类组织中的SA-β-gal表型。

[0004] 巨噬细胞的吞噬作用是选择性消除衰老细胞的先天机制,其可以快速发生(Kay,Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ.Proc Natl Acad Sci U S A.1975;72(9):3521-5)。将巨噬细胞吸引到骨骼肌中的一种方法是进行包含离心性肌肉收缩的阻力运动(Paulsen等人,Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise.Med Sci Sports Exerc.2010;42(1):75-85;和Malm等人,Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies.J Physiol.2000;529(1):243-62)。CD 68^{+}吞噬巨噬细胞浸润到受诱发的组织中对于通过吞噬作用识别和消除受损细胞是必要不可少的(Ritschka等人,The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration.Genes Dev.2017;31(2):172-83;和Tidball,Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system.Nat Rev Immunol.2017;17(3):165-78)。该过程有助于建立理想的组织再生微环境(Tidball和Wehling Henricks,Macrophages promote muscle

membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo.J Physiol.2007;578(Pt 1):327-36)。

[0005] 仍然需要开发一种旨在消除骨骼肌中衰老细胞的抗老化方法。

发明内容

[0006] 因此,本发明提供了一种抗老化方法,其目的是在食用能刺激巨噬细胞的吞噬功能以进行原位衰老细胞清除的草药组合物后,消除运动后骨骼肌中的衰老细胞。

[0007] 一方面,本发明提供了一种草药组合物,其包含(1)人参提取物(Panax ginseng)或三七提取物(Panax notoginseng)或其组合,和(2)刺梨(Rosa roxburghii)提取物,其量用以活化吞噬巨噬细胞,其与完成运动的一人类对象的衰老细胞清除相关,其中所述草药组合物被标准化为含有30%至40%(总重量%)的总皂苷、0.6%至2.0%的维生素C和2.0%至4.0%的多酚,和人参皂苷Rg1(Rg1)作为一种指标成分,一份剂量范围为5毫克至50毫克。

[0008] 另一方面,本发明提供本发明草药组合物用于制备抗老化药剂或饮食品组合物之用途,其中所述草药组合物包含(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物,并且标准化为含有30%-40%的总皂苷、0.6%至2.0的维生素C%和2.0%-4.0%的多酚,和Rg1作为一种指标成分,一份剂量范围为5毫克至50毫克,该草药组合物有效激活吞噬巨噬细胞,对一人类完成急性有氧运动后的衰老细胞清除相关。

[0009] 在本发明的一个实施例中,所述人参提取物是人参根的水和/或乙醇提取物。

[0010] 在本发明的一个实施例中,所述三七提取物是三七根的水和/或乙醇提取物。

[0011] 在本发明的一个实施例中,所述刺梨提取物是刺梨果实的水和/或乙醇提取物。

[0012] 在本发明的一个实施例中,所述草药组合物(在本文中也称为P+R补充剂)包含(1)人参提取物或三七提取物,和(2)刺梨提取物,比例为4:1～1:4,例如1:1。

[0013] 在本发明的另一个实施例中,所述草药组合物基本上由(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物以4:1～1:4的比例组成,例如1:1。

[0014] 在本发明的更另一个实施例中,所述草药组合物由(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物以4:1～1:4的比例组成,例如1:1。

附图说明

[0015] 当结合附图阅读时,将更好地理解前述发明内容以及本发明的以下详细描述。出于说明本发明的目的,在附图实施例中示出了目前优选的具体实施例。然而,应该理解,本发明不限于此具体实施例。

[0016] 在附图中:

[0017] 图1提供了以P+R补充剂治疗的参与者在急性有氧运动之前和之后的人体肌肉中衰老相关的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal,SABG)的结果,显示参与者在运动前用P+R补充剂(标准化以含有5毫克Rg1)治疗,股外侧肌中的SA-β-gal在70%$\dot{V}O2max$下自行车运动1小时后降低;其中数值表示为100个肌纤维中的阳性信号数(%)(*:与Pre的显著差异,P<0.05;缩写:安慰剂,PLA)。

[0018] 图2(A)提供了运动前人体肌肉中凋亡DNA核的结果(%Pre)。图2(B)显示在以P+R补充剂治疗运动后1小时受试者的股外侧肌中的凋亡细胞核的结果(%Post)在3小时恢复

期间逆转(其中值标准化为相对于运动后0小时);其中数值表示为100个肌纤维中的阳性信号数(%)(*:与Pre的显著差异,P<0.01;†:与PLA的显著差异,P<0.01;缩写:安慰剂,PLA)。

[0019] 图3(A)显示在用PLA和P+R补充剂治疗的两组别运动后白细胞浸润增加,标准化为相对于Pre。图3(B)显示与用PLA治疗的组别相比,用P+R补充剂治疗的组别3小时恢复期间白细胞浸润逆转更快。数值表示为100个肌纤维中的聚集体数(%),并且标准化为相对于运动后0小时(*:与Pre相比有显著差异,P<0.01;†:与运动后0小时相比有显著差异,P<0.01;缩写:安慰剂,PLA)。

[0020] 图4提供了运动后人体肌肉中CD 68^+巨噬细胞浸润的结果,显示在用P+R补充剂和PLA处理的组别,在70%$\dot{V}O_{2max}$下自行车运动1小时后CD 68^+巨噬细胞皆增加;其中数值表示为100个肌肉纤维中$CD68^+$信号的数量(%)(*:与Pre相比有显著差异,P<0.05;缩写:安慰剂,PLA)。

[0021] 图5(A)提供了运动后人体肌肉中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的mRNA水平,显示用P+R补充剂治疗的组别股外侧肌的早期增加。

[0022] 图5(B)提供了用PLA和P+R补充剂处理的组别运动后3小时恢复期间人类肌肉中白细胞介素6(IL-6)的mRNA水平,显示与用PLA处理的组别相比,用P+R补充剂处理的组别有更大程度的增加;其中将值标准化为相对于18S核醣体RNA值。

[0023] 图5(C)提供了运动后3小时期间胶原酶活性的水平,显示仅在用PLA处理的组别运动后增加;其中,与用PLA处理的组别相比,用P+R补充剂处理的组别的胶原酶活性较低;其中胶原酶活性值标准化为相对于总胶原含量(*:与Pre相比有显著差异,P<0.05;†:与PLA相比有显著差异,P<0.05;缩写:安慰剂,PLA)。

[0024] 图6显示P+R补充剂改善了80%$\dot{V}O_{2max}$下的自行车运动表现;其中单个条长表示每个参与者用PLA和P+R补充剂治疗的组别之间的骑乘时间差(通过在80%$\dot{V}O_{2max}$下的自行车测功仪运动评估)(缩写:秒,S;安慰剂,PLA)。

具体实施方式

[0025] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0026] 如本文所用,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一样品”包括多个这样的样品及其本领域技术人员已知的等同物。

