



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103153298 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201180045566. 0

A61K 31/195(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 09. 26

A61P 1/04(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/386, 317 2010. 09. 24 US

61/431, 629 2011. 01. 11 US

(56) 对比文件

CN 1422125 A, 2003. 06. 04, 权利要求 1-20,
实施例 1-2.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 03. 21

审查员 贺伊博

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/053265 2011. 09. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/040707 EN 2012. 03. 29

(73) 专利权人 佛罗里达大学研究基金会有限公
司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 萨达希瓦·维佳萨加尔

保罗·奥库尼夫 张鲁榕

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51) Int. Cl.

A61K 31/198(2006. 01)

权利要求书1页 说明书38页 附图22页

(54) 发明名称

用于改善胃肠功能的材料和方法

(57) 摘要

本发明提供了治疗组合物及其用于治疗或改
善小肠黏膜损伤的用途。在一些优选的实施方案
中,所述组合物包含一种或更多种获得或保持相
当大吸收能力的营养物和 / 或电解质。

1. 一种无菌的治疗组合物,其用于改善小肠健康,其中所述组合物配制为用于经肠施用,并且包含作为游离氨基酸的色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸和酪氨酸;以及水;并且其中所述组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺和甲硫氨酸,或者,如果存在这些成分,则葡萄糖以小于 1g/l 的浓度存在,谷氨酰胺以小于 300mg/l 的浓度存在,甲硫氨酸以小于 300mg/l 的浓度存在。

2. 根据权利要求 1 所述的治疗组合物,其中所述组合物的总摩尔渗透压浓度为 230mosm 至 280mosm。

3. 根据权利要求 2 所述的治疗组合物,其还包含天冬氨酸和 / 或异亮氨酸。

4. 根据权利要求 1 所述的治疗组合物,其中所述组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺和甲硫氨酸。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物还包含电解质、维生素、矿物质和 / 或矫味剂。

6. 权利要求 1 所述的组合物在制备用于治疗有绒毛萎缩之对象的药物中的用途,其中所述治疗包括通过经肠施用向所述对象施用权利要求 1 所述的组合物。

7. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述对象是人。

8. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述对象的绒毛区中小肠上皮细胞的总数目与正常相比减少至少 10%。

9. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述对象的小肠中绒毛的高度与正常相比损失至少 10%。

10. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺和甲硫氨酸,或者,如果存在这些成分中的一种或更多种,则葡萄糖以小于 1g/l 的浓度存在,谷氨酰胺以小于 300mg/l 的浓度存在,甲硫氨酸以小于 300mg/l 的浓度存在。

11. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述组合物还包含天冬氨酸和 / 或异亮氨酸。

12. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺和甲硫氨酸。

13. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述绒毛萎缩是由疾病、辐射、化学治疗、质子治疗、腹部手术和 / 或细胞毒性剂造成的。

14. 根据权利要求 13 所述的用途,其中在所述对象接受辐射、化学治疗、质子治疗或细胞毒性剂后施用所述组合物 1 至 14 天时间。

15. 根据权利要求 13 所述的用途,其中所述药物用于治疗放射性肠炎。

16. 根据权利要求 13 所述的用途,其用于治疗由化学治疗或选自以下的细胞毒性剂造成的小肠损伤:顺铂、5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、羟基脲、依托泊苷、阿糖胞苷、6- 巯嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、氟达拉滨、甲氨蝶呤、类固醇或其组合。

17. 根据权利要求 13 所述的用途,其中所述药物用于治疗炎性肠病 (IBD)、溃疡性结肠炎、十二指肠溃疡或克罗恩病。

18. 一种成套试剂,其包含权利要求 1 所述的组合物或当与水组合时形成权利要求 1 所述组合物的粉末,其中所述成套试剂还包含用于向有或预期发生绒毛萎缩之患者施用所述组合物的说明书。

用于改善胃肠功能的材料和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 9 月 24 日提交的序列号为 61/386,317 之美国临时申请和 2011 年 1 月 11 日提交的序列号 61/431,629 之美国临时申请的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明在由美国国立卫生研究院 (NIH) 授予的基金 N₀. RC2-AI-087580 的政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 辐射 (radiation) 是用于腹部和骨盆中恶性肿瘤的常用治疗,它可对由快速分裂的肠上皮细胞构成的胃肠 (GI) 道衬里 (lining) 造成严重损伤。辐射对胃肠系统的毒性作用引起症状如恶心、呕吐、腹泻、电解质失衡 (electrolyte imbalance) 和脱水,并且不利地影响患者在癌症治疗过程中的恢复。即便在低剂量下,辐照 (irradiation) 后数天内也观察到小肠绒毛和刷状缘的连续损失。虽然隐窝细胞 (crypt cell) 可在轻度至中度剂量的 (辐照) IR 之后快速地重新填充 (repopulate) 该区域,但是它们在高剂量的辐照后变得以对数速度损失。

[0006] 辐照对发生营养物和电解质吸收的绒毛上皮特别有破坏性。绒毛上皮经历连续的细胞损失和再生过程,其中持续供应的未成熟肠细胞 (源自位于利伯屈恩隐窝 (crypts of Lieberkuhn) 下极 (lower pole) 内的祖细胞) 从隐窝基底部的增殖区室 (proliferative compartment) 迁移到达绒毛的顶部。在它们短暂的寿命期间,这些肠细胞沿着隐窝 - 绒毛轴 (crypt-villous axis) 逐渐地成熟成为绒毛细胞。对腹部和骨盆区域进行的放射治疗不仅破坏现有的绒毛细胞,而且破坏形成新绒毛细胞的肠细胞,因此,即便在中等剂量下也可耗尽几乎整个绒毛上皮。

[0007] 由于越来越多地使用高的总放射剂量和细胞毒性剂,放射治疗因其急性 GI 毒性而复杂化。对 GI 道的损伤不仅导致营养物和流体的吸收不良和损失,而且破坏肠屏障功能。肠漏 (leaky gut) 允许病原体容易穿过黏膜屏障而进入,引起炎症、菌血症和内毒素血症。例如,虽然 GI 毒性通常在较高剂量下发生,但是在辐照后数天内可发生急性放射性肠炎、腹泻和腹痛,即便在低至 5 ~ 12Gy (辐射的常规分割过程使用每分割 1.8 ~ 2Gy) 的剂量下也是如此。慢性放射性肠炎可在放射治疗后的 18 个月至 6 年中发生,但它也可在甚至 15 年后发生^{27 29}。

[0008] 放射性肠炎的治疗选择是有限的。常规治疗方案包括:施用止泄剂以防止流体损失;施用蒙脱石 (smectite) 作为胆盐的吸附剂;施用阿片样物质以减轻胃痛或直肠痛,以及施用类固醇以减轻炎症。临床试验还研究了嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、蒙脱石或蔗糖铝 (sucralfate) 对腹泻预防的效力,但仅实现了急性 GI 症状的中度减轻³⁰。

[0009] 治疗放射性肠炎的常用方法是使用全肠胃外营养 (total parenteral nutrition, TPN) 以提供肠休息。但是,仍然需要确定肠胃外营养是否满足患者的营养需求,

或者实际上对放射性肠炎是否具有治疗效果。虽然 TPN 可纠正某些患者中的营养失衡,但是仍可发生严重的放射性肠炎³⁷。TPN 还引起肠萎缩,通常在施用的 48 小时之内。TPN 还削弱机械屏障和免疫屏障³⁸。

[0010] 认为在 TPN 过程中导致黏膜萎缩的准确生物学机制(尚未确立)涉及局部营养-感知细胞信号³⁹和体液信号(例如胃肠激素)^{40,41}这二者。已显示 TPN 诱导肠血流量迅速(< 8h)降低(这先于绒毛萎缩)以及在 24 小时抑制蛋白质合成和在 48 小时抑制细胞增殖和存活⁴²。相反,经口饲喂迅速地提高新生动物和成熟动物中的肠血流量^{43,44}。类似地,在新生小猪中,肠内饲喂(enteral feeding)几乎立即(在 1 至 3 小时之内)使门静脉血流量(portal blood flow, PBF)提高至比食物剥夺小猪中的值高 50%⁴⁵。因此,如多个研究所示,肠内饲喂远优于肠胃外饲喂^{7,8}。

[0011] 目前,缺少可有效地缓解放射性肠炎的营养治疗。虽然早期研究表明,要素饮食(elemental diet)或特定排除饮食(specific exclusion diet)可在选定的情况下有益^{2,31,32},但是后来,该方法的效力并未得到证实。现有饮食治疗仅为患有慢性放射性肠炎的营养不良患者提供营养支持方法。

[0012] 动物研究证实,谷氨酰胺保护上 GI 道和下 GI 道二者的黏膜不受由化学治疗或放射治疗(RT)引起的损伤³³⁻³⁵。但是,临床试验未能示出经口谷氨酰胺饲喂可在接受了骨盆放射治疗的患者中预防或缓解急性腹泻³⁶。因此,需要开发用于治疗辐照诱导之 GI 损伤的改进的饲喂组合物。如将通过以下公开内容而显而易见的那样,本发明提供了这些和另一些益处。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了用于改善小肠功能的治疗组合物和方法。本发明组合物可用于治疗或改善与小肠上皮细胞(特别是在绒毛区和刷状缘中)损失相关的胃肠损伤,和/或用于治疗或改善与小肠的吸收能力改变相关的疾病或病症。

[0015] 有利地,可将本发明治疗组合物定制为适于由小肠上皮细胞的损失和小肠中转运蛋白功能的改变引起的胃肠系统的失衡吸收状态。在一个优选实施方案中,将本发明组合物配制为用于经口施用。

[0016] 在一个实施方案中,治疗组合物包含以下、基本由以下组成或者由以下组成:选自赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸中一种或更多种的游离氨基酸;以及任选的可药用载体、电解质、维生素、缓冲剂和矫味剂(flavoring agent)。治疗组合物通过肠内途径施用。在一个实施方案中,组合物的总摩尔渗透压浓度(osmolality)为约 230mosm 至 280mosm,或者优选为约 250mosm 至 260mosm。在一个实施方案中,组合物的 pH 为约 7.1 至 7.9,优选为约 7.4。

[0017] 在一个具体的实施方案中,本发明的组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺、甲硫氨酸和/或乳糖。

[0018] 还提供了用于治疗或改善与小肠上皮细胞(特别是绒毛区和刷状缘中)损失相关之疾病或症状,和与小肠上皮中转运蛋白功能改变相关之疾病或症状的方法。所述方法包括通过肠内途径向有此治疗需要的对象施用有效量的本发明组合物。优选地,本发明组合物经口施用并且到达对象的肠。

[0019] 本发明还提供了用于制备治疗组合物的方法,和用于通过选择在小肠上皮细胞破

坏之后保持或获得相当大吸收能力的营养物或电解质来筛选用于包含到本发明治疗 / 饮食组合物中的营养物或电解质的方法。这些方法可适用于个体患者,从而有助于开发特别设计以满足个体患者之需要的组合物和方法。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1 示出辐照 (IR) 对净阴离子分泌 (net anion secretion) (A) 和电导 (B) 的影响。(A). 在第 1、3 和 4 天研究 12Gy IR 组织。在第 2 天见到 I_{sc} 的最大升高。箭头表示添加毛喉素 (forskolin) 时的时间点。(B). 提高剂量的 IR 对净阴离子分泌的影响。在第 6 天研究所有这些组织,且 $n = 12$ 。结果示出电导的 IR 剂量依赖性升高。

[0022] 图 2 示出随着辐照剂量提高, I_{sc} 的变化。所有这些值得自 $n = 24$ 个组织。在辐照后第 4 天于常规林格液 (Ringer solution) 中进行实验,室两侧的总摩尔渗透压浓度为 296mosm。组织病理学切片示出,与 0Gy 相比,3Gy 时最小的绒毛和隐窝损伤和 7Gy 时广泛的绒毛和隐窝损伤。

[0023] 图 3A 示出以 3Gy 辐照后,小鼠上皮细胞中的 I_{sc} 随时间推移的变化。值表示平均值 $\pm$ S. E. M, $n = 6$ 个组织。在放射后第 6 天见到 I_{sc} 的最大升高。第 5、6 与 7 天之间未见显著性差异。随着时间 > 辐照后 7 天,与第 5、6 或 7 天相比, I_{sc} 稍微降低。第 5、6 和 7 天的 I_{sc} 值类似。图 3B 示出小肠上皮细胞的离子转运。图 3C 示出布美他尼 (bumetanide) 对未经辐照的组织 and 经 3Gy 辐照的组织中的基础的 I_{sc} 和 cAMP- 刺激的 I_{sc} 的影响。图 3D 示出 HCO_3^- 对净阴离子分泌的贡献。其通过用等摩尔量的羟乙基磺酸盐 (isethionate) 来替换林格液中的 Cl 来确定。毛喉素刺激了 0Gy (* : $p < 0.02$) 组织中 I_{sc} 的升高,但在 3Gy 组织中并非如此。图 3E 示出浴 (bath) Na^+ 对 HCO_3^- 分泌的影响。图 3 所示的所有结果来自 $n = 6$ 个组织。误差线表示 SEM。

[0024] 图 4A 示出 IR 后血浆内毒素水平的变化。在 IR 后第 6 天,测量血浆内毒素水平。图 4B 示出针对膜电压变化 (稀释电势, dilution potential) 绘出的 Cl 与 Na^+ 之间渗透性比值 (permeability ratio) 的变化。以 7Gy 辐照导致选择性的完全丧失。

[0025] 图 5 示出辐照使炎性介质 (包括 IL-1 β 、TNF α 和 MIP- α) 的水平升高。

[0026] 图 6 示出由辐照引起的 HCO_3^- 分泌的变化和 HCO_3^- 分泌机制的免疫染色。(A) 示出辐照对浴 Na^+ 对 HCO_3^- 分泌的影响。实验在 A) 具有 140mM Na^+ 的含 Cl 溶液或 B) 没有 Na^+ 的含 Cl 溶液中进行。用毛喉素刺激组织。比较经 0Gy 辐照的小鼠和经 3Gy 辐照的小鼠的 HCO_3^- 分泌。与经 3Gy 辐照的小鼠相比,在经 0Gy 辐照的小鼠中观察到了显著更高的浴 Na^+ 依赖性 HCO_3^- 分泌 ($p < 0.001$)。结果得自 $n = 6$ 个组织。误差线表示 S. E. M。(B-E) 示出使用 NBCe1a/b 抗体,接受了 0Gy 辐照和 3Gy 辐照的小鼠的空肠组织的免疫染色。

[0027] 图 7 示出葡萄糖转运和动力学的 IR 剂量依赖性变化。(A) 示出辐照导致在尤斯室 (Ussing chamber) 中测量的葡萄糖刺激的 Na^+I_{sc} 剂量依赖性地降低。(B) 示出随着辐照剂量提高,葡萄糖的 SGLT1 亲和力降低。

[0028] 图 8 示出从以 1Gy 辐照开始,辐照以剂量依赖的方式降低葡萄糖刺激的电流。以 7Gy 辐照几乎使葡萄糖转运完全失活。

[0029] 图 9 显示短路电流,示出随着葡萄糖浓度之升高的饱和和动力学。特别地,葡萄糖转运在浓度为 4mM 时饱和。图 9B 示出 K_m 值的辐照剂量依赖性升高。在 7Gy 时观察到 K_m 的最大升高。这表明辐照引起 SGLT-1 与葡萄糖的亲和力降低。

[0030] 图 10 示出 $V_{\max}$ 随辐照剂量升高而降低。在 7Gy 时观察到 $V_{\max}$ 的最小降低。这表明辐照引起用于葡萄糖转运的功能性 SGLT-1 减少。

[0031] 图 11 示出 K_m 随辐照后时间推移的变化。 K_m 在辐照后立即升高并在辐照后约 14 天恢复至正常（对照值）。

[0032] 图 12A 和 B 示出 9Gy 和 15.6Gy 辐照之后，鼠存活研究的结果。经葡萄糖处理的小鼠在第 5 和第 7 天开始发生死亡，而对照小鼠直至辐照后第 10 天才死亡。在第 20 天，30% 的对照小鼠活着，而经葡萄糖处理的小鼠在第 20 天均未存活。

[0033] 图 13 示出全细胞裂解物中 SGLT-1 蛋白水平的 Western 印迹分析。结果示出辐照提高了 SGLT-1 表达。

[0034] 图 14 示出空肠组织的刷状缘膜囊中 SGLT-1 蛋白水平的 Western 印迹分析。辐照以剂量依赖的方式提高了 SGLT-1 蛋白水平。在结肠组织中未检测到 SGLT-1 蛋白。

[0035] 图 15 示出辐照引起谷氨酰胺刺激的 I_{sc} 剂量依赖性地升高。

[0036] 图 16 示出辐照引起赖氨酸刺激的 I_{sc} 剂量依赖性地降低。

[0037] 图 17A 和 B 示出 IR 后赖氨酸 (A) 或葡萄糖 (B) 处理之后的小鼠存活率。施用赖氨酸导致升高的存活，而施用葡萄糖导致降低的存活。

[0038] 图 18 示出多种转运蛋白的 Western 印迹分析。Western 印迹分析示出小鼠空肠中的 NKCC1 (A)、CFTR (C) 和 NBCe1-A/B (B) 蛋白水平。从左到右，泳道表示 0Gy、1Gy、3Gy、5Gy 和 7Gy。从 1Gy 至 5Gy，辐照使 NKCC1 蛋白水平升高，这样的升高在 7Gy 时减小 (A)。辐照后，NBCe1-A/B 蛋白水平显著降低。与 0Gy 相比，以 3Gy 辐照后，空肠组织中 CFTR 蛋白水平显著升高 (C)。与十二指肠、回肠或结肠相比，空肠具有最高的 NBCe1-A/B 蛋白水平 (D)。在辐照后第 6 天收获组织用于 Western 印迹。

[0039] 图 19A 和 B 是 cAMP- 刺激的 (A) 和辐照诱导的 (B) 阴离子分泌的图解模式。

[0040] 图 20 示出经 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) (图 20A) 和顺铂 (图 20B) 处理的小鼠中小肠黏膜的损伤。(A) 示出注射了 5-FU 的小鼠中的 I_{sc} 变化。(B) 示出注射了顺铂的小鼠中的 I_{sc} 变化。

[0041] 图 21 示出施用本发明的治疗组合物提高了已接受 5-FU 的小鼠的小肠功能。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明提供了用于提高小肠功能的治疗组合物和方法。该组合物被配制为用于经肠施用 (enteral administration)。本发明的组合物和方法尤其可用于治疗或改善与小肠上皮细胞（特别是绒毛区和刷状缘中）的损失相关的胃肠损伤，和 / 或用于治疗与小肠上皮中转运蛋白功能的改变相关的疾病或病症。

[0044] 有利地，可将本发明治疗组合物定制为适于由小肠上皮细胞（特别是小肠绒毛区和刷状缘中）之损失及转运蛋白功能之改变引起的胃肠系统的失衡吸收状态。特别地，本发明可在有小肠黏膜损伤的患者中改善小肠黏膜愈合、恢复小肠功能、增强液体滞留、预防或缓解小肠萎缩，和 / 或恢复或增强小肠屏障功能。

[0045] 在一个实施方案中，治疗组合物包含以下、基本由以下组成或者由以下组成：选自赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸中的一种或更多种游离氨基酸；以及任选地，可药用载体、电解质、维生素、缓冲剂和矫味剂。治疗组合物通过经肠途径施用。在一个实施方案中，组合物的总摩尔渗透压浓度为约

230mosm 至 280mosm, 或者优选为约 250mosm 至 260mosm。在一个实施方案中, 组合物的 pH 为约 4.0 至 8.5, 优选为 5.0 至 8.2, 更优选为 6.0 至 8.0, 更优选为 7.1 至 7.9, 最优选为约 7.4。

[0046] 在一个具体的实施方案中, 本发明的组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺、甲硫氨酸和 / 或乳糖。

[0047] 还提供了用于治疗或改善与小肠上皮细胞 (特别是绒毛区和刷状缘中) 损失相关之疾病或病症和与小肠上皮中转运蛋白功能改变相关之疾病或病症的方法。该方法包括通过经肠途径向有此治疗需要的对象施用有效量的本发明组合物。

[0048] 本发明至少部分地基于这样的发现: 在小肠黏膜损伤之后, 仅以保持或获得充分吸收能力的营养物向对象进行经肠饲喂改善黏膜愈合、恢复小肠功能、增强流体潴留, 以及缓解一系列相关疾病症状, 所述症状包括但不限于吸收不良、腹泻、恶心、呕吐、电解质失衡和脱水。

[0049] 根据本发明, 已确定, 辐射和化学治疗之后, 参照例如葡萄糖、谷氨酰胺和赖氨酸以及电解质 (如 Na^+ 、 HCO_3^- 和 Cl^-) 观察到了转运蛋白功能的改变。此外, 辐照引起升高的净阴离子分泌。营养物和电解质吸收能力的改变在辐射和化学治疗后立即发生, 但吸收能力可恢复至正常 (在小鼠模型中, 辐照后约 8 至 14 天)。

[0050] 具体地, 辐照引起葡萄糖吸收辐照剂量依赖地降低, 这是由于钠依赖的葡萄糖转运系统 (SGLT-1) 对葡萄糖的亲合力下降。对葡萄糖刺激的功能性研究示出, 辐照引起葡萄糖转运活性剂量依赖性地下降以及 SGLT-1 对葡萄糖的亲合力下降。

[0051] 已知肠腔中未吸收营养物或溶质的存在可引起渗透性腹泻。根据本发明, 已发现对经辐照对象经口饲喂葡萄糖和 / 或谷氨酰胺引起渗透性腹泻和降低的存活, 而经口饲喂选自以下的每种氨基酸或其组合延长存活: 赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和 / 或丝氨酸。

[0052] 用于升高小肠功能的治疗组合物

[0053] 在一个方面, 本发明提供了用于提高小肠功能的治疗组合物。在一个实施方案中, 治疗组合物包含以下、基本由以下组成或者由以下组成: 选自赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸中的一种或更多种游离氨基酸; 以及任选地, 可药用载体、电解质、维生素、缓冲剂和矫味剂。治疗组合物通过经肠途径施用。

[0054] 优选地, 组合物是弱碱性的, 并且与小肠上皮细胞 (如小肠的绒毛细胞和隐窝细胞) 的渗透压相比是低渗的。优选地, 本发明组合物包含水。优选地, 将组合物配制为用于提高因绒毛上皮细胞的损失或损伤而被破坏之小肠功能的经口再水化饮品 (oral rehydration drink)。

[0055] 在一个实施方案中, 组合物的总摩尔渗透压浓度为约 230mosm 至 280mosm, 或者其间的任何值。优选地, 总摩尔渗透压浓度为约 250mosm 至 260mosm。在另一个实施方案中, 组合物的总摩尔渗透压浓度为低于 280mosm 的任何值。

[0056] 在一个实施方案中, 组合物的 pH 为约 7.1 至 7.9, 或其间的任何值。优选地, 组合物的 pH 为约 7.3 至 7.5, 更优选为约 7.4。

[0057] 在某些实施方案中, 各游离氨基酸可以 4mM 至 40mM 或其间任何值的浓度存在, 其

中组合物的总摩尔渗透压浓度为约 230mosm 至 280mosm。或者,如果基于 mg/l 计算氨基酸浓度,则各游离氨基酸可以 300mg/l 至 8000mg/L 或其间任何值的浓度存在,其中组合物的总摩尔渗透压浓度为约 240mosm 至 280mosm。

[0058] 在某些具体的实施方案中,治疗组合物包含以如下各浓度存在的一种或更多种游离氨基酸:浓度为约 730mg/l 至 6575mg/l 或其间任何值的赖氨酸;浓度为约 532mg/l 至 4792mg/l 或其间任何值的天冬氨酸;浓度为约 300mg/l 至 2703mg/l 或其间任何值的甘氨酸;浓度为约 525mg/l 至 4722mg/l 或其间任何值的异亮氨酸;浓度为约 476mg/l 至 4288mg/l 或其间任何值的苏氨酸;浓度为约 725mg/l 至 6523mg/l 或其间任何值的酪氨酸;浓度为约 469mg/l 至 4217mg/l 或其间任何值的缬氨酸;浓度为约 817mg/l 至 7352mg/l 或其间任何值的色氨酸;浓度为约 528mg/l 至 4756mg/l 或其间任何值的天冬酰胺;和 / 或浓度为约 420mg/l 至 3784mg/l 或其间任何值的丝氨酸;其中,组合物的总摩尔渗透压浓度为约 240mosm 至 280mosm。

[0059] 在一个实施方案中,本发明提供了包含以下组分的饮品:赖氨酸 (11mosm 至 21mosm)、天冬氨酸 (3mosm 至 13mosm)、甘氨酸 (19mosm 至 29mosm)、异亮氨酸 (19mosm 至 29mosm)、苏氨酸 (19mosm 至 29mosm)、酪氨酸 (0.5mosm 至 5mosm)、缬氨酸 (19mosm 至 29mosm)、色氨酸 (5mosm 至 20mosm)、天冬酰胺 (3mosm 至 13mosm) 和丝氨酸 (3mosm 至 8mosm) 或这些成分的子集 (subset)。

[0060] 在一个具体的实施方案中,组合物包含游离氨基酸形式的赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸和酪氨酸。在另一个具体实施方案中,组合物包含游离氨基酸形式的赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。

[0061] 在另一个实施方案中,组合物包含由选自以下的相同或不同氨基酸制成的一种或更多种二肽:赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺或丝氨酸。

[0062] 在一个实施方案中,组合物不包含谷氨酰胺和 / 或甲硫氨酸;以及可水解为谷氨酰胺和 / 或甲硫氨酸的任何二肽、寡肽或多肽或者蛋白质。

[0063] 在一个替选实施方案中,组合物可包含游离氨基酸谷氨酰胺,和任选地,一种或更多种含谷氨酰胺的二肽,其中游离氨基酸谷氨酰胺和含谷氨酰胺之二肽的总浓度为小于 300mg/l,或者低于 300mg/l 的任何浓度,例如 100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l 或 0.01mg/l。

[0064] 在另一个替选实施方案中,治疗组合物可包含游离氨基酸甲硫氨酸,和任选地,一种或更多种含甲硫氨酸的二肽,其中游离氨基酸甲硫氨酸和含甲硫氨酸之二肽的总浓度为小于 300mg/l,或者低于 300mg/l 的任何浓度,例如 100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l 或 0.01mg/l。

[0065] 在一个实施方案中,治疗组合物不包含任何糖类,所述糖类包括任何单糖、二糖、寡糖、多糖和碳水化合物。在一个具体的实施方案中,治疗组合物不包含葡萄糖,和 / 或可水解为葡萄糖的任何二糖、寡糖、多糖和碳水化合物。在一个具体的实施方案中,组合物不包含乳糖。在另一个具体的实施方案中,治疗组合物不包含果糖和 / 或半乳糖,和 / 或可水解为果糖和 / 或半乳糖的任何二糖、寡糖、多糖和碳水化合物。

[0066] 在一个替选实施方案中,治疗组合物可包含单糖葡萄糖,和任选地,一种或更多种

包含葡萄糖的二糖（乳糖除外），其中单糖葡萄糖和包含葡萄糖之二糖的总浓度为小于 3g/l，或低于 3g/l 的任何浓度，如 1g/l、500mg/l、300mg/l、100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l 或 0.01mg/l。

[0067] 在某些实施方案中，治疗组合物包含选自例如以下的一种或更多种电解质： Na^+ ； K^+ ； HCO_3^- ； CO_3^{2-} ； Ca^{2+} ； Mg^{2+} ； Fe^{2+} ； Cl^- ；磷酸根离子，如 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ；锌；碘；铜；铁；硒；铬；和钼。在一个替选实施方案中，组合物不包含 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 。在另一个替选实施方案中，组合物包含总浓度小于 5m_g/l 或者浓度低于 5m_g/l 的 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 。

