



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103445049 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310399203. 8

(22) 申请日 2013. 09. 05

(73) 专利权人 中国科学院南海海洋研究所  
地址 510301 广东省广州市海珠区新港西路  
164 号

(72) 发明人 蔡冰娜 潘剑宇 孙恢礼 陈华  
万鹏 陈得科

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 谢敏楠

(51) Int. Cl.

A23L 29/30(2016. 01)

A23L 33/125(2016. 01)

C08B 37/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101361804 A, 2009. 02. 11, 说明书第 1 页  
第 2-6 段 .

CN 101361804 A, 2009. 02. 11, 说明书第 1 页

第 2-6 段 .

CN 101703248 A, 2010. 05. 12, 说明书第  
009-0012 段 .

CN 101703248 A, 2010. 05. 12, 说明书第  
009-0012 段 .

JP 特开平 11-178529 A, 1999. 07. 06, 全文 .

US 20070099820 A, 2007. 05. 03, 全文 .

CN 101544686 A, 2009. 09. 30, 全文 .

陈艳辉 等 . 广西产牡蛎多糖的制备和  
抗肿瘤活性初步研究 . 《中国现代医学杂  
志》. 2010, ( 第 7 期 ), 第 1004-1007 页 .

审查员 樊海涛

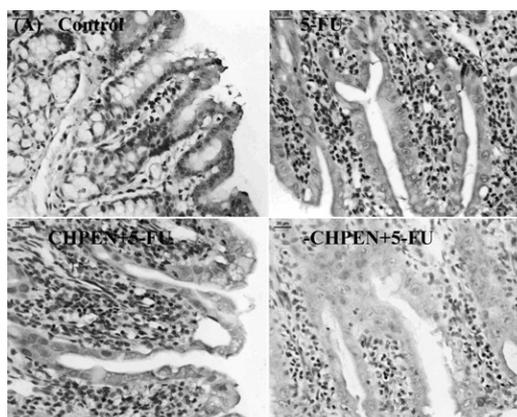
权利要求书1页 说明书12页 附图5页

(54) 发明名称

一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内  
营养制剂

(57) 摘要

本发明属于食品生产领域,具体涉及一种保  
护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制  
剂。该营养制剂含有牡蛎多糖。牡蛎多糖通  
过以下方法获得:取牡蛎肉,洗净,匀浆,加  
水超声处理后,加入蛋白酶进行酶解,再加  
入乙醇沉淀,获得牡蛎多糖。本发明通过细  
胞活性筛选具有显著抗氧化、增强免疫和  
促进肠上皮细胞增殖活性的牡蛎多糖组分,  
作为免疫营养素应用于肠内营养制剂,开发  
具有修复和维持化疗损伤的肠黏膜屏障功  
能,改善肿瘤患者预后。发明根据肿瘤患者  
的生理代谢进行营养物质合理配比,设计开  
发具有修复和维持化疗损伤的肠黏膜屏障  
功能,改善肿瘤患者预后的肠内营养制剂。



CN 103445049 B

1. 一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂,其特征在于含有牡蛎多糖,所述的牡蛎多糖通过以下方法获得:取牡蛎肉,洗净,匀浆,加入水,超声处理后,加入蛋白酶进行酶解后,再加入乙醇沉淀之后,进一步脱蛋白,获得牡蛎多糖,

所述的超声条件为:超声功率为 800~900W,温度为 50~60℃,超声时间为 20~30min;所述的蛋白酶为碱性蛋白酶或胰蛋白酶;所述的酶解条件为:温度 45~55℃, pH 值 8.0-10.0,酶解时间 4~6h;

所述的乙醇沉淀为分级沉淀:

第一级沉淀:先加入乙醇使乙醇终浓度达到 28-32%,沉淀得到第一级沉淀物,上清液进行第二级沉淀;

第二级沉淀:第一级沉淀后剩余的上清液中,加入乙醇使乙醇终浓度达到 58-62%,沉淀得到第二级沉淀物,上清液进行第三级沉淀;

第三级沉淀:第二级沉淀后剩余的上清液中,加入乙醇使乙醇终浓度达到 88-95%,沉淀得到第三级沉淀物,

所述的牡蛎多糖沉淀物的重均分子量为:500k~1000kDa 或 8k~500kDa 或 <8kDa。

2. 如权利要求 1 所述的营养制剂,其特征在于,所述制剂还包括蛋白质、油脂、膳食纤维和维生素。

3. 一种如权利要求 1 所述的营养制剂在制备减轻化疗对肠粘膜的损伤药物中的应用。

4. 一种如权利要求 1 所述的营养制剂在制备促进肠上皮细胞的增殖药物中的应用。

## 一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品生产领域,具体涉及一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂。

### 背景技术

[0002] 大约 90% 的恶性肿瘤患者在治疗的整个过程期间都需要进行化疗,化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时,对细胞增殖活跃的消化道黏膜有严重的副作用,“肠道是应激的中心器官”,可发生炎症,通透性增大,细菌易位,内毒素感染,加剧免疫功能损伤,导致黏膜屏障功能失调,严重影响预后,降低生活质量,影响病情发展和转归。肠黏膜屏障是机体的第一道免疫防线,构成了人体与外环境最大的交界面,正常的肠道屏障功能包括机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障 4 个部分,任何一部分缺陷或受损都可导致肠道功能障碍,引起肠道菌群易位、肠源性感染等,严重影响肿瘤患者的预后,导致并发症的发生。肠黏膜机械屏障主要由肠黏膜上皮细胞、上皮细胞侧面的细胞连接和上皮下的固有膜等成分组成,肠道黏膜是机体中生长最快的组织之一,其上皮不断更新成为保持黏膜屏障完整性的重要机制。肠黏膜的生物屏障主要由正常的肠道菌群构成,正常情况下,肠道内大量厌氧菌能组织病原微生物过度生长及限制它们黏附于黏膜。肠黏膜免疫系统由肠上皮淋巴细胞、固有层淋巴细胞、Peyer 淋巴结其分泌的 sIgA 及粘液等组成,与机械屏障、细菌生态屏障共同构建肠黏膜阻挡微生物入侵的第一道防线。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供了牡蛎多糖在制备保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能制剂方面的应用。

[0004] 本发明的目的还在于提供一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂。

[0005] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

[0006] 发明首先公开了牡蛎多糖在制备保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能制剂方面的应用。发明人首次发现,牡蛎多糖可以用于促进 RAW264.7 细胞, T 淋巴细胞和 IEC-6 细胞增殖作用。发明人发现,从牡蛎中分离所得的牡蛎多糖组分是通过体外抗氧化,促单核-巨噬 RAW264.7 细胞, T 淋巴细胞和小肠上皮 IEC-6 细胞增殖活性模型筛选获得的具有最显著抗氧化,促进 RAW264.7 细胞, T 淋巴细胞和 IEC-6 细胞增殖作用。

[0007] 对于牡蛎多糖中的多种组分,发明人进一步通过多级分离,分离出三级多糖。三级多糖的重均分子量分别为 500k~1000kDa 或 8k~500kDa 或 <8kDa。

[0008] 发明进一步公开了一种保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂,该制剂含有牡蛎多糖。

[0009] 所述的牡蛎多糖通过以下方法获得:取牡蛎肉,洗净,匀浆,加入水,超声处理后,加入蛋白酶进行酶解后,再加入乙醇沉淀,获得牡蛎多糖。所述的酶解结束之后,优选进行灭酶处理;所述的乙醇沉淀之后,优选进一步除蛋白,获得牡蛎多糖。

[0010] 优选地,所述蛋白酶为碱性蛋白酶或胰蛋白酶;所述的酶解条件为:温度45~55℃,pH值8.0~10.0,酶解时间4~6h。

[0011] 优选地,所述的超声条件为:超声功率为800~900W,温度为50~60℃,超声时间为20~30min。

[0012] 在进行以下的多级乙醇沉淀(分级沉淀)之后,可以获得不同分子量分布的多级多糖组分:

[0013] 第一级沉淀:先加入乙醇使乙醇终浓度达到28~32%,沉淀得到第一级沉淀物,上清液进行第二级沉淀;

[0014] 第二级沉淀:第一级沉淀后剩余的上清液中,加入乙醇使乙醇终浓度达到58~62%,沉淀得到第二级沉淀物,上清液进行第三级沉淀;