[0027] 在本发明中出乎意料地发现,通过补充一种由(1)人参提取物(Panax ginseng)或三七提取物(Panax notoginseng)或其组合和(2)刺梨(Rosa roxburghii)提取物的草药组合物可以减少运动后的人类骨骼肌的衰老细胞。因此,本发明提供一种草药组合物,其包含,或基本上由以下组成或由以下组成:(1)人参提取物或三七提取物或其组合,和(2)刺梨提取物,其量可激活吞噬巨噬细胞,其与完成运动后的一人类对象的衰老细胞清除相关,其中所述草药组合物被标准化为含有30%-40%的总皂苷、0.6%至2.0%的维生素C和2.0%-4.0%的多酚,和Rg1作为一种指标成分,一份剂量范围为5毫克至50毫克。

[0028] 另一方面，本发明提供本发明草药组合物用于制备抗老化药剂或饮食品组合物之用途，其中所述草药组合物包含(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物，并且标准化为含有30％-40％的总皂苷、0.6％至2.0的维生素C％和2.0％-4.0％的多酚，和Rg1作为一种指标成分，一份剂量范围为5毫克至50毫克，该草药组合物有效激活吞噬巨噬细胞，对一人类完成急性有氧运动后的衰老细胞清除相关。

[0029] 根据本发明，所述草药可以用水，乙醇或其组合提取，其可以通过任何常用的方法或标准方法获得。在本发明中，可以使用人参或三七提供人参皂苷Rg1(Rg1)以作为一种指标成分，其可以通过用水或/和乙醇提取人参或三七的根来获得。在一个特定实例中，人参或三七的提取包括以下步骤：

[0030] -洗涤原料；

[0031] -将材料通过20目筛网粉碎并重复用水萃取材料以获得水提取物；

[0032] -离心并浓缩水提取物，并将之通过吸收性树脂柱；和-收集洗脱液，进一步洗涤并浓缩以获得在储存之前的提取物。

[0033] 在本发明中，刺梨提取物可以通过任何常用的方法或标准方法用水和/或乙醇提取而获得。在一个特定实例中，通过以下方法的步骤获得刺梨提取物：

[0034] -洗涤刺梨的新鲜果实，并在无氧条件下用低温水重复提取果实以获得粗提物；

[0035] -过滤粗提物并弃去固体物质以获得滤液；

[0036] -在低温和无氧条件下蒸发滤液；和

[0037] -将糊状物纯化，干燥并研磨至特定的网眼尺寸以获得最终提取物。

[0038] 在本发明中，可以使用本领域技术人员已知的任何标准技术或常用方法配制所述草药组合物。所述草药组合物包含人参或三七提取物和刺梨提取物，比例为4:1～1:4。在一个特定实例中，所述草药组合物由(或基本上由)两种提取物以1:1的比例组成。

[0039] 在本发明中，所述草药组合物，在下文中也称为“P+R补充剂”，包含，或基本上由以下组成或由以下组成：(1)人参提取物或三七提取物和(2)刺梨提取物，比例为4:1～1:4，例如1:1，其被标准化含有30％-40％的总皂苷、0.6％-2.0％的维生素C和2.0％-4.0％的总多酚，和Rg1作为一种指标组分，一份剂量范围为5毫克至50毫克(例如5毫克)。P+R补充剂的一个实例是由美国Nuliv Science提供的商标名为ActiGin的产品。

[0040] 本文中所使用的术语“人参皂苷Rg1”或“Rg1”是指化学名称为：(3β,6α,12β)-3,12-二羟基达马-24-烯-6,20-二基双-β-D-吡喃葡萄糖苷(3β,6α,12β)-3,12-Dihydroxydammar-24-ene-6,20-diyl bis-β-D-glucopyranoside)的化合物，是人参植物根和茎的主要成分。

[0041] 本文中所使用的术语“有效量”是指药物或药剂的量，与未接受该量的相应对象相比，其导致治疗或预防疾病、病症或副作用，或疾病或病症的进展速度降低的效果。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量。

[0042] 本文中所使用的术语“生理学上可接受的载体”是指生理学上可接受的载体，稀释剂或赋形剂，其意义上与制剂的其他成分兼容并且对给药所述组合物的受试者无害。根据制剂的要求，本领域中通常已知或使用的任何载体，稀释剂或赋形剂均可用于本发明。

[0043] 现在将参考以下实施例更具体地描述本发明，提供这些实施例是为了证明而非限制。

[0044] 实施例

[0045] 实施例1制备根据本发明的草药组合物

[0046] 根据本发明的草药组合物可以通过组合人参或三七提取物和刺梨提取物来获得，其中所述草药用水和/或乙醇提取。

[0047] 为了获得人参根的水提取物，将原料洗涤并通过20目筛网粉碎；然后将水提取物离心、浓缩。获得的溶液通过吸收性树脂管柱，收集洗脱液，进一步洗涤，并在储存前浓缩。

[0048] 洗涤刺梨的果实并在低温无氧条件下用水重复提取。然后，过滤固体物质并弃去得到滤液；然后将滤液在低温无氧条件下蒸发，得到糊状物。将得到的糊状物纯化、干燥并研磨至特定的筛目大小，得到最终的提取物。

[0049] 将人参提取物和刺梨提取物以4:1-1:4的比例混合，然后标准化为含有30％-40％的总皂苷、0.6％-2.0％的维生素C，和2.0％-4.0％的总多酚，和Rg1作为一种指标成分，一份剂量范围为5毫克至50毫克(例如5毫克)，用于之后的人体试验时被称为“P+R补充剂”。

[0050] 实施例2人体试验

[0051] 2.1参与者

[0052] 依据赫尔辛基宣言，人体试验由台北市立大学伦理审查委员会(IRB-2015-004)批准。所有参与者在解释实验程序和参与的潜在风险和益处后，都给出了书面知情同意书。

[0053] 在用P+R补充剂处理的高强度自行车运动后测定SA-β-gal、凋亡、DNA片段化、和人体骨骼肌巨噬细胞浸润的研究中(也称为“P+R补充”)，12名自愿参与者为健康男性(年龄21±0.2岁，身高171±2.2公分，体重65±3.7公斤；$\dot{V}O_{2max}$ 为48±1.1毫升·公斤$^{-1}$·分钟$^{-1}$)。

[0054] 在确认P+R补充剂的增能效益的研究中，有12名男性参与者(年龄23±0.5岁，身高173±0.9公分，体重66±2.0公斤；$\dot{V}O_{2max}$ 为45±2.5毫升·公斤$^{-1}$·分钟$^{-1}$)。

[0055] 参与者熟悉每个实验中使用的实验程序，然后试验前在自行车测功仪(Monark 839E，Stockholm，Sweden)上测量渐增负荷试验中的$\dot{V}O_{2max}$。参与者在测试前无负荷热身1分钟，然后从100W开始进行渐增负荷测试，每3分钟增加25W直到力竭。在测试期间用气体分析系统(Cortex Biophysik GmbH，Leipzig，SN，Germany)测量肺部气体交换。参与者在测试期间保持60转/分钟的节奏。尽管有口头鼓励，但当踩踏频率低于50转/分钟达两次时，或者呼吸交换率高于1.1，氧气吸收达到稳定水平，仍会判断停止测试。