[0068] 在另一个实施方案中，治疗组合物包含一种或更多种维生素，包括但不限于维生素 A、维生素 C、维生素 D（例如，维生素 D₁、D₂、D₃、D₄ 和 / 或 D₅）、维生素 E、维生素 B₁（硫胺素）、维生素 B₂（例如，核黄素）、维生素 B₃（例如，烟酸或烟酰胺）、维生素 B₅（泛酸）、维生素 B₆（吡多醇）、维生素 B₇（生物素）、维生素 B₉（例如，叶酸）、维生素 B₁₂（钴胺素）和维生素 K（例如，维生素 K₁、K₂、K₃、K₄ 和 K₅）和胆碱。

[0069] 在某些实施方案中，组合物不包含选自以下的一种或更多种成分：寡糖、多糖和碳水化合物；寡肽或多肽或蛋白质；脂质；小链、中链和 / 长链脂肪酸；和 / 或包含一种或更多种上述营养物的食物。

[0070] 在一个实施方案中，使用磷酸根离子（如 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ）来缓冲本发明的组合物。在一个实施方案中，治疗组合物使用 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 作为缓冲剂。在另一个实施方案中，治疗组合物不使用 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 作为缓冲剂。

[0071] 本文所使用的术语“基本由... 组成”将成分和步骤的范围限制为指定的材料或步骤以及不在本质上影响本发明的基本特征和新特征的那些，即，用于治疗小肠上皮（特别是绒毛区和刷状缘中）损伤的组合物和方法。例如，通过使用“基本由... 组成”，治疗组合物不包含任何未指定的成分，包括但不限于对小肠上皮（特别是绒毛区和刷状缘中）损伤的治疗具有直接的有利或不利治疗效果的游离氨基酸、二肽、寡肽或多肽或蛋白质以及单糖、二糖、寡糖、多糖和碳水化合物。此外，通过使用术语“基本由... 组成”，组合物可包含对小肠上皮损伤的治疗不具有治疗效果的物质；这样的成分包括载体、赋形剂、辅料（adjuvant）、矫味剂等，它们不影响被损伤小肠上皮（特别是绒毛区和刷状缘中）的健康或功能。

[0072] 本文所使用的术语“寡肽”是指由三至二十个氨基酸组成的肽。本文所使用的术语“寡糖”是指由三至二十个单糖组成的糖。

[0073] 在一个实施方案中，本发明的组合物包含与没有小肠上皮细胞（如绒毛细胞、隐窝细胞、肠细胞和肠祖细胞（intestinal progenitor cell））损伤的正常对照的吸收能力相比，在有小肠上皮细胞损伤的对象中保持或获得提高的吸收能力的营养物（如游离氨基酸）和 / 或电解质。

[0074] 在另一个实施方案中，本发明的组合物不包含不被吸收或者与没有小肠上皮细胞（如绒毛细胞、隐窝细胞、肠细胞和肠祖（progenitor）细胞）损伤的正常对照的吸收能力相比，在有小肠上皮细胞损伤的对象中具有降低之吸收的营养物（如氨基酸）和 / 或电解质。有利地，本发明的组合物有助于小肠容易地吸收营养物，以降低不适当的能量消耗，从而在黏膜损伤后即时提供肠休息。

[0075] 用于提高小肠功能的治疗方法

[0076] 本发明的另一方面提供了用于治疗或改善与小肠上皮细胞（特别是绒毛区和刷状缘中）的损失或损伤相关之疾病或病症的方法。在一个实施方案中，小肠上皮细胞的损失或损伤引起营养物、电解质和 / 或流体的吸收能力改变。有利地，针对有小肠上皮细胞损失或损伤的患者，特别是针对有小肠绒毛萎缩的患者，本发明改善小肠上皮黏膜愈合；提高小肠功能；增强小肠中营养物吸收和流体滞留；预防或缓解小肠萎缩；减轻腹部疼痛；预防和 / 或治疗腹泻；恢复或增强小肠屏障功能；和 / 或减轻小肠黏膜炎症、菌血症和 / 或内毒素血症。

[0077] 因此，本发明特别有利于改善以下对象的胃肠健康：接受了细胞毒性化学治疗剂、骨盆或腹部辐射、质子治疗和腹部手术的对象；患有与急性或慢性小肠炎症相关的感染或自身免疫疾病的对象；经常性地或者偶尔地暴露于辐射的对象，如经常性地暴露于空间辐射的宇航员和飞行员；以及由于核事故、战争行为或恐怖行为而暴露于辐射的对象。

[0078] 在一个实施方案中，该方法包括通过经肠途径向有此治疗需要的患者或对象施用有效量的本发明组合物。组合物可在损伤小肠上皮细胞之前即刻、期间和 / 或之后施用于患者或对象，并且每天可施用一次或多次。

[0079] 本文所使用的术语“对象”或“患者”描述了可向其提供用根据本发明的组合物进行治疗的生物（包括哺乳动物如灵长类动物）。可从所公开的治疗方法获益的哺乳动物物种包括但不限于：猿（ape）、黑猩猩、猩猩、人、猴；驯养动物（domesticated animal）如狗、猫；畜禽（live stock）如马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡；以及动物如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0080] 在一个具体的实施方案中，有治疗需要的对象是有小肠黏膜上皮细胞（包括十二指肠、空肠和回肠的黏膜层）损伤的患者。特别地，有治疗需要的对象是有小肠绒毛区和刷状缘损伤的患者。例如，有治疗需要的对象与正常相比有绒毛萎缩（例如，绒毛区和刷状缘的部分地或完全地日渐衰减（wasting away））；小肠中绒毛细胞减少至少 5%（如至少 10%、20%、30% 或 50%）；损失至少 5%（如至少 10%、20%、30% 或 50%）的绒毛高度；损失小肠的绒毛区和刷状缘中一种或更多种转运蛋白（transporter）的功能，其中转运蛋白包括但不限于 SGLT-1 转运蛋白、AE2 转运蛋白、NHE1 转运蛋白和 NBCe1-A/B 转运蛋白，其中转运蛋白功能的损失为至少 5%（如至少 10%、20%、30% 或 50%）；和 / 或小肠中一种或更多种营养物的吸收能力变化，其中所述营养物选自：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、组氨酸、酪氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、葡萄糖、果糖和 / 或乳糖，其中吸收能力的变化为至少 5%（如至少 10%、20%、30% 或 50%）。

[0081] 例如，可通过如本文的“材料和方法”部分所述使用尤斯室来确定小肠的吸收能力。例如，可通过例如测量指标（包括，例如 K_m 、 V_{max} 和 I_{sc} ）的组合来确定吸收状态的变化。可通过例如对小肠黏膜的生物活检样本的检查来确定小肠的绒毛区和其他区的损伤。

[0082] 熟练的医师可容易地确定造成小肠黏膜上皮细胞（如小肠绒毛细胞）损伤的疾病和治疗方法。如在医疗职业中公知的，患有某些疾病（如炎症肠病（IBD）、溃疡性结肠炎、十二指肠溃疡和克罗恩病（Crohn's disease））的患者遭受小肠黏膜的慢性破坏。放射治疗、化学治疗和质子治疗也引起小肠细胞的损伤。

[0083] 本文所使用的术语“治疗”或其任何语法变化形式包括但不限于缓解疾病或病症的症状；和 / 或减轻、压制、抑制、降低或影响疾病或病症的进程、严重程度和 / 或范围。

[0084] 本文所使用的术语“改善”或其任何语法变化形式包括但不限于延迟发病,或者降低疾病或病症(例如,腹泻,菌血症和/或内毒素血症)的严重程度。本文所使用的改善不要求症状完全不存在。

[0085] 本文所使用的术语“有效量”是指能够治疗或改善疾病或病症或者能够产生预期治疗效果的量。

[0086] 在一个具体的实施方案中,本发明提供了用于促进有小肠上皮细胞损伤之对象的肠健康的方法,其中所述方法包括:鉴定有小肠上皮细胞损伤,或者将遭受这样的损伤以及需要治疗或改善的对象,并且通过经肠途径向对象施用有效量的包含以下、基本由以下组成或者由以下组成的组合物:选自赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸中的一种或更多种游离氨基酸;水;以及任选地,可治疗用载体、电解质、维生素、缓冲剂和矫味剂,其中组合物的总摩尔渗透压浓度为 240mosm 至 280mosm, pH 为约 7.1 至 7.9。

[0087] 在一个实施方案中,未通过经肠途径向有(或者即将有)小肠上皮细胞损伤的对象施用一种或更多种以下营养物,其中所述营养物选自:谷氨酰胺、甲硫氨酸、和可水解为谷氨酰胺和/或甲硫氨酸的任何二肽、寡肽或多肽或蛋白质;葡萄糖和可水解为葡萄糖的任何二糖、寡糖、多糖和碳水化合物;和/或消化后需要在小肠中吸收任何上述营养物的食物。

[0088] 在另一个实施方案中,对于有(或即将有)小肠上皮细胞损伤的对象而言,未通过经肠途径施用以下营养物,其中所述营养物选自:糖类、脂质、脂肪酸和/或消化后需要在小肠中吸收任何上述营养物的食物。对于暴露于辐射或者接受放射治疗、化学治疗和质子治疗的患者而言,小肠上皮细胞的损伤通常持续至少 3、7、14、21、30 天或者 1 至 30 天之间的任何时间。

[0089] 在另一个实施方案中,在 1 至 30 天之间的任何时间(如 3、7、14、21、30 天)之后,因为对象暴露于辐照或者接受放射治疗、化学治疗和/或质子治疗,所以通过经肠途径施用一种或更多种以下营养物以增强黏膜愈合,其中所述营养物选自:谷氨酰胺、甲硫氨酸和可水解为谷氨酰胺和/或甲硫氨酸的任何二肽、寡肽或多肽或蛋白质;葡萄糖和可水解为葡萄糖的任何二糖、寡糖、多糖和碳水化合物;和/或消化后需要在小肠中吸收任何上述营养物的食物。

[0090] 在一个具体的实施方案中,本发明组合物经口施用并且达到对象的小肠。任选地,该方法还包括通过肠胃外途径施用未以充分量通过经肠途径施用的所需营养物和电解质。

[0091] 在一个实施方案中,本发明未用于向对象提供显著量的或者全部的必需营养物,但用于改善小肠黏膜愈合、恢复小肠功能、增强流体滞留、预防或缓解小肠绒毛萎缩、预防和/或治疗腹泻,和/或恢复或增强肠屏障功能。在一个具体的实施方案中,饮品组合物也基于屏障功能的提高。屏障功能可通过使用多种技术来确定,包括:a) 对安放在尤斯室中组织的电导测量结果升高,b) 用于测量 Cl 和 Na 的相对渗透性 (PCl/PNa) 的稀释电势(只有完整的和功能性的屏障可保持离子选择性;当失去屏障功能时,离子选择比值接近于 1),以及 c) 测量血浆内毒素水平。当失去黏膜屏障功能时,共生的肠道细菌可找到进入体循环的途径,导致升高的血浆内毒素水平。可测量患者血液样本中的内毒素水平。血浆内毒素水平还可用作测量治疗改善的指标。

[0092] 本发明的组合物可用于治疗或改善与小肠上皮细胞的损失、破坏或减少（特别是小肠的绒毛细胞、肠细胞和 / 或肠祖细胞的功能或数目的损失、破坏或减少）相关的任何疾病或病症。本发明尤其可用于治疗或改善与小肠上皮细胞中的转运蛋白（特别是小肠绒毛细胞中的转运蛋白）的损失、失活或功能改变相关的任何疾病或病症。

[0093] 在一个实施方案中，本发明的组合物和方法可用于治疗或改善产生自以下或者与以下相关的疾病或病症：钠依赖的葡萄糖转运系统（SGLT-1）对葡萄糖的亲合力下降； NH_2^- 末端产电 $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 协同转运蛋白（NBCe1-A/B）的损失或活性下降；顶端 $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ 交换转运蛋白（AE1）的损失或活性下降；和 / 或 CFTR 和 / 或 NKCC-1 转运蛋白系统的水平或活性升高。

[0094] 在一个特别优选的实施方案中，本发明的组合物和方法可用于治疗或改善由辐射引起的小肠损伤。在一个具体的实施方案中，本发明可用于治疗或改善由放射治疗（特别是骨盆和腹部放射治疗）引起的小肠损伤。在一个具体的实施方案中，辐照治疗用于癌症治疗。

[0095] 此外，本发明可用于治疗或改善由经常性辐射暴露（如宇航员和飞行员暴露于空间辐射，如由放射性武器和意外核泄露引起的辐射暴露）引起的小肠损伤。具体地，本发明可用于治疗或改善急性和 / 或慢性放射性肠炎。

[0096] 在某些具体的实施方案中，本发明的组合物和方法可用于治疗或改善小肠损伤，其中患者接受了以下辐射：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20Gy。在另一个实施方案中，对象接受了剂量高于 20Gy 的辐射。

[0097] 此外，本发明可用于治疗或改善由化学治疗剂引起的小肠损伤，所述化学治疗剂包括但不限于：顺铂、5- 氟尿嘧啶（5-FU）、羟基脲、依托泊苷、阿糖胞苷（arabinoside）、6- 巯嘌呤、6- 巯鸟嘌呤、氟达拉滨、甲氨蝶呤、类固醇和 / 或其组合。

[0098] 此外，本发明可用于治疗或改善由质子治疗引起的小肠损伤。

[0099] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗或改善涉及小肠损伤的疾病，包括但不限于炎性肠病（IBD）、溃疡性结肠炎、十二指肠溃疡、克罗恩病、和 / 或乳糜泻（还称为腹腔疾病）。本发明可用于治疗或改善由病原性感染（如病毒、细菌、真菌或其他微生物感染）引起的小肠损伤。

[0100] 在一个具体的实施方案中，本发明可用于治疗或改善小肠绒毛萎缩，即，绒毛区和刷状缘的部分地或完全地日渐衰减，以及产生自小肠绒毛萎缩、与小肠绒毛萎缩相关和 / 或由小肠绒毛萎缩引起的疾病和病症。

[0101] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗或改善局灶性绒毛萎缩和 / 或弥漫性绒毛萎缩；增生性绒毛萎缩和 / 或发育不良性绒毛萎缩；和 / 或有和没有黏膜炎症的绒毛萎缩。

[0102] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗或改善增生性绒毛萎缩（有隐窝增生）和相关疾病和病症，包括但不限于乳糜泻（有面筋（gluten）敏感性肠病）；慢性创伤；小肠移植；尿回肠导管；肠黏膜炎症；肠溃疡；肠吻合；胰高血糖素瘤；广泛性小肠切除；原发性回肠绒毛萎缩；显微镜结肠炎（microscopic colitis）萎缩；肠微绒毛萎缩；和线粒体细胞病（线粒体呼吸链异常）。

[0103] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗或改善发育不良性绒毛萎缩（没有隐窝增生）和相关疾病或病症，包括但不限于：恶性肿瘤；帕内特细胞缺陷（paneth cell

deficiency); 垂体功能减退; 对无面筋饮食不响应的乳糜泄; 热带口炎性腹泻 (tropical sprue); 辐射相关的局部缺血; 药物诱导的绒毛萎缩, 如由新霉素和硫唑嘌呤诱导的绒毛萎缩。

[0104] 在某些实施方案中, 本发明可用于治疗或改善有黏膜炎症的绒毛萎缩以及相关的疾病和病症, 包括但不限于: 乳糜泄; 严重的食物不耐受 (alimentary intolerance); 先天性克罗恩病; 自身免疫性肠病; 小肠结肠炎; 和免疫缺陷综合征。

[0105] 在某些实施方案中, 本发明可用于治疗或改善由包括但不限于以下的疾病引起的绒毛萎缩: 肝炎; 肠癌; 肠淋巴瘤; 1 型糖尿病; 变态反应; 嗜酸性细胞性胃肠炎 (eosinophilic gastroenteritis); 病毒性胃肠炎; 以及自身免疫性肠病。

[0106] 在某些实施方案中, 本发明可用于治疗或改善与小肠中与乳糜泄相关的绒毛萎缩, 包括但不限于 Marsh3a 型绒毛萎缩 (每 100 个肠细胞 > 40 个上皮内淋巴细胞)、Marsh3b 型绒毛萎缩 (每 100 个肠细胞 > 40 个上皮内淋巴细胞; 显著的绒毛萎缩)、Marsh3c 型绒毛萎缩 (每 100 个肠细胞 > 40 个上皮淋巴细胞, 绒毛区不存在或几乎不存在) (基于乳糜泄和肠绒毛萎缩的经修改的 Marsh 分类)。

[0107] 本发明还可用于治疗或改善与小肠损伤相关的症状, 包括但不限于吸收不良、腹泻、恶心、呕吐、电解质失衡、吸收不良和脱水。

[0108] 制备用于提高小肠功能的治疗组合物

[0109] 在另一方面, 提供了用于制备本发明治疗组合物的方法。在一个实施方案中, 该方法包括制备用于促进有小肠上皮细胞损失或损伤之对象的肠健康的组合物, 其中所述组合物包含以下、基本由以下组成或者由以下组成: 有效量的一种或更多种成分, 其中这些成分被有小肠上皮细胞损失或损伤的对象的小肠吸收, 其中该组合物的总摩尔渗透压浓度为 230mosm 至 280mosm, 或其间的任何值 (优选为约 250mosm 至 260mosm), 其中该组合物的 pH 为约 7.1 至 7.9 或其间的任何值 (优选为约 7.4), 其中该组合物被配制为用于经肠施用。

[0110] 在一个实施方案中, 成分选自: 游离氨基酸、二肽、单糖、二糖或其组合, 以及任选地, 电解质、维生素、矫味剂和 / 或载体。

[0111] 在一个实施方案中, 本发明提供了通过筛选在绒毛和隐窝区的小肠上皮细胞破坏之后保持或获得吸收能力的营养物或电解质, 筛选用于包含进本发明治疗组合物之营养物或电解质的方法。

[0112] 本发明的筛选方法可用于确定可用于治疗或改善与小肠上皮细胞的损失、破坏或减少 (特别是绒毛细胞、肠细胞和 / 或肠祖细胞的损失、破坏或减少) 相关的疾病或病症的治疗营养物和 / 或电解质。在一些具体的实施方案中, 该方法可用于设计用以满足特定患者或患者群体之需求的组合物和方法。在一个具体的实施方案中, 本发明组合物可用于治疗或改善放射治疗、化学治疗治疗、质子治疗之后的或者由小肠的急性或慢性炎症引起的小肠损伤。

[0113] 在一个实施方案中, 本发明筛选方法包括:

[0114] a) 使有黏膜损伤的小肠上皮组织与候选营养物或电解质相接触;

[0115] b) 确定小肠上皮组织吸收所述营养物或电解质的能力水平;

[0116] c) 将所述水平与预定水平 (如正常组织中) 进行比较; 以及

[0117] d) 如果候选营养物或电解质的吸收能力是预定水平的至少例如 50%、60%、

70%、80%或90%，则选择该候选营养物或电解质。

[0118] 在一个实施方案中，本发明筛选方法包括：

[0119] a) 通过经肠途径向有小肠黏膜损伤的对象施用候选营养物或电解质；

[0120] b) 确定所述营养物或电解质的肠吸收能力水平；

[0121] c) 将所述水平与预定水平（如正常对象中）进行比较；以及

[0122] d) 如果候选营养物或电解质的吸收水平是预定水平的至少例如50%、60%、70%、80%或90%，则选择该候选营养物或电解质。

[0123] 可根据指标（包括，例如 K_m 、 V_{max} 和 I_{sc} ）的组合来确定吸收能力的水平。

[0124] 本领域技术人员可建立预定参考值。例如，可通过测量没有黏膜（如绒毛细胞、隐窝细胞、肠细胞和肠祖细胞）损伤的正常小肠上皮组织中的所述营养物或电解质的吸收能力水平来建立预定的参考值。在另一情况下，可通过测量没有小肠上皮细胞（如绒毛细胞、隐窝细胞、肠细胞和肠祖细胞）损伤的正常群体中的所述营养物或电解质的吸收能力水平来建立预定参考值。

[0125] 在另一个实施方案中，本发明筛选方法包括：

[0126] a) 确定有黏膜损伤的小肠组织的功能；

[0127] b) 使候选营养物或电解质与小肠组织相接触；

[0128] c) 确定小肠组织与候选营养物或电解质接触后小肠组织的功能；以及

[0129] d) 如果所述候选营养物或电解质提高了小肠功能，则选择该候选营养物或电解质。

[0130] 在另一个实施方案中，本发明筛选方法包括：

[0131] a) 确定有小肠黏膜损伤的对象的小肠功能；

[0132] b) 通过经肠途径向对象施用候选营养物或电解质；

[0133] c) 确定施用候选营养物后对象的小肠功能；以及

[0134] d) 如果所述候选营养物或电解质提高了小肠功能，则选择该候选营养物或电解质。

[0135] 在某些实施方案中，如果候选营养物或电解质的施用使细胞旁通透性（paracellular permeability）下降、增强了小肠屏障功能，则小肠功能得到了提高。此外，如果候选营养物或电解质的经肠施用预防或治疗了腹泻和/或延长了存活，则小肠功能得到了提高。

[0136] 在某些实施方案中，可使用如实施例（特别是实施例15至17）中所说明的方法来选择提高了有小肠黏膜损伤之对象的小肠功能的营养物和电解质。

[0137] 合适的候选电解质包括例如 Na^+ 、 K^+ 、 HCO_3^- 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和/或 Zn^{2+} 。

[0138] 合适的候选营养物包括选自例如以下的必需氨基酸和非必需氨基酸：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、组氨酸、酪氨酸、硒半胱氨酸（selenocysteine）、丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺和吡咯赖氨酸。合适的候选营养物还可包括脂肪酸、糖类（例如，单糖、二糖和寡糖）、电解质和维生素。

[0139] 候选营养物还可包括非天然氨基酸，如鸟氨酸、瓜氨酸、羟脯氨酸、高丝氨酸（homoserine）、苯甘氨酸、牛磺酸、碘化酪氨酸、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨

基丁酸、2-氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 ϵ -氨基己酸、6-氨基己酸、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、正亮氨酸 (norleucine)、正缬氨酸 (norvaline)、肌氨酸 (sarcosine)、高瓜氨酸 (homocitrulline)、磺基丙氨酸 (cysteic acid)、 τ -丁基甘氨酸、 τ -丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸和 β -丙氨酸。

[0140] 在另一个实施方案中,营养物和电解物的选择还至少部分取决于对象所接受的 IR 剂量、辐射源、被辐照的身体部分、和 / 或辐射后的时间 ; 化学治疗剂的类型、剂量、和 / 或化学治疗后的时间 ; 以及对象所接受的质子治疗的剂量,和 / 或质子治疗后的时间。

[0141] 本发明筛选测定可采用本领域中公知的技术组合来进行,包括但不限于尤斯室研究、细胞学、免疫组化、Western 印迹、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、聚合酶链反应 (PCR)、离子通量实验 (ion flux experiment)、免疫沉淀、免疫荧光、放射免疫测定和免疫细胞化学。

[0142] 具体地,成分可根据成分被患者小肠黏膜吸收的能力 (如通过原位或分离的肠制备物确定的) 来选择,采用技术如尤斯室来测量小肠对此类成分的吸收能力。

[0143] 制剂和施用

[0144] 本发明提供了包含治疗有效量的本发明组合物和任选的可药用载体的治疗组合物或药物组合物。这样的药用载体可以是无菌液体,例如水。治疗组合物还可包含不影响受损伤小肠上皮 (特别是绒毛区和刷状缘中) 之健康或功能的赋形剂、辅料、矫味剂等。在一个实施方案中,治疗组合物和其中所包含的全部成分都是无菌的。

[0145] 术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、辅料、赋形剂或载剂。合适的药用载体的实例描述于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。这样的组合物包含治疗有效量的治疗组合物,以及合适量的载体以向患者提供适当的施用形式。制剂应当适合经肠施用模式。

[0146] 本发明还提供了药物包 (pharmaceutical pack) 或药盒 (kit),其包括填充有一种或更多种成分 (例如,本发明的化合物、载体或药物组合物) 的一个或更多个容器。

[0147] 在一个实施方案中,药物包或药盒还包括施用说明书,例如,关于有效治疗剂量,和 / 或参考例如暴露于辐射、化学治疗或质子治疗后之时间的施用时间。在一个实施方案中,组合物的治疗剂量根据小肠黏膜的损伤程度来确定。例如,对于接受了或者即将接受辐射的对象,组合物的治疗剂量根据辐射源、被辐照的身体部分和 / 或辐射后的时间来确定。对于接受了或者即将接受化学治疗的对象,组合物的治疗剂量根据化学治疗剂的类型、化学治疗剂的剂量和 / 或化学治疗后的时间来确定。对于接受了或者即将接受质子治疗的对象,组合物的治疗剂量根据对象所接受的质子治疗的剂量和 / 或质子治疗后的时间来确定。

[0148] 材料和方法

[0149] 实验动物

[0150] 为了研究活性 HCO_3 分泌,从国家癌症研究所 (National Cancer Institute) 获得 8 周龄的、未经辐照和经辐照的雄性 BALB/c 小鼠。将小鼠随机分组,使用以 1.84Gy/ 分钟递送 γ -辐照的 ^{137}Cs 源,根据胃肠急性放射综合征 (gastrointestinal acute radiation syndrome, GI ARS) 模型以 Shepherd Mark-I 辐照腹部。辐射以单分割 (single fraction) 给出。在骨盆或腹部肿瘤的放射治疗期间,GIARS 模型将实现肠组织的最大辐射损伤,并模拟肠损伤。

[0151] 检查作为辐射后的时间和辐射剂量升高二者之函数的短路电流 (short circuit current, I_{sc}) 的变化以确定产生显著的 I_{sc} 变化所需的最早时间和最小辐射剂量。这些研究经罗切斯特大学动物管理与使用委员会 (UniVersity of Rochester Animal Care and Use Committee) 批准。

[0152] 离子通量研究

[0153] 放血 (exsanguination) 之后, 通过排除邻近盲肠的小肠远端的 12cm 而得到空肠段。在从下面的肌肉层剥离黏膜之前, 在冰冷的林格液中清洗和冲洗该段 (Zhang, Ameen 等. 2007)。将黏膜安放在面积为 0.30cm^2 的尤斯型璐彩特 (Lucite) 室 (P2304, Physiologic instruments, San Diego, CA92128USA) 的两半之间, 使用电压 / 电流钳装置 (VCC MC-8, Physiologic instruments, San Diego, CA92128USA) 记录电参数 (Vidyasagar 等. 2005; Vidyasagar 等. 2004; Zhang 等. 2007; Vidyasagar 和 Ramakrishna 2002)。在包含 8mM 的谷氨酰胺且用 95% 氧气 (O_2) 与 5% 二氧化碳 (CO_2) 之混合物充气的常规林格液 (表 1) 中沐浴 (bathed) 肠制备物的两边。

[0154] 表 1. 溶液的组成

[0155]

离子组成	常规林格液	不含 HCO_3^-	不含 Na^+ 的溶液	不含 Cl^- 的溶液	不含 HCO_3^- (UB)	不含 HCO_3^- 和 Cl^- (UB)
Na^+	140	140	-	140	140	140
Cl^-	119.8	119.8	119.8	-	119.8	-
K^+	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
HCO_3^-	25	-	25	25	-	-
HPO_4^-	2.4	2.4	2.4	2.4	-	-
$H_2PO_4^-$	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-
Ca^{2+}	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Mg^{2+}	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
SO_4^{2-}	-	-	-	1.2	2.4	2.4
葡萄糖酸盐	-	-	-	-	-	-
环酰胺 (cyclamide)	-	-	-	1.2	0.4	5.2
羧乙磺酸盐	-	25	-	115	25	140
NMDG	-	-	140	-	-	-
HEPES	-	-	-	-	0.1	0.1

[0156] 注释: 值以 mM 计。离子溶液用于离子置换实验。所有溶液的 pH 均为 7.4。

[0157] 在不含 Cl^- 的溶液中, 使用 H_2SO_4 将 pH 调节至 7.4,

[0158] 而在所有其他溶液中, 使用 HCl 进行调节。

[0159] 缩略语: UB, 未缓冲的溶液

[0160] HCO_3^- 运动的测量

[0161] 使用双 - 滴定管 (bi-burette) TIM856 (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne, France) 来测量剥离的空肠片中的 HCO_3^- 分泌 (Vidyasagar 等. 2005; Vidyasagar 等. 2004; Zhang 等. 2007)。通过添加 $0.01\mu l$ 的 0.025M 硫酸 (H_2SO_4), 自动化泵使腔溶液的 pH 保持恒定。通过向包含升高浓度的 HCO_3^- 的弱缓冲溶液中添加已知量的 H_2SO_4 来建立标准至稳定 (standard-to-stat) pH 校准以产生线性滴定曲线。