[0015] 第三级沉淀:第二级沉淀后剩余的上清液中,加入乙醇使乙醇终浓度达到88~95%,沉淀得到第三级沉淀物。

[0016] 加入一定量的乙醇之后,体系中的多糖组分会开始沉淀。根据体系中不同的醇浓度,不同分子量大小的牡蛎多糖被依次沉淀下来。优选地,沉淀后,为了更好地让沉淀物与上清液分离,采用离心方法分离沉淀物。进一步优选地,离心方法为:1500~2500×g,8~15min。

[0017] 通过上述的方法,获得了不同分子量分布的三级多糖组分,它们的重均分子量范围分别为:500k~1000kDa 或 8k~500kDa 或 <8kDa。

[0018] 实验进一步证实,在这三级多糖中,分子量8k~500kDa 的多糖组分,具有最显著抗氧化,促进RAW264.7细胞,T淋巴细胞和IEC-6细胞增殖作用。

[0019] 作为进一步的实施方案,可以通过以下方法制备牡蛎多糖:牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入4~6倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为800~900W,温度为50~60℃,超声时间为20~30min,超声时间/间歇时间为3/5(s/s),随后置于预热至45~55℃的水浴振荡锅内,调节pH值至8.0,加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶3000U/g,酶解4h~6h后100℃水浴灭酶10min,离心1800×g,15min取上清液,真空浓缩后,加入无水乙醇调至体系乙醇度为30%,4℃静置24h离心获得第一级沉淀物和上清液;取上清液,加入无水乙醇调至体系乙醇度为60%,4℃静置24h离心,获得第二级沉淀和上清液;取上清液,加入无水乙醇调至体系乙醇度为90%,4℃静置24h离心获得第三级沉淀物。三级的沉淀物分别进行真空干燥后研磨成粉末,即为制剂所强化的牡蛎多糖组分。

[0020] 作为一种适用于临床应用的优选的营养制剂,该制剂还可进一步包括蛋白质、油脂、膳食纤维和维生素。

[0021] 例如,作为一种实施方案,该营养制剂包括了如下原料,以百分比重量计,牡蛎多糖1~1.5%,牡蛎肽5~8%,大豆肽6~9%,大豆分离蛋白1%~1.5%,橄榄油5~8%,鱼油0.05~0.1%与中链甘油三酯9~12%。

[0022] 优选的,本发明的营养制剂还可以包括其他适用于作用肠内营养剂的多种组分,例如,其还包括以下原料,以百分比重量计,麦芽糊精55~60%,多元膳食纤维3~4%,复合维生素2~3%和复合矿物质2~3%。

[0023] 所述的多元膳食纤维为低聚果糖、水溶性膳食纤维、燕麦纤维、大豆多糖中的两种或三种复合。作为一种实施方案,可将肠内营养制剂制备为粉剂或乳剂。

[0024] 作为进一步的实施方案,可以通过以下方法制备肠内营养粉剂:新鲜牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 4~6 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 800~900W,温度为 50~60℃,超声时间为 20~30min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 45~55℃的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶 3000U/g,酶解 4h~6h 后 100℃水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩至固含物浓度为 15%,保温于 50℃水浴,边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯,随后加入麦芽糊精 7.5%~10%,搅拌溶解均质至料液均一无油滴,喷雾干燥制粉,条件为进口温度 140~160℃,进料速度 1000~1200mL/h,引风量为 0.4~0.5m<sup>3</sup>/min,雾化压力为 6×10<sup>3</sup>Pa。根据等量递加混合法添加其他物料进行混合即得。

[0025] 作为进一步的实施方案,可以通过以下方法制备肠内营养乳剂的制备方法:新鲜牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 4~6 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 800~900W,温度为 50~60℃,超声时间为 20~30min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 45~55℃的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶 3000U/g,酶解 4h~6h 后 100℃水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g,15 min 取上清液,调整至固含物浓度为 5%~8%,边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯,以及预混的大豆肽、大豆分离蛋白、牡蛎多糖、麦芽糊精、膳食纤维、复合维生素及复合矿物质,搅拌溶解,加入乳化剂西黄耆胶 0.5~0.75%,加水补至 500mL,超声乳化 20min~30min 即得。

[0026] 发明人首次发现,低浓度时可以促进肠上皮细胞的增殖。其中以 C<sub>30-60%</sub>多糖的增殖活性最强。

[0027] 本发明通过细胞活性筛选具有显著抗氧化、增强免疫和促进肠上皮细胞增殖活性的牡蛎多糖组分,作为免疫营养素应用于肠内营养制剂,开发具有修复和维持化疗损伤的肠黏膜屏障功能,改善肿瘤患者预后。发明根据肿瘤患者的生理代谢进行营养物质合理配比,设计开发具有修复和维持化疗损伤的肠黏膜屏障功能,改善肿瘤患者预后的肠内营养制剂。

[0028] 本肠内营养制剂配方三大产能物质配比设计,根据病人的分解代谢情况计算病人每天所需要的氨基酸的需要量;再根据肿瘤患者推荐的热氮比值,计算出与该病人氮量所匹配的热量值;制剂的能量供给由脂肪、碳水化合物双能源系统提供,根据肿瘤患者推荐糖脂比计算所需脂肪和碳水化合物用量;再根据推荐合理能量密度计算配制 100g 该制剂所需三大产能物质用量。

[0029] 本肠内营养制剂配方蛋白源配比设计,主要根据临床的不平衡氨基酸理论进行调配。分析常用的蛋白来源的氨基酸组分,依据肿瘤患者的推荐的精氨酸、亮氨酸和限制的缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸,筛选牡蛎肽酶解工艺及其他植物蛋白来源,规划求解获得蛋白源最佳组成及配比。

[0030] 本肠内营养制剂配方脂肪来源配比设计,主要依据肿瘤患者推荐的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸比例, n-6/n-3 比例及中长链脂肪酸比值,分析常用植物油的脂肪酸组成,规划求解筛选最佳脂肪来源及配比。

[0031] 本肠内营养制剂配方特别强化的海洋资源功能因子牡蛎多糖的设计依据体外抗氧化活性及细胞活性,和动物实验进行调整剂量调整。

[0032] 牡蛎多糖混合物的制备方法为:牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 4~6

倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 800~900W,温度为 50~60℃,超声时间为 20~30min,超声时间 / 间歇时间为 3/5(s/s),随后置于预热至 45~55℃的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶 3000U/g,酶解 4h~6h 后 100℃水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩后,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 30%,4℃静置 24h 离心取上清液,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 60%,4℃静置 24h 离心取沉淀,真空干燥后研磨成粉末,即为制剂所强化的牡蛎多糖组分。作为一种实施方案,可以采用如本发明实施例 1 的方法制备牡蛎多糖混合物,但该方法并不能作为本发明方案的限制。

[0033] 本发明所强化的牡蛎多糖组分是通过体外抗氧化,促单核-巨噬 RAW264.7 细胞, T 淋巴细胞和小肠上皮 IEC-6 细胞增殖活性筛选获得的具有最显著抗氧化,促进 RAW264.7 细胞, T 淋巴细胞和 IEC-6 细胞增殖作用。

[0034] 1 牡蛎多糖的抗氧化活性

[0035] (1) 总抗氧化能力 ABTS 法

[0036] ABTS<sup>+</sup>储备液制备:以去离子水将 ABT 和 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>分别溶解并混合,使其终浓度分别为 7 mmol/L 和 2.6 mmol/L,在室温、避光条件下静置 16 h。测定时,ABTS<sup>+</sup>储备液将以磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4)稀释,使其吸光度达到 0.700±0.020 (734 nm 波长下),形成 ABTS<sup>+</sup>测定液。取 4.0 mL ABTS<sup>+</sup>测定液,加入 200 μL 不同浓度样品稀释液,准确振荡 30s,测定反应 6 min 后 734 nm 处的吸光值,以相同体积去离子水替代样品做为空白对照。

[0037] (2) 清除 DPPH 自由基能力

[0038] 在 1.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 自由基无水乙醇溶液中加入 2.0 mL 不同质量浓度的样品溶液,摇匀。暗处反应 30 min,于波长 517 nm 处测定吸光度 A<sub>1</sub>

[0039] (3) 清除羟基自由基能力

[0040] 一定体积的样品溶液加入 pH 4.4 的柠檬酸缓冲液 2 mL, 0.01 mol/L 邻二氮菲溶液 1 mL, 0.01 mol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL, 0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液 0.05 mL。用超纯水定容至 10 mL,置于 37℃水浴中反应 1h。以 pH 4.4 的柠檬酸缓冲液为参比,在 200~700nm 进行扫描,得最大吸收波长,测定样品溶液吸光度,计算样品对羟自由基的清除率。

