[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A23L 1/29 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480043417.0

[45] 授权公告日 2010 年 2 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100589712C

[22] 申请日 2004.6.22
[21] 申请号 200480043417.0
[86] 国际申请 PCT/NL2004/000444 2004.6.22
[87] 国际公布 WO2005/122790 英 2005.12.29
[85] 进入国家阶段日期 2006.12.22
[73] 专利权人 努特里希亚公司
地址 荷兰祖特梅尔
[72] 发明人 E·A·F·文托
L·E·M·威廉姆森
M·A·克齐尔 C·比尔曼
B·斯坦尔
[56] 参考文献
CN1429078A 2003.7.9
CN1436048A 2003.8.13
US6468987B1 2002.10.22
审查员 叶 青
[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 4 页

[54] 发明名称

肠屏障完整性的改进

[57] 摘要

本发明涉及通过对哺乳动物施用包含：二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(ARA)和至少两种不同低聚糖的组合物以激发哺乳动物的屏障完整性的方法。

1. 聚不饱和脂肪酸用于制造在激发肠屏障完整性的方法中使用的组合物的用途，所述方法包括对哺乳动物施用包含下列物质的组合物：

a）二十碳五烯酸（EPA）、二十二碳六烯酸（DHA）和花生四烯酸（ARA），其中含有 20 和 22 个碳原子的长链聚不饱和脂肪酸的含量不超过总脂肪含量的 15wt%；和

b）至少两种不同的低聚糖，其中所述的至少两种不同的低聚糖具有低于 90%的单糖单元同源性。

2. 营养组合物，其包含：

a）EPA、DHA 和 ARA，其中含有 20 和 22 个碳原子的长链聚不饱和脂肪酸的含量不超过总脂肪含量的 15wt%；和

b）至少两种不同的低聚糖，其中所述的至少两种不同的低聚糖具有低于 90%的单糖单元同源性。

3. 根据权利要求 2 的组合物，其中所述的低聚糖是低聚半乳糖和果聚糖。

4. 根据权利要求 3 的组合物，其中所述的果聚糖选自低聚果糖、菊粉及其混合物。

5. 根据权利要求 2 的组合物，其中至少 10wt%的低聚糖具有 2 至 5 的聚合度（DP）且至少 5wt%具有 10 至 60 的 DP。

6. 根据权利要求 2 的组合物，进一步包括酸性低聚糖。

7. 根据权利要求 6 的组合物，其中所述的酸性低聚糖是 DP 为 2 至 60 的糖醛酸聚合物。

8. 根据权利要求 2 的组合物，包含 7.5 至 12.5 能量%的蛋白质；

40 至 55 能量%的碳水化合物；和 35 至 50 能量%的脂肪，其中所述蛋白质包括选自水解的乳蛋白、植物蛋白和/或氨基酸的一员。

9. 根据权利要求 2 的组合物，所述组合物具有 0.6 至 0.8 千卡/毫升的热量含量；50 至 500 mOsm/kg 的重量克分子渗透浓度；和低于 50 mPas 的粘度。

10. 根据权利要求 2 的组合物，适用于喂养婴儿，其中：

a. 长链聚不饱和脂肪酸的含量低于总脂肪含量的 3wt%；

b. Ω-3 长链聚不饱和脂肪酸低于总脂肪含量的 1wt%；

c. Ω-6 长链聚不饱和脂肪酸低于总脂肪含量的 2wt%；

d. ARA 含量低于总脂肪含量的 1wt%；且

e. EPA/DHA 比率为 1 或更低。

11. 根据权利要求 2 的组合物，所述组合物进一步每 100 克干配方包含 1 至 500 毫克核苷和/或核苷酸。

12. 根据权利要求 2-11 任一项的组合物，用作药剂。

13. 根据权利要求 2-11 任一项的组合物用于制造在治疗或预防过敏症的方法中使用的药剂的用途，所述方法包括对哺乳动物施用根据权利要求 2-11 任一项的组合物。

14. 根据权利要求 2-11 任一项的组合物用于制造在治疗或预防腹泻的方法中使用的药剂的用途，所述方法包括对哺乳动物施用根据权利要求 2-11 任一项的组合物。

肠屏障完整性的改进

技术领域

本发明涉及改进肠屏障完整性的方法和适用于此方法的组合物。

背景技术

胃肠上皮通常充当选择性屏障——其允许吸收营养物、电解质和水并防止暴露于饮食和微生物抗原，包括食物过敏原。胃肠上皮限制抗原进入体循环中，后者会造成炎性反应，例如过敏反应。由于过敏，特别是食物过敏的发生率与日俱增，许多研究团体都在探求这些疾病的（预防性）治疗。