[0162] 将空肠组织的浴侧 (浆膜侧) 暴露于缓冲溶液, 而腔侧暴露于不含 HCO_3^- 的低缓

冲溶液 (0.1-mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸) 缓冲剂, pH7.4)。HCO₃ 分泌相当于添加到腔溶液中用以将 pH 保持在 7.4 (或稳定 pH) 之酸的量。所有这些实验均在电压钳条件下进行。不含的 HCO₃ 的溶液用 100% O₂ 充气, 含 HCO₃ 的溶液用 95% O₂ 和 5% CO₂ 充气。HCO₃ 分泌表示为 $\mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Vidyasagar 等. 2005; Vidyasagar 等 2004; Zhang 等. 2007)。

[0163] 在组织安放好之后, 在开始不存在浴 HCO₃ 时, 存在 HCO₃ 分泌, 但在 20 至 30 分钟之内迅速降至 0。如果在滴定期间不存在浴 HCO₃, 则 HCO₃ 分泌依然接近 0。浴溶液中 HCO₃ 的存在导致 HCO₃ 分泌迅速升高, 其在至少 2 小时中保持恒定 (Vidyasagar 等. 2005; Vidyasagar 等. 2004; Zhang 等. 2007)。当将抑制剂添加到黏膜溶液中时, 调节 pH, 并使之平衡 30 分钟, 直至观察到稳定速率的 HCO₃ 分泌。当将抑制剂添加到浴侧 (bath side) 时, 同样将组织平衡 30 分钟以达到稳定速率的 HCO₃ 分泌 (参见表 3)。

[0164] 所有实验均在起始的 1 小时稳定态期间进行。使用来自每只动物的 1 个组织来进行每个实验; 对于各组织样本, 只研究 1 个实验条件。所有实验均重复至少 4 次。

[0165] 免疫组化

[0166] 使用抗 NBCe1-A/B 抗体 (Bevensee, Schmitt 等. 2000) 对来自未经辐照和经辐照小鼠二者的冷冻组织切片进行免疫荧光染色。NBCe1-A/B 是针对碳酸氢钠协同转运蛋白 (NBCe1-A 和 NBCe1-B) 二者共有的羧基末端产生的多克隆抗体。在辐照后第 6 天完成免疫染色操作。在冰冷的常规林格液中清洗分离的组织, 包埋于冰冻切片包埋介质中, 并置于液氮中; 在低温恒温器 (cryostat) 中制作 6- μm 切片。

[0167] Western 印迹研究

[0168] 从未经辐照和经辐照小鼠的黏膜碎屑制备空肠裂解物。通过 Western 印迹 (Bevensee 等. 2000) 分析组织的 NKCC1 (Santa Cruz CA, USA)、NBCe1-A/B (Mark Daniel Parker, Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, OH) 和囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) (Santa Cruz CA, USA) 蛋白表达。

[0169] 在 pH 为 7.4 的包含 25-mM HEPES、10% 甘油和含有蛋白酶抑制剂混合物 (10mM 碘乙酰胺、1mM 苯甲基磺酰氟和 2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 亮抑酶肽) 之 1% Triton X-100 (聚乙二醇对-(1, 1, 3, 3-四甲基丁基)-苯基醚) 的三酰甘油水解酶缓冲液中裂解黏膜碎屑 (除非另有说明, 否则所有化学品均获自 Sigma-Aldrich Co., USA)。蛋白质浓度使用 Bradford 测定来确定。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 来分析来自经辐照和未经辐照样本的蛋白质的等效负荷。使用亲和纯化多克隆抗体来检测 NKCC1、NBCe1-A/B 和 CFTR 蛋白。

[0170] 统计

[0171] 结果表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误。在 2 个步骤中进行统计分析: 1) 使用方差分析 (ANOVA) (或其非参数等同形式 Kruskal-Wallis) 来检验总体差异; 和 2) 计算 Bonferroni 校正的 P 值用于全部成对比较。

实施例

[0172] 以下是举例说明用于实施本发明之方法的实施例。这些实施例不应当解释为限制。除非另有指明, 否则所有百分比按重量计, 并且所有溶剂混合物比例按体积计。

[0173] 实施例 1- 辐照使净阴离子分泌升高

[0174] 该实施例示出, 辐照使净阴离子分泌升高, 并且引起绒毛上皮细胞与隐窝细胞相比更大的损失。具体地, 从接受了 12Gy 辐照的小鼠得到小肠上皮组织, 采用尤斯室研究来检查阴离子分泌。在第 1、2、3 和 4 天测量跨上皮 I_{sc} (阴离子分泌的指标)。

[0175] 如图 1A 所示, 与未暴露于 IR 的组织相比, 辐照后 24 小时和 72 小时的暴露于 IR 的组织相比, 在辐照后 48 小时观察到跨上皮 I_{sc} 的最大升高 (图 1A)。在 48 小时结束时 I_{sc} 的显著升高表明, 辐照破坏了吸收与分泌之间的精密平衡。相比之下, 在 48 小时和 72 小时结束时记录的 I_{sc} 低于未经 IR 小鼠组织。

[0176] 组织病理学切片还示出由于辐照, 绒毛上皮细胞与隐窝细胞相比更大的损失。虽然 48 小时之前获取的组织病理学切片示出最小的绒毛损伤和很小或者没有隐窝细胞损伤, 但是在第 3 天和第 4 天获取的组织病理学切片示出隐窝细胞和绒毛细胞的广泛损伤。特别地, 3 天后, 绒毛细胞变得几乎完全耗尽。如由应答于 IR 后 72 和 96 小时的分泌刺激而未能刺激阴离子分泌所证实的, 还观察到了隐窝细胞的损失 (图 1A)。在高剂量的 IR 下, 有不充分的隐窝干细胞, 其成熟并分化形成绒毛上皮细胞。

[0177] 图 1B 示出辐照使跨上皮电导升高 (图 1B)。通过尤斯室实验测量了跨上皮电导 (S) (复合的跨细胞电导和细胞旁电导)。

[0178] 根据欧姆定律 (Ohms law) $1/S = R$, 跨上皮电导的升高表明跨上皮电阻 (transepithelial resistance, TER 或 R) 下降。小鼠小肠具有低上皮电阻。细胞旁途径的电阻比跨细胞电阻^{65 67}低得多。如 $1/TER = (1/R_{跨细胞}) + (1/R_{旁细胞})$ 所示, 细胞旁途径和跨细胞途径平行; 因此, 所测量的 TER 大体上反映了细胞旁电阻。

[0179] 实施例 2- 辐照引起短路电流 (I_{sc}) 的剂量依赖性升高

[0180] 该实施例揭示了辐照引起短路电流的剂量依赖性升高, 表明升高的产电阴离子分泌。简要地, 在第 4 天处死接受了 0、1、3、5、7、9 或 12Gy 辐照的小鼠。图 2 示出与以 0Gy 和 1Gy 辐照的那些相比, 以 3、5 和 7Gy 辐照的小鼠组织中 I_{sc} 显著升高 ($* p < 0.001$)。与以 3、5 和 7Gy 辐照的小鼠相比, 在以 9 和 12Gy 辐照的小鼠组织中观察到了降低的 I_{sc} ($** p < 0.01$, 图 2)。以 1 至 3Gy 辐照引起 I_{sc} 的最高升高和最小的组织病理学变化。

[0181] 此外, 辐照引起 I_{sc} 随时间变化。对于在第 0、1、2、3、4、5、6 或 7 天处死的小鼠, 在 IR 后第 5 和第 6 天观察到了 I_{sc} 的最高升高 (图 3A)。为了确定作为时间的函数的 I_{sc} 的最大升高, 以 3Gy 辐照小鼠, 并在第 0、1、2、3、4、5、6、7、9、11 和 14 天处死以记录电参数 Kruskal-Wallis ($P < 0.001$)。事后分析在辐照后第 6 天示出 I_{sc} 的最大升高。

[0182] 如图 3A 所示, 在辐照后第 1 和第 2 天记录的 I_{sc} 示出非常小的统计差异。但是, 在辐照后时间 > 2 天记录的 I_{sc} 与第 0 天相比时示出显著性差异 ($* P < 0.01$)。在第 4、5、6 和 7 天记录的 I_{sc} 中, 观察到了很小的显著性差异。在辐照后第 9 和第 10 天记录的 I_{sc} 与在辐照后第 7 天记录的也没有显著性差异 ($** P = n_s$)。虽然, 示出在接受了 3Gy ($4.8 \pm 0.5 \mu eq. h^{-1}. cm^2$) IR 的小鼠中, 第 6 天后 I_{sc} 示出显著升高, 但是其在辐照后第 14 天以及在甚至 2 年内都继续保持在升高的水平。图 3A 示出在以 3Gy 辐照的小鼠中, 在第 6 天发生 I_{sc} 的最大升高。

[0183] 辐照后所观察到的 I_{sc} 升高主要是由于产电阴离子分泌的净升高。 I_{sc} 升高有 3 种可能的机制: 1) 升高的产电阴离子分泌 (例如, Cl^- 和 / 或 HCO_3^-); 2) 升高的产电 Na^+ 吸收;

或 3) 升高的产电 K^+ 吸收。辐照不大可能引起小鼠小肠中升高的产电 Na^+ 吸收过程。此外, 因为辐照引起腹泻, 其导致 K^+ 损失而非 K^+ 吸收, 所以 I_{sc} 的升高不可能是由于升高的 K^+ 吸收。

[0184] 实施例 3- Na^+ 和 Cl^- 吸收的降低

[0185] 该实施例示出辐照使 Na^+ 和 Cl^- 吸收降低。如表 2 所示, 使用 ^{22}Na - 置换的尤斯室通量研究揭示, 在未经 IR (0Gy) 的小鼠中有 Na^+ 的净吸收 (表 2), 因为黏膜 / 浆膜通量 (J_{ms}) 超过浆膜 / 黏膜通量 (J_{sm})。辐照使 J_{ms} 以剂量依赖方式降低, 并引起降低的净 Na^+ 吸收 ($J_{Net, Na}$)。在 7Gy 和 9Gy 的剂量下, J_{sm} 远远超过 J_{ms} , 引起净分泌。此外, 在高剂量辐照下, 小鼠粪便样本变得疏松或者不良地形成, 进一步证实电解质降低的吸收和升高的分泌。类似地, 净 Cl^- 吸收还随 IR 剂量升高而降低。在 9Gy 下观察到净 Cl^- 分泌。 Cl^- 吸收降低是由于 $J_{ms} Cl^-$ 降低。

[0186] 表 2 Na^+ 和 Cl^- 的单向净通量 ($J_{Net} = J_{ms} - J_{sm}$)

[0187]

Na 通量				Cl 通量			
IR				IR			
Gy	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}	Gy	J_{ms}	J_{sm}	J_{net}
0	16.4 ± 0.9	7.1 ± 0.8	9.3 ± 0.8	0	17.3 ± 1.1	7.1 ± 0.6	10.2 ± 0.8
1	15.6 ± 1	7.1 ± 1.1	8.6 ± 0.9	1	12.8 ± 0.9	7.6 ± 1.3	5.2 ± 0.9
3	6.8 ± 0.7	3.5 ± 0.3	2.6 ± 0.5	3	16.8 ± 0.7	9.3 ± 0.8	7.5 ± 0.8
5	5.2 ± 0.6	4.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2	5	14.2 ± 1.2	10.3 ± 0.9	3.9 ± 0.7
7	4.8 ± 0.4	5.4 ± 0.4	-0.6 ± 0.3	7	7.1 ± 0.5	6.9 ± 0.3	0.3 ± 0.2
9	4.3 ± 0.7	4.7 ± 0.6	-0.4 ± 0.2	9	-9.2 ± 0.8	0.1 ± 0.1	-9.3 ± 0.9

[0188] 实施例 4- 辐照引起升高的细胞旁渗透性

[0189] 该实施例示出辐照引起小肠衬里黏膜 (lining mucosa) 的损失, 引起削弱的小肠屏障功能。该升高的小肠渗透性使得肠共生细菌、肽和毒素易于进入系统隔室 (systemic compartment), 从而引起内毒素血症。如图 4A 所示, 辐照使如由东方蜚蚶试剂 (tachypleus amebocyte lysate) 试剂盒测量的血浆内毒素水平升高。

[0190] 如在尤斯室研究中确定的稀释电势的变化所表明的, 辐照还升高 Cl^- 和 Na^+ (PCl^-/PNa) 渗透性。使用稀释电势作为膜渗透性的指标基于以下原理。具体地, 完整的半透膜 (如小肠黏膜) 维持通过用不同离子强度沐浴黏膜和浆膜侧溶液而人工地产生的电势梯度。但是, 使得易于扩散通过膜的漏膜 (leaky membrane) 具有降低的膜电势。因而, 跨膜的渗透性越高, 则电势梯度越低。自由渗透之膜的 Cl^- 和 Na^+ (PCl^-/PNa) 的相对渗透性为 1, 其表明选择性的完全损失。

[0191] 在未经 IR 的小鼠中, 保留了膜选择性, 与 Cl^- 相比, Na^+ 更易于渗透通过膜。辐照使膜稀释电势降低。特别地, 在 7Gy 时, Na^+ 和 Cl^- 变得相等地渗透通过膜, 表明选择性的显著损失 (图 4B)。由辐照引起的电解质渗透性的升高与图 4A 所示的血浆内毒素水平升高相一致。监测膜渗透性的变化可用作敏感性工具以监测由对象经口辐射饮食引起的黏膜屏障功能的升高。

[0192] 实施例 5- 由辐照引起的炎性介质水平的升高

[0193] 使用 LUMINEX 多重珠阵列技术 (multiple bead array technique) 来测量经 IR 暴露和未经 IR 暴露的小鼠中的炎性介质水平。如图 5 所示, 辐照使 $IL1-\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $MIP-\alpha$ 的产生提高 (图 5)。

[0194] 实施例 6- 由辐照引起的阴离子分泌降低是 $NKCC1$ 依赖的和 $CFTR$ 依赖的

[0195] 该实施例示出辐照下的阴离子分泌是 $NKCC1$ 依赖的和 $CFTR$ 依赖的。为了确定

NKCC1 对基础 I_{sc} 的贡献, 向浴溶液中添加 $100 \mu M$ 的布美他尼 (bumetanide) (Sigma-Aldrich Co., USA)。图 3C 示出经辐照组织中的布美他尼 - 可抑制电流 ($5.5 \pm 0.5 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $0.6 \pm 0.1 \mu eq. h^{-1}. cm^2$), 但在 0Gy 小鼠中并非如此 ($1.6 \pm 0.2 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $0.9 \pm 0.1 \mu eq. h^{-1}. cm^2$)。此外, cAMP 刺激引起经 0Gy 辐照小鼠 ($1.6 \pm 0.2 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $6.9 \pm 0.6 \mu eq. h^{-1}. cm^2$, $P < 0.001$) 和经 3Gy 辐照小鼠 ($5.5 \pm 0.5 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $7.3 \pm 0.5 \mu eq. h^{-1}. cm^2$, $P < 0.05$) 中的 I_{sc} 升高。

[0196] 此外, 在 3Gy 中, 布美他尼使得毛喉素 (Sigma-Aldrich Co., USA) 刺激的 I_{sc} 降低 ($7.3 \pm 0.5 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $0.4 \pm 0.1 \mu eq. h^{-1}. cm^2$), 但在 0Gy 中并非如此 ($6.9 \pm 0.6 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ 对 $1.3 \pm 0.2 \mu eq. h^{-1}. cm^2$)。这表明没有辐照时较大的 NKCC1 依赖的阴离子分泌 ($P < 0.05$)。

[0197] 结果还示出辐照下的阴离子分泌是 CFTR 依赖的。为了确定 I_{sc} 的布美他尼不敏感性部分是否通过顶端膜阴离子通道发生, 采用非特异性阴离子通道阻断剂 5- 硝基 -2-(3- 苯基丙基氨基) - 苯甲酸 (Sigma-Aldrich Co., USA) ($10 \mu M$ NPPB) 和特异性囊性纤维化跨膜电导调节因子 (CFTR) 阻断剂 ($100 \mu M$ 格列本脲 (glibenclamide), Sigma-Aldrich Co., USA)。通过非特异性阴离子通道阻断剂 (NPPB) ($0.1 \pm 0.01 \mu eq. h^{-1}. cm^2$) 和格列本脲 ($0.1 \pm 0.01 \mu eq. h^{-1}. cm^2$) 的黏膜添加, 消除了 0Gy 小鼠中的布美他尼不敏感性 I_{sc} 。这表明阴离子分泌通过阴离子通道或 CFTR 而发生 (图 3B)。

[0198] 实施例 7- 由辐照引起的 HCO_3 分泌的降低

[0199] 感染性腹泻 (如霍乱) 导致粪便中富含 HCO_3 流体的损失, 并且引起代谢性酸中毒。该实施例表明, 与感染性腹泻相反, IR 诱导升高的 Cl 分泌和降低的 HCO_3 分泌。

[0200] 为了确定 Cl 对净阴离子分泌的贡献, 采用了 Cl 吸收入细胞中的阻断剂 (Na-K-2Cl 协同转运阻断剂)。 $10 \mu M$ 布美他尼的添加消除了几乎所有与 IR 相关 I_{sc} , 表明 IR 诱导的阴离子分泌主要是由于升高的 Cl 分泌, 并且该分泌是 NKCC1- 依赖的 (图 3A-C)。

[0201] pH 稳定实验证实了 IR 诱导的 HCO_3 分泌 (表 3)。当浆膜浴溶液 (浴) 中的 Na^+ 被非渗透性阳离子 NMDG 所置换时, HCO_3 的分泌消除, 表明 HCO_3 转运到细胞的基底侧膜是浴 Na^+ 依赖的。在 IR 后第 6 天的小鼠中以 5Gy 重复类似的实验。在浴 Na^+ 的存在下, HCO_3 分泌显著降低。

[0202] 使用 NBCe1a/b 抗体进行得自未经 IR 小鼠和经 IR 小鼠二者的冷冻组织切片的免疫荧光染色 (图 6B-E)。NBCe1a/b 抗体特异性染色表明, NBCe1a/b 在绒毛上皮细胞中表达, 但在隐窝细胞中不表达。来自经 IR 小鼠组织的免疫染色示出 NBCe1a/b 抗体在绒毛或隐窝中未被识别。来自经 3Gy (IR) 辐照小鼠的组织未在绒毛或隐窝中表达 NBCe1-A/B- 特异性染色图案。在高剂量的 IR 下, HCO_3 分泌功能下降是由于绒毛上皮细胞的损失。监测 Na^+ 和 HCO_3 分泌的变化可以用以监测因对象经口辐射饮食引起的黏膜屏障功能提高的敏感性工具。

[0203] 辐照下的 HCO_3 分泌是 NKCC1 依赖的

[0204] 为了确定 HCO_3 是否有助于阴离子分泌, 在不存在浴 Cl 的条件下进行实验。认为 HCO_3 有助于对继发于辐照或毛喉素刺激的 I_{sc} 升高。结果示出, 辐照下 HCO_3 的分泌不是浴 Cl 依赖的; 因此, 在辐照下, HCO_3 分泌不涉及顶端膜中的 Cl - HCO_3 交换转运蛋白 (AE1)。在不含 Cl 的溶液中, 经 3Gy 辐照的小鼠中的基础 ($1.0 \pm 0.2 \mu eq. h^{-1}. cm^2$ vs $0.3 \pm 0.1 \mu eq.$

$\text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $P = \text{ns}$) I_{sc} 和毛喉素刺激的 ($1.7 \pm 0.2 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $0.3 \pm 0.1 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $P < 0.001$) I_{sc} 较低 (图 3D)。与在 3Gy 下相比, 在 0Gy 下毛喉素刺激的 I_{sc} 更高 ($P < 0.001$), 表明由辐照引起 HCO_3^- 分泌降低。

[0205] 为了确定在基础刺激条件和毛喉素刺激条件下, NKCC1 是否介导 HCO_3^- 运动, 将布美他尼添加到两侧在不含 Cl 的溶液中平衡的组织的浴侧。结果示出, 布美他尼不抑制基础的 I_{sc} 升高和毛喉素刺激的 I_{sc} 升高; 缺少该抑制表明基底侧膜处 HCO_3^- 吸收的 NKCC1 非依赖机制。

[0206] 辐照下的 HCO_3^- 分泌是内腔 Cl 非依赖的

[0207] 经辐照小鼠中 HCO_3^- 分泌的直接测量示出与未经辐照小鼠 ($0.8 \pm 0.2 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $6.7 \pm 0.2 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) 相比降低的 HCO_3^- 分泌。通过去除内腔 Cl, 经辐照小鼠中的 HCO_3^- 分泌不变 (表 3)。经辐照小鼠中 NPPB ($0.2 \pm 0.01 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) 和格列本脲 ($0.11 \pm 0.1 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (而非 DIDS) 的黏膜添加, 结束了 HCO_3^- 分泌。这表明 HCO_3^- 分泌是由阴离子通道 (CFTR 通道) 介导的, 而非通过 Cl- HCO_3^- 交换而介导 (图 19B)。

[0208] 相比之下, 未经辐照小鼠中的 HCO_3^- 分泌是内腔 Cl 依赖的和 Cl 非依赖的。跨上皮电测量结果表明产电 HCO_3^- 分泌; 但是, 这不表明 HCO_3^- 分泌是通道介导的和 / 或通过电中性的 Cl- HCO_3^- 交换。

[0209] 在不存在内腔 Cl 的条件下进行 pH- 稳定实验, 以研究未经辐照小鼠中的 Cl- HCO_3^- 交换。在不含内腔 Cl 的溶液中, HCO_3^- 分泌较低 ($4.5 \pm 0.1 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $P < 0.01$)。这表明, 未经辐照小鼠中的基础 HCO_3^- 分泌部分地是内腔 Cl 依赖的, 部分地是 Cl 非依赖的 (表 3)。添加 $100 \mu \text{M}$ 4,4'-二异硫氰基-2,2'-芪二磺酸 (DIDS) (Sigma-Aldrich Co., USA) 部分地抑制了 HCO_3^- 分泌 ($P < 0.001$), 该抑制类似于以内腔 Cl 去除中所观察到的。毛喉素刺激的内腔 Cl 非依赖性 HCO_3^- 分泌

[0210] 对于 0Gy 小鼠, 向浴溶液中添加毛喉素示出显著升高的基础 HCO_3^- 分泌 ($P < 0.001$), 其不随内腔 Cl 去除而改变 ($8.4 \pm 0.4 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $8.7 \pm 0.4 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $n = 6$)。NPPB 消除了毛喉素刺激的 HCO_3^- 分泌 ($0.2 \pm 0.01 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $n = 6$); 这表明阴离子通道在 cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌中的作用。

[0211] cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌是 NKCC1 非依赖的

[0212] 为了确定 cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌是否需要顶端 CFTR 通道, 向腔侧添加格列本脲。格列本脲抑制了 ($0.1 \pm 0.1 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) HCO_3^- 分泌 (表 3 和图 19), 表明 cAMP 不仅抑制净 HCO_3^- 分泌的基础 Cl- HCO_3^- 交换组分, 而且诱导顶端阴离子通道介导的 HCO_3^- 分泌。经辐照小鼠的毛喉素刺激示出与基础 HCO_3^- 分泌相比很少的升高 ($0.6 \pm 0.2 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $0.78 \pm 0.2 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。这还表明内腔 Cl 非依赖的 HCO_3^- 分泌或抑制 Cl- HCO_3^- 交换。

[0213] 跨上皮电测量结果示出, HCO_3^- 运动的降低也是 NKCC1 非依赖的。在基础条件和毛喉素刺激条件二者下, 经辐照小鼠中最小的 HCO_3^- 分泌不受添加布美他尼的影响 (表 3)。类似地, 在未经辐照的小鼠中, 布美他尼不改变毛喉素刺激的 HCO_3^- 分泌, 表明 cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌是 NKCC1 非依赖的 ($8.4 \pm 0.4 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $8.6 \pm 0.4 \mu \text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (表 3 和图 3B)。

[0214] HCO_3^- 分泌是浴 Cl 非依赖的

[0215] 需要浴 Cl 用于基底侧 HCO_3^- 吸收的转运过程示于图 3B 中。结果示出布美他尼不

改变 cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌。这表明,在辐照下, Cl^- - HCO_3^- 交换 (AE2) 转运蛋白受到抑制。浴 Cl^- 的去除还可抑制 NKCC1 和 AE2 相关的 HCO_3^- 吸收 (表 3)。从浴溶液中去掉 Cl^- 不改变 HCO_3^- 分泌 ($6.7 \pm 0.3 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $7.1 \pm 0.6 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

[0216] HCO_3^- 分泌是浴 Na^+ 依赖的

[0217] Na^+ 偶联的基底侧 HCO_3^- 进入的转运过程示于图 3B 中。图 3C 和 3D 表明 NKCC1 不影响 HCO_3^- 分泌。将 1mM 3- 甲基磺酰基 -4- 哌啶子基苯甲酰基胍盐酸盐 (HOE694) 添加到浴侧通过与 Cl^- - HCO_3^- 交换偶联的 NHE1 而消除了 HCO_3^- 吸收。Counillon, Scholz 等 (1993) 还描述了 1mM 3- 甲基磺酰基 -4- 哌啶子基苯甲酰基胍盐酸盐 (HOE694) 可抑制 Na^+ - H^+ 交换 (NHE1)。

[0218] HOE694 不抑制 cAMP 刺激的 HCO_3^- 分泌 ($8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $7.2 \pm 0.9 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。在未经辐照小鼠中,用 N- 甲基 -D- 葡糖胺 (NMDG) 替换浴 Na^+ 消除了毛喉素刺激的 HCO_3^- 分泌 ($8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 对 $0.3 \pm 0.01 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), 其表明 Na^+ 偶联的 HCO_3^- 协同转运 (NBC) (图 3E)。

[0219] 表 3. 未经辐照 (0Gy) 和经辐照 (3Gy) 小鼠的空肠中测量的 HCO_3^- 分泌

[0220]

内腔溶液	含 Cl^-	不含 Cl^-	100 μM DIDS	100 μM 格列本脲
0 Gy	6.7 ± 0.3	$4.5 \pm 0.1^{\ddagger}$	$4.4 \pm 0.1^{\ddagger}$	0.5 ± 0.1
3 Gy	$0.8 \pm 0.2^*$	$0.6 \pm 0.1^{*ns}$	$0.9 \pm 0.2^{*ns}$	0.1 ± 0.1^{ns}
0 Gy + 毛喉素	8.4 ± 0.4	8.7 ± 0.4	-	0.1 ± 0.1
3 Gy + 毛喉素	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	-	-
0 Gy + 布美他尼	8.6 ± 0.4	8.4 ± 0.4	7.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1
3 Gy + 布美他尼	$0.8 \pm 0.14^*$	0.8 ± 0.1^{ns}	0.7 ± 0.12^{ns}	0.2 ± 0.1^{ns}

[0221] 注释: 值表示平均值 $\pm$ SEM n = 6 个组织。*p < 0.001,

[0222] 0Gy 与 3Gy 组之间的比较。 ‡ p < 0.001 现有组之间的比较。

[0223] 在未经辐照小鼠的布美他尼实验中,用 10mM 毛喉素来处理组织。

[0224] 缩略语: ns, 组间没有显著性; 4,4- 二异硫氰基 -2,2' - 茚二磺酸, DIDS

[0225] 对于顶端膜处的活性 HCO_3^- 分泌,需要其基底侧吸收。直接或间接地涉及基底侧膜处 HCO_3^- 运动的四个已知交换机制是: 1) Na^+ - K^+ -2 Cl^- 协同转运作为可能的 HCO_3^- 转运蛋白; 2) 通过 NKCC1 吸收入细胞的 Cl^- 通过基底侧 Cl^- - HCO_3^- 交换 (AE2) 而再循环,导致基底侧膜处的净 HCO_3^- 吸收; 3) Na^+ - H^+ 交换将质子挤到胞内空间,导致降低的胞内 HCO_3^- 浓度,然后其刺激顶端电中性 Cl^- - HCO_3^- 交换; 以及 4) Na^+ 偶联的 HCO_3^- 协同转运。这些转运蛋白可以是电中性的或产电的,取决于每分子 Na^+ 转运的 HCO_3^- 分子的数目 (图 3B)。