[0041] (4) 抑制脂质过氧化能力

[0042] 牡蛎多糖样品用 2.5 mL pH 7.0 50 mmol 磷酸盐缓冲液溶解,加入 50 mmol 亚油酸乙醇溶液 (95%) 2.5 mL 混合,加去离子水至 6.25 mL。混匀后置于培养箱 45±1℃培养,间隔 24 h 取 1 mL 待测样品,加入 2 mL 25% 的三氯乙酸,混匀放置,终止反应。然后加入 2 mL 0.67% 的 TBA 沸水浴中加热 15min,取出自然冷却后加入 4 mL 正丁醇,摇匀,于 4000r/min 离心 15min,取上层正丁醇液,于 532nm 比色,同时测定不加抗氧化物的空白样品的吸光度 A 值。

[0043] (5) 乙醇分级沉淀多糖三组分 C<sub>0-30%</sub>, C<sub>30-60%</sub>, C<sub>60-90%</sub> 抗氧化活性比较

[0044] 下文的 C<sub>0-30%</sub>, C<sub>30-60%</sub> 和 C<sub>60-90%</sub>, 分别表示本发明方案中的第一级沉淀物(30% 质量分数的乙醇沉淀)、第二级沉淀物(60% 质量分数的乙醇沉淀)和第三级沉淀物(90% 质量分数的乙醇沉淀)。

[0045] 由表 1 结果可知,在浓度为 4.0mg/mL 时, C<sub>30-60%</sub> 多糖清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基以及羟自由基和抑制脂质过氧化明显高于多糖组分 C<sub>0-30%</sub> 和 C<sub>60-90%</sub>。

[0046] 表 1 C<sub>0-30%</sub>, C<sub>30-60%</sub> 和 C<sub>60-90%</sub> 多糖(4mg/mL) 的抗氧化活性比较(%)

[0047]

| 多糖      | C <sub>0-30%</sub> | C <sub>30-60%</sub> | C <sub>60-90%</sub> |
|---------|--------------------|---------------------|---------------------|
| ABTS    | 26.18±0.51         | 75.88±0.25          | 34.48±0.53          |
| DPPH    | 12.76±0.60         | 74.68±0.35          | 45.49±0.36          |
| 羟自由基    | 64.34±0.56         | 83.92±0.45          | 74.07±0.40          |
| 抑制脂质过氧化 | 52.76±0.35         | 83.67±0.40          | 55.64±0.36          |

[0048] 2 牡蛎多糖的免疫活性

[0049] (1) 单核 - 巨噬细胞 RAW264.7 的增殖实验

[0050] 将各种细胞株分别于 37℃ 恒温水箱中快速复苏, 洗涤离心数次, 于 RPMI1640 培养基及 DMEM 培养基中扩大培养备用。将 RPMI1640 干粉倒入约 800mL 三蒸水中, 搅拌使其溶解; 加入 5.94gHEPES, 在磁力搅拌器上搅拌约半小时; 加入 2gNaHCO<sub>3</sub>, 继续搅拌约 2 小时。定容至 1000mL, 必要时用 1MNaOH 调至 pH7.2-7.4。0.22 μm 过滤除菌, 并加入抗生素液至每毫升 100 单位青霉素 + 100 μg 链霉素。按需要加入 10% 的胎牛血清。密封置 4℃ 冰箱保存。将 DMEM 干粉倒入约 800mL 三蒸水中, 搅拌使其溶解; 加入 5.94gHEPES, 在磁力搅拌器上搅拌约半小时; 加入 3.7gNaHCO<sub>3</sub>, 继续搅拌约 2 小时。定容至 1000mL, 必要时用 1MNaOH 调至 pH7.2-7.4。再过滤除菌。并加入抗生素液至每毫升 100 单位青霉素 + 100 μg 链霉素。按需要加入 10% 的胎牛血清。密封置 4℃ 冰箱保存。IEC-6 细胞株需另外增加 10 μg/mL 的胰岛素促进生长。实验室采用 0.125% 胰蛋白酶 + 0.01% EDTA。按 0.25% 的浓度计算所需的胰蛋白酶量, 将称好的胰蛋白酶粉末置于烧杯中, 用少许消毒的 PBS 液 (或 D-Hank 液) 调成糊状, 再补足盐溶液。搅拌均匀, 置于 4℃ 冰箱中一到两天, 并不时搅拌振荡。过滤除菌, 分装成小瓶, 置于 -20℃ 冰箱。按 0.02% 的浓度计算并称量 EDTA, 溶解; 高压蒸汽灭菌, 分装成小瓶; 4℃ 冰箱保存。将受试样品用完全培养基将其配成 20mg/mL 的原液, 二倍稀释法产生的各浓度。每孔 100 μl 加样量。经 0.25% 胰蛋白酶消化 5min 成单细胞悬液, 台盼蓝染色计数活细胞数, 调整活细胞浓度为 2.5 × 10<sup>5</sup>/mL 加于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 培养 24h 后, 再分别加入不同浓度药物, 置 37℃, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 或 48h, 于结束前 4 小时加入 MTT 20 μl/孔, 4h 后弃上清液, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 100 μl/孔, 振荡 10min 左右, 置酶标仪测定 OD 值, 波长为 492 或者 570nm, 计算存活率。

[0051] (2) 对正常小鼠体外 T 淋巴细胞 ConA 诱导增殖和转化实验

[0052] 选择健康昆明小鼠, 体重 25-30g, 性别不拘, 共 20 只, 实验前先将小鼠脱颈椎处死, 无菌取每只小鼠全脾, 置于灭菌的 1.5mL EP 管内, 加入 1mL PBS 液, 用眼科剪先轻轻剪碎组织, 再用吸管吹打, 制备单细胞悬液。经 200 目筛网过滤 2 次, PBS 洗涤 2 次, 每次 1000rpm 离心 5min, 弃上清, 悬浮于 2mLRPMI1640 培养液中, 用台盼兰染色计数活细胞数 (存活率应在 95% 以上), 调整细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL 后, 将细胞悬液分成 2 孔转移至 24 孔培养板中, 每孔 0.5mL, 一孔立即加入 75 μl ConA 液 (200 μg/mL), 另一孔作为对照, 置于 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内, 37℃ 培养 72h。培养结束前 4 小时, 将 24 孔板的悬浮液转移至 96 孔板内, 作 3 个孔的平行样, 每孔 100 μl, 加入 50 μl RPMI1640 培养液, 再加入 MTT 液 (5mg/mL) 50 μl/孔, 继续培养 4h。培养结束后, 板式离心机 1000rpm 离心 10min, 小心吸去上清, 每孔加入 100 μl DMSO 溶液, 轻轻振荡使结晶溶解并混合均匀, 酶标仪 570nm 测定 OD 值, 用扣减法计算 T 淋巴细胞增殖能力及提高率。

[0053] (3) 乙醇分级沉淀多糖三组分  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$ ,  $C_{60-90\%}$  免疫活性比较

[0054] 由表 2 可知,  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$ ,  $C_{60-90\%}$  多糖低浓度时可以促进 RAW264.7 细胞的增殖, 而高浓度时对 RAW264.7 具有抑制增殖作用; 体外实验结果表明可能具有一定的免疫调节作用, 其中  $C_{30-60\%}$  活性比另外两个组分和云芝糖肽强。

[0055] 由表 3 可知,  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$ ,  $C_{60-90\%}$  多糖高浓度时均对 T 淋巴细胞增殖具有一定的抑制作用, 低浓度时对 T 淋巴细胞增殖具有显著的促进作用, 提示牡蛎多糖对免疫调节具有双向作用。其中低浓度时  $C_{30-60\%}$  多糖的活性最强, 其次为  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{60-90\%}$ , 云芝糖肽。

[0056] 表 2  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$  和  $C_{60-90\%}$  多糖的对 RAW264.7 的增殖活性比较(%)

[0057]

| 浓度 (mg/mL) | 云芝糖肽 (OD 值)    | $C_{0-30\%}$ (OD 值) | $C_{30-60\%}$ (OD 值) | $C_{60-90\%}$ (OD 值) |
|------------|----------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 0          | 0.466±0.009    | 0.466±0.009         | 0.416±0.023          | 0.416±0.023          |
| 0.0098     | -              | -                   | 0.458±0.015          | 0.358±0.013*         |
| 0.0195     | -              | 0.492±0.045         | 0.498±0.034*         | 0.376±0.014          |
| 0.0391     | -              | 0.492±0.032         | 0.571±0.033**        | 0.375±0.021          |
| 0.0781     | 0.489±0.011*   | 0.478±0.017         | 0.538±0.063*         | 0.415±0.072          |
| 0.1563     | 0.586±0.013*** | 0.511±0.030         | 0.507±0.024**        | 0.459±0.022          |
| 0.3125     | 0.587±0.011*** | 0.531±0.036*        | 0.499±0.007**        | 0.481±0.022*         |
| 0.6250     | 0.551±0.042*   | 0.569±0.016**       | 0.445±0.140          | 0.481±0.024*         |
| 1.250      | 0.549±0.021**  | 0.555±0.032*        | 0.442±0.017          | 0.536±0.071*         |
| 2.5000     | 0.523±0.029*   | 0.237±0.007         | 0.368±0.025          | 0.459±0.021          |
| 5.0000     | 0.474±0.046    | 0.036±0.014         | 0.238±0.013***       | 0.444±0.004          |