[0056] 2.2试验程序

[0057] 每个试验以随机双盲安慰剂对照交叉方式进行。参与者进入实验室并分成两组：一组用PLA治疗，另一组用P+R补充剂治疗，每次试验之间至少四周的清除期。在每次试验前12小时向参与者提供标准的等热量饮食。活检肌肉样品为运动后立即收集和在3小时恢复期间收集。

[0058] 参与者在自行车测功仪(Monark 839E，Stockholm，Sweden)上运动前1小时接受P+R补充剂或PLA。参与者总是在相同的自行车测功仪以功率输出为70％$\dot{V}O2max$，节奏为60转/分钟运动1小时。参与者食用含有1.5克碳水化合物/公斤体重的高碳水化合物(GI:80)餐(80％碳水化合物、8％脂肪和12％蛋白质)。他们可以随意饮用额外的水。运动后10分钟内进餐。

[0059] 为了测定耐力表现，分开的12名参与者在测试之前1小时接受P+R补充剂或PLA。参与者以60％$\dot{V}O2max$的强度(瓦特)热身5分钟，然后在相同的Monark自行车测功仪上以80％$\dot{V}O2max$进行踩踏，采用相同的实验设计直到力竭。

[0060] 2.3肌肉活检

[0061] 在运动前(Pre)，立即(0小时)和运动后3小时从股外侧肌进行肌肉活检，使用18G Temno一次性切割针(Cardinal Health，Waukegan，IL，USA)在局部麻醉(2％利多卡因)下，插入位于3厘米深处，距膝盖近端20厘米的股外侧肌。在此试验中，在运动诱发前4周进行股外侧肌的基线肌肉活检。以70％$\dot{V}O2max$进行1小时自行车运动后，立即和3小时后在相同位置的对侧腿上再次进行另外两次肌肉活检。从针头快速取出肌肉组织，并置于含有10％福尔马林的锥形小瓶中。将石蜡包埋的组织切片。将其他活检样品直接在液氮中冷冻并储存用于随后mRNA表达的生化测定。

[0062] 2.4吞噬巨噬细胞和SA-β-gal阳性细胞

[0063] 免疫荧光和苏木精和伊红(H&E)染色一起用于鉴定吞噬巨噬细胞(CD 68^{+})浸润。VECTASTAIN®Universal Quick Kit(PK 8800)(Vector Laboratories，Burlingame，CA，USA)用于CD 68^{+}分析。免疫组织化学用于检测SA-β-gal阳性细胞。根据制造商的说明书，将通用DAB检测试剂盒(REF 760-500)(Ventana Medical Systems，Tucson，AZ，USA)用于pH 6的SA-β-gal分析。使用的一抗是兔来源的抗人CD 68+(1:200，ab955)(Abcam，Cambridge，MA，USA)和小鼠来源的抗人β-半乳糖苷酶-1/GLB1抗体(1:150，NBP2-45731)(Novus Biologicals Europe，Abingdon，OXF，UK)。由合格的病理学家在×200和×400的放大倍数下检视玻片。定量细胞阳性标记物并表示为阳性信号数/总骨骼肌纤维数(％)。包括总共600根肌纤维用于分析。所有数据由台北病理中心的合格病理学家和大学的专家重复，其结果相似。

[0064] 2.5凋亡DNA片段化

[0065] 根据制造商说明书关于检测肌肉横截面的说明，通过荧光TUNEL检测试剂盒(Mebstain Apoptosis Kit Direct，#8445)(Medical&Biological Laboratories，Woburn，MA，USA)鉴定凋亡DNA片段化。简言之，将组织切片与荧光素缀合的TUNEL反应一起温育。通过组织切片上略去TUNEL反应混合物中的TdT酶来进行阴性对照实验。TUNEL标记后，用4'，6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI，H-1200)(Vector Laboratories，Burlingame，CA，USA)固定肌肉切片。在荧光显微镜(Olympus BX51，Olympus Corporation，Tokyo，Japan)下拍摄TUNEL和DAPI阳性细胞核染色。在20X物镜放大倍数下从总横截面计数TUNEL和DAPI阳性细胞核的数目。只有TUNEL阳性细胞核重叠纤维核被定量为凋亡细胞核。TUNEL标记定量为每600根肌纤维中TUNEL阳性细胞核的数目。

[0066] 2.6白细胞浸润

[0067] 对于组织学分析，H&E染色用于鉴定白细胞在横截面上浸润到肌肉组织中。通过可见的炎性细胞侵袭，过度收缩或凝固的细胞质判断白细胞浸润。从总共600根纤维计算白细胞浸润纤维的百分比。在光学显微镜(Olympus BX51，Olympus Corporation，TKY，Japan)下观察切片，并拍摄覆盖股外侧肌整个横截面的数位图像。

[0068] 2.7RNA分析

[0069] 将冷冻的肌肉样品(约15毫克)均质化,并使用TRI试剂(T9424-200)(Sigma,St.Louis,MO,USA)提取总RNA,然后用异丙醇沉淀,两次乙醇洗涤,干燥,20μl无核酸酶水悬浮。定量总RNA并通过分光亮度法在260/280nm的吸亮度下检测(Thermo Fisher Scientific,Madison,WI,USA)。使用iScript cDNA合成试剂盒(#170-8890)(Bio-Rad,Hercules,CA,USA),根据制造商的说明使用总体积为20μl的1微克RNA进行逆转录,然后在-20℃下储存用于随后的定量PCR分析。

[0070] 使用MyiQ单色实时PCR检测系统(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)、TaqMan Probe(Sigma-Aldrich,Singapore)和iQ Supermix试剂盒(#170-8860)(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)进行实时PCR。使用18S核醣体RNA作为内目标相对RT-PCR方法用于确定靶mRNA的相对表达水平。用于扩增靶mRNA的引物和探针是18S核醣体(18S):正向(5'-3'):ACAGGATTGACAGATTGATAGCTC(SEQ ID NO:1),反向(5'-3'):TCGCTCCACCAACTAAGAACG(SEQ ID NO:2),探针(5'-3'):TGCACCACCACCCACGGAATCGAG(SEQ ID NO:3);interleukin 6(IL-6):正向(5'-3'):CAGTGGACAGGTTTCTGA(SEQ IDNO:4),反向(5'-3'):TTCGGCAAATGTAGCATG(SEQ ID NO:5),探针(5'-3'):CCATTAACAACAACAATCTGAGGTGC(SEQ ID NO:6);和inducible nitric oxide synthase(iNOS):正向(5'-3'):AGCGGGATGACTTTCCAAGA(SEQ ID NO:7),反向(5'-3'):TAATGGACCCCAGGCAAGATT(SEQ ID NO:8),探针(5'-3'):CCTGCAAGTTAAAATCCCTTTGGCCTTATG(SEQ ID NO:9)。通过对cDNA样品以5倍或2倍进行系列连续稀释,评估PCR逆转录的效率(>90%),并确定标准曲线的Ct。对于每个PCR反应,将18S基因与每种靶cDNA共扩增。为了控制由于逆转录和PCR的效率引起的任何变化,结果表示为靶mRNA/18S的比率。