[0226] 在未经辐照小鼠中, HCO_3^- 吸收通过位于基底侧表面的 Na^+ 偶联的协同转运蛋白 (NBCe1-A/B) 而发生。顶端输出通过与 Na^+ - H^+ 交换结合的电中性 Cl^- - HCO_3^- 交换以及通过 CFTR (产电阴离子分泌) 而发生。通过添加毛喉素实现的胞内 cAMP 升高导致升高 Cl^- 和 HCO_3^- 的分泌,以及同时抑制电中性的 Na^+ 和 Cl^- 吸收 (Na^+ - H^+ 交换与 Cl^- - HCO_3^- 交换偶联)。

Cl⁻ 吸收通过 NKCC1 而发生, HCO₃⁻ 吸收通过 NBCe1-A/B 而发生; Cl⁻ 和 HCO₃⁻ 二者的输出通过顶端表面的 CFTR 而发生。

[0227] 根据本发明, 已发现辐照抑制电中性的 Na⁺ 和 Cl⁻ 吸收。辐照还抑制 NBCe1-A/B, 该抑制导致基底侧膜处 HCO₃⁻ 吸收降低, 最终, 其在顶端膜处输出。因而, 辐照导致产电 Cl⁻ 分泌, 以及电中性的和产电的 HCO₃⁻ 分泌二者的选择性抑制 (图 19B)。

[0228] 辐照引起小肠上皮组织中升高的 NKCC-1 蛋白表达和降低的 NBCe1-A/B 表达。辐照还抑制顶端 Cl⁻-HCO₃⁻ 交换转运蛋白 (AE1)。放射性腹泻中的 HCO₃⁻ 分泌是 Na⁺ 依赖的, 但是内腔 Cl⁻ 非依赖的以及 NKCC-1 非依赖的。辐照下的 Cl⁻ 转运涉及基底侧 NKCC-1 转运蛋白, 而非 Cl⁻-HCO₃⁻ 交换转运蛋白 (AE1)。

[0229] 如图 19B 所示, 辐照还改变胃肠道中的电解质 (如 HCO₃⁻ 和 Cl⁻) 转运。经辐照小鼠主要显示出 Cl⁻ 分泌和最小的 HCO₃⁻ 分泌。推测由辐照引起的最小 HCO₃⁻ 分泌是由抑制 HCO₃⁻ 吸收引起的。相反, 在促分泌素 (secretagogue) 诱导的腹泻中有活跃的 Cl⁻ 以及 HCO₃⁻ 分泌。

[0230] 实施例 8- 辐照引起葡萄糖吸收的降低

[0231] 该实施例示出在 IR 诱导的肠炎中, 葡萄糖吸收剂量依赖性地降低。此外, 肠内腔中未吸收葡萄糖的存在可导致渗透性腹泻, 还劣化与 IR 相关的腹泻性病症。图 7A 示出辐照引起 I_{sc} 剂量依赖性地降低。图 7B 示出辐照以剂量依赖的方式提高葡萄糖转运中的 K_m。

[0232] SGLT1 是多功能的转运蛋白。SGLT1 在感染性腹泻 (如霍乱) 中维持其功能。在感染性腹泻中 SGLT1 功能的保持已被用于 Na⁺ 吸收的经口再水化治疗。

[0233] 为了研究 SGLT-1 的功能及其对辐照后葡萄糖吸收的影响, 在以 0、1、3、5 或 7Gy IR 暴露后的第 6 天获得 Swiss 小鼠的小肠黏膜。在尤斯室中测量葡萄糖刺激的短路电流 (I_{sc}) 以研究 SGLT1 转运功能。以 9Gy 对 TBI 和 15.6- 亚-TBI 小鼠实施存活研究。

[0234] 具体地, 使得自国立卫生研究院 (NIH) 的 8 周龄 Balb/c 小鼠经历 137C 亚全身 (sub-total body) 辐照 (亚-TBI) (保护一条腿不受辐照) 和全身 (total-body) 辐照 (TBI)。

[0235] 在动物存活研究中, 将小鼠分为 2 组: 9Gy TBI 和 15.6Gy 亚-TBI。用生理盐水处理对照小鼠; 其他小鼠用 5% 葡萄糖处理。在实验过程中采用管饲法 (gavage), 在辐照后前 5 天和辐照后直至 10 天的隔天给予处理。

[0236] 在尤斯室研究中采用多通道电压 / 电流钳 (Physiological Instruments, San Diego, CA)。在经常改良的林格液中沐浴用于安放的小鼠空肠切片, 并以 95% O₂ 和 5% CO₂ 充气以测量短路 I_{sc}。在辐照后 6 天处死所有小鼠。

[0237] 为了研究 SGLT-1 动力学, 底物 (葡萄糖) 浓度始于 0.05mM, 终于 10mM。以始于 0.05mM 并且进展至 0.1mM、0.5mM 和 1mM 的速度添加葡萄糖。用 Origin8 软件 (OriginLab Corp., Northhampton, MA) 分析结果。I_{sc} 绘制为 Y 轴, 葡萄糖浓度绘制为 X 轴。使曲线拟合为 Hill' s 方程 (Hill' s equation)。

[0238] 为了制备空肠全细胞裂解物, 在包含 25mM HEPES、10% 甘油、1% Triton X-100 的三酰甘油水解酶缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物 (10mM 碘乙酰胺、1mM 苯甲基磺酰氟和 2 μg/ml 亮抑酶肽, pH7.4) 中裂解正常小鼠和经辐照小鼠的黏膜碎屑。

[0239] 为了制备刷状缘膜囊泡裂解物, 在 2mM Tris-HCl (pH7.1) / 50mM KCl / 1M PMSF 溶液

中使正常小鼠和经辐照小鼠的黏膜碎屑匀浆。用离心机分别以 8000RPM 和 13,000RPM 将样本离心,然后再用结核菌素 (turbidulin) 注射器 (27G 针) 和 TEFLON 匀浆器进行匀浆。然后以 4,000RPM 离心样本,再以 15,000RPM 离心样本。用包含蛋白酶抑制剂混合物 (10mM 碘乙酰胺,1mM 苯甲基磺酰氟和 2 μ g/ml 亮抑酶肽, pH7.4) 的常规林格液重悬样本。

[0240] 通过 Western 印迹来分析空肠全细胞裂解物和刷状缘膜囊泡二者的 SGLT-1 蛋白的蛋白浓度。通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析来自经辐照样本和对照样本的蛋白质等价负荷。将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上,并使用亲和纯化的多克隆抗体检测 SGLT-1 蛋白。

[0241] 如图 8 至 14 所示,结果证明:1) 辐照以剂量依赖的方式降低葡萄糖刺激的 I_{sc} ; 2) 在 0、1、3、5 和 7Gy, 葡萄糖的 K_m 值分别为 (mM) 0.38 ± 0.04 、 0.49 ± 0.06 、 1.76 ± 0.16 、 1.91 ± 0.3 、 2.32 ± 0.4 ; 3) 在 0、1、3、5 和 7Gy, 葡萄糖的 V_{max} 值分别为 387.4 ± 16.2 、 306.6 ± 16.4 、 273.2 ± 14.9 、 212.9 ± 9.14 、 188.1 ± 9.12 ; 4) IR 后约 14 天, K_m 和 V_{max} 值恢复到正常水平; 5) 在辐照后的头 10 天抑制葡萄糖摄入提高了存活; 6) SGLT-1 刷状缘膜的 Western 印迹分析示出 SGLT-1 蛋白水平随 IR 的剂量升高而升高。

[0242] SGLT-1 K_m 的升高表明,由于辐照, SGLT-1 对葡萄糖的亲合力降低。 V_{max} 的降低表明由于辐照引起的绒毛上皮细胞损失也如由组织病理学检查所证明的那样。如在 Western 印迹分析中所示的,经 IR 处理的小鼠组织中蛋白质水平的升高表明表达了 SGLT1 转运蛋白,但其是非功能性的。

[0243] 结果还证明经口葡萄糖饲喂引起葡萄糖和电解质的吸收不良,这导致渗透性腹泻,因而提高了 IR 诱导的 GI 毒性。相反,在 IR 后的前 14 天对来自经口饲喂之葡萄糖的抑制预防或者减轻了腹泻症状,并提高了总体存活。

[0244] 实施例 9 辐照引起谷氨酰胺转运降低

[0245] 虽然谷氨酰胺是非必需氨基酸,但是它是肠细胞的主要营养物,并且以高浓度存在于血浆 (26%) 和骨骼肌 (75%) 中。随着机体对谷氨酰胺需求的提高,在手术后患者、外伤患者或者危重患者中谷氨酰胺水平下降。因而,认为谷氨酰胺对于消化系统、肾系统、免疫系统和神经系统的正常运作而言是重要的。

[0246] 该实施例示出,辐照引起转运到细胞中的谷氨酰胺剂量依赖性地降低。在 $IR \geq 7Gy$ 时,谷氨酰胺变得主要存在于肠腔中,从而引起渗透性腹泻。谷氨酰胺转运蛋白的饱和和动力学示出 K_m 的 IR 剂量依赖性地升高 (图 15),表明谷氨酰胺转运蛋白对谷氨酰胺的亲合力降低。

[0247] 实施例 10- 辐照引起赖氨酸转运的剂量依赖性升高

[0248] 向小肠内腔侧添加赖氨酸引起 I_{sc} 升高,表明赖氨酸的产电转运 (图 16)。来自未经 IR 小鼠的组织示出 $1.16 \pm 0.04mM$ 的 K_m ,而 3Gy IR 组织具有 $0.27 \pm 0.01mM$ 的 K_m 。不同于葡萄糖和谷氨酰胺,结果示出辐照提高了赖氨酸转运蛋白对赖氨酸的亲合力,因而,升高了赖氨酸吸收。

[0249] 实施例 11- 经口赖氨酸饲喂对小鼠存活的影响

[0250] 该实施例示出,抑制来自经口饲喂的未吸收营养物同时选择性地饲喂吸收的营养物预防或者减轻了腹泻,并且提高了辐照后的存活。

[0251] 在第一系列实验中,将葡萄糖 (10mM i/m, 5 天,然后隔天) 经口施用于经 IR 小鼠。

结果示出,葡萄糖施用降低了总体存活(图 17B)。相比之下,作为胃灌洗,将赖氨酸(20mg/小鼠/天)经口施用于经 IR 小鼠,保持 5 天,随后隔天。与对照组相比,用赖氨酸处理的小鼠示出升高的存活(图 17A)。因而,降低或者限制未吸收营养物(如葡萄糖)的经口摄入,以及被吸收营养物(如赖氨酸)升高的经口摄入可延长经辐照患者的存活。

[0252] 实施例 12- 由辐照引起的离子转运蛋白表达水平的变化

[0253] 该实施例说明了由辐照引起的转运蛋白表达水平的变化。

[0254] 具体地,在辐照后第 6 天,收获组织用于 Western 印迹。如图 18 所示,回肠组织的 Western 印迹揭示了 1 至 5Gy 的辐照引起升高的 NKCC1 蛋白水平;而与接受了 1 至 5Gy IR 的组织相比,NKCC1 表达这样的升高在接受了 7Gy IR 的组织中下降(A)。

[0255] 在辐照之后,NBCe1-A/B 蛋白水平显著下降,即便在低至 1Gy 的剂量下也是如此(B)。与 0Gy 空肠组织相比,在 3Gy 辐照之后,空肠组织中的 CFTR 蛋白水平显著升高(C)。与未经辐照小鼠中的十二指肠、回肠和结肠相比,NBCe1-A/B 特异性抗体在空肠中示出升高的表达水平(D)。空肠组织与十二指肠、回肠和结肠相比具有最高的 NBCe1-A/B 蛋白水平(D)。转运蛋白水平的变化对应于 IR 后所观察到的功能变化。与未经 IR 的组织相比,辐照后转运蛋白的表达方式可用于监测经口辐射饮食的有效性。

[0256] 实施例 13- 有小肠黏膜损伤的小鼠中营养物和电解质吸收能力的变化

[0257] 在小肠用辐射、化学治疗处理的以及有小肠炎症的 C57BL/6 小鼠中观察到了类似方式的小肠吸收能力改变。如实施例 1 至 12 所述构建辐射模型。

[0258] 在化学治疗模型中,所有小鼠均注射了单剂量的 5-FU 或顺铂。在一些小鼠中,第一次注射后 3 天,注射第二剂量的 5-FU 或顺铂。在每次注射之后,在如图 20 所示的时间点,使用尤斯室测量跨上皮 Isc(净阴离子分泌的指标)。对于每次测量,最少检查 32 个组织。

[0259] 结果示出,在注射了单剂量顺铂(图 20B)或 5-FU(图 20A)的小鼠中,在第 3 天净阴离子分泌显著升高。同样,与接受单剂量的小鼠相比,注射了第二剂量化学治疗剂的小鼠显示出显著更高的净阴离子分泌升高。

[0260] 在克罗恩病模型中,小鼠注射了抗-CD3mAb(模拟克罗恩病之状况的急性炎性模型)。小肠的净阴离子分泌(基于细胞旁电导确定的)和细胞旁渗透性也显著升高。还观察到了营养物和电解质吸收能力的改变。

[0261] 使用有小肠黏膜损伤的疾病模型(即,辐射模型、化学治疗模型和克罗恩病模型)来确定营养物的吸收能力改变。具体地,将候选营养物经口施用于对照小鼠和分别接受了辐照、化学治疗和抗-CD3mAb 的小鼠。此外,经口施用包含候选营养物之多种组合的组合物。

[0262] 候选营养物选自:赖氨酸、组氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、精氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸和葡萄糖。

[0263] 为了确定各营养物的吸收能力,使用尤斯室进行生物电测量。测量包括:a) 钠偶联的氨基酸电流(Isc)和电导变化;b) 施用各营养物后,各营养物的饱和和动力学变化和 Isc 变化;c) 在存在和不存在特异性候选营养物的条件下,采用同位素通量研究的电解质吸收研究。结果表明,在辐射模型、化学治疗模型和克罗恩病模型中,对于所研究的所有氨基酸和葡萄糖,吸收能力以类似的方式改变。具体地,结果示出经口施用选自以下氨基酸中的

每一种改善了小肠愈合,降低了细胞旁电导(从而改善了小肠黏膜屏障机制),提高了电解质吸收和/或提高了动物存活;赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。结果还示出在辐射模型、化学治疗模型和克罗恩病模型中,经口施用葡萄糖和/或谷氨酰胺损伤了小肠黏膜屏障,并且对小鼠存活具有不利作用。

[0264] 实施例 14- 在已接受化学治疗的小鼠中改善小肠功能

[0265] 该实施例示出,本发明的治疗组合物改善了已接受化学治疗之小鼠的小肠愈合。在所研究的所有化学治疗药物中,5-FU 示出对小肠的最大毒性。因此,使用 5-FU 来表征化学治疗模型中电解质和营养物转运的改变。

[0266] 用 5-FU 注射 NIH Swiss 小鼠。注射后 5 或 6 天,分离来自小鼠的肠组织,并在尤斯室中研究,暴露于林格液或本发明的治疗组合物。治疗组合物包含赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸、天冬酰胺和丝氨酸;水;和可治疗用载体,电解质和缓冲剂。治疗组合物是弱碱性 (pH7.4) 的。治疗组合物不包含葡萄糖、谷氨酰胺或甲硫氨酸。

[0267] 结果示出,治疗组合物显著地提高了已接受 5-FU 之小鼠的小肠功能。具体地,治疗组合物显著地降低注射了 5-FU 之小鼠的小肠中跨上皮 I_{sc} (图 21A) 和跨上皮电导的病理性升高。

[0268] 实施例 15- 确定由辐照引起的 GI 功能的变化

[0269] 主要的 GI 功能包括:营养物、电解质和水的吸收,这样的吸收发生于分化良好且成熟的绒毛上皮细胞中。流体和电解质吸收的 80% 发生在小肠中。如本文所示,IR 导致取决于 IR 剂量的绒毛和/或隐窝的选择性损失,从而导致 Na^+ 、 Cl^- 和营养物吸收的降低。该实施例说明了用于确定由随时间 IR 的多种剂量引起的 GI 功能改变的实验设计。

[0270] 方法

[0271] 使用来自 NCI 的 C57BL/6 小鼠 (8 周龄,雄性)。将身体观察、细胞学、免疫组化、Western 分析、血浆替代标记和功能研究确定为 IR 诱导之 GI 毒性的特定指标。将小鼠随机分组,使用以 1.84Gy/ 分钟的剂量速率递送 IR 到腹部的 Cs 源,以 Shepherd Mark-I 辐照腹部。使小鼠经历 0、1、3、5、7 和 9Gy 的 IR。在第 0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25 和 30 天检测葡萄糖和氨基酸转运变化,每组 10 只小鼠。在收获组织之前收集血浆样本。收获回肠和空肠组织用于组织病理学、Western 印迹、免疫组化和尤斯室研究(进行单独评价)。

[0272] A) 确定电解质 (Na^+ 、 Cl^- 和 HCO_3^-) 的功能改变

[0273] 该实施例说明了用于确定与 IR 后电解质吸收相关的转运蛋白功能改变的实验设计。然后使电解质转运功能与血浆标记、细胞学和身体观察(如每日活动、体重、粪便形成和粪便潜血)相关联。使用隐窝测定、H&E 染色、BrdU 染色、免疫组化和 Western 印迹分析进行细胞学检查。

[0274] 首先,在尤斯室中检查 Na^+ 和 Cl^- 的跨上皮通量以评价 IR 后的电解质吸收。处死小鼠,检查未经 IR 小鼠和经不同剂量 IR 处理的小鼠中的基础离子转运变化。在规则的上皮中 Na^+ 和 Cl^- 吸收是电中性的。

[0275] 在该实施例中,进行同位素 (^{22}Na 和 ^{36}Cl) 置换研究以确定基础的 Na^+ 和 Cl^- 运动。简要地,将 ^{22}Na 和 ^{36}Cl 添加到黏膜或浆膜侧。在每 30 分钟结束时,从冷侧收集 0.5ml 样本。使用标准公式来计算单向通量,并表示为 $\mu mol \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$ 。计算净通量 (J_{Net}) 作为组织对的

J_{ms} 通量与 J_{sm} 通量的差。实验在短路条件下进行。

[0276] 此外,使用 pH 稳定技术来测量 HCO_3 分泌的变化。如本文所示,IR 使空肠中的 HCO_3 分泌降低。 HCO_3 分泌对于肠的上段的酸碱平衡和酸中和而言是关键的^{72 74}。这些实验提出了 HCO_3 分泌的可能机制,并且表明正常小鼠和经辐照小鼠中的 1) 内腔 Cl^- 依赖的 HCO_3 分泌,和 2) 内腔 Cl^- 非依赖的 HCO_3 分泌。碳酸氢盐分泌表示为如下:

[0277]

$$\text{总碳酸氢盐分泌}(\mu\text{eq/h/cm}^2) = \frac{(D2-D1) \times 0.025 \times 2 \times 60}{1.13 \times (t)}$$

[0278] 其中, D2 和 D1 是在两个时间点之间所添加的总酸之差,0.025 表示所添加的酸的常态,2 是 H_2SO_4 的化合价,60 表示以分钟计的时间以最终表示每小时的分泌。1.13 表示在时间 t 时尤斯室中所使用组织的表面积。使用 pH 稳定技术所研究的 HCO_3 分泌将补足跨上皮 Na^+ 和 Cl^- 通量测量。

[0279] 离子通量实验、pH 稳定研究和跨上皮电测量结果可说明未经 IR 小鼠和经 IR 小鼠中的转运过程。

[0280] B) 确定由辐照引起的营养物吸收功能变化

[0281] 营养物的肠吸收不良影响 IR 后的营养状态。如本文所述,在 IR 后发生营养物的选择性吸收。肠中未吸收的营养物的存在引起渗透性腹泻,这进一步使由辐照引起的损伤复杂化。该实施例说明了用于确定在 IR 后从肠吸收的营养物的实验设计。

[0282] 可将易于吸收的营养物包含到本发明的治疗 / 饮食组合物中以检查多种 IR 剂量随时间对葡萄糖吸收的作用。

[0283] 具体地,在 IR 后于在尤斯室中确定葡萄糖转运的变化。还研究了葡萄糖转运蛋白恢复其正常功能(未经 IR 的水平)所需的时间。根据小鼠耐受经口葡萄糖的能力得到制剂(ORD)。通过经口支持方案扣除葡萄糖直至葡萄糖转运开始改善。

[0284] 此外,检查了 IR 后氨基酸(a.a)转运的变化。由于当转运氨基酸时发生净电荷运动,所以在尤斯室中可检测到产电氨基酸转运。因为没有与电中性氨基酸相关的电荷运动,所以,在刷状缘膜囊泡研究(BBMV)中研究这些转运。在 BBMV 中研究了产电氨基酸和电中性氨基酸二者以在不同实验方法之间进行比较。

[0285] 具体地,通过测试来自未经 IR 和经 IR 小鼠的刷状缘膜囊泡(BBMV)中代表性氨基酸 L-亮氨酸(中性氨基酸)、L-脯氨酸(亚氨基酸(IMINOacid))、L-谷氨酸(酸性氨基酸)和 L-半胱氨酸(含硫氨基酸(sulfurate amino acid))的吸收来研究氨基酸转运系统的四个主要类型。

[0286] 由 IR 引起的产电氨基酸转运变化

[0287] 氨基酸大致分为中性、阳离子性和阴离子性,因为它们的转运特性主要基于电荷(表 4)。产电氨基酸转运可通过 $B^{0/+}$ (中性和阳离子性氨基酸)或 x_{AG} 而发生。通过在存在或不存在内腔 Na^+ 下进行实验来确定 Na 偶联的和 Na 非依赖的氨基酸转运。此外,使用 ^{14}C 标记的氨基酸在 BBMV 中研究电中性氨基酸转运。

[0288] 表 4 小肠刷状缘膜中的氨基酸转运系统

[0289]

转运系统	分子身份	替代身份	底物	对Na的 依赖	涉及其他 离子
B ⁰	B ⁰ AT1	SLC6A19	中性氨基酸	是	否
B ⁰⁺	AT1B ⁰⁺	SLC6A14	中性氨基酸, 阳离子性氨基酸	是	Cl ⁻
b ⁰⁺	b ⁰⁺ AT	SLC7A9	中性氨基酸, 阳离子性氨基酸 半胱氨酸	否	否
	BAT	SLC3A1	其本身不具有转运功能, 其影响b ⁰⁺ AT 转运功能的动力学参数		
PAT	PAT1	SLC26A8	中性短链氨基酸 (甘氨酸, 丙氨酸和脯氨酸)	否	H ⁺
X _{AG}	EAAT3	SLC1A1	阴离子性氨基酸 (天冬氨酸, 谷氨酸)	是	K ⁺ , H ⁺

[0290] 制备 BBMV 以研究氨基酸转运和 Western 印迹

[0291] 使用镁沉淀方法来分离 BBMV⁷⁵。使用 Bradford 法确定 BBMV 的总蛋白含量⁷⁶。囊泡贮存于液氮中或者于 -80°C 下。

[0292] 评估 BBMV 的氨基酸吸收

[0293] 在 25°C 下, 使用由 Hopfer 等⁷⁵描述的迅速过滤技术 (略有更改) 进行 BBMV 的氨基酸吸收。将 BBMV 悬液 (5 μl) 添加到孵育培养基 (45 μl) 中, 所述孵育培养基包含 1mmol/l 的未标记氨基酸、25 μCi/ml 的放射性标记的底物 L-[U-¹⁴C] 亮氨酸、L-[U-¹⁴C] 脯氨酸、L-[U-¹⁴C] 谷氨酸或 L-[³⁵S] 半胱氨酸、100mmol/l NaSCN 或 KSCN、100mmol/l 甘露醇、0.1mmol/l MgSO₄ 和 10mmol/l HEPES (pH7.4)。在存在 Na⁺ 梯度 (使用含 NaSCN 的培养基) 和不存在 Na⁺ 梯度 (含 KSCN 的培养基) 的条件下, 测量氨基酸吸收的时间过程。在特定时间间隔, 通过添加 5ml 的冰冷终止液 (含 150mmol/l KSCN 和 10mmol/l Tris-HEPES (pH7.4)) 结束吸收过程。立即将悬液倒到预润湿的微孔滤器上, 所述预润湿的微孔滤器 (Millipore filter) 用 3ml 冰冷终止液洗涤 3 次, 并浸于 5ml 的闪烁剂 Hisafe3 流体 (LKB Products, Bromma, Sweden) 中。然后在流体闪烁计数器中对滤器进行计数。先前已测量与过滤器的非特异性结合, 并将其从总吸收中减去。结果表示为每毫克蛋白质之氨基酸吸收的皮摩尔数。

[0294] C) 确定由 IR 引起的细胞旁渗透性变化

[0295] 采用以下技术来确定细胞旁渗透性的改变。i) 稀释电势; ii) TEER; iii) 不同大小的大非离子溶质的渗透; FITC 缀合的葡聚糖和罗丹明 B 异硫氰酸-葡聚糖 (isothionate-dextran)。

[0296] IR 后缓解的稀释电势变化

[0297] 稀释电势测量用于使用能斯特方程 (Nernst equation) 来确定 Na⁺ 与 Cl⁻ 之间渗透比值的变化。在未经 IR 小鼠组和经 IR 小鼠之间比较这些实验的结果。使来自细胞旁渗透性和血浆内毒素研究的结果与电生理学数据和存活数据相关联。

[0298] 通过黏膜灌注林格液 (包含不同浓度的 Na⁺) 来诱导稀释电势, 用甘露醇来调节总摩尔渗透压浓度以保持实验间的等摩尔渗透压浓度。估计其他离子对电导的贡献小于 5%, 因此被忽略。使用 AgCl-AgCl 电极和万用表 (VCC MC8, Physiologic instruments Inc.) 来测量跨膜电势差。针对接界电势 (junction potential) (通常小于 1mV) 变化来校正稀释电势。这些实验允许使用以下公式来计算细胞旁通路的氯和钠电导。

[0299]

$$E_m = RT/F \cdot 2.303 \log_{10} \left(\frac{P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_o}{P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_i} \right)$$
$$R = 8.314472 \text{ (J/K/mol)}; F = 96.48531 \text{ (KJ/mol)};$$

渗透率 (β) = P_{Cl} / P_{Na} ; $T = 310$ (开尔文)

[0300] IR 后通过细胞旁空间之非离子溶质渗透变化

[0301] 使用 FITC 缀合的葡聚糖和罗丹明 B 异硫氰酸 - 葡聚糖 (Sigma) 在安放于尤斯室的小肠组织中研究对水溶性不带电的多种大小之溶质的细胞旁渗透性。这些研究允许确定由 IR 引起的细胞旁渗透性变化。

[0302] 通过紧密连接 (tight junction) 形成的细胞间屏障是高度受控的, 并且对大小和离子敏感。因此, 该细胞间屏障代表半渗透性扩散屏障。设计了实验以确定在基础条件下在正常上皮和暴露于辐射的上皮中对安放于尤斯室中的回肠或空肠组织中不同大小的水溶性不带电溶质的细胞旁渗透性。

[0303] 向尤斯室的黏膜侧添加溶于林格液中的浓度为 3mg/ml 的 FITC 缀合的葡聚糖和罗丹明 B 异硫氰酸 - 葡聚糖 (Sigma), 并在 37°C 下保持 60 分钟。对基底侧浴溶液中的溶液进行取样以对荧光标记的葡聚糖进行定量。FITC- 葡聚糖 :Exc485nm 和 Em :544nm, 罗丹明 B 异硫氰酸 - 葡聚糖 :Exc520nm 和 Em590nm。从安放于浴尤斯室中的小鼠回肠或空肠组织获得标准曲线, 以检查渗透性随时间的任何变化。然后, 比较经 IR 小鼠和未经 IR 小鼠之组织的这些值。