[0058] 注: 与空白对照组相比 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

[0059] 表 3  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$  和  $C_{60-90\%}$  多糖的对 T 淋巴细胞的增殖活性比较(%)

[0060]

| 浓度 (mg/mL) | 云芝糖肽 (OD 值)    | $C_{0-30\%}$ (OD 值) | $C_{30-60\%}$ (OD 值) | $C_{60-90\%}$ (OD 值) |
|------------|----------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 0          | 0.212±0.015    | 0.212±0.015         | 0.153±0.047          | 0.225±0.004          |
| 0.0098     | 0.286±0.008**  | -                   | 0.333±0.030**        | 0.379±0.030***       |
| 0.0195     | 0.306±0.013**  | 0.206±0.019         | 0.279±0.022*         | 0.361±0.018***       |
| 0.0391     | 0.335±0.013*** | 0.340±0.062*        | 0.393±0.041**        | 0.364±0.028***       |
| 0.0781     | 0.308±0.004*** | 0.328±0.029**       | 0.398±0.009***       | 0.264±0.018*         |
| 0.1563     | 0.296±0.005**  | 0.395±0.042**       | 0.371±0.015**        | 0.236±0.014          |
| 0.3125     | 0.292±0.010**  | 0.331±0.023**       | 0.324±0.013**        | 0.248±0.020          |
| 0.6250     | 0.300±0.013**  | 0.250±0.024         | 0.216±0.051          | 0.215±0.025          |
| 1.250      | 0.274±0.001**  | 0.247±0.016         | 0.210±0.002          | 0.183±0.019*         |
| 2.5000     | 0.269±0.006**  | 0.234±0.044         | 0.249±0.027*         | 0.135±0.023**        |
| 5.0000     | 0.169±0.005#   | 0.047±0.010         | 0.133±0.006          | 0.132±0.033**        |

[0061] 注: 与空白对照组相比 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

[0062] 3 牡蛎多糖的促肠上皮细胞增殖活性

[0063] 方法同 2 的 MTT 法。

[0064] 由表 4 可知, 云芝糖肽胶囊样品对促进 IEC-6 细胞增殖无明显的作用。 $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$ ,

$C_{60-90\%}$ 多糖高浓度时对 IEC-6 具有抑制增殖作用；而低浓度时可以促进 IEC-6 细胞的增殖。其中以  $C_{30-60\%}$ 多糖的增殖活性最强。

[0065] 表 4  $C_{0-30\%}$ ,  $C_{30-60\%}$  和  $C_{60-90\%}$ 多糖的对肠上皮细胞 IEC-6 的增殖活性比较

[0066]

| 浓度 (mg/mL) | 云芝糖肽(OD 值)  | $C_{0-30\%}$ (OD 值) | $C_{30-60\%}$ (OD 值) | $C_{60-90\%}$ (OD 值) |
|------------|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 0          | 0.249±0.012 | 0.249±0.012         | 0.610±0.051          | 0.610±0.051          |
| 0.0098     | -           | 0.253±0.010         | 0.739±0.042**        | 0.792±0.011**        |
| 0.0195     | 0.213±0.042 | 0.292±0.015*        | 0.937±0.057**        | 0.823±0.004**        |
| 0.0391     | 0.216±0.054 | 0.321±0.005***      | 0.845±0.026**        | 0.915±0.066**        |
| 0.0781     | 0.204±0.044 | 0.175±0.006         | 0.825±0.039*         | 0.849±0.082*         |
| 0.1563     | 0.241±0.008 | 0.171±0.008         | 0.752±0.052          | 0.730±0.034*         |
| 0.3125     | 0.242±0.011 | 0.161±0.009         | 0.661±0.017          | 0.771±0.018**        |
| 0.6250     | 0.249±0.010 | 0.174±0.007         | 0.609±0.027          | 0.774±0.038*         |
| 1.250      | 0.255±0.009 | 0.178±0.010         | 0.561±0.016          | 0.693±0.032          |
| 2.5000     | 0.254±0.011 | 0.173±0.008         | 0.572±0.008          | 0.744±0.074          |
| 5.0000     | 0.252±0.005 | 0.185±0.031         | 0.556±0.048          | 0.733±0.048*         |

[0067] 注：与空白对照组相比 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

[0068] 本发明肠内营养制剂的原料还包括以下原料，以百分比重量计，麦芽糊精 55~60%，多元膳食纤维 3~4%，复合维生素 2~3% 和复合矿物质 2~3%。多元膳食纤维为低聚果糖、水溶性膳食纤维、燕麦纤维、大豆多糖中的两种或三种复合。

[0069] 本发明肠内营养粉剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：新鲜牡蛎去壳取肉，蒸馏水洗净沥干，匀浆，加入 4~6 倍体积蒸馏水，采用超声波预处理，超声功率为 800~900W，温度为 50~60℃，超声时间为 20~30min，超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s)，随后置于预热至 45~55℃ 的水浴振荡锅内，调节 pH 值至 8.0，加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶 3000U/g，酶解 4h~6h 后 100℃ 水浴灭酶 10min，离心 1800 ×g，15 min 取上清液，真空浓缩至固含物浓度为 15%，保温于 50℃ 水浴，边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯，随后加入麦芽糊精 7.5%~10%，搅拌溶解均质至料液均一无油滴，喷雾干燥制粉，条件为进口温度 140~160℃，进料速度 1000~1200mL/h，引风量为 0.4~0.5m<sup>3</sup>/min，雾化压力为 6×10<sup>3</sup>Pa。根据等量递加混合法添加其他物料进行混合即得。

[0070] 本发明肠内营养乳剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：新鲜牡蛎去壳取肉，蒸馏水洗净沥干，匀浆，加入 4~6 倍体积蒸馏水，采用超声波预处理，超声功率为 800~900W，温度为 50~60℃，超声时间为 20~30min，超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s)，随后置于预热至 45~55℃ 的水浴振荡锅内，调节 pH 值至 8.0，加入碱性蛋白酶或胰蛋白酶 3000U/g，酶解 4h~6h 后 100℃ 水浴灭酶 10min，离心 1800 ×g，15 min 取上清液，调整至固含物浓度为 5%~8%，边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯，以及预混的大豆肽、大豆分离蛋白、牡蛎多糖、麦芽糊精、膳食纤维、复合维生素及复合矿物质，搅拌溶解，加入乳化剂西黄耆胶 0.5~0.75%，加水补至 500mL，超声乳化 20min~30min 即得。

[0071] 感官评价结果表明，本发明肠内营养粉剂具有特有的海产鲜味，呈淡乳黄色，经搅拌可迅速溶于水，温水溶解口感更好。

[0072] 本发明肠内营养制剂能有效保护化疗药物所致的肠黏膜损伤，可减轻化疗大鼠肠

黏膜组织结构的损伤,有助于维持肠黏膜结构的完整性。改善和保护 5-FU 损伤后的肠黏膜机械屏障,防御细菌和内毒素移位,机体内毒素浓度可恢复到正常水平。提高化疗损伤大鼠的肠黏膜免疫屏障功能,拮抗由炎症感染引起的免疫功能紊乱,提高 T 细胞亚群,促进细胞免疫因子释放,降低炎症因子水平,修复免疫屏障功能。牡蛎多糖强化的肠内营养制剂还能减少机体蛋白质的丢失、对促进肝脏蛋白质的合成和改善机体整体营养状况都有积极作用。