[0071] 2.8总胶原酶活性

[0072] 根据制造商的方案,使用胶原酶(一种基质金属蛋白酶或MMP家族)活性比色测定试剂盒(K792-100)(BioVision,Milpitas,CA,USA)测定胶原酶活性。将均化的样品(10μl)加入96孔盘中用于测定。在酶标仪中在37℃下在在345nm波长下测定30分钟动态的吸光度。

[0073] 2.9数据分析

[0074] 所有数据均表示为平均值±标准误差。使用双因素重复测量ANOVA(SPSS 20.0)分析数据。使用配对学生t检验进行事后分析。显着性水平设定为$P<0.05$。

[0075] 2.10结果

[0076] 2.10.1衰老相关的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)

[0077] 基于医生跟踪和参与者自我报告,在整个研究期间,他们都没有报告由于P+R补充或肌肉活检引起的任何不良事件。

[0078] 免疫组织化学染色分析表明在基线(Pre)中来自股外侧肌的肌纤维中存在少于2%的SA-β-gal阳性信号(参见图1)。在PLA试验期间,在$\dot{V}O2max$的1小时自行车运动后,未观察到肌肉的SA-β-gal的可检测变化。相反,在急性有氧运动前1小时口服补充P+R补充剂后,观察到相同运动后SA-β-gal显着下降(从1.6%降至～0.6%,$P<0.05$)(Pre vs.0小时,$P<0.05$;Pre vs.3小时,$P<0.05$)。

[0079] 2.10.2凋亡DNA片段化

[0080] 通过TUNEL染色鉴定1小时运动后肌肉中的凋亡DNA片段化,表示为100个肌纤维中的阳性信号的数量(%)。在Pre的活检肌肉中检测到约6%的凋亡DNA片段化阳性信号。运动

后肌肉细胞凋亡DNA片段分别在PLA和P+R补充治疗组明显增加(运动的主效应,P<0.01)。在用P+R补充剂治疗的组中,发现更大的运动诱导的凋亡DNA片段化增加(PLA:+87%对比P+R:+133%,P<0.05),见图2(A)。在运动后3小时恢复期间,凋亡DNA片段化的阳性信号仅在P+R补充剂治疗组中显着逆转(从12.8%到8.5%,P<0.01),但在PLA治疗组中则没有,见图2(B)。

[0081] 2.10.3白细胞浸润

[0082] 检测肌肉中的白细胞浸润,表示为一百个肌纤维中细胞浸润位点的数量(%)。在运动前(Pre),约有2%的人体骨骼肌显示出白细胞浸润。运动后,PLA和P+R补充治疗两组股外侧肌白细胞浸润增加(运动的主要影响,P<0.01)。在白细胞浸润中发现更大的运动诱导的增加(PLA:+78%对比P+R:+121%,P<0.05),见图3(A)。在运动后3小时恢复期间,与PLA试验相比,在P+R补充期间观察到骨骼肌中白细胞浸润的早期逆转趋势(PLA:-11%对比P+R:-43%,P=0.06),见图3(B)。

[0083] 2.10.4CD 68^{+}巨噬细胞浸润

[0084] 通过免疫荧光染色鉴定肌肉中的CD 68^{+}巨噬细胞。对于用PLA和P+R补充治疗的两组,运动后比运动前(Pre)肌肉中CD 68^{+}巨噬细胞的水平显着增加(+2倍,P<0.05)。在3小时恢复期间,这种增加被逆转但没有显着的组间差异,见图4。

[0085] 2.10.5炎症标志物

[0086] 为了测定巨噬细胞活化,还测量了iNOS mRNA(图5(A))和IL-6mRNA(图5(B))对运动的反应。与PLA补充相比,在P+R补充期间观察到肌肉的iNOS mRNA的早期增加(PLA:+2.7倍与P+R:+4.5倍,组效应:P<0.05)。发现P+R补充剂还增强了运动诱导的IL-6反应(PLA:110倍对P+R:209倍,P<0.05)。测量肌肉的总胶原酶(MMP)活性,与运动前(Pre)相比,见图5(C)。在急性有氧运动后,PLA治疗组肌肉的胶原酶活性瞬时增加(+38%,P<0.05),而P+R补充治疗组则没有。

[0087] 2.10.6P+R补充剂可提高80% $\dot{V}O2max$的自行车运动表现

[0088] 通过在80% $\dot{V}O2max$下的自行车测功仪运动来评估耐力表现。P+R补充显着增加12%的自行车运动时间(PLA:1219±135秒vs.P+R:1364±145秒,P<0.05)和功率输出13%(PLA:199±31kJ vs P+R:225±33kJ,P<0.05)。与用PLA处理相比,用P+R补充剂治疗的12名参与者中的8名显示出自行车运动时间的显着改善,见图6。

[0089] 可以得出结论,高强度自行车运动瞬时增加细胞凋亡以及白细胞和巨噬细胞浸润到受挑战的骨骼肌中;然而,这种情况不足以影响骨骼肌中的衰老细胞数量。此外,显示通过补充P+R的巨噬细胞活化与运动的人体骨骼肌的衰老细胞清除有关。