[0304] D) 确定辐照作用

[0305] 将处死用于尤斯室和 pH 稳定研究之小鼠的组织用于 H&E 染色、BrdU、粪便形成、潜血、体重、免疫组化和 Western 分析。然后, 将这些结果与未经 IR 和经 IR 小鼠中电解质和营养物的功能改变以及细胞旁渗透性变化进行比较。

[0306] 通过隐窝测定、H&E、BrdU 染色进行病理学分析

[0307] a) 隐窝测定 / 微集落存活测定

[0308] 使用推测多细胞结构中的克隆源性 ('结构 - 挽救') 细胞根据泊松统计 (Poisson statistics) 起作用的细胞杀伤模型来使目标曲线拟合于数据。推测结构保持完整, 直至平均起来每个结构小于 3 个细胞存活; 细胞的存活在所分析的剂量范围中是指数性的 (exponential); 并且该结构可从一个或更多个存活细胞再生 (regrow)。认为各上皮中心表示能够产生再生性隐窝的一个或更多个克隆源性干细胞的存活。

[0309] 在 IR 后 3.5 天处死小鼠用于隐窝微集落测定。该间隔位于 IR 后隐窝中有丝分裂恢复的峰处或附近。其用于研究 IR 的急性作用。

[0310] 对于对辐照的生物学响应, 计算了 D_0 值和 D_{10} 值。研究表明, 虽然 D_0 值之间缺少统计上的显著性差异, 但是关于的 D_0 的方差极大地取决于小鼠的数目和每数据点的区间。通过提高大于二之区间的数目和大于四的小鼠数目, 不能得到变异系数 ($\sim 5\%$) 值的降低。因而, 以每只小鼠 3 个区间和每数据点 6 只小鼠来设计该研究。

[0311] b) BrdU 染色以检测 IR 后的有丝分裂活性

[0312] 用 BrdU (30mg/kg 体重) 注射小鼠, 在 12、24、48 或 72 小时处死动物, 同时收获组织用于功能研究。每 24 小时重复一次 BrdU 注射, 在其注射后超过 24 小时继续进行 BrdU 标记研究。BrdU 标记后, 制备小鼠小肠的石蜡切片, 并用抗 BrdU 抗体 (Ab) 进行染色。针对整个隐窝和绒毛单位, 对细胞进行评分。针对每个小鼠分析至少 60 个隐窝和相应的绒毛。

将 BrdU 标记的细胞以每个隐窝或绒毛的总细胞数目进行归一化。然后,将所得百分数针对诱导时间绘图。这些研究允许确定隐窝祖细胞转变为有丝分裂期后绒毛室的速度、与隐窝中细胞分裂速度和迁移隐窝细胞动力学直接相关⁷⁷。

[0313] IR 后身体参数的变化

[0314] 研究了小鼠中的体重、粪便形成和粪便潜血以检测 IR 后的动物的营养状态变化。对于每日活动和疾病迹象,针对腹泻、缺乏梳理 (grooming)、竖起的毛发 (ruffled hair)、降低的饮食习性、嗜睡等对所有小鼠每天观察一次,并仔细记录。

[0315] 将这些研究中的发现与替代标记的血浆分析、病理学观察、Western 印迹、免疫组化和功能研究进行比较。

[0316] 用于确定电解质和营养物转运中所涉及的转运过程之分子改变的 Western 印迹分析

[0317] 检查了电解质和营养物吸收中所直接或间接涉及的以下转运蛋白的活性变化。所述转运蛋白包括:CFTR 活性(与产电 Cl 分泌相关)、NHE3 活性(与 Na⁺ 吸收相关)、绒毛中的 NBCe1-A/B 活性(与 HCO₃⁻ 分泌相关)、NKCC1 (Na⁺、K⁺ 和 Cl⁻ 基底侧吸收入细胞)、SGLT-1 (葡萄糖吸收)、B⁰、B^{0/+}、b^{0/+}、PAT (质子偶联的产电转运系统) 和 X_{AG} (表 2)。将这些研究与未经 IR、经 IR 和用 ORD 处理后的功能数据进行比较。

[0318] 用于检测转运蛋白、隐窝和绒毛细胞标记的表达方式变化的免疫组化

[0319] 当处死动物用于功能研究以及用于使用对多种转运蛋白 (CFTR、NHE3、NKCC、NBCe1-A/B、SGLT、B⁰、B^{0/+}、b^{0/+}、PAT1 和 X_{AG}) 具有特异性的多种抗体进行免疫染色时制作冷冻切片。此外,检测细胞表面标记表达方式以提供对隐窝与绒毛细胞比率的认识。这些研究允许确定经 IR 或 ORD 处理之转运蛋白的表达方式改变。

[0320] E) 用于辐照作用的替代标记的鉴定

[0321] 虽然有若干研究试图鉴定替代标记以确定从辐射开始的辐射剂量和时间以确定 GI 毒性的发生,但是这些研究基本上不成功。该实施例说明了允许鉴定替代标记以预测 GI 毒性发作的实验设计,证明其还可用于涉及多种器官的情形。

[0322] 具体地,当处死动物用于功能评价(尤斯室)时,收集血浆。在暴露于 0、1、3、5、7 或 9Gy 的 IR 剂量之后,在第 1、2、3、6 或 9 天处死小鼠。为了鉴定替代标记物,研究了肠肽、细胞因子和内毒素。

[0323] 内毒素的血浆分析

[0324] 测量了血浆内毒素水平。将血浆内毒素水平的变化与细胞旁渗透性、血浆肠肽水平、疾病和存活率的变化相关联。

[0325] 细胞因子的血浆分析

[0326] 使用 LUMINEX 多重珠阵列技术在经 IR 小鼠和未经 IR 小鼠中检查血浆细胞因子水平的变化。

[0327] 肠肽的血浆分析

[0328] 研究了肠特异性肽,包括胰岛素、胰高血糖素、胰泌素 (secretin)、缩胆囊素 (cholecystokinin)、瓜氨酸 (citrullin)、生长抑素、肽 YY、胃饥饿素 (ghrelin)、NPY 和 GLP-2。所有这些肠肽试剂盒购自 Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (CA, USA)。根据制造商的说明书进行实验。

[0329] 统计分析

[0330] 比较了正常组织与经 IR 组织之间的功能差异。使用方差分析 (ANOVA) 来计算统计显著性。比较这些测定的数据。分析相关系数 (R) 以确定最佳功能标记。所有统计分析均使用 Window 的 SAS 系统的版本 9.1 (Copyright© 2002–2003 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.) 进行。如果违反了与特定统计步骤相关的分布假设, 则使用合适的转换或非参替代物。构建接受者操作特征 (ROC) 曲线, 使用 DeLong 等. (1988) 的非参方法比较多种功能测试中 ROC 曲线下方的面积 (AUC)。使用用于多重比较的 Tukey's 法, 将总体 1 类误差率 (family-wise Type I error rate) 控制在 0.05。报道了皮尔森 (Pearson) 相关系数和相关 p 值及 95% 置信区间。

[0331] 实施例 16- 开发用于治疗 IR 诱导的胃肠损伤的理想经口方案

[0332] 该实施例说明了用于开发治疗或改善辐射诱导的 GI 毒性的经口治疗组合物的实验设计。其还确定了经口再水化饮食 (oral rehydration diet, ORD) 应当开始的时间以及在暴露于多种剂量的 IR 后至少多长时间应当施用组合物。需要施用 ORD 的时间取决于 K_m 恢复至基础水平所需的时间。

[0333] 方法

[0334] 使用来自 NCI 的 C57BL/6 小鼠 (8 周龄, 雄性)。为了确定转运蛋白的亲合力, 通过使用升高浓度的各营养物来计算饱和和动力学。初步研究表明, 一些氨基酸具有升高的吸收, 而一些示出降低的吸收, 其中 IR 后 K_m 和 V_{max} 发生变化。将升高浓度的氨基酸添加到回肠或空肠 (进行单独评价) 引起 I_{sc} 升高。将氨基酸的已知浓度对 I_{sc} 绘图允许确定饱和和动力学。施用 IR 后通过胃灌洗选择性地吸收的氨基酸使小鼠存活升高。确定以 0、1、3、5、7 或 9Gy 在第 0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25 和 30 天 IR 的小鼠中确定营养物的 K_m 和 V_{max} , 每组 10 只小鼠。

[0335] A) 用于开发理想经口辐射饮食 (ORD) 的必需氨基酸及葡萄糖的 K_m 和 V_{max} 的确定

[0336] 如本文所述, 辐照引起营养物的转运动力学的变化, 表明对各转运蛋白亲合力改变的。使用该技术确定的对葡萄糖转运蛋白的亲合力示出显著下降并且需要约两周以恢复至基础水平。已知肠内腔中未吸收葡萄糖和营养物的存在引起腹泻。确定暴露于不同剂量 IR 并且在 IR 后追踪多至 30 天时间的小鼠中营养物的 K_m 和 V_{max} 。这些研究可用于配制 ORD, 基于其随时间和辐射剂量的吸收方式。此外, IR 后示出提高吸收的营养物可用作系统的替代能量来源。于是, 制剂 (ORD) 可用于存活研究中。

[0337] IR 后尤斯室中葡萄糖转运的 K_m 和 V_{max} 变化

[0338] 研究了葡萄糖转运。具体地, 研究了葡萄糖的 K_m 和 V_{max} 。在尤斯室实验中将升高浓度的葡萄糖添加到内腔侧, 并且记录 I_{sc} 的升高。从经口扣除方案中拒绝葡萄糖直至葡萄糖转运开始改善。该制剂基于小鼠耐受经口葡萄糖的能力。

[0339] IR 后氨基酸 (a. a) 转运的 K_m 和 V_{max} 变化

[0340] 通过确定各氨基酸的 K_m 和 V_{max} 来研究基于 IR 剂量和 IR 后时间的氨基酸动力学方式。在如上所述设置的尤斯室中确定产电氨基酸的动力学指标。简要地, 升高添加到内腔液中的氨基酸的浓度导致升高的 I_{sc} 响应, 在特定氨基酸浓度下饱和。从饱和曲线计算 K_m 和 V_{max} 。

[0341] 使用 BBMV 来研究电中性的氨基酸。在不同浓度的底物 (0.025mmol/l 至 7mmol/l)

的存在下,以 3s(19) 的固定转运时间进行 BBMV 的氨基酸吸收。使用各实验组的 BBMV 合并 ($n = 12$) 以三个重复进行每个测定。最大速度 $V_{\max}$ 表示为在 3 秒内底物的皮摩尔数 / 毫克蛋白质,并且转运亲和力常数 (K_m) 表示为毫摩尔 / 升。

[0342] 优化 ORD 治疗以减轻 GI 毒性和提高存活

[0343] 发现剂量范围为 20mg/ 小鼠 / 天的赖氨酸可提高小鼠的存活。为了通过选择合适施用剂量、频率和间隔来优化 ORD 方案,对 ORD 对 7 天的存活、粪便形成、潜血和体重的影响进行分析。在致死剂量 ($15.6\text{Gy} = 1.2 \times \text{LD}_{50/7}$ 值) 的 IR 后早至 3 小时开始 ORD, IR 的剂量范围由各氨基酸或葡萄糖的 K_m 值来确定。根据目前用于成人中的葡萄糖和必需氨基酸的推荐日用量,由 K_m 来计算用于胃灌洗的葡萄糖或氨基酸的浓度。人至小鼠的剂量换算基于 K_m 因子⁷⁸。因而, K_m 与营养物的日剂量之间存在逆相关。如果 IR 提高 K_m (表明对转运蛋白的亲和力下降), 则各营养物的日剂量成比例降低。配制了额外两份 ORD 剂量, 即比所计算的剂量高和低 3 倍。根据存活研究来确定最佳 ORD 剂量。

[0344] 每天重复一次胃灌洗, 保持 7 天。根据存活研究的结果, 使 ORD 胃灌洗的剂量频率和间隔发生变化。GI 毒性在 IR 后第 2 至 3 天达峰, 然后如果 ORD 有效的话, 到 7 天逐渐恢复。每天观察小鼠至 IR 后 7 天以监测它们的存活。

[0345] 在 IR 后 7 天内, 接受常规饮食的所有小鼠均死亡或者被处死 (垂死; 定义为体重损失 20%、不能再梳理、活动降低以及好奇性降低的组合)。如果保护接受 ORD 处理的小鼠使其不受 IR 诱导的致死性, 那么用额外的 10 只小鼠 / 组以相同的处理重复存活实验以确保结果的可重复性。通过 Fisher's 精确检验 (exact test) 来分析存活数据。

[0346] 10 只动物每组的样本大小确保用以检测对于载剂组而言接近 0% 与对于各干扰而言 60% 或更高 (在 $0.017 \approx 0.05/3$ 的经调整 α 水平下进行成对比较) 的存活差异的足够高的效能 (power) ($> 80\%$), 以确保 5% 的总体 α 水平。在其中未观察到统计显著性差异或者通过 ORD 处理仅实现部分减轻的事件中, 将进行之前所述的新循环的方案优化以确保针对 IR 诱导之致死性的最大减轻效力。在选择最佳剂量之后, 评价是否需要更频繁 (每天两次) 的 ORD 胃灌洗以达到更大的辐射减轻和更迅速的隐窝恢复。确定 DMF 和 ORD 对 IR 后治疗的有效性的窗口

[0347] 剂量变更因子 (dose modification factor, DMF) 是用以测量辐射缓和剂之有效性的最重要参数之一, 其定义为 $DMF = \text{LD}_{50}^T / \text{LD}_{50}^C$, 其中 T 是 ORD 治疗组, C 表示进行常规饮食的对照组⁵¹。为了确定 ORD 治疗在减轻 IR 诱导的致死性中的效力, 使用由之前的实验所定义的最佳方案, 以载剂或 ORD 处理平均 10 只 C57BL/6 小鼠 (根据 IR 剂量, 10 至 20 只小鼠 / 组不等) 的组。将经载剂处理的小鼠暴露于 11Gy 至 13Gy IR, 采用 0.5Gy 至 1Gy 的增量。在 IR 后 7 天的观察期记录这些小鼠的存活情况。在观察期结束时或者当它们变得垂死时, 使小鼠安乐死。

[0348] 在安乐死后收集小肠和血浆。血液样本用于肠肽分析, 而小肠组织样本用于研究 IR 诱导的肠损伤。 $\text{LD}_{50/7}$ 值是 IR 诱导的 GI 毒性的良好指标。

[0349] 根据我们实验室之前的观察, 经载剂处理的小鼠的 $\text{LD}_{50/7}$ 接近 13Gy。将经 ORD 处理的组暴露于范围为 14.5 至 16.5Gy IR 的 IR (0.5 至 1Gy 的增量), 如针对经载剂处理小鼠的上述方法进行观察和检查。如果 ORD 处理组中大量小鼠存活 (即便在暴露于 16.5Gy 后也是如此), 则在后续研究中给予小鼠更高的 IR 剂量。根据经 ORD 处理动物的存活曲线来

计算其 $LD_{50/7}$ 值, 然后计算 ORD 的 DMF。经 ORD 处理小鼠的 $LD_{50/7}$ DMF 大于 1.2。

[0350] 为了确定 IR 后多长时间给出 ORD 处理, 在 IR 后 0、1、3、5、7、9、12 和 24 小时向 5 组动物施用以 ORD, 接着进行预定的 ORD 处理, 观察 7 天, 与阳性对照 (IR 处理后 3 小时) 和阴性对照 (盐水载剂) 同时进行。根据 7 天时间点的存活情况比较动物的存活情况。

[0351] 在该模型中, 考虑了 IR 后已施用 ORD 的八组的若干逻辑性回归 (logistic-regression) 模型 (结果变量, 在 7 天死亡 / 存活) 和多个时间趋势。考虑了线性模型 (因为治疗延缓升高, 所以最有可能降低存活) 和非线性模型 (呈指数的存活下降) 二者。

[0352] 使用 Fisher's 精确检验以成对方式进行 IR 后 3 小时施用与载剂的比较。存在成对比较 (不同时间组对 IR 后 3 小时, ORD 组以及对载剂), 将个体检验 α 水平保持在 0.005 ($\approx 0.05/10$)。

[0353] a) 存活率

[0354] 对于 ORD 的处理效果而言的一个主要指标是确定存活率。每天记录两次, 并生成存活曲线。

[0355] b) 每日活动或疾病迹象

[0356] 针对疾病迹象, 如腹泻、缺乏梳理、竖起的毛发、降低的饮食习性、嗜睡等, 对所有小鼠每天观察一次, 并仔细记录。

[0357] c) 体重、粪便形成和潜血

[0358] 为了确定 ORD 是否可逆转 IR 诱导的 GI 毒性的一些作用, 将在处死那些动物用于本文所述的功能研究时取出结肠, 针对粪便形成绘图并分析粪便的潜血。这些研究允许确定缓和剂是否能够保持肉眼可见的 GI 黏膜完整性及其功能。

[0359] d) 免疫组化

[0360] 使用来自空肠或回肠的 H&E 染色的切片分析固有层 (lamina propria) 中的炎性细胞浸润。仔细确定淋巴滤泡的分布频数。

[0361] 顺序确定针对急性 GI 毒性的最佳剂量、起始时间和 ORD 方案。在 IR 暴露后用不同剂量配方的 ORD 处理小鼠。通过确定经 7 天的存活 (是对否) 作为响应变量以及剂量水平作为说明性变量来在逻辑性回归模型中确定最佳剂量。由于剂量响应曲线的不确定性, 提出若干似乎合理的剂量响应模型。确定剂量响应模型之后, 计算最小有效剂量 (minimum effective dose, MED)。通过采用 ANOVA 模型中的方差和估计平均响应的等效检验回答治疗的起始时间和最佳持续时间。

[0362] 实施例 17 确定 GI 功能的功能改善

[0363] 在该实施例中, 进行电生理学实验以确定 ORD 如何有助于恢复 IR 损伤的肠黏膜以吸收电解质和营养物。使功能变化与血浆替代标记、细胞学和身体观察 (如每日活动、体重和粪便形成) 相关联。粪便潜血、细胞学如隐窝测定、H&E 染色、BrdU 染色、免疫组化和 Western 印迹分析。这些研究允许确定在分子、细胞和功能水平上 ORD 对 GI 功能的保护作用。

[0364] 方法

[0365] 使用来自 NCI 的 C57BL/6 小鼠 (8 周龄, 雄性)。进行功能研究、身体观察、细胞学、免疫组化、Western 分析, 将血浆替代标记用作 IR 诱导的 GI 毒性的特定指标。将小鼠随机

分组,使用以 1.84Gy/ 分钟的剂量速率递送 IR 的 Cs 源以 Shepherd Mark-I 辐照腹部。用 1、3、5、7 和 9Gy 辐照小鼠,然后施用 ORD。用 ORD 处理小鼠。在第 6 天处死小鼠,组织用于功能研究、组织病理学、Western 印迹和免疫组化。

[0366] A)ORD 的作用与电解质和营养物吸收之功能性改善的相关性

[0367] 使用一系列指标来评价处理效果:1) 对小鼠每天称重,紧密观察任何疾病迹象;2) 当处死动物用于功能研究(电解质和营养物吸收)、隐窝测定、免疫组化和 western 印迹分析时,分析血液样本和物理参数。血液样本用于测量血浆内毒素(肠屏障功能障碍的指标)、细胞因子、肠肽(胰岛素、胰高血糖素、胰泌素、缩胆囊肽、瓜氨酸、生长抑素、肽 YY、胃饥饿素、NPY 和 GLP2)、瓜氨酸、葡萄糖和胰岛素。

[0368] 尤斯室研究中 Na^+ 和 Cl^- 的跨上皮通量的确定

[0369] 为了研究 ORD 的功能改善,将得自小鼠的空肠和回肠片(进行单独评价)安放于尤斯室中,并如实施例 15 所述进行实验。比较未经 IR、经 IR 和经 ORD 处理小鼠组的 Na^+ 和 Cl^- 吸收。

[0370] 使用 pH 稳定技术确定 pHCO_3 分泌

[0371] 如实施例 15 所述进行实验。经 ORD 处理的 HCO_3 分泌恢复表明功能改善。比较未经 IR、经 IR 和经 ORD 处理小鼠组的 HCO_3 分泌。

[0372] 尤斯室中营养物吸收的确定以及囊泡研究

[0373] 如实施例 15 所述,确定葡萄糖、产电氨基酸和电中性氨基酸的吸收。比较未经 IR、经 IR 和经 ORD 处理小鼠组这些研究的结果。

[0374] 确定 IR 后缓和的细胞旁渗透性变化

[0375] 经 ORD 处理的细胞旁渗透性降低表明上皮完整性的改善。这些变化将表明血浆内毒素水平的伴随改善。

[0376] 将 ORD 作用与隐窝测定、H&E 染色、BrdU、粪便形成、潜血、体重、免疫组化和 Western 分析相关联

[0377] 该研究类似于之前实施例 15 所述,并且比较未经 IR、经 IR 和经 ORD 处理小鼠组的结果。

[0378] 用以确定解剖学改善的组织病理学分析

[0379] 如实施例 15 所示,处理样本用于 H&E 染色和病理分析,包括隐窝测定、BrdU 染色。简要地,将组织在福尔马林中固定,在石蜡块中处理,用 H&E 染色。

[0380] 免疫组化用以检测转运蛋白、隐窝和绒毛细胞标记的表达谱(expression pattern)变化

[0381] 采用对多种转运蛋白(NHE3、NBCe1-A/B、SGLT、 $\text{B}^{0/+}$ 、 $\text{b}^{0/+}$ 、 X_{AG})和细胞表面标记(Lgr5、EphB2 和 EphB3)具有特异性的多种抗体,将所收获的组织用于免疫染色。该方法类似于实施例 15 所述。这些研究将有助于确定用 ORD 处理之后绒毛和隐窝细胞形成的程度。

[0382] Western 印迹分析用以研究电解质和营养物转运中所涉及的转运过程的分子改变

[0383] 该方法类似于实施例 15 所述。将检查 CFTR 活性(与产电 Cl^- 分泌相关)、NHE3 活性(与 Na^+ 吸收相关)、绒毛中的 NBCe1-A/B 活性(与 HCO_3 分泌相关)、SGLT-1、 $\text{B}^{0/+}$ 、 $\text{b}^{0/+}$ 或 X_{AG} 。

[0384] 采用替换标记的血浆分析与 ORD 的作用相关联

[0385] 初步研究已示出 IR 后小鼠中肠肽的变化。检查了替换标记水平相对于基础水平的变化,结果将表明经 ORD 处理的全身改善。

[0386] 统计分析

[0387] 计算原始数据的平均和标准偏差,将采用图解技术如条形图。用以比较这两组(处理对载剂)的主要方法采用基于纵向数据的混合作用模型(线性或非线性)。

[0388] 本文中所引用的全部参考文献,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入,程度如同各参考文献单独地并且特别是示出通过引用并入并且在本文中以其整体给出。

[0389] 除非在本文中另有指明,或者明确地与上下文相矛盾,否则在描述本发明的上下文中所使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。

[0390] 本文中的值之范围的叙述仅意在作为单独地指落在该范围内的各单独的值的便捷方法,在本文中另有指明除外,各单独的值并入说明书中,如同其在本文中单独引用。除非另有指明,否则本文中所提供的所有准确的值是相应近似值的代表(例如,关于特定因素或测量结果而提供的所有准确的示例性值可理解为还提供相应的近似测量结果,适当时由“约”修饰)。

[0391] 本文中所提供的任何和全部实施例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅意在更好地说明本发明,并且不对本发明的范围作出限制,另有指明除外。说明书中的任何语言都不应当解释为表示对于本发明的实施而言必要的任何要素,明示地陈述除外。

[0392] 除非上下文中另有指明,或者明确地与上下文相矛盾,否则使用提及要素的术语如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”的本发明任意方面或实施方案的本文中的描述意在为“由...组成”、“基本由...组成”或“基本包含”特定要素的本发明的类似方面或实施方案提供支持,(例如,除非上下文中另有指明,或者明确地与上下文相矛盾,否则包含特定要素的本文所述的组合物应当理解为还描述由该要素组成的组合物)。

[0393] 应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅出于举例说明的目的,并且鉴于其的多种修改或变化将提示给本领域技术人员并且包含在本申请的精神和范围内。

[0394] 参考文献

[0395] 1. Wolfe, B. M., et al. Experience with home parenteral nutrition. Am J Surg 146, 7-14 (1983).

[0396] 2. Beer, W. H., Fan, A. & Halsted, C. H. Clinical and nutritional implications of radiation enteritis. Am J Clin Nutr 41, 85-91 (1985).

[0397] 3. Donaldson, S. S. Nutritional consequences of radiotherapy. Cancer Res 37, 2407-2413 (1977).

[0398] 4. Theis, V. S., Sripadam, R., Ramani, V. & Lal, S. Chronic Radiation Enteritis. Clin Oncol (R Coll Radiol) (2009).

[0399] 5. Gunnlaugsson, A., et al. Dose-volume relationships between enteritis and irradiated bowel volumes during 5-fluorouracil and oxaliplatin based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. Acta Oncol 46, 937-944 (2007).

[0400] 6. Dickerson, J. W. Nutrition in the cancer patient: a review. J R Soc Med 77, 309-315 (1984).

- [0401] 7. Bounous, G., et al. Dietary protection during radiation therapy. *Strahlentherapie* 149, 476-483 (1975).
- [0402] 8. Alpers, D. H. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *Gastroenterology* 130, S106-116 (2006).
- [0403] 9. Hauer-Jensen, M., Wang, J., Boerma, M., Fu, Q. & Denham, J. W. Radiation damage to the gastrointestinal tract: mechanisms, diagnosis, and management. *Curr Opin Support Palliat Care* 1, 23-29 (2007).
- [0404] 10. Tankel, H. I., Clark, D. H. & Lee, F. D. Radiation enteritis with malabsorption. *Gut* 6, 560-569 (1965).
- [0405] 11. Yeoh, E. K., et al. Gastrointestinal function in chronic radiation enteritis—effects of loperamide-N-oxide. *Gut* 34, 476-482 (1993).
- [0406] 12. Gavazzi, C., Bhooori, S., Lovullo, S., Cozzi, G. & Mariani, L. Role of home parenteral nutrition in chronic radiation enteritis. *Am J Gastroenterol* 101, 374-379 (2006).
- [0407] 13. Traber, P. G., Yu, L., Wu, G. D. & Judge, T. A. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villous axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol* 262, G123-130 (1992).
- [0408] 14. Minhas, B. S. & Field, M. Localization of bicarbonate transport along the crypt-villous axis in rabbit ileum. *Gastroenterology* 106, 1562-1567. (1994).
- [0409] 15. Welsh, M. J., Smith, P. L., Fromm, M. & Frizzell, R. A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218, 1219-1221. (1982).
- [0410] 16. Rijke, R. P., van der Meer-Fiegeen, W. & Galjaard, H. Effect of villous length on cell proliferation and migration in small intestinal epithelium. *Cell Tissue Kinet* 7, 577-586 (1974).
- [0411] 17. Wright, N. A. & Irwin, M. The kinetics of villous cell populations in the mouse small intestine. I. Normal villi: the steady state requirement. *Cell Tissue Kinet* 15, 595-609 (1982).
- [0412] 18. Roberts, S. A., Hendry, J. H. & Potten, C. S. Intestinal crypt clonogens: a new interpretation of radiation survival curve shape and clonogenic cell number. *Cell Prolif* 36, 215-231 (2003).
- [0413] 19. Roberts, S. A. & Potten, C. S. Clonogen content of intestinal crypts: its deduction using a microcolony assay on whole mount preparations and its dependence on radiation dose. *Int J Radiat Biol* 65, 477-481 (1994).
- [0414] 20. Potten, C. S., Owen, G. & Roberts, S. A. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 57, 185-199 (1990).
- [0415] 21. MacNaughton, W. K. Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 523-528 (2000).