[0073] 经分析,本发明肠内营养制剂的营养成分如表 5,为高热量高蛋白高脂,是肿瘤患者推荐营养素的良好来源,且经济费用降低。

[0074] 表 5 保护化疗损伤的肠黏膜屏障功能的肠内营养制剂的营养分析

[0075]

| 营养成分    | 单位      | 含量(/100g) | 营养成分  | 单位      | 含量(/100g) |
|---------|---------|-----------|-------|---------|-----------|
| 能量      | kJ      | ≥ 1800    | 维生素 C | mg      | ≥ 38      |
| 蛋白质     | g       | ≥ 15.0    | 烟酸    | mg      | ≥ 7       |
| 脂肪      | g       | ≥ 16.9    | 叶酸    | μ g DFE | ≥ 100     |
| 饱和脂肪酸   | g       | ≥ 9       | 泛酸    | mg      | ≥ 2.3     |
| 单不饱和脂肪酸 | g       | ≥ 5       | 生物素   | μ g     | ≥ 17      |
| 多不饱和脂肪酸 | g       | ≥ 0.5     | 胆碱    | mg      | ≥ 210     |
| 碳水化合物   | g       | ≥ 55      | 钙     | mg      | ≥ 330     |
| 膳食纤维    | g       | ≥ 3       | 磷     | mg      | ≥ 310     |
| 钠       | mg      | ≥ 300     | 钾     | mg      | ≥ 410     |
| 维生素 A   | μ gRE   | ≥ 400     | 镁     | mg      | ≥ 95      |
| 维生素 D   | μ g     | ≥ 2.3     | 铁     | mg      | ≥ 5.3     |
| 维生素 E   | mg α-TE | ≥ 5.2     | 锌     | mg      | ≥ 4.8     |
| 维生素 K   | μ g     | ≥ 25      | 碘     | μ g     | ≥ 33      |
| 维生素 B1  | mg      | ≥ 0.75    | 硒     | μ g     | ≥ 40      |
| 维生素 B2  | mg      | ≥ 0.75    | 铜     | mg      | ≥ 0.6     |
| 维生素 B6  | mg      | ≥ 0.80    | 氟     | mg      | ≥ 0.4     |
| 维生素 B12 | μ g     | ≥ 1.0     | 锰     | mg      | ≥ 1.2     |

## 附图说明

[0076] 图 1 大鼠肠黏膜固有层 T 细胞亚群 CD3<sup>+</sup>的变化(10×100)。

[0077] 图 2 大鼠肠黏膜固有层的 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup>的变化(10×100)。

[0078] 图 3 大鼠肠黏膜固有层的 IL-4 变化(10×100)。

[0079] 图 4 大鼠肠黏膜固有层的 IL-2 变化(10×100)。

[0080] 图 5 大鼠肠黏膜固有层的 IFN-γ 变化(10×100)。

## 具体实施例

[0081] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案。具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0082] 实施例 1 牡蛎多糖的制备

[0083] 牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 4 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 800W,温度为 60℃,超声时间为 30min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后

置于预热至 55℃ 的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶 3000U/g,酶解 4h 后 100℃ 水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩后,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 30%,4℃ 静置 24h 离心取上清液,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 60%,4℃ 静置 24h 离心取沉淀,真空干燥后研磨成粉末,即为制剂所强化的牡蛎多糖组分。

#### [0084] 实施例 2 牡蛎多糖的制备

[0085] 牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 6 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 900W,温度为 50℃,超声时间为 20min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 45℃ 的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入胰蛋白酶 3000U/g,酶解 6h 后 100℃ 水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩后,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 30%,4℃ 静置 24h 离心取上清液,加入无水乙醇调至体系乙醇度为 60%,4℃ 静置 24h 离心取沉淀,真空干燥后研磨成粉末,即为制剂所强化的牡蛎多糖组分。

#### [0086] 实施例 3 肠内营养粉剂的制备

[0087] 新鲜牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 6 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 800W,温度为 60℃,超声时间为 30min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 55℃ 的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶 3000U/g,酶解 4h 后 100℃ 水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩至固含物浓度为 15%,保温于 50℃ 水浴,边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯,随后加入麦芽糊精 10%,搅拌溶解均质至料液均一无油滴,喷雾干燥制粉,条件为进口温度 140℃,进料速度 1000mL/h,引风量为 0.5m<sup>3</sup>/min,雾化压力为 6×10<sup>3</sup>Pa,即得预混基料,其中牡蛎肽 8%,橄榄油 6.3%,鱼油 0.05%,中链甘油三酯 10.55%,麦芽糊精 8%,根据等量递加混合法添加其他物料大豆肽 7%,大豆分离蛋白 1.1%,牡蛎多糖 1.3%,麦芽糊精 50%,低聚果糖 2.6%,燕麦纤维 1.1%,复合维生素 2% 和复合矿物质 2%,进行 V 型混合器进行混合均匀。

#### [0088] 实施例 4 肠内营养粉剂的制备

[0089] 新鲜牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 4 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 900W,温度为 50℃,超声时间为 20min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 45℃ 的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入胰蛋白酶 3000U/g,酶解 4h~6h 后 100℃ 水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,真空浓缩至固含物浓度为 15%,保温于 50℃ 水浴,边搅拌边加入预混的橄榄油、鱼油和中链甘油三酯,随后加入麦芽糊精 7.5%,搅拌溶解均质至料液均一无油滴,喷雾干燥制粉,条件为进口温度 140℃,进料速度 1200mL/h,引风量为 0.4m<sup>3</sup>/min,雾化压力为 6×10<sup>3</sup>Pa,即得预混基料,其中牡蛎肽 6%,橄榄油 8%,鱼油 0.05%,中链甘油三酯 9%,麦芽糊精 5%,根据等量递加混合法添加其他物料大豆肽 8%,大豆分离蛋白 1.0%,牡蛎多糖 1.5%,麦芽糊精 54%,低聚果糖 2.55%,水溶性膳食纤维 0.9%,复合维生素 2% 和复合矿物质 2%,进行 V 型混合器进行混合均匀。

#### [0090] 实施例 5 肠内营养乳剂的制备

[0091] 新鲜牡蛎去壳取肉,蒸馏水洗净沥干,匀浆,加入 5 倍体积蒸馏水,采用超声波预处理,超声功率为 850W,温度为 60℃,超声时间为 250min,超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s),随后置于预热至 55℃ 的水浴振荡锅内,调节 pH 值至 8.0,加入碱性蛋白酶 3000U/g,酶解 5h 后 100℃ 水浴灭酶 10min,离心 1800 ×g, 15 min 取上清液,调整至固含物浓度为 5%,边搅拌边加入预混的橄榄油 7%、鱼油 0.1% 和中链甘油三酯 11.4%,以及预混的大豆肽 9%、大豆

分离蛋白 1.3%、牡蛎多糖 1.2%、麦芽糊精 55%、水溶性膳食纤维 2.0%、燕麦纤维 1.6%、大豆多糖 0.4%、复合维生素 3% 及复合矿物质 %, 搅拌溶解, 加入乳化剂西黄耆胶 0.75%, 加水补至 500mL, 超声乳化 30min 即得。

[0092] 实施例 6 肠内营养乳剂的制备

[0093] 新鲜牡蛎去壳取肉, 蒸馏水洗净沥干, 匀浆, 加入 6 倍体积蒸馏水, 采用超声波预处理, 超声功率为 900W, 温度为 50℃, 超声时间为 20min, 超声时间 / 间歇时间为 3/5 (s/s), 随后置于预热至 45℃ 的水浴振荡锅内, 调节 pH 值至 8.0, 加入胰蛋白酶 3000U/g, 酶解 4h~6h 后 100℃ 水浴灭酶 10min, 离心 1800 ×g, 15 min 取上清液, 调整至固含物浓度为 7%, 边搅拌边加入预混的橄榄油 5%、鱼油 0.08% 和中链甘油三酯 12%, 以及预混的大豆肽 60%、大豆分离蛋白 1.5%、牡蛎多糖 1.0%、麦芽糊精 60%、低聚果糖 1.8、水溶性膳食纤维 0.7、大豆多糖 0.5、复合维生素 2.42% 及复合矿物质 2%, 搅拌溶解, 加入乳化剂西黄耆胶 0.5%, 加水补至 500mL, 超声乳化 20min 即得。

[0094] 实施例 7 肠内营养制剂保护肠黏膜屏障功能

[0095] (一) 动物分组及造模

[0096] SD 大鼠适应饲养环境一周后随机分为 4 组, 即空白对照组(A), 5-FU 组(B), 添加牡蛎多糖的肠内营养组(C), 不额外添加牡蛎多糖的肠内营养组(D), 每组 20 只, C 组和 D 组大鼠每日分别灌胃牡蛎多糖强化的肠内营养(CHPEN)和不额外添加牡蛎多糖的肠内营养(-CHPEN) 1.0g/kg. d, 20mL/kg, A 组和 B 组大鼠给予等量生理盐水, 每日一次, 连用 13 天。实验期间在第 5 天给予 B、C 和 D 组大鼠腹腔注射 5-FU 50mg/kg, 连用 5 天。分别处死所有大鼠, 按具体要求分别采集样本及取材备用, 整个实验过程中动物自由摄食和饮水。