[0090] 从所述具体实施例中将更全面地理解本公开内容仅用于说明,因此不限制本公开。在本公开的精神和范围内的任何修改都落入本公开的范围内。

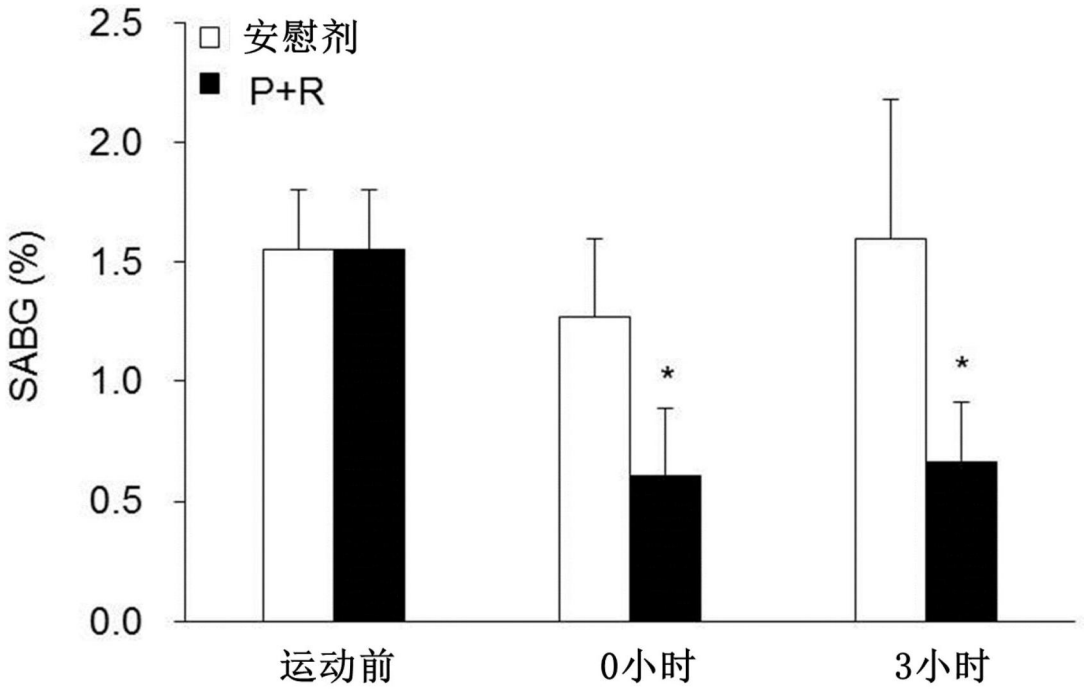


图1

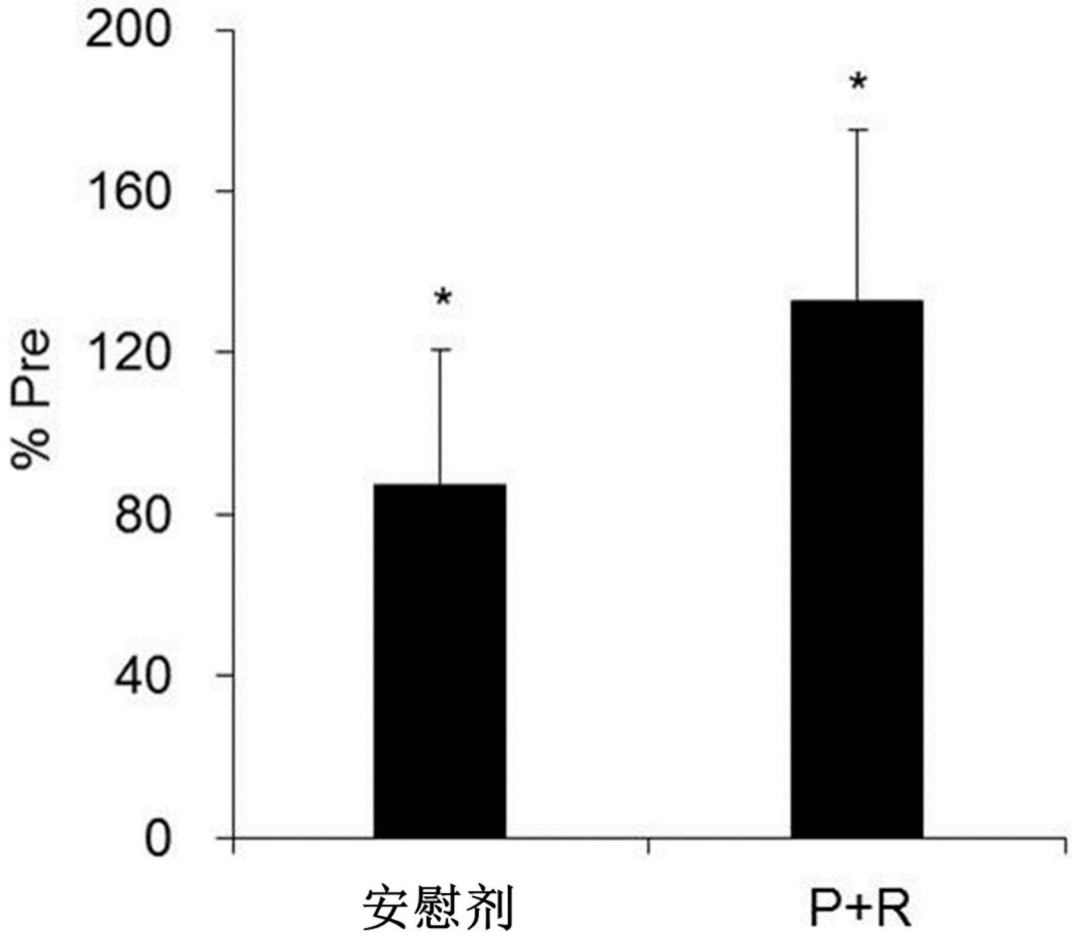


图2(A)

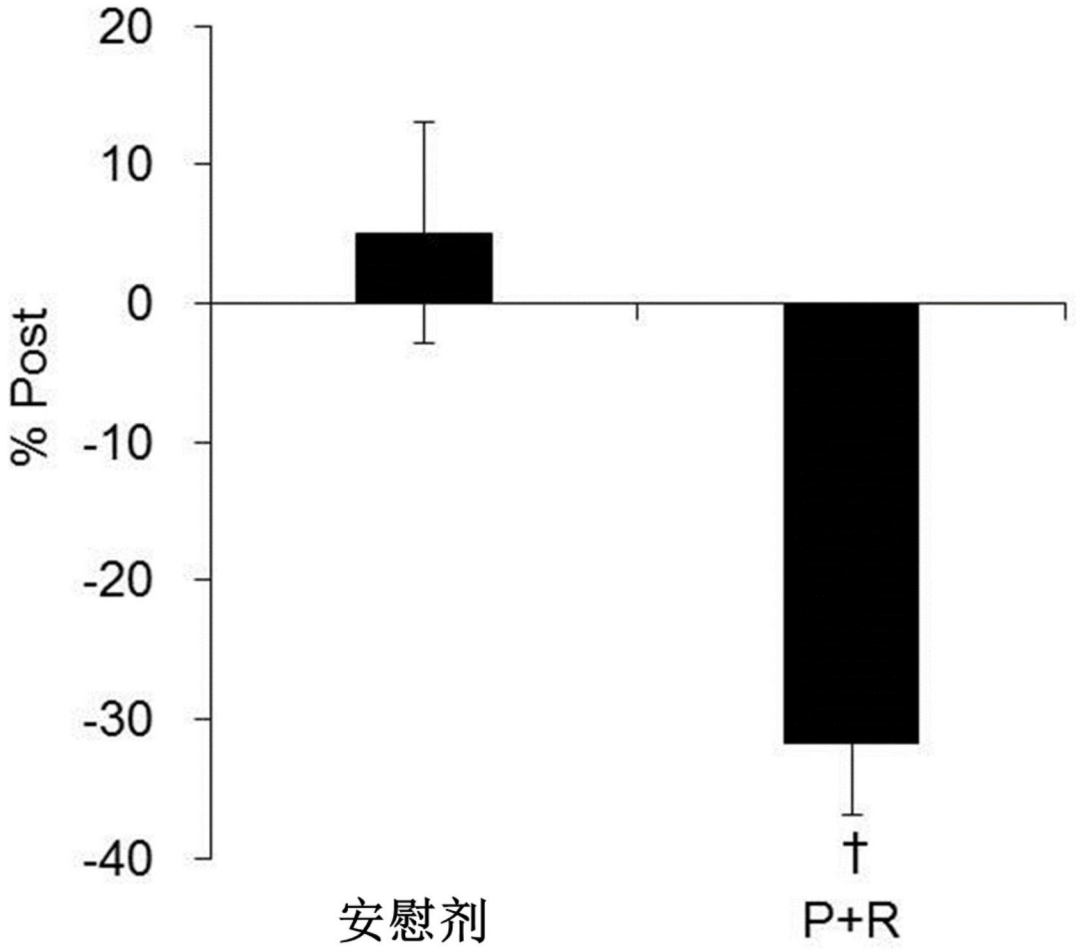


图2(B)