- [0416] 22. Rodier, J. F. Radiation enteropathy--incidence, aetiology, risk factors, pathology and symptoms. *Tumori* 81, 122-125 (1995).
- [0417] 23. Pia de la Maza, M., et al. Acute nutritional and intestinal changes after pelvic radiation. *J Am Coll Nutr* 20, 637-642 (2001).
- [0418] 24. Leiper, K. & Morris, A. I. Treatment of radiation proctitis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19, 724-729 (2007).
- [0419] 25. Denton, A. S., Andreyev, H. J., Forbes, A. & Maher, E. J. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. *Br J Cancer* 87, 134-143 (2002).
- [0420] 26. Andreyev, J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 54, 1051-1054 (2005).
- [0421] 27. DeCosse, J. J., et al. The natural history and management of radiation induced injury of the gastrointestinal tract. *Ann Surg* 170, 369-384 (1969).
- [0422] 28. Libotte, F., et al. Survival of patients with radiation enteritis of the small and the large intestine. *Acta Chir Belg* 95, 190-194 (1995).
- [0423] 29. Galland, R. B. & Spencer, J. The natural history of clinically established radiation enteritis. *Lancet* 1, 1257-1258 (1985).
- [0424] 30. Classen, J., et al. Radiation-induced gastrointestinal toxicity. Pathophysiology, approaches to treatment and prophylaxis. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3, 82-84 (1998).
- [0425] 31. Donaldson, S. S., et al. Radiation enteritis in children. A retrospective review, clinicopathologic correlation, and dietary management. *Cancer* 35, 1167-1178 (1975).
- [0426] 32. Voitk, A. J., Brown, R. A., McArdle, A. H., Hinchey, E. J. & Gurd, F. N. Clinical uses of an elemental diet: preliminary studies. *Can Med Assoc J* 107, 123-129 (1972).
- [0427] 33. Klimberg, V. S., et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 66, 62-68 (1990).
- [0428] 34. Klimberg, V. S., et al. Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg* 125, 1040-1045 (1990).
- [0429] 35. Jensen, J. C., et al. Prevention of chronic radiation enteropathy by dietary glutamine. *Ann Surg Oncol* 1, 157-163 (1994).
- [0430] 36. Kozelsky, T. F., et al. Phase III double-blind study of glutamine versus placebo for the prevention of acute diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy. *J Clin Oncol* 21, 1669-1674 (2003).
- [0431] 37. Silvain, C., et al. Long-term outcome of severe radiation enteritis treated by total parenteral nutrition. *Dig Dis Sci* 37, 1065-1071 (1992).
- [0432] 38. Ekelund, M., Kristensson, E. & Ekblad, E. Total parenteral nutrition causes circumferential intestinal atrophy, remodeling of the intestinal wall, and

redistribution of eosinophils in the rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 52, 1833-1839 (2007).

[0433] 39. Jackson, W. D. & Grand, R. J. The human intestinal response to enteral nutrients :a review. *J Am Coll Nutr* 10, 500-509 (1991).

[0434] 40. Burrin, D. G. , et al. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets :how much is enough ? *Am J Clin Nutr* 71, 1603-1610 (2000).

[0435] 41. Drucker, D. J. , et al. Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide-2. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23, S98-100 (1999).

[0436] 42. Niinikoski, H. , et al. Onset of small intestinal atrophy is associated with reduced intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *J Nutr* 134, 1467-1474 (2004).

[0437] 43. Matheson, P. J. , Wilson, M. A. & Garrison, R. N. Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* 93, 182-196 (2000).

[0438] 44. Nowicki, P. T. , Stonestreet, B. S. , Hansen, N. B. , Yao, A. C. & Oh, W. Gastrointestinal blood flow and oxygen consumption in awake newborn piglets : effect of feeding. *Am J Physiol* 245, G697-702 (1983).

[0439] 45. van Goudoever, J. B. , et al. Secretion of trophic gut peptides is not different in bolus- and continuously fed piglets. *J Nutr* 131, 729-732 (2001).

[0440] 46. Knickelbein, R. , Aronson, P. S. , Schron, C. M. , Seifter, J. & Dobbins, J. W. Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *The American Journal of Physiology* 249, G236-245 (1985).

[0441] 47. Field, M. , Fromm, D. & McColl, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am J Physiol* 220, 1388-1396 (1971).

[0442] 48. Sellin, J. H. & DeSoignie, R. Rabbit proximal colon :a distinct transport epithelium. *Am J Physiol* 246, G603-610 (1984).

[0443] 49. Turnberg, L. A. , Bieberdorf, F. A. , Morawski, S. G. & Fordtran, J. S. Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum. *J Clin Invest* 49, 557-567 (1970).

[0444] 50. Bach, S. P. , Renahan, A. G. & Potten, C. S. Stem cells :the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21, 469-476 (2000).

[0445] 51. Kaur, P. & Potten, C. S. Cell migration velocities in the crypts of the small intestine after cytotoxic insult are not dependent on mitotic activity. *Cell Tissue Kinet* 19, 601-610 (1986).

[0446] 52. Qiu, J. M. , Roberts, S. A. & Potten, C. S. Cell migration in the small and large bowel shows a strong circadian rhythm. *Epithelial Cell Biol* 3, 137-148 (1994).

[0447] 53. Al-Dewachi, H. S. , Wright, N. A. , Appleton, D. R. & Watson, A. J. The effect

of a single injection of hydroxyurea on cell population kinetics in the small bowel mucosa of the rat. *Cell Tissue Kinet*10,203-213(1977).

[0448] 54. Hendry, J. H., et al. The response of murine intestinal crypts to short-range promethium-147beta irradiation:deductions concerning clonogenic cell numbers and positions. *Radiat Res*118,364-374(1989).

[0449] 55. Okine, E. K., Glimm, D. R., Thompson, J. R. & Kennelly, J. J. Influence of stage of lactation on glucose and glutamine metabolism in isolated enterocytes from dairy cattle. *Metabolism*44,325-331(1995).

[0450] 56. Alpers, D. H. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells? *Curr Opin Gastroenterol*16,155(2000).

[0451] 57. Wu, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*128, 1249-1252(1998).

[0452] 58. Tome, D. & Bos, C. Lysine requirement through the human life cycle. *J Nutr*137,1642S-1645S(2007).

[0453] 59. Vayro, S., Lo, B. & Silverman, M. Functional studies of the rabbit intestinal Na⁺/glucose carrier(SGLT1)expressed in COS-7cells:evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na⁺-activation of the carrier. *Biochem J*332(Pt1),119-125(1998).

[0454] 60. Loo, D. D., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E. M. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*93,13367-13370(1996).

[0455] 61. Benson, A. B., 3rd, et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol*22,2918-2926(2004).

[0456] 62. Mehta, D. I., Horvath, K., Chanasongcram, S., Hill, I. D. & Panigrahi, P. Epidermal growth factor up-regulates sodium-glucose cotransport in enterocyte models in the presence of cholera toxin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*21, 185-191(1997).

[0457] 63. Thomson, A. B., Cheeseman, C. I. & Walker, K. Late effects of abdominal radiation on intestinal uptake of nutrients. *Radiat Res*107,344-353(1986).

[0458] 64. Porteous, J. W. Intestinal metabolism. *Environ Health Perspect*33, 25-35(1979).

[0459] 65. Balda, M. S. & Matter, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J*19, 2024-2033(2000).

[0460] 66. Stefani, E. & Cereijido, M. Electrical properties of cultured epithelioid cells(MDCK). *J Membr Biol*73,177-184(1983).

[0461] 67. Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., Lazaro, A. & Cereijido, M. Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *J Membr Biol*107,43-56(1989).

[0462] 68. Souba, W. W., Scott, T. E. & Wilmore, D. W. Intestinal consumption of

intravenously administered fuels, JPENJ Parenter Enteral Nutr9,18-22(1985).

[0463] 69. Cardona Pera, D. [Administration of glutamine and its dipeptides in parenteral nutrition. Which patients are candidates?]. Nutr Hosp13,8-20(1998).

[0464] 70. Joiner, W. J., et al. Active K⁺ secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol285, G185-196(2003).

[0465] 71. Vidyasagar, S. & Ramakrishna, B. S. Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon. J Physiol (Lond) 539, 163-173(2002).

[0466] 72. Vidyasagar, S., Barmeyer, C., Geibel, J., Binder, H. J. & Rajendran, V. M. Role of Short-Chain Fatty Acids in Colonic HCO₃ Secretion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol288, G1217-1226(2005).

[0467] 73. Vidyasagar, S., Rajendran, V. M. & Binder, H. J. Three distinct mechanisms of HCO₃-secretion in rat distal colon. Am J Physiol Cell Physiol287, C612-621(2004).

[0468] 74. Zhang, H., Ameen, N., Melvin, J. E. & Vidyasagar, S. Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. J Physiol581,1221-1233(2007).

[0469] 75. Hopfer, U., Nelson, K., Perrotto, J. & Isselbacher, K. J. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. J Biol Chem248, 25-32(1973).

[0470] 76. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem72, 248-254(1976).

[0471] 77. Heath, J. P. Epithelial cell migration in the intestine. Cell Biol Int20, 139-146(1996).

[0472] 78. Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J22,659-661(2008).