[0097] (二) 肠内营养制剂对肠黏膜机械屏障的保护作用

[0098] (1) 肠黏膜组织形态结构修复

[0099] 大鼠放血处死后, 沿腹正中线开腹, 在距离屈氏韧带 5cm 处剪取一段 4cm 肠段, 用 10% 甲醛固定, 经脱水, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色, 采用医学图像分析系统测量绒毛高度、绒毛宽度、粘膜厚度, 各组进行统计学处理, 并比较组间差异。

[0100] 由表 6 可知, CHPEN 和 -CHPEN 能改善 5-FU 损伤的大鼠肠黏膜, 显著增大绒毛宽度, 在一定程度上提高绒毛高度和黏膜厚度, CHPEN 具有更好的改善和保护大鼠肠黏膜。

[0101] 表 6 肠道黏膜定量分析

[0102]

| 组别          | 绒毛高度(μm)          | 绒毛宽度(μm)            | 黏膜厚度(μm)           |
|-------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 空白组         | 30.6817±5.8238    | 282.2071±108.9516   | 621.4026±172.9606  |
| 5-FU 组      | 23.9718±4.8695*** | 165.5949±84.1404*** | 495.9668±58.6186** |
| CHPEN+5-FU  | 25.9227±6.6696*   | 241.9625±88.6184##  | 522.3841±95.3943*  |
| -CHPEN+5-FU | 24.9755±8.5936*   | 232.4940±75.6907##  | 528.8237±86.8112*  |

[0103] 注: 与空白组比较, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ; 与 5-FU 组比较, ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$ 。

[0104] (2) 拮抗肠黏膜机械屏障功能损伤

[0105] 肠系膜淋巴结细菌移位: 打开腹腔, 在无菌台严格按照无菌手术要求取回盲部肠系膜淋巴结进行细菌培养。取淋巴结组织 0.1~0.2mg, 放入无菌的 EP 管内, 加无菌生理盐水 1mL 匀浆器匀浆。分别取 20 μL 涂布接种于琼脂平板培养, 37℃ 恒温培养箱内培养 48h 后菌落计数, 按照国际通用标准, 大于 100 菌落形成单位(CFU) / 克淋巴结组织(或肝组织) 为细

菌移位阳性。计算各组细菌移位率(移位阳性动物个数 / 该组动物总数 × 100)。在取淋巴结进行细菌培养的同时,每一动物开腹后均用棉拭子搽拭腹腔脏器进行培养,以排除手术外人为污染造成的淋巴结培养阳性。腹腔脏器棉拭子培养阴性的动物才能作为统计对象。将各组细菌移位的例数进行卡方检验,并比较组间差异,评价受试样品的作用效果。

[0106] 血清内毒素测定:采用鲎试剂法测定血清内毒素。严格按照无菌手术的要求,在无菌操作下暴露大鼠腹腔,无菌采集大鼠的血清样本。立即将血清样本迅速低温离心 10min (1000rpm),然后吸出上清液(富含血小板或血清) 0.1mL 于热源试管中,吸取鲎试剂盒的配套血液处理剂 II 0.9mL,制成十倍稀释液备用。取无热原试管,加入 100mL 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液及处理好的血清样本。再加入 100mL 鲎试剂溶液,混匀,37°C 温育 T<sub>1</sub> 分钟。温育结束,加入 100mL 显色基质溶液,混匀,37°C 温育 T<sub>2</sub> 分钟。温育结束,加入 500mL 偶氮化试剂 1 溶液,混匀,加入 500mL 偶氮化试剂 2 溶液,混匀加入 500mL 偶氮化试剂 3 溶液,混匀,静置 5 分钟,于 545nm 波长处读取吸光度值。将各组的内毒素值(结果以 EU/mL)进行统计学处理,并比较组间差异。

[0107] 由表 7 可知,而在正常饮食基础上分别给予大鼠 CHPEN 制剂和 -CHPEN 并进行腹腔 5-FU 注射后,大鼠外周血内毒素浓度迅速下降,提示 CHPEN 和 -CHPEN 都具有清除内毒素能力。CHPEN+5-FU 组和 -CHPEN+5-FU 组大鼠的肠粘膜细菌移位数略减少,且细菌计数虽高于空白组,但与同期 5-FU 组相比,已明显减少;提示 CHPEN 和 -CHPEN 能减轻 5-FU 造成肠道屏障损伤,具有一定保护肠黏膜作用。

[0108] 表 7 大鼠外周血内毒素和肠系膜淋巴结细菌移位变化情况(n=10, )

[0109]

| 组别            | 内毒素含量(EU/mL)     | 细菌总数 CFU/g        | 移位数(只) | 未移位数(只) | 移位率(%) |
|---------------|------------------|-------------------|--------|---------|--------|
| 空白组           | 0.0197±0.0040    | 87.25±60.47       | 1      | 9       | 10     |
| 5-FU 组        | 0.2175±0.0303*** | 1767.29±998.45*** | 10     | 0       | 100*** |
| CHPEN+5-FU 组  | 0.0642±0.0389*** | 1014.37±493.54*** | 9      | 1       | 90***  |
| -CHPEN+5-FU 组 | 0.0202±0.0038*** | 667.90±496.24***  | 7      | 3       | 70**   |

[0110] 注:与空白组比较,\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ;与 5-FU 组比较,# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ 。

[0111] (三) 提高肠黏膜免疫屏障功能

[0112] 采用流式细胞仪检测血清 T 淋巴亚群。大鼠无菌采集全血 50  $\mu$ L, 分别加入 FITC-CD3、APC-CD4 和 CD8  $\alpha$  共三种抗体,振荡器涡旋混匀,于室温避光反应 15min; 1200rpm, 5min, 弃上清;加入 1mLPBS, 振荡器混匀, 1500rpm, 5min, 弃上清;再加入 1mL 红细胞裂解液, 避光放置 15min, 离心弃上清, 加 PBS 清洗 1 次, 离心弃上清, 加入 0.3mL 多聚甲醛吹散细胞, 混匀后 4 度冰箱放置过夜。400 目尼龙网过滤, 流式细胞仪调整细胞数量约 3-5  $\times 10^6$ /100  $\mu$ L, 上机检测。以不加染料管, 加 CD3、CD4、CD8  $\alpha$  染料单管各 1 支, 用于机器调试。结果分析, 以 CD3 阳性、CD4 阳性、CD8  $\alpha$  阳性以及 CD<sup>3+</sup>CD<sup>4+</sup>, CD<sup>4+</sup>CD8  $\alpha$  进行统计学处理, 并比较组间差异。

[0113] 大鼠麻醉后, 后腔静脉采集全血, 3000rpm 离心 20min, 取上清, -20°C 保存, 用酶联免疫法检测 IL-2、IL-4、IL-10、sIgA、TNF- $\beta$  以及 IFN- $\gamma$  的含量。另取肠黏膜固有层, 10% 多聚甲醛固定后, 48h 内脱水, 石蜡包埋, 切片, 免疫组化法测定 CD3、CD4、IL-2、IL-4 及 IFN。

[0114] 由表 8 的结果可得, CHPEN+5-FU 和 -CHPEN+5-FU 组的 T 淋巴细胞数量增多, 亚群中的细胞毒 T 淋巴细胞数量明显增多, 由此可能产生一系列的细胞免疫反应; 也可能是由

于炎症的发生激活了免疫系统的 T 淋巴细胞反应。

[0115] 表 8 大鼠血清的 T 细胞亚群变化(n=10, )

[0116]

| 组别                                   | 空白组          | 5-FU 组           | +CHPEN+5-FU 组                 | -CHPEN+5-FU 组   |
|--------------------------------------|--------------|------------------|-------------------------------|-----------------|
| CD3 <sup>+</sup>                     | 82.021±1.689 | 93.252±2.952***  | 93.147±2.897***               | 91.296±4.807*** |
| CD4 <sup>+</sup>                     | 49.293±2.610 | 48.606±5.529     | 47.358±5.467                  | 45.788±6.329    |
| CD8 <sup>+</sup>                     | 28.187±3.685 | 37.186±33.334*** | 33.592±3.807** <sup>#</sup>   | 35.242±5.293**  |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 α <sup>+</sup> | 1.779±0.282  | 1.321±0.223***   | 1.441±0.342*                  | 1.337±0.314**   |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>    | 36.263±2.971 | 46.471±5.282***  | 44.317±6.270**                | 43.227±6.738**  |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 α <sup>+</sup>  | 19.123±1.749 | 33.637±3.850***  | 28.695±2.681*** <sup>##</sup> | 30.836±3.729*** |