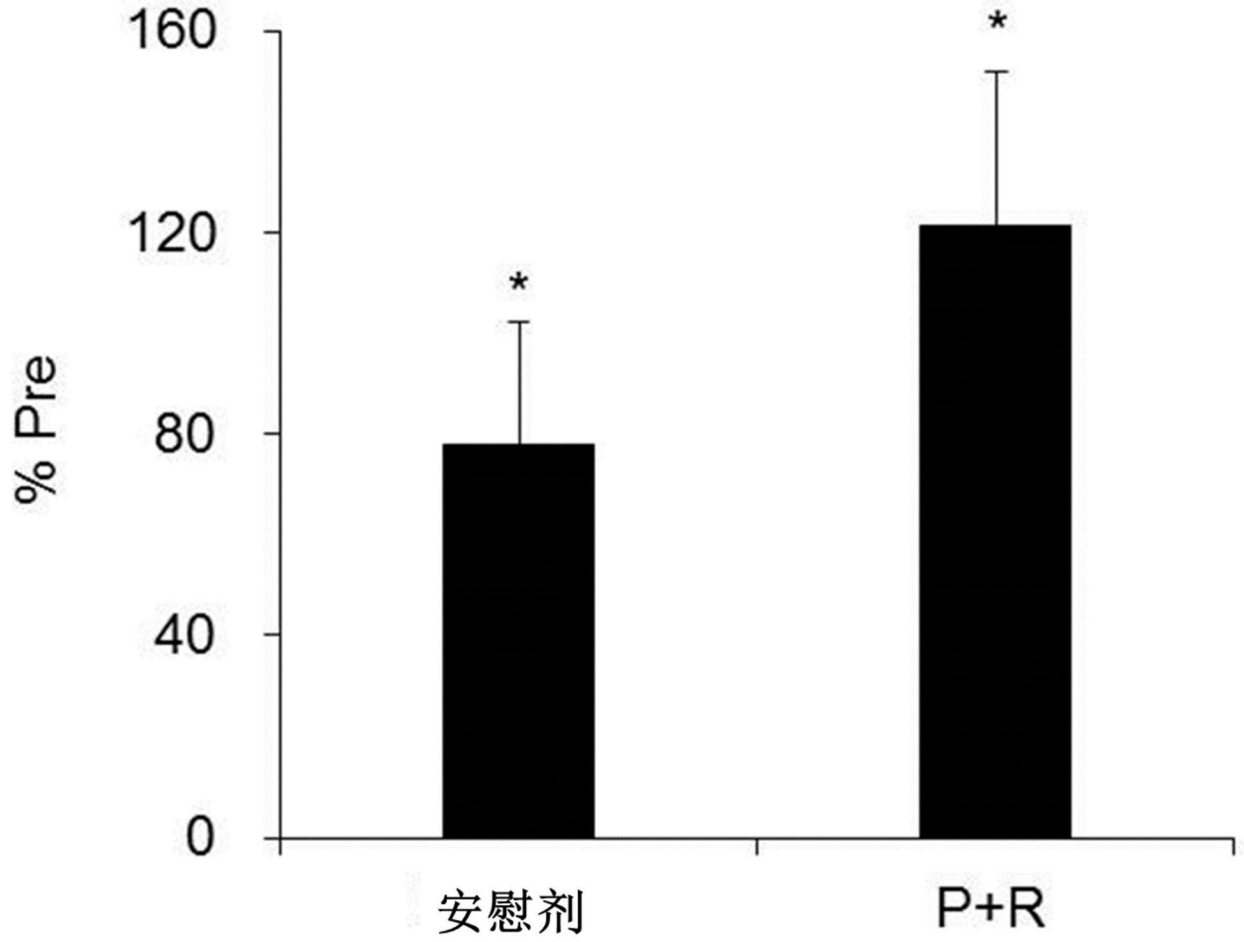


图3(A)

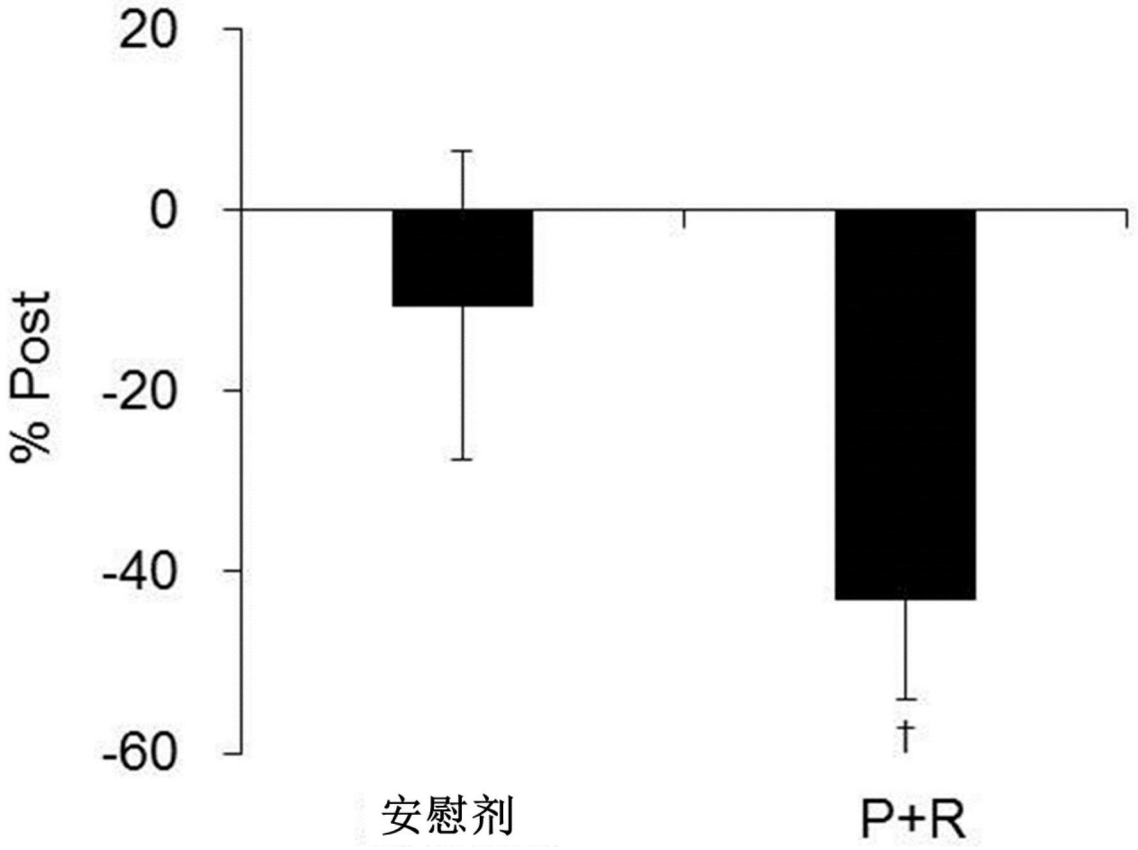


图3(B)