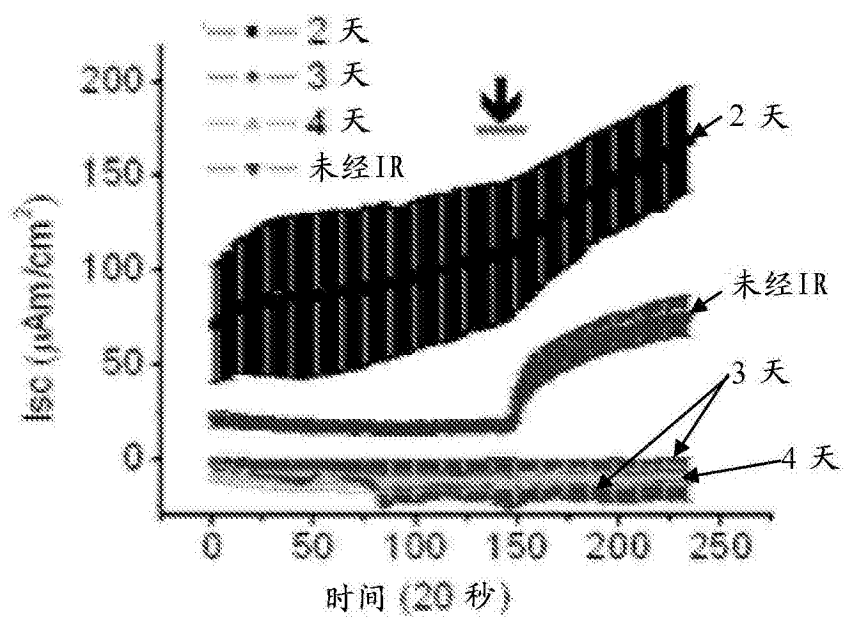


图 1A

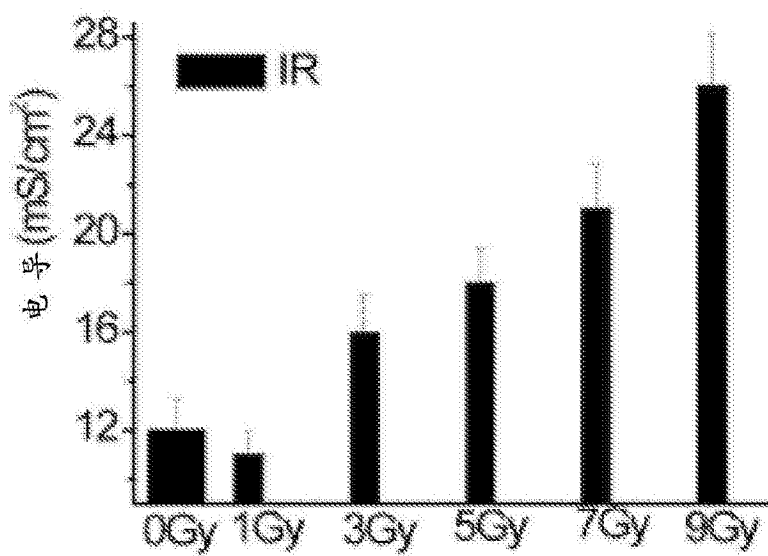


图 1B

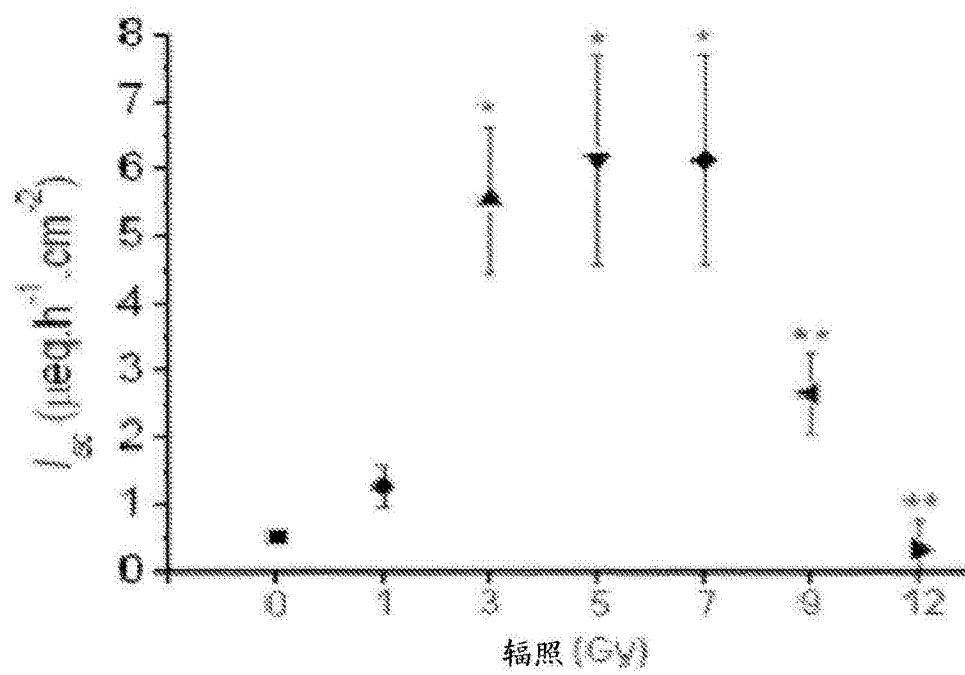


图 2A

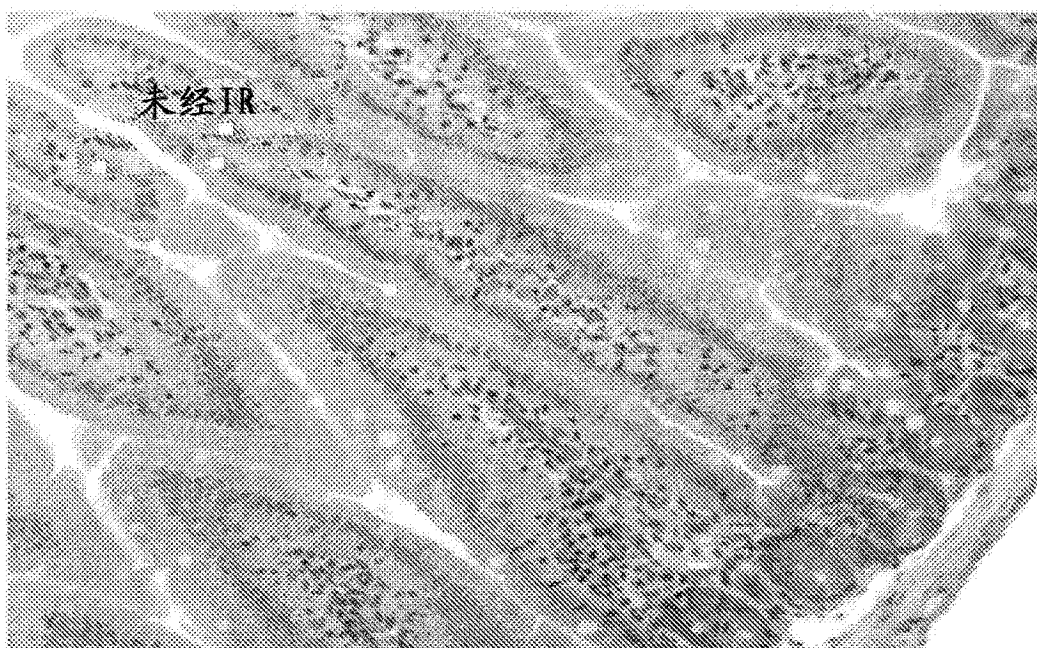


图 2B



图 2C

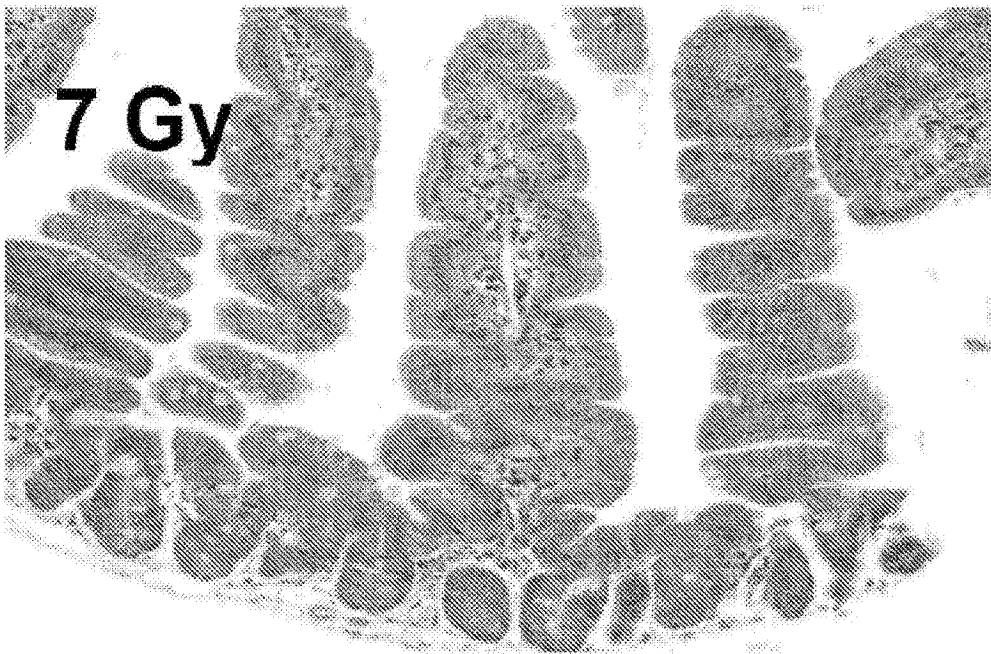


图 2D

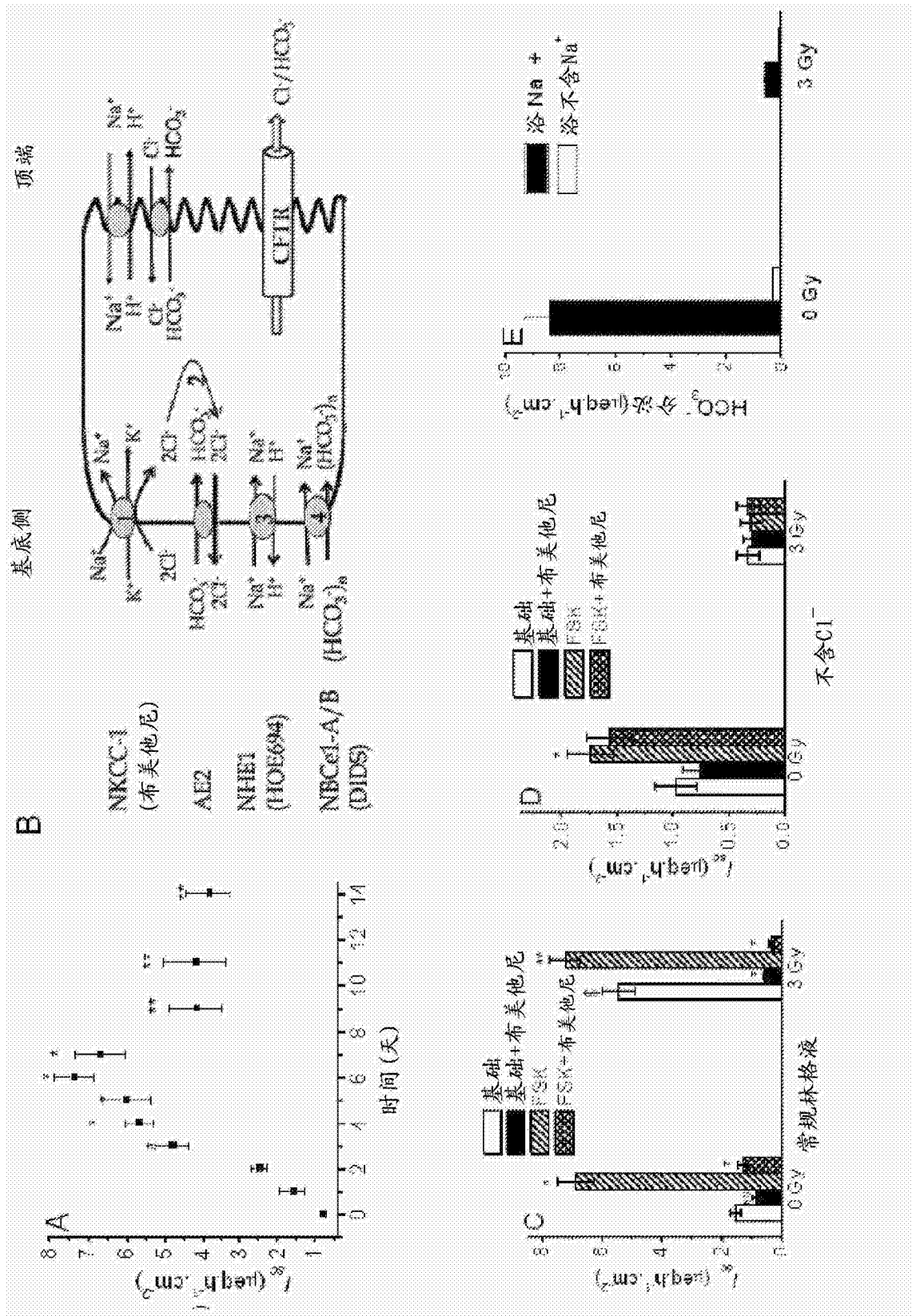


图 3

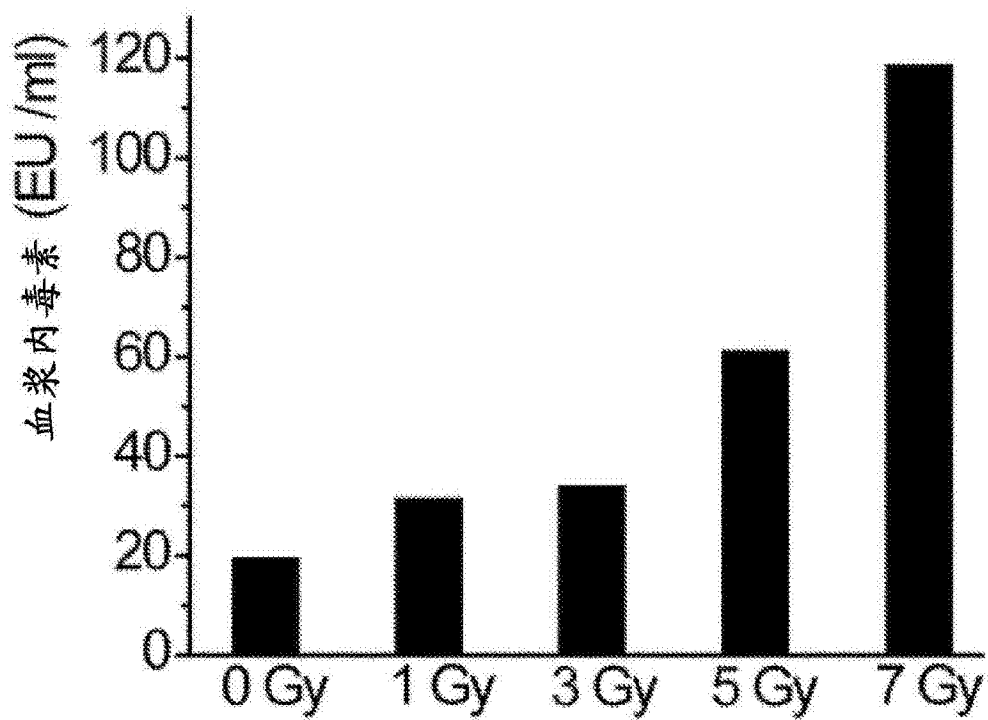


图 4A

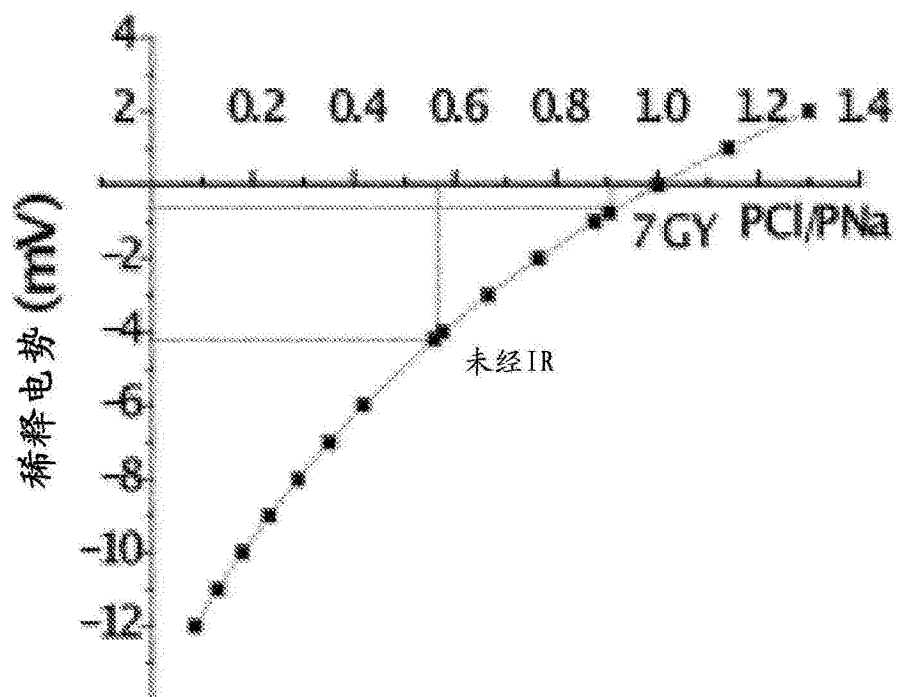


图 4B

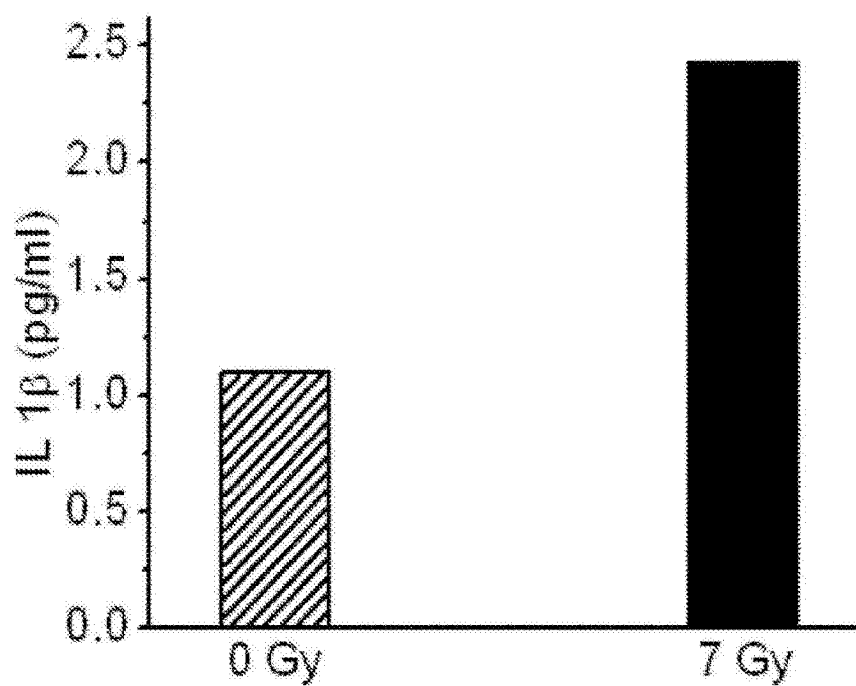


图 5A

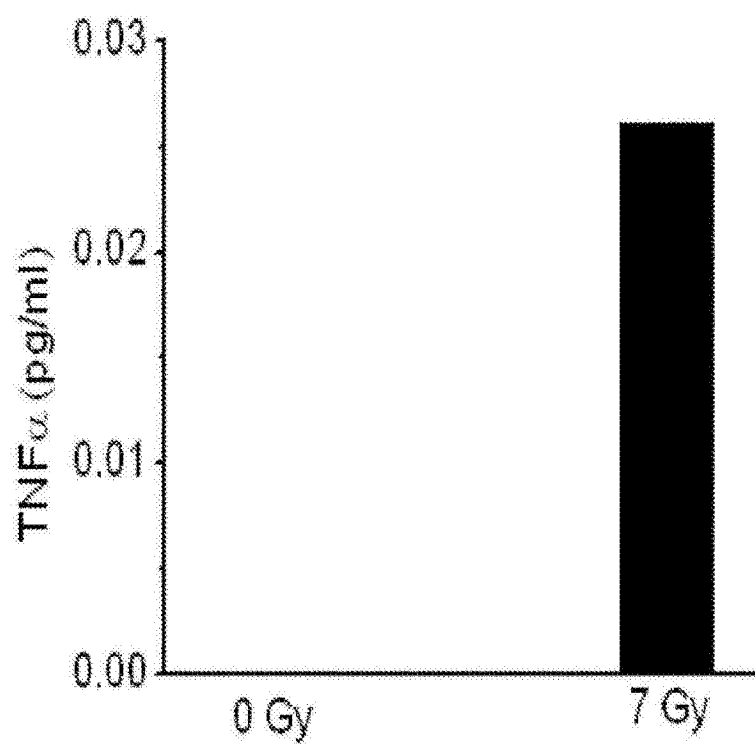


图 5B

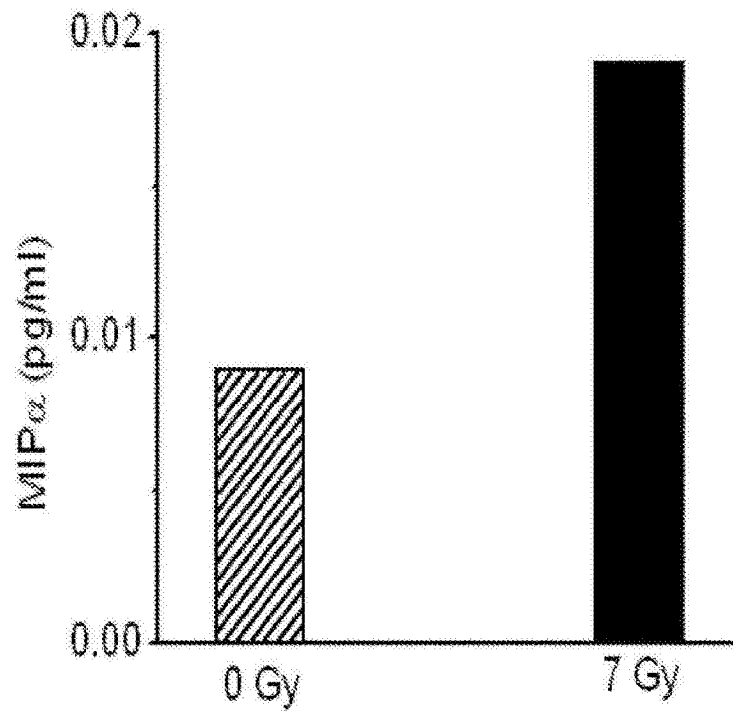


图 5C

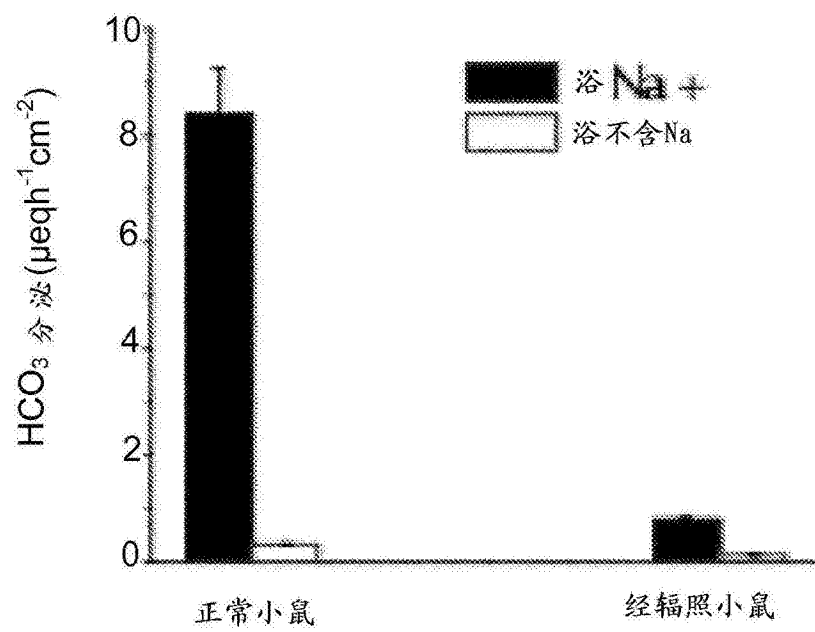


图 6A

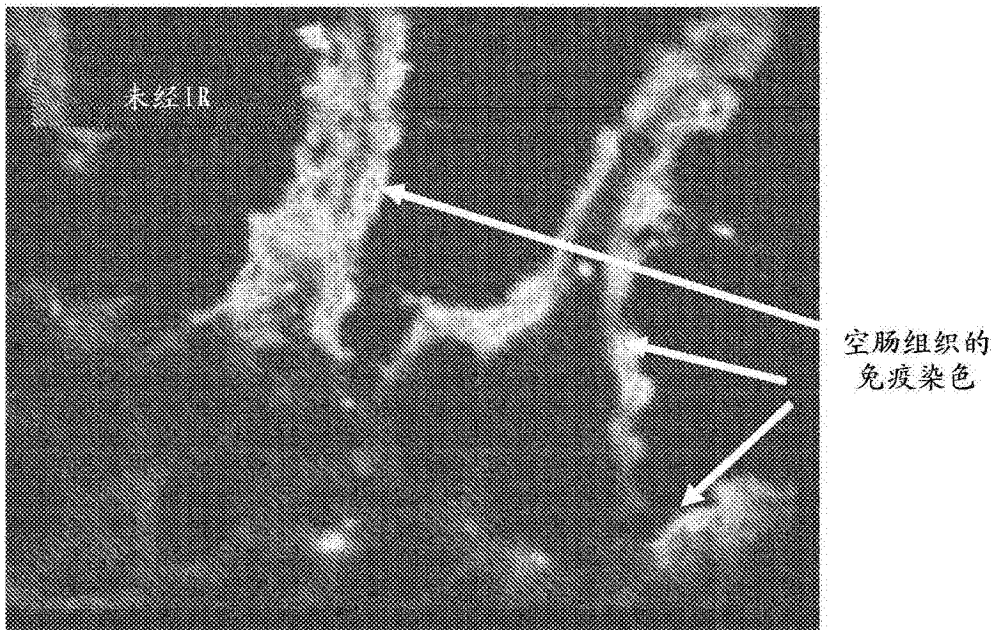


图 6B

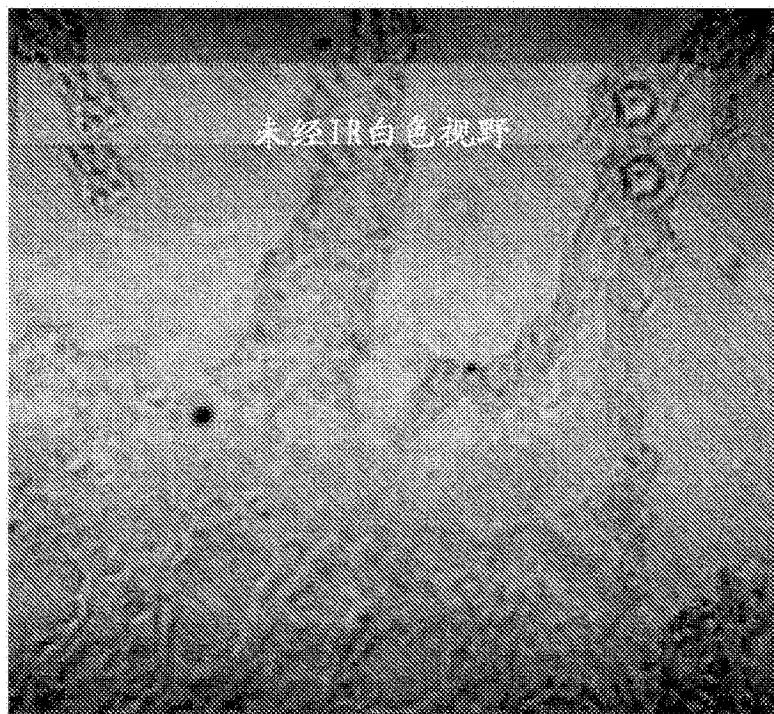


图 6C

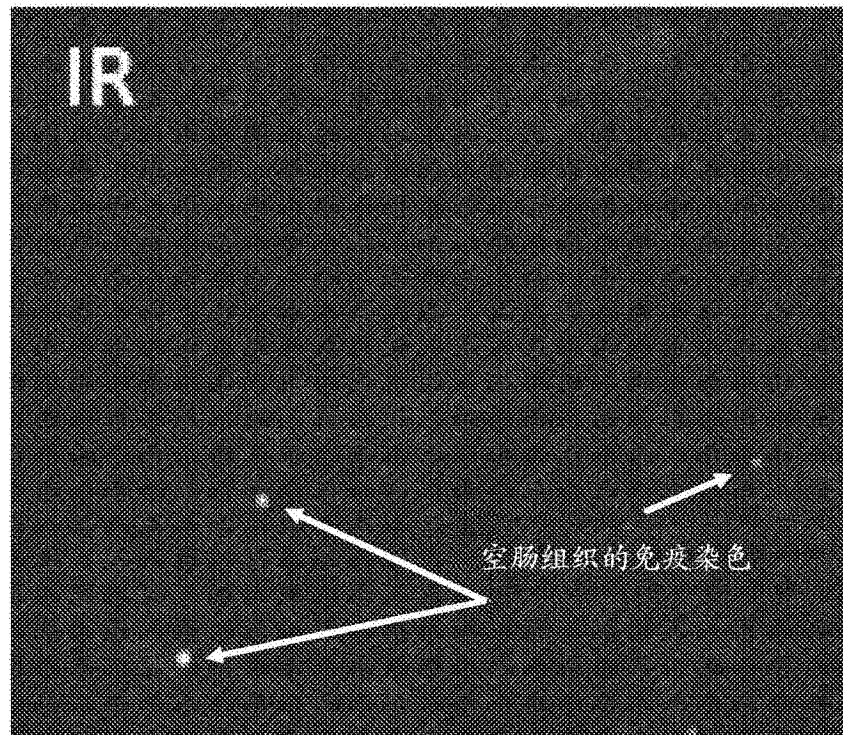


图 6D

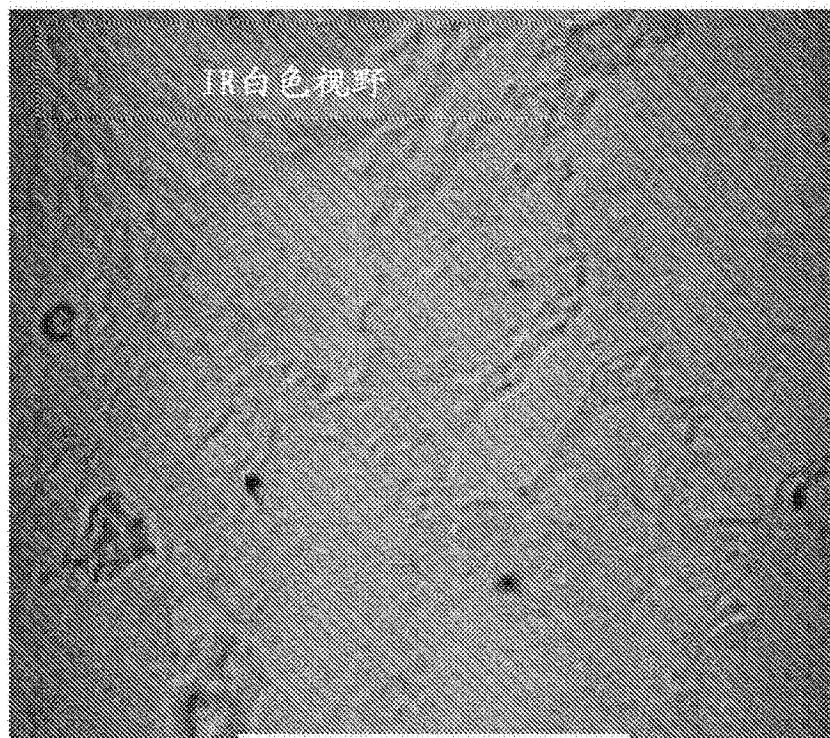


图 6E

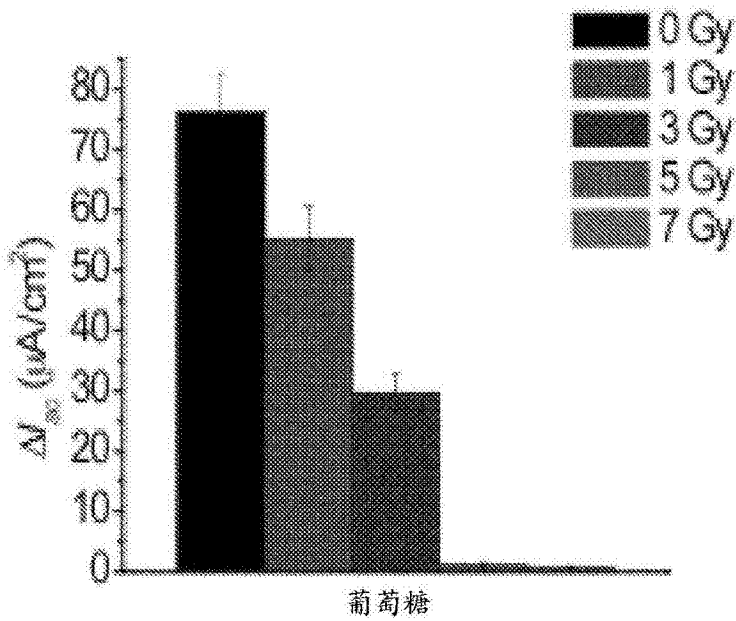


图 7A

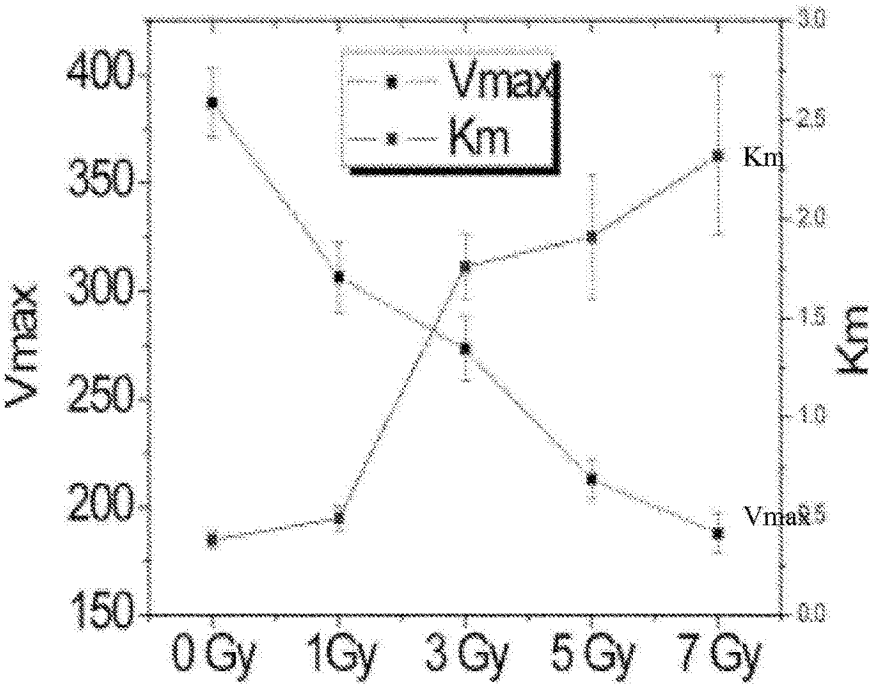


图 7B

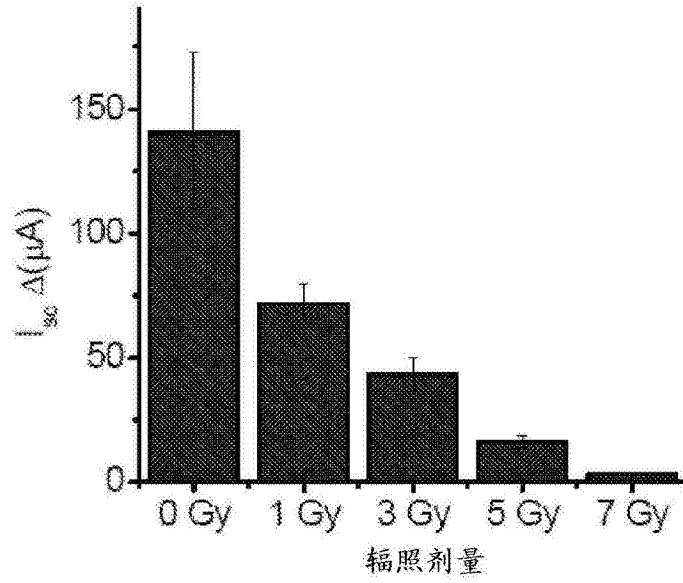
Swiss 小鼠中不同辐射剂量后的葡萄糖刺激的电流变化 (Δ)

图 8

正常组织葡萄糖饱和曲线

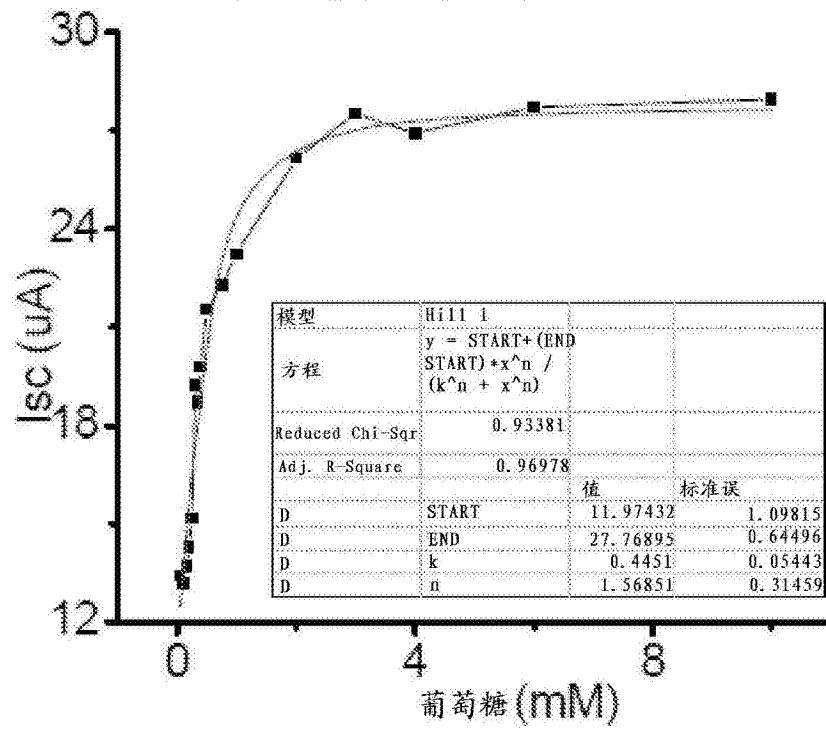


图 9A

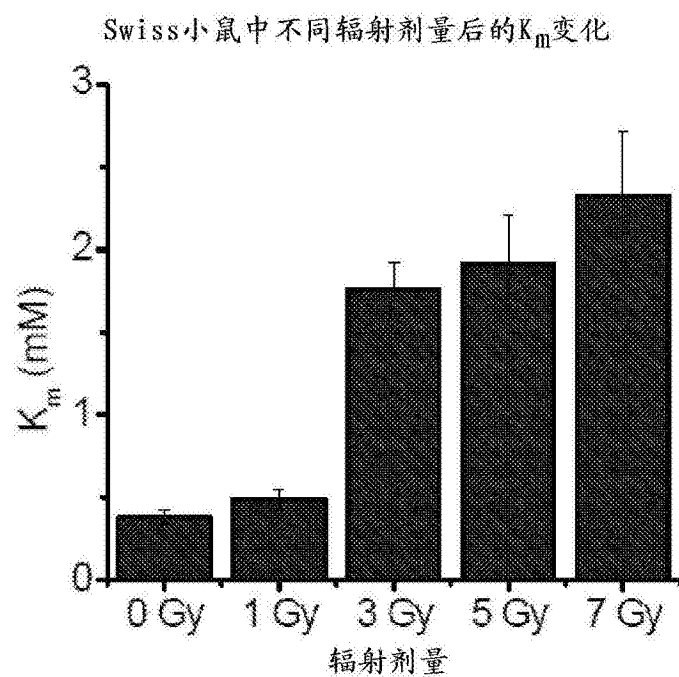


图 9B

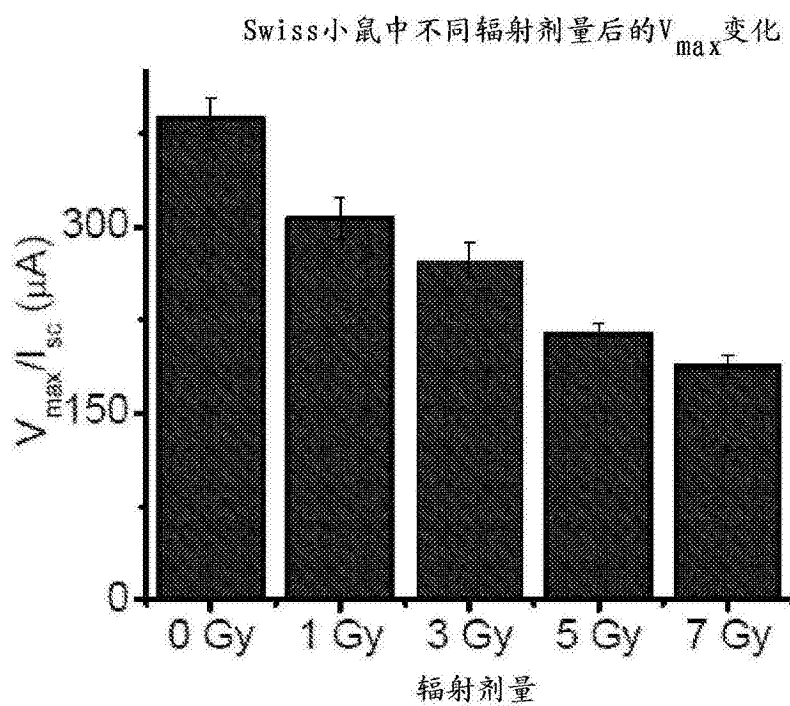


图 10

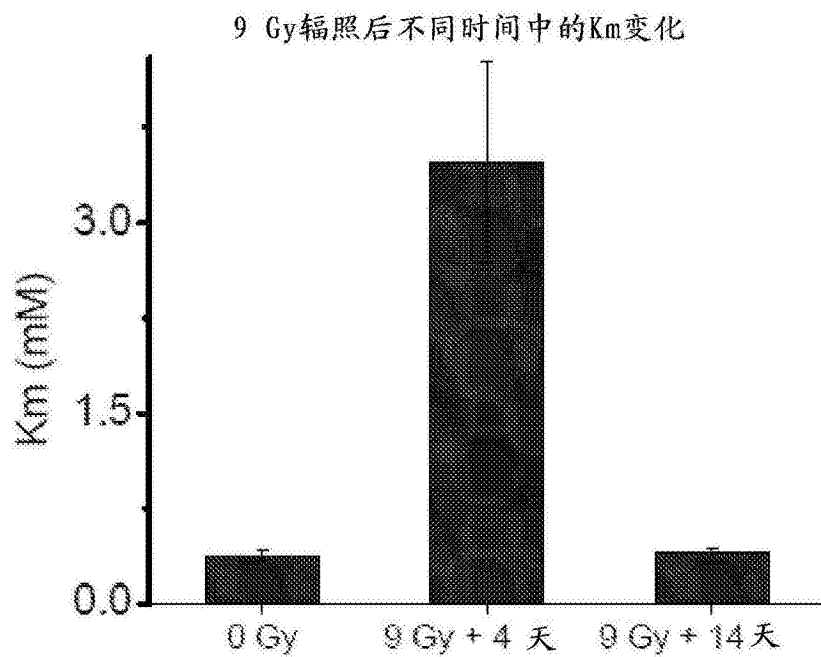


图 11

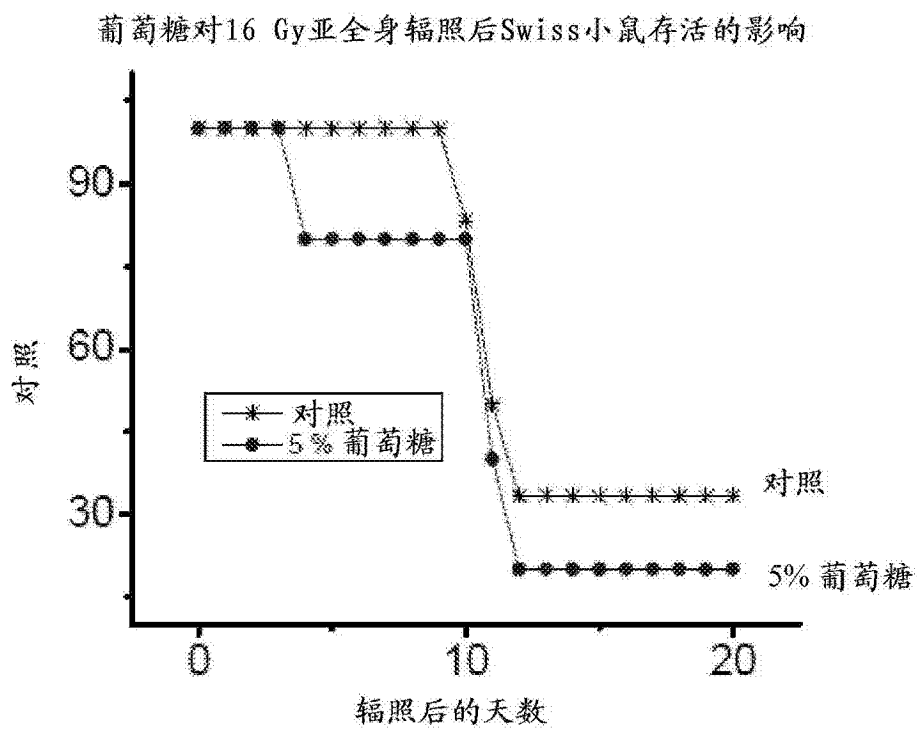


图 12A

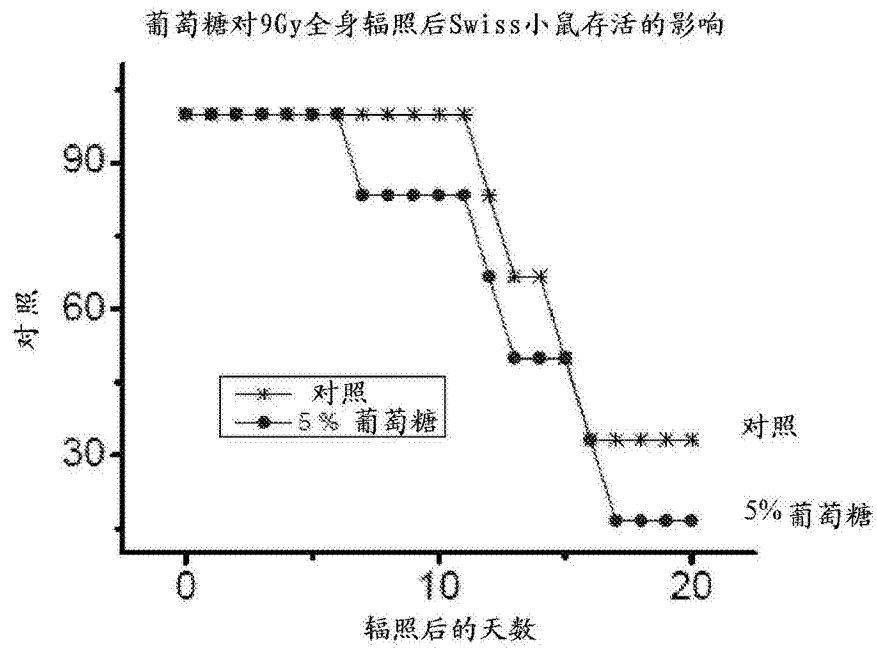


图 12B

不同辐照剂量后SGLT-1表达升高
(空肠裂解物)