[0117] 注：与空白组比较，\*\*\* $p < 0.001$ ，\*\* $p < 0.01$ ，\* $p < 0.05$ ；与 5-FU 组比较，<sup>#</sup> $p < 0.05$ ，<sup>##</sup> $p < 0.01$ 。

[0118] 由图 1 可得，由于 5-FU 的造模导致肠炎的发生，5-FU, CHPEN+5-FU 和 -CHPEN+5-FU 组均可见粘膜固有层中炎症细胞数量激增；CHPEN+5-FU 和 -CHPEN+5-FU 组的 CD3<sup>+</sup>阳性表达略小于 5-FU 组，炎症程度与 CD3<sup>+</sup>阳性表达的数量成正比关系。由图 2 可知，CHPEN+5-FU 组的 CD4<sup>+</sup>阳性表达的数量增多，与空白组相差不大；而 -CHPEN+5-FU 组的 CD4<sup>+</sup>阳性表达的细胞数量略减少，介于 5-FU 组和 CHPEN+5-FU 组之间。

[0119] 上述动物试验采用本发明实施例 3 的营养制剂作为实验对象。但本领域技术人员认可的是，基于本发明的理念，能实现上述保护肠黏膜屏障功能的制剂并不限制于实施例所示的制剂。在本发明理念之下，对本方案进行任何修饰、组合、调整的技术方案，将仍然落入本发明的保护范围。