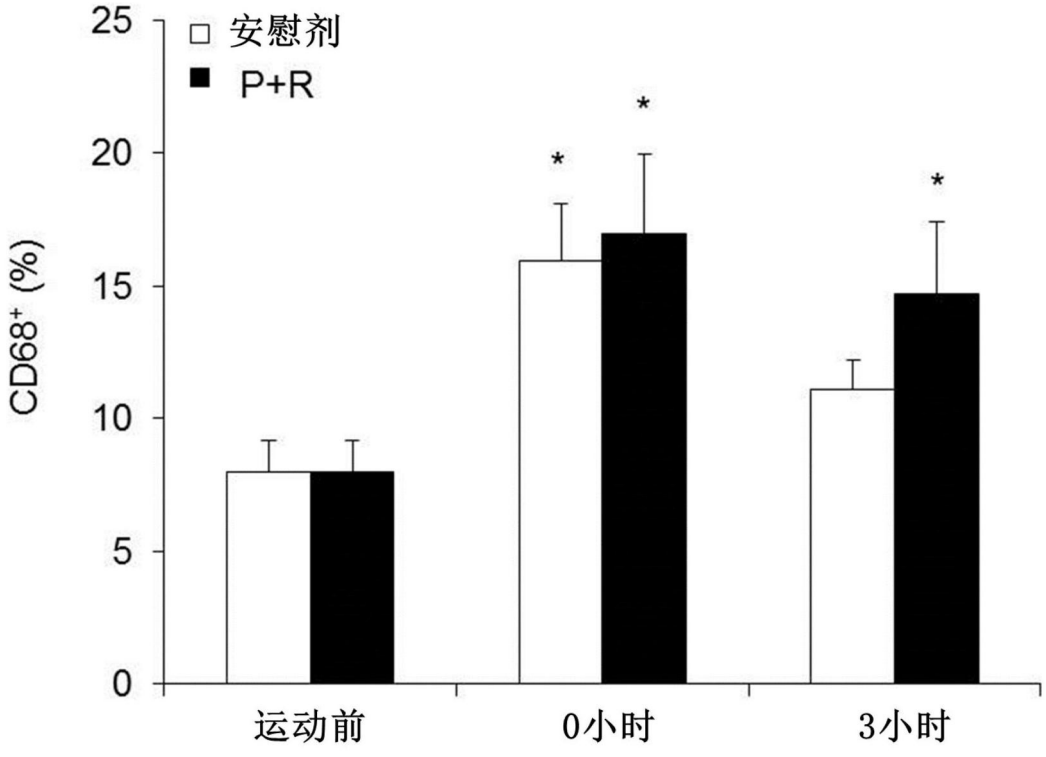


图4

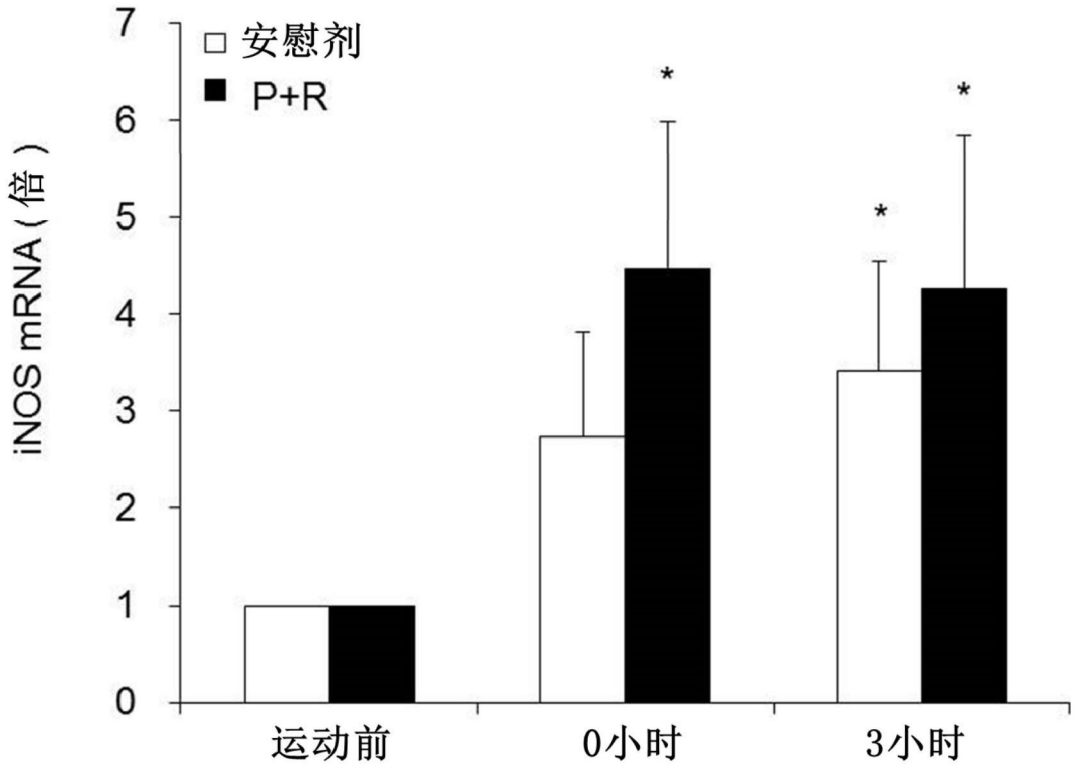

安慰剂
P+R
iNOS mRNA (倍)
0
1
2
3
4
5
6
7
*
*
*
运动前
0小时
3小时

图5(A)