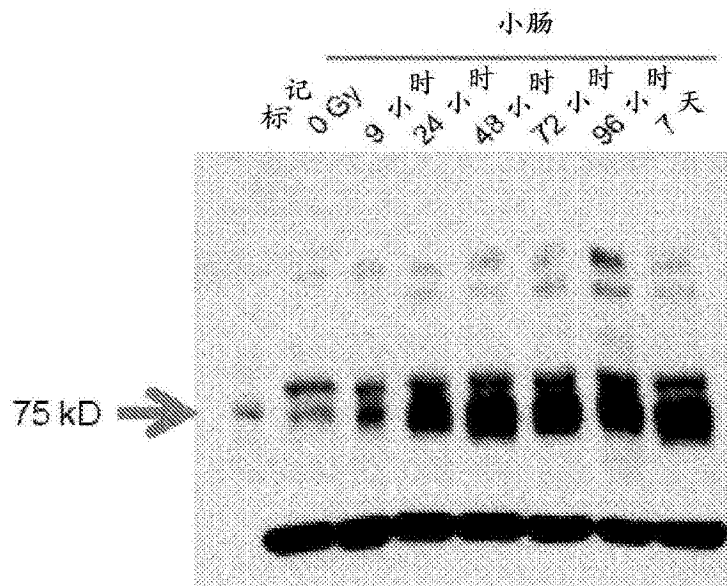


图 13

不同辐照时间后SGLT-1表达升高（刷状缘膜囊泡）

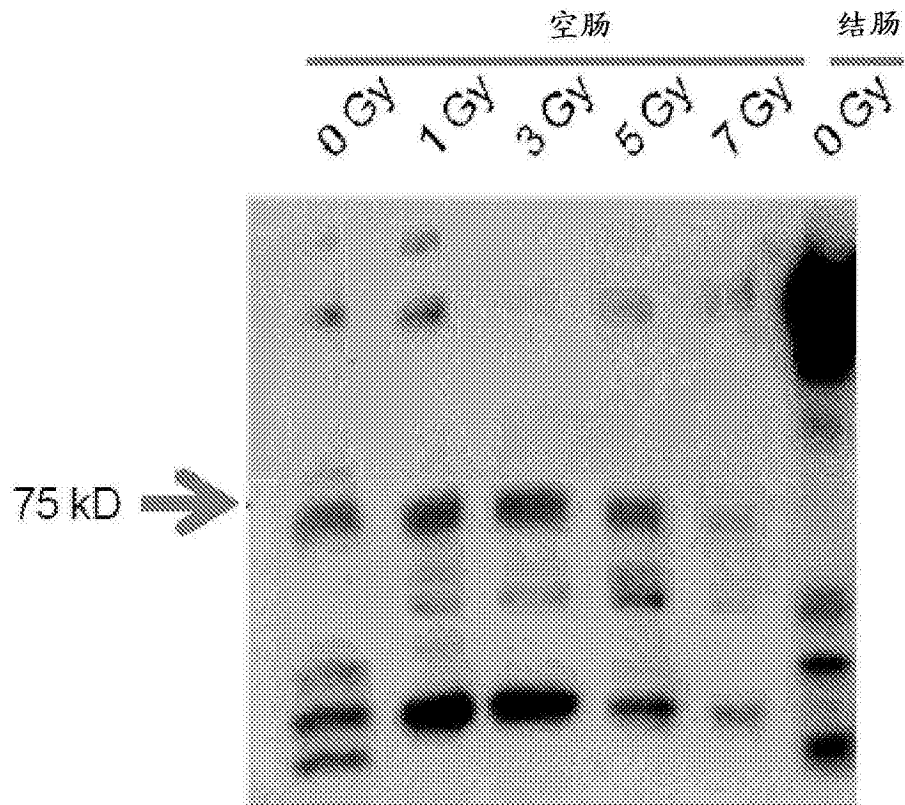


图 14

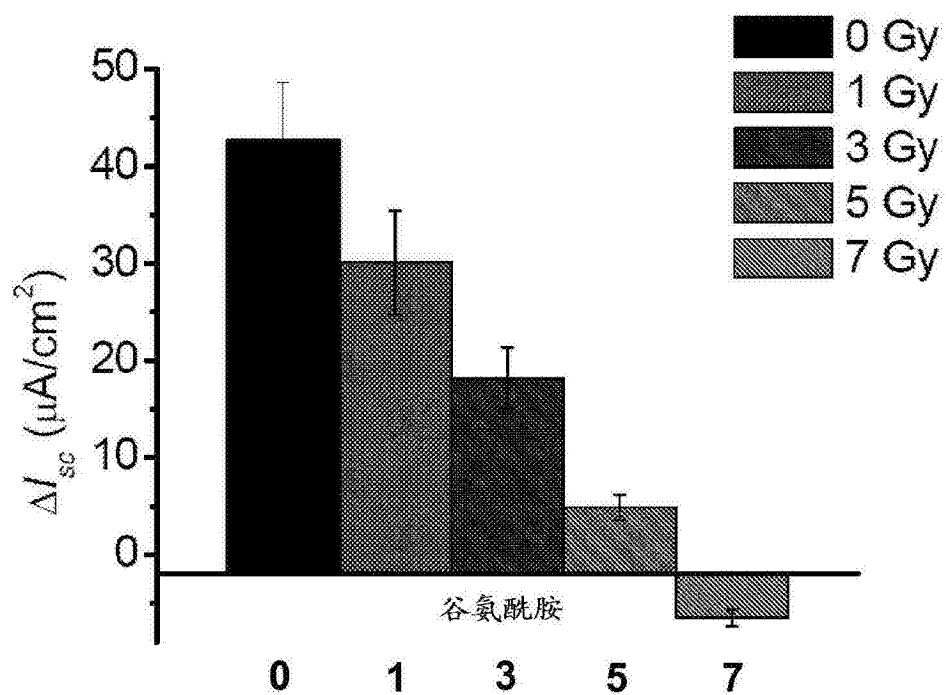


图 15

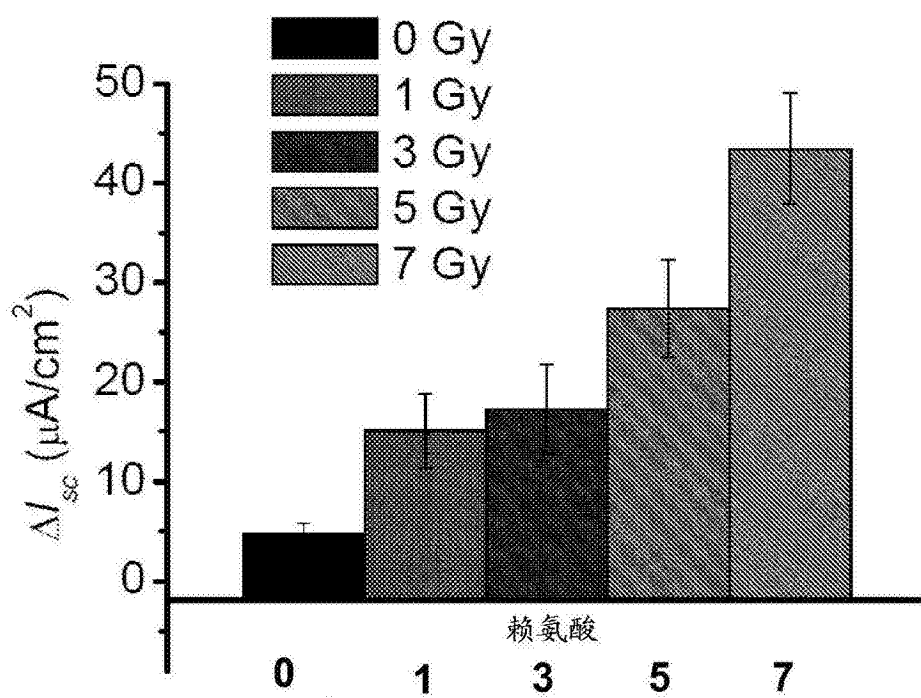


图 16

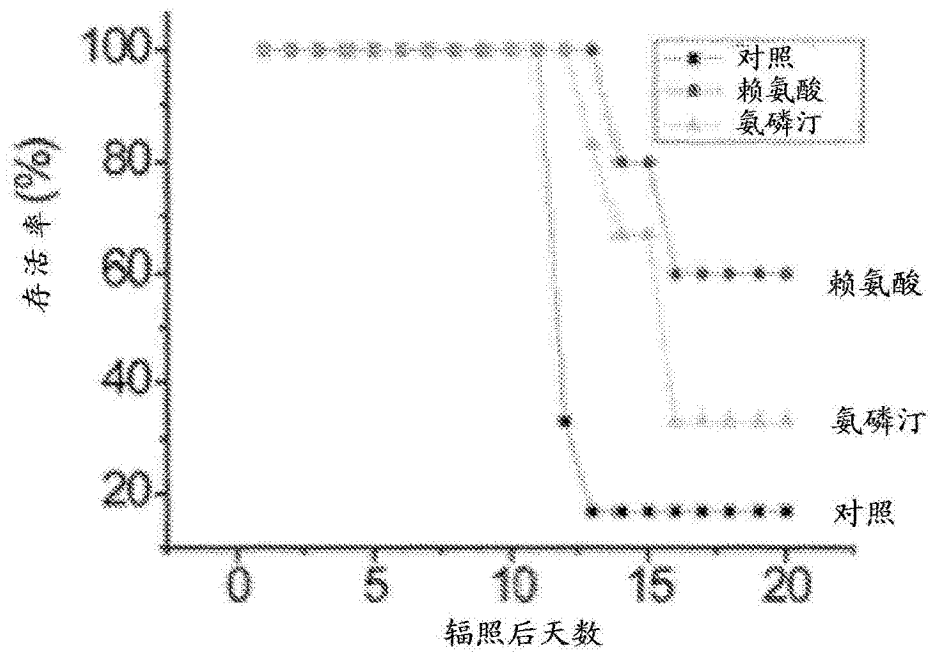


图 17A

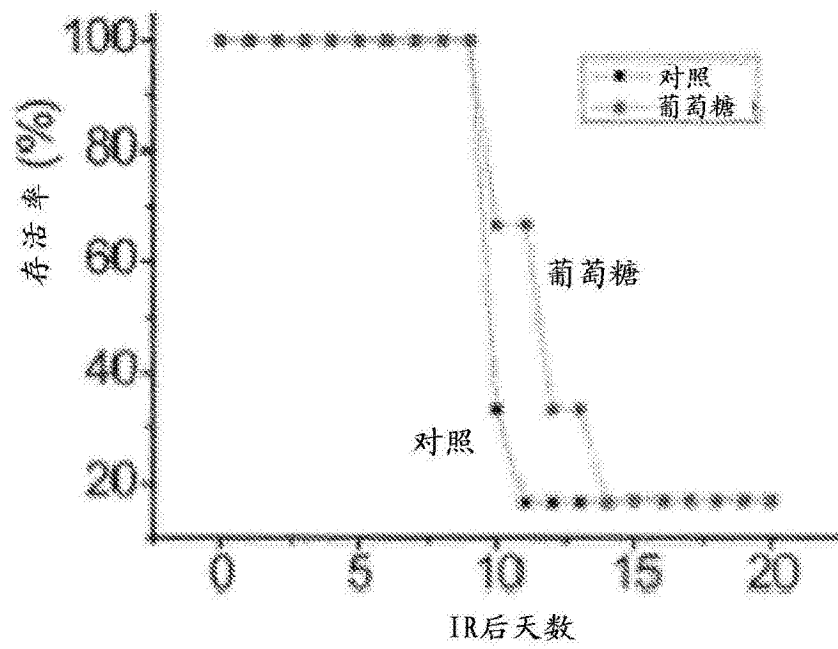


图 17B

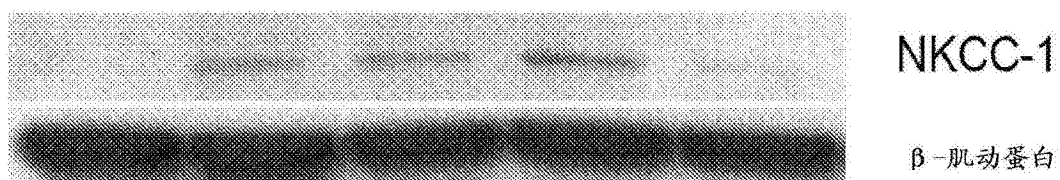


图 18A

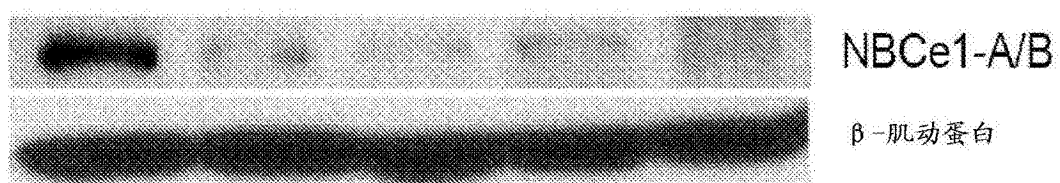


图 18B

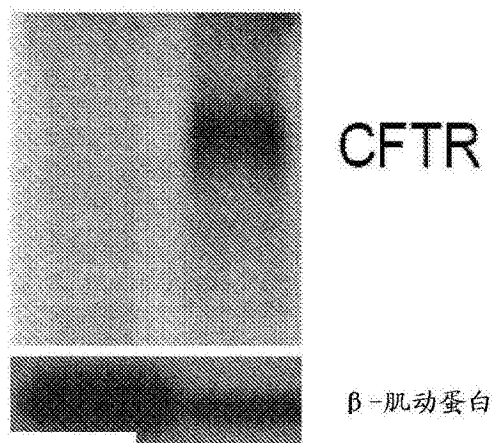


图 18C

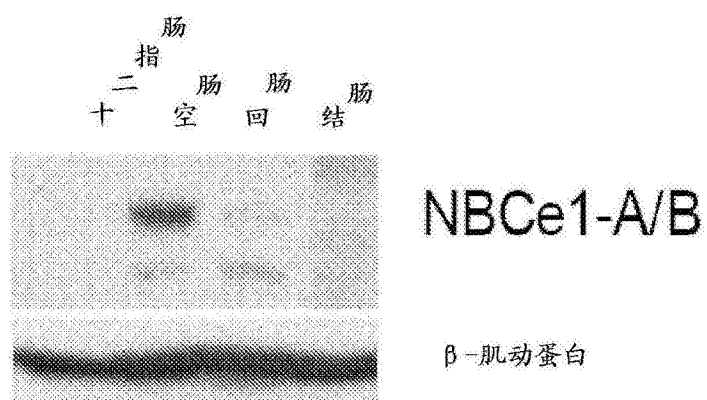


图 18D

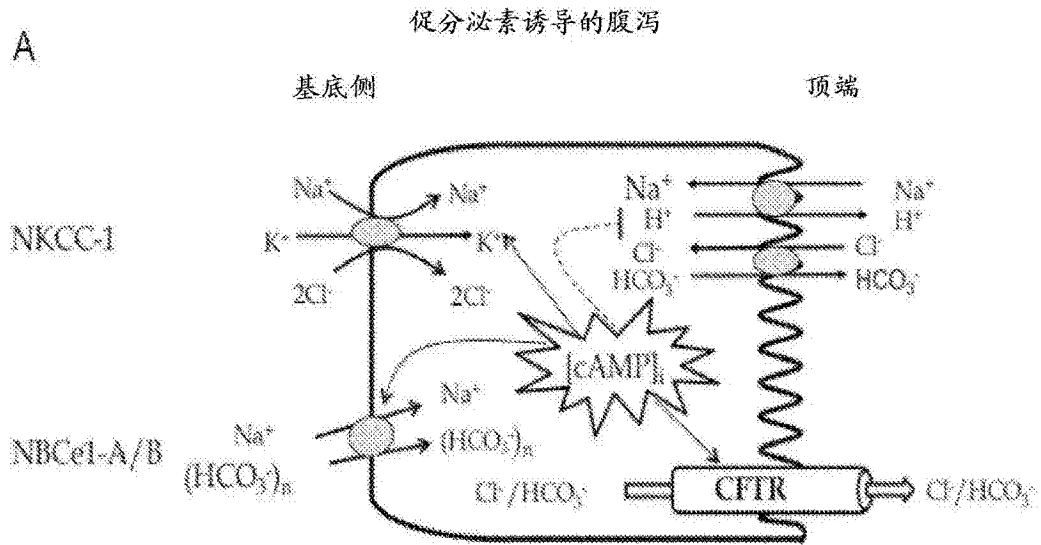


图 19A

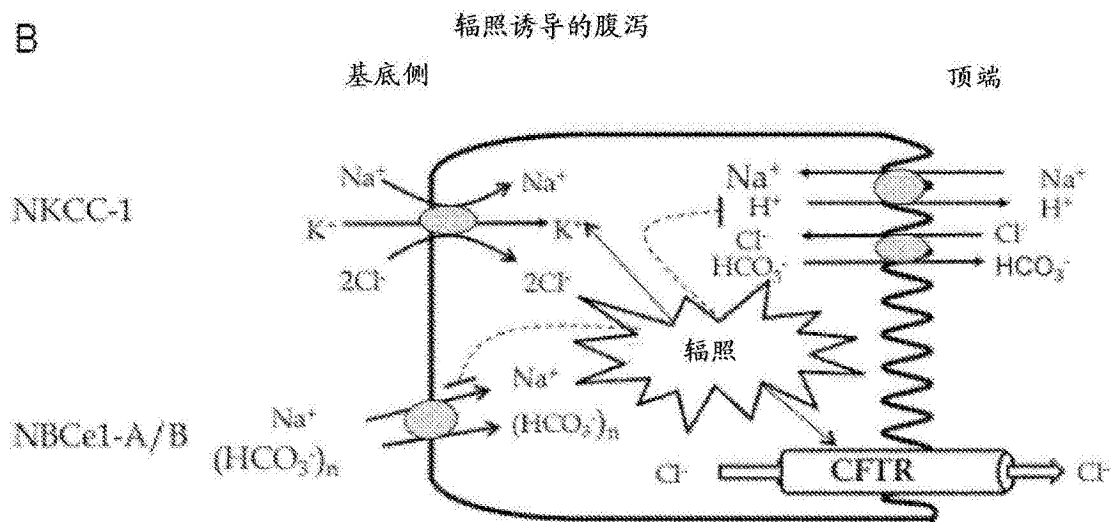


图 19B

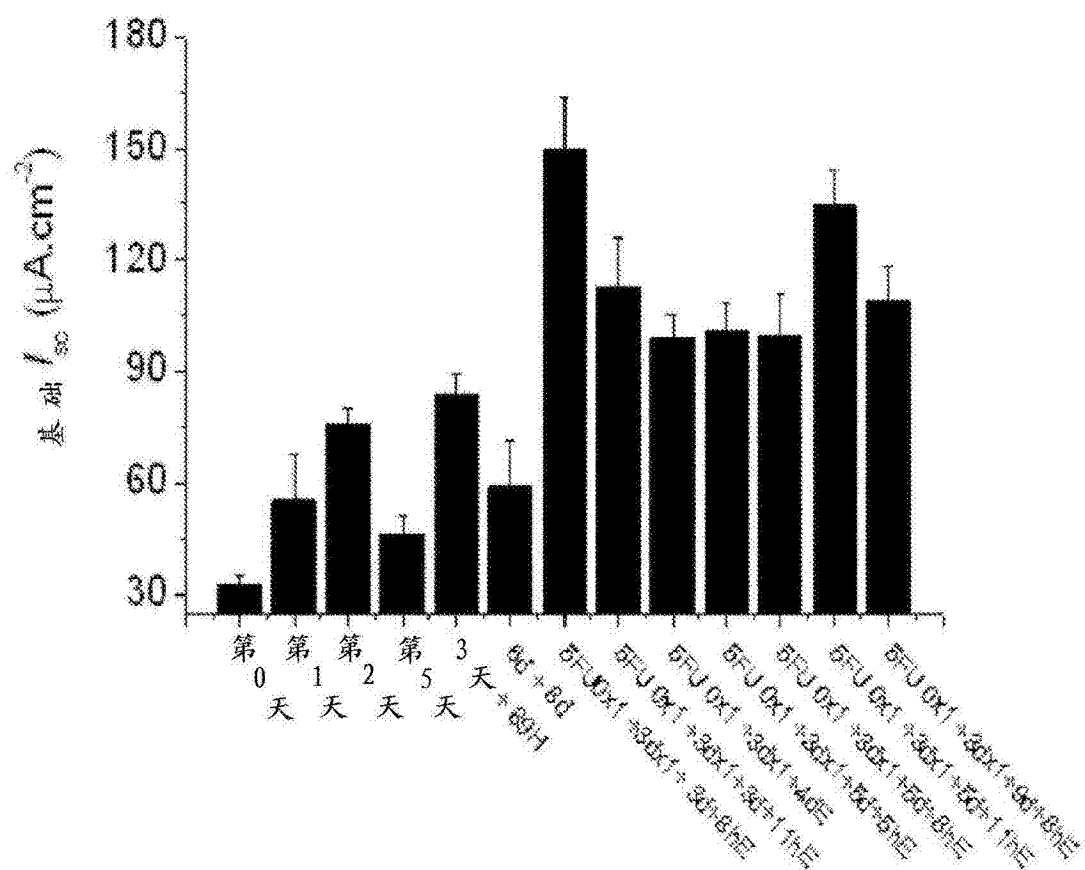


图 20A

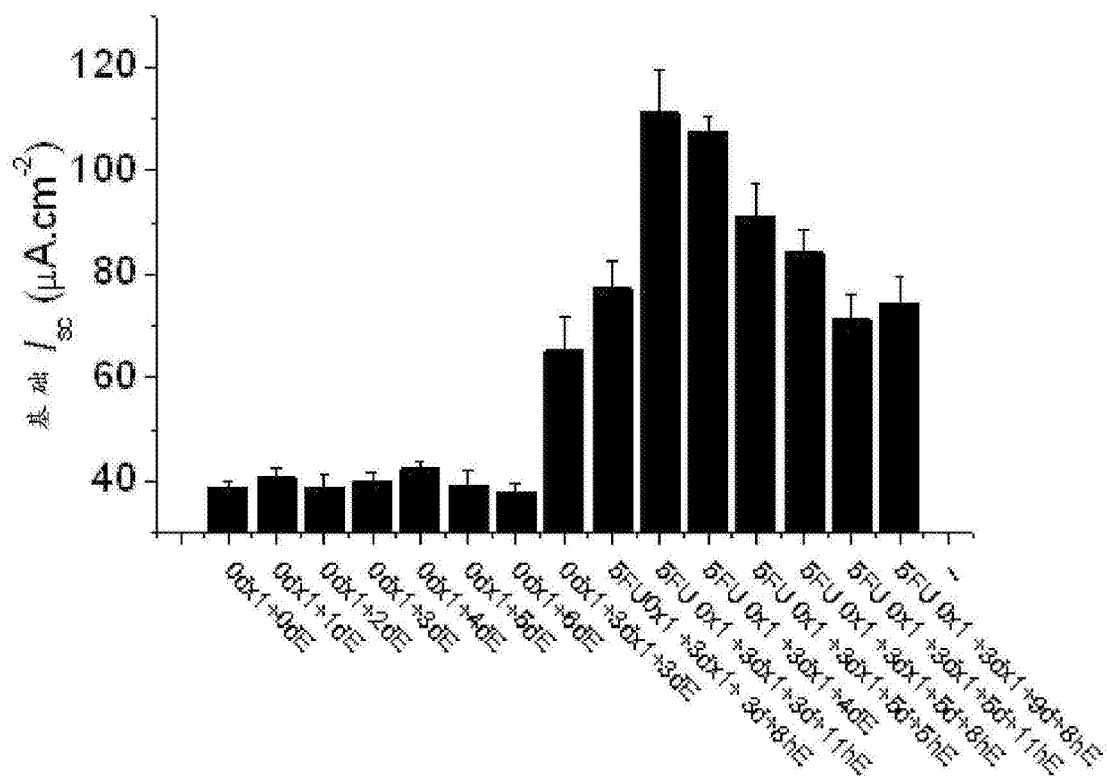


图 20B

不同组合物中记录的 I_{sc} 描记线

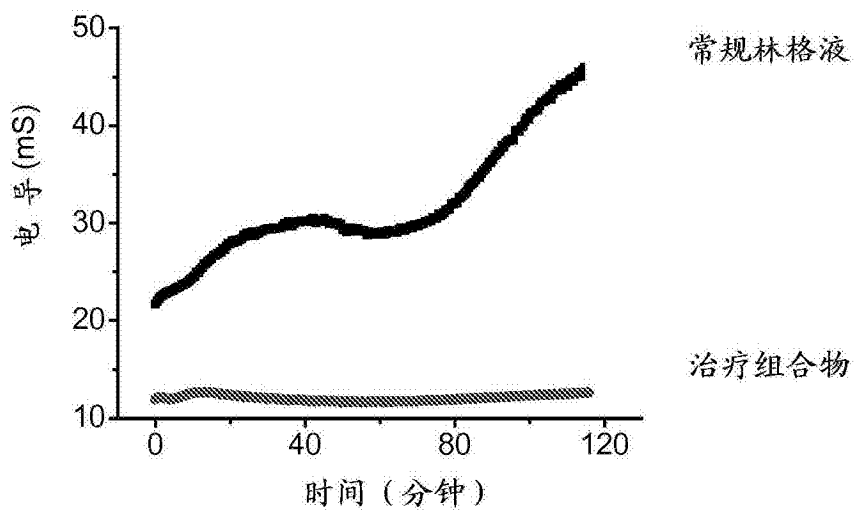


图 21A

不同组合物中组织之间的电导差
(经5 FU处理的小鼠)

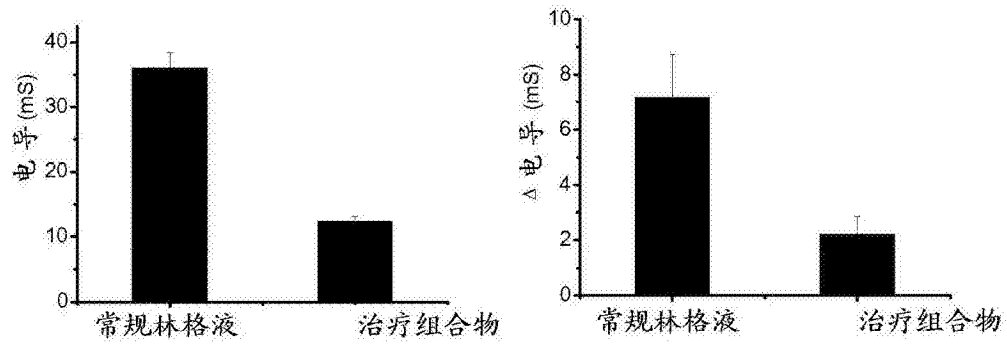


图 22B