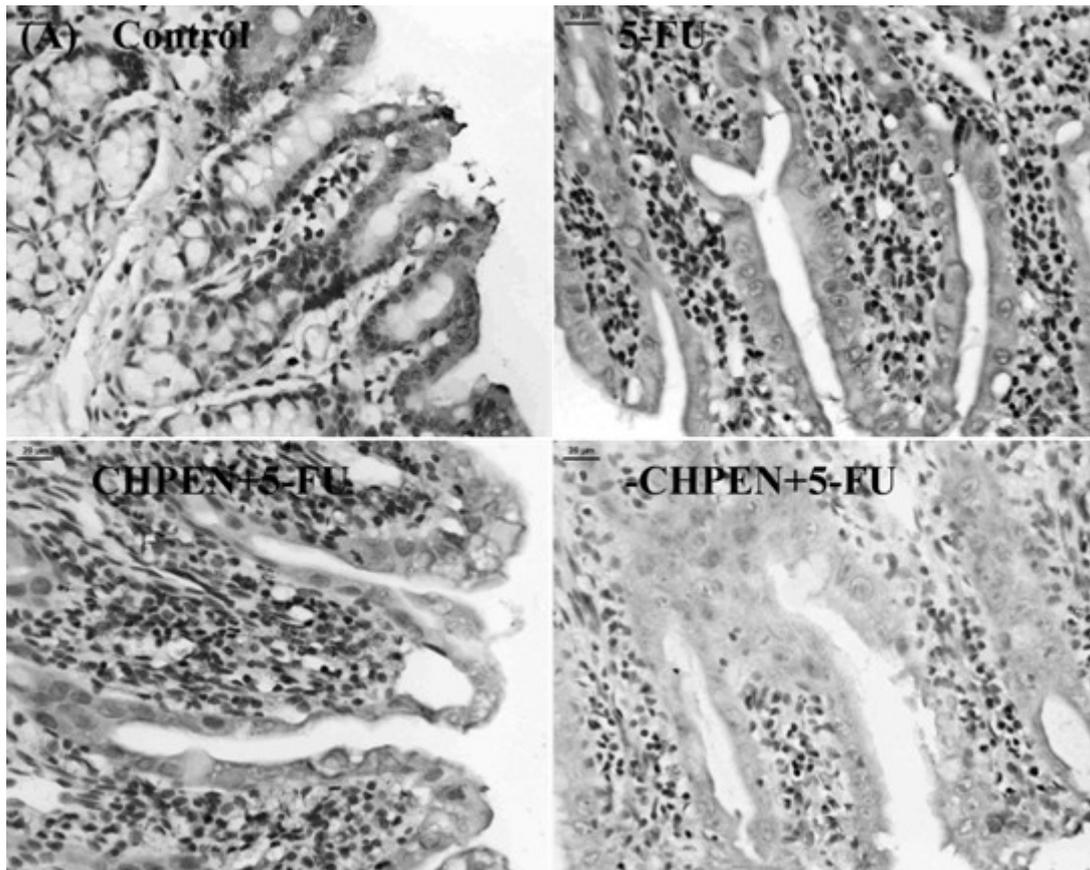


图 1

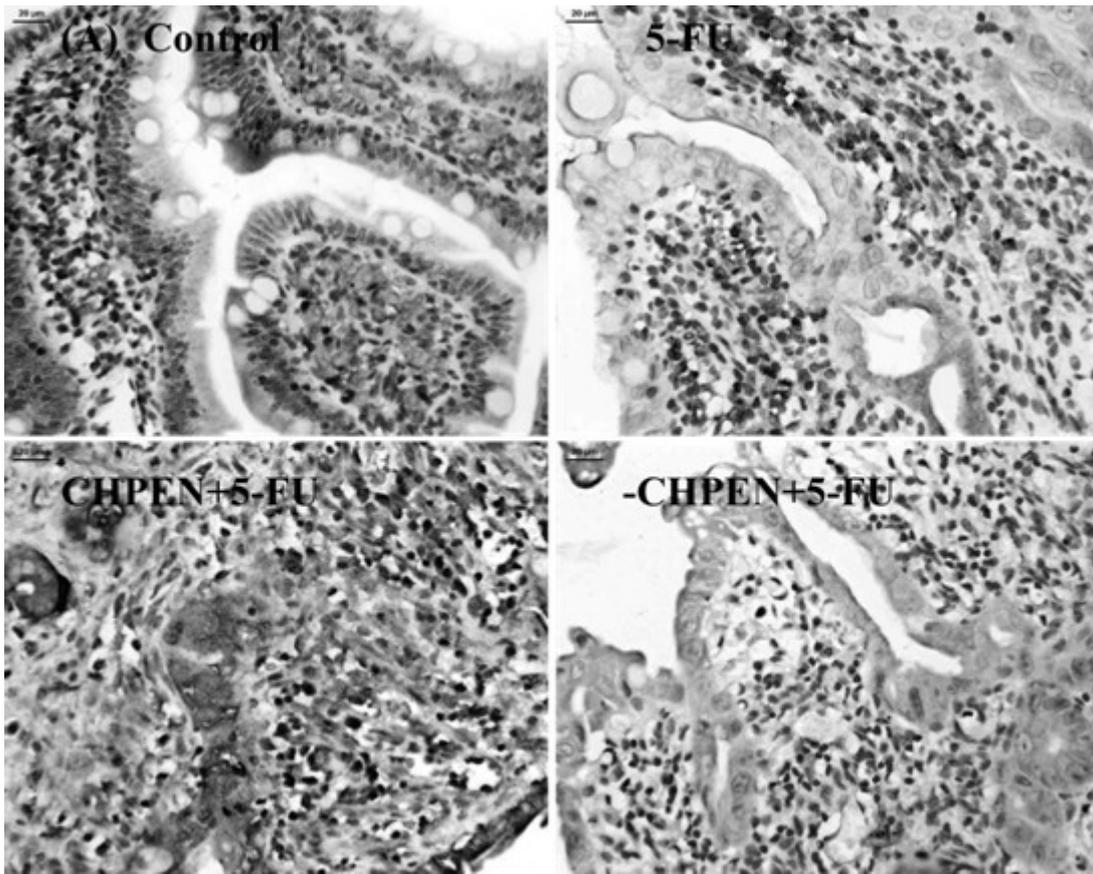


图 2

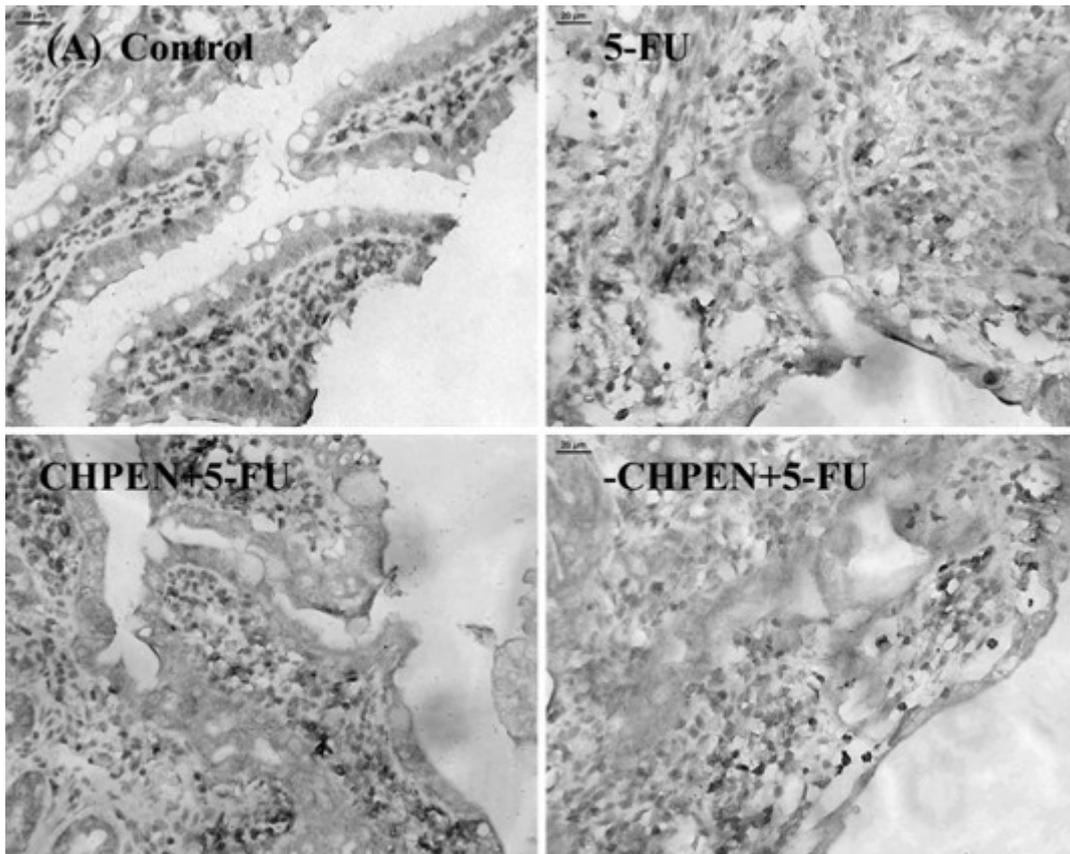


图 3

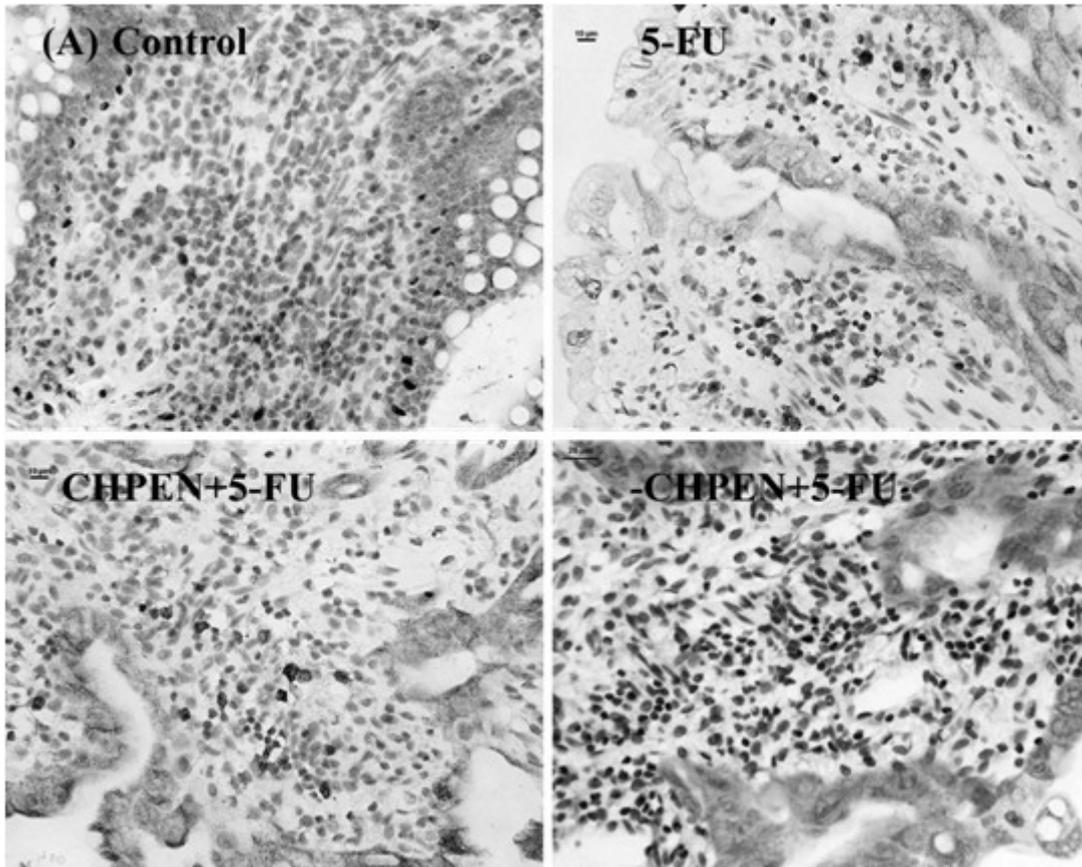


图 4

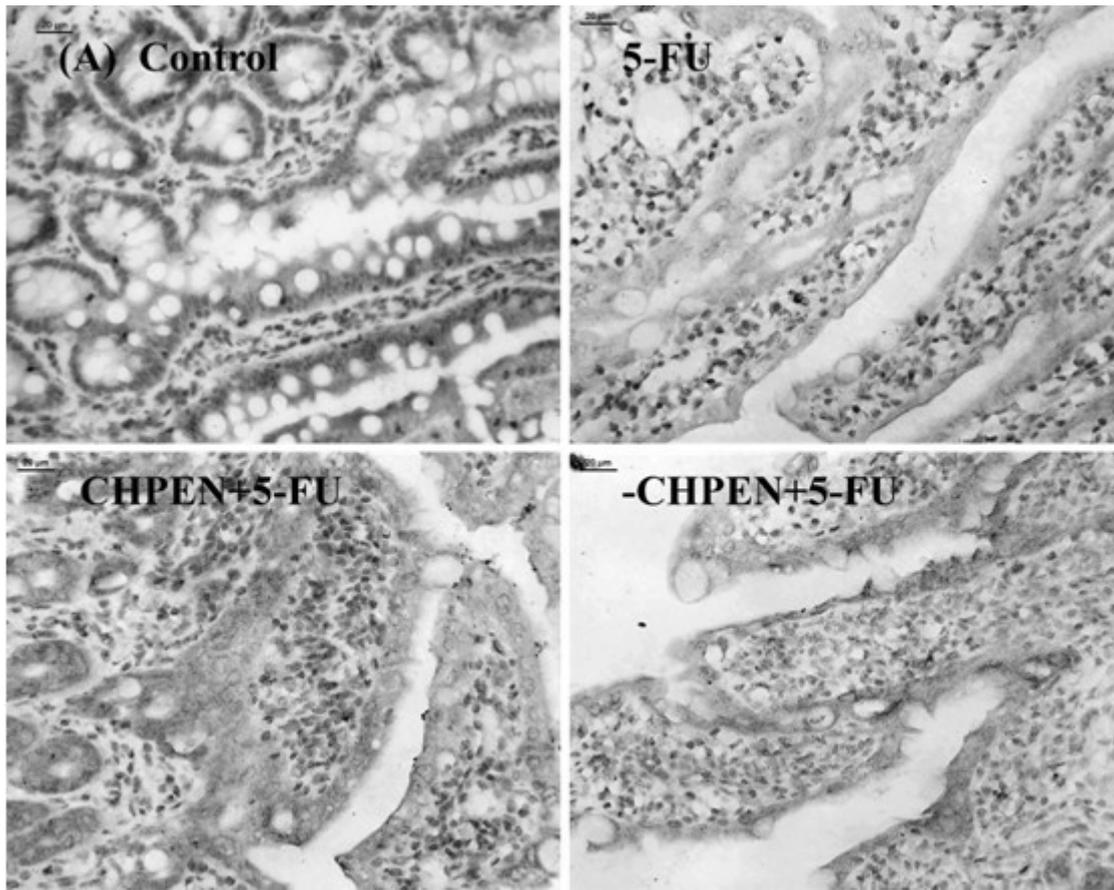


图 5