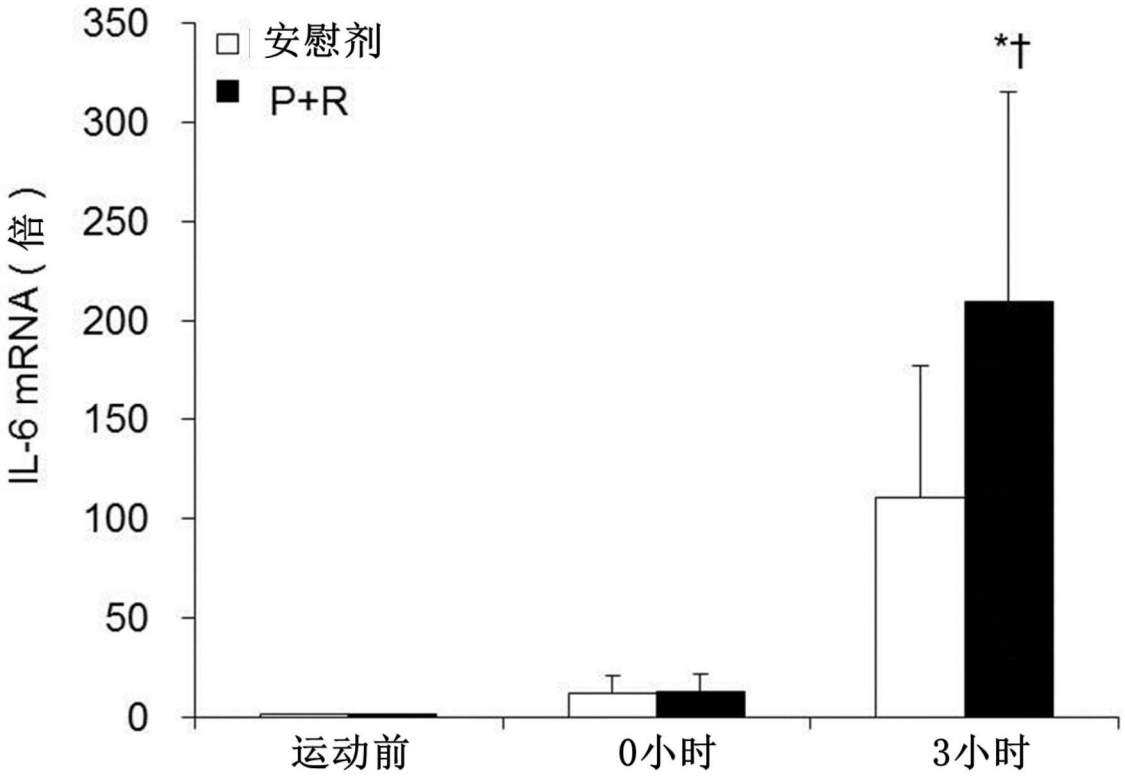

安慰剂
P+R
IL-6 mRNA (倍)
0
50
100
150
200
250
300
350
*†
运动前
0小时
3小时

图5(B)

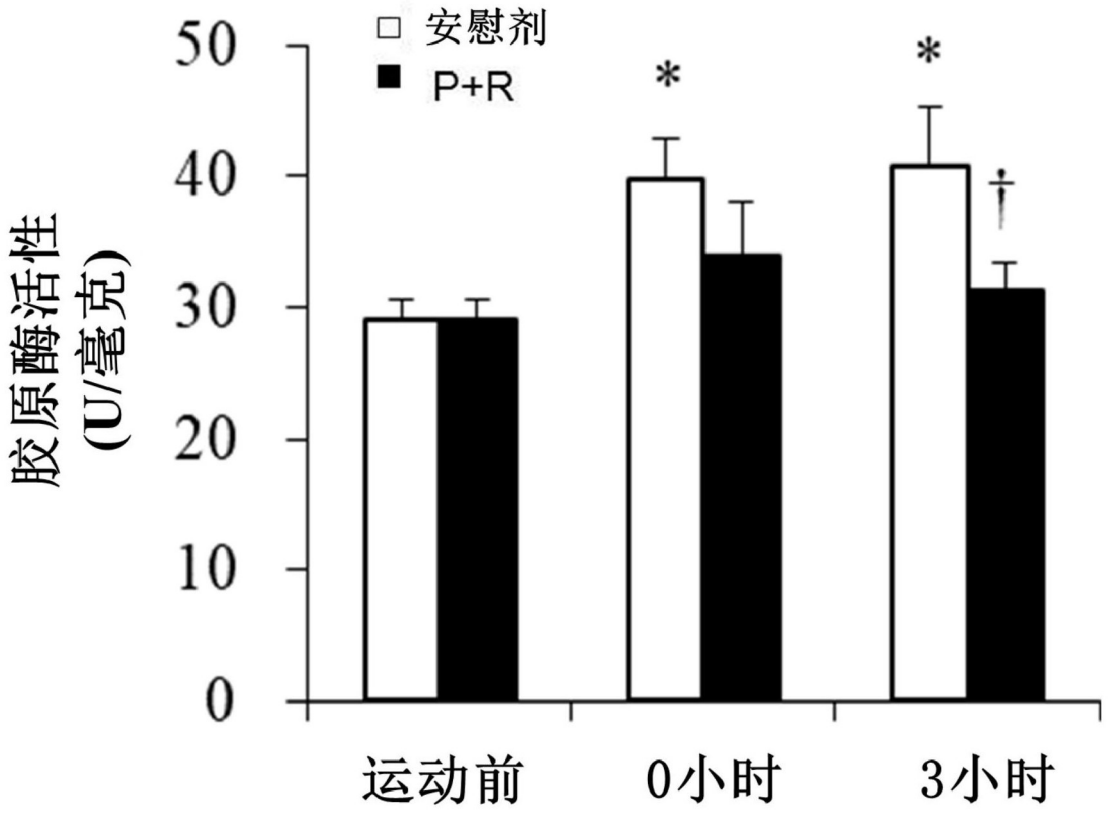

安慰剂
P+R
胶原酶活性
(U/毫克)
50
40
30
20
10
0
*
*
†
运动前
0小时
3小时

图5(C)

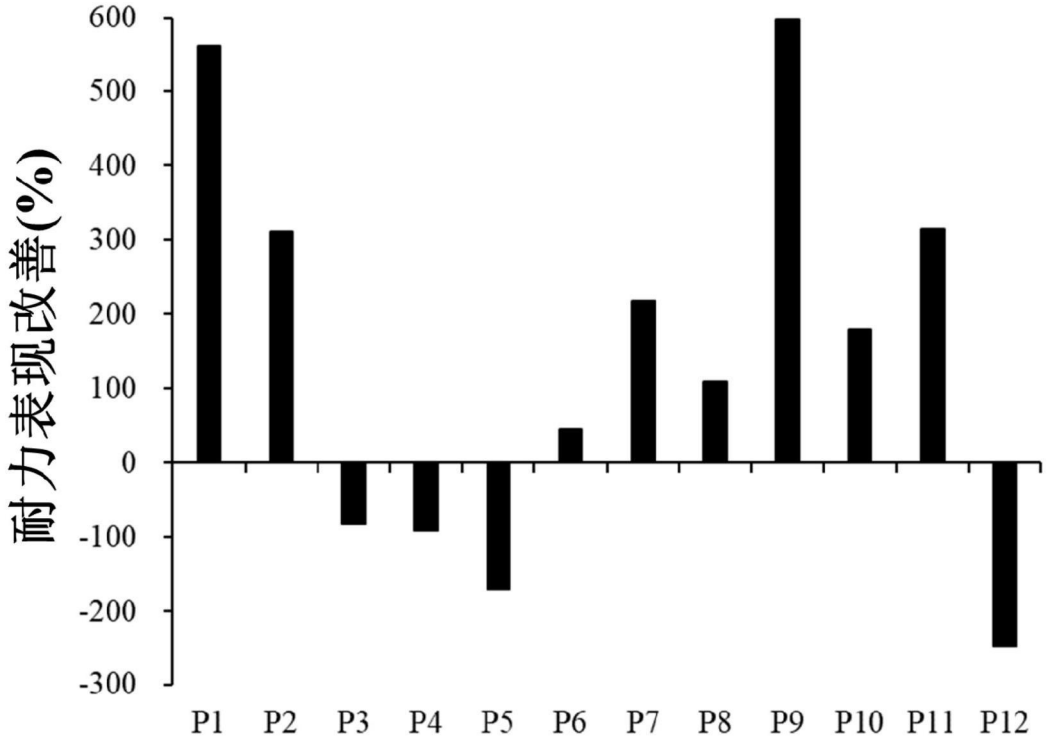

耐力表现改善(%)
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P11
P12

图6