EP1272058 描述了用于改进紧密连接以降低肠渗透性并降低过敏反应的包含难消化的低聚糖的组合物。该组合物可以包含 LC-PUFA's（长链-聚不饱和脂肪酸）。

EP 745001 描述了难消化的低聚糖和 n-3 和 n-6 脂肪酸结合用于治疗溃疡性结肠炎。

Usami 等人（Clinical Nutrition 2001, 20(4): 351-359）描述了二十碳五烯酸（EPA）对肠单层细胞中紧密连接渗透性的影响。在他们的研究中，EPA 据发现提高了渗透性，这意味着 EPA 不适合改进肠屏障完整性。

现有技术制剂并非最适于改进屏障完整性。

发明概述

本发明提供了选定的长链聚不饱和脂肪酸（LC-PUFA's）和选定的低聚糖的组合。本发明的 LC-PUFA's 和低聚糖的组合通过协同改进肠渗透性和粘液生成而有效改进了屏障完整性，并特别适于改进人类婴儿的屏障完整性。

意外地发现，选定的 LC-PUFA's 有效降低了上皮细胞旁渗透性。与 Usami 等人（Clinical Nutrition 2001, 20(4): 351-359）已经论述的相

反，本发明人发现，C18 和 C20 聚不饱和脂肪酸，特别是二十碳五烯酸（EPA）、二十二碳六烯酸（DHA）和花生四烯酸（ARA）能够有效降低肠紧密连接渗透性。

除了 LC-PUFAs，本组合物还包含低聚糖。选定的低聚糖通过刺激粘液生成而改进了屏障完整性，这提高了粘液层厚度。这种作用被认为是由不同低聚糖对短链脂肪酸（SCFA）生成的影响造成的。因此，当经肠施用到哺乳动物上时，本发明的 LC-PUFA 和难消化的低聚糖的组合通过同时降低紧密连接渗透性和刺激粘液生成，协同改进了屏障完整性和/或协同降低了肠渗透性。

在进一步方面，本组合物改进了肠粘液层的质量。粘液层包含粘蛋白。粘蛋白是通过杯形细胞合成并分泌的高分子量糖蛋白。它们在粘膜表面上形成凝胶状层，由此改进屏障完整性。粘液层包含不同类型的粘蛋白，例如酸、中性和磺化粘蛋白。粘液层的提高的异质性被认为改进了屏障功能性。

本组合物优选包含至少两种不同的低聚糖，它们直接或通过改变肠内菌丛来影响粘膜构造并有利地影响粘液层的粘蛋白异质性。每种不同的所选低聚糖被认为对粘液量和质量具有不同影响。此外，两种不同的低聚糖还能够通过它们协同刺激 SCFA 的生成来促进如硫化程度所体现的粘液质量。本发明人意外地发现，本发明的两种不同低聚糖的混合物协同刺激了乙酸盐生成。本发明人还发现，粘液生成取决于乙酸盐生成。

优选通过提供长链和短链低聚糖来进一步改进本组合物。提供不同链长导致在回肠和结肠的不同部位刺激粘液生成。短链低聚糖（通常具有 2、3、4 或 5 的聚合度（DP））在近端结肠和/或远端回肠处刺激粘液生成，而具有较长链长（优选具有大于 5 至 60 的聚合度（DP））的低聚糖被认为在结肠的更远端部位刺激粘液生成。

通过提供至少两种不同低聚糖——短链和长链低聚糖，可以实现更进一步的改进。这些优选实施方案均有助于进一步改进整个回肠和/或结肠中的屏障完整性。

此外，意外地发现，EPA、DHA 和 ARA 能够降低白细胞介素 4（IL-4）对肠渗透性的有害影响。IL-4 是在某些患者体内由粘膜 T-细胞以提高

的量分泌的并诱发肠渗透性的细胞因子。因此，本发明还提供了治疗和/或预防与肠 IL-4 浓度提高有关的疾病（例如过敏症，特别是特异性皮炎）的方法。

发明详述

本发明涉及营养组合物，其包含：

a）EPA、DHA 和 ARA，其中含有 20 和 22 个碳原子的长链聚不饱和脂肪酸的含量不超过总脂肪含量的 15wt%；和

b）至少两种不同的低聚糖，其中这两种不同的低聚糖具有低于 90%的单糖单元同源性。

这种组合物可有利地用在激发肠屏障完整性的方法中，所述方法包括对哺乳动物施用所述组合物。

聚不饱和脂肪酸

本发明人意外地发现，二十碳五烯酸（EPA，n-3）、二十二碳六烯酸（DHA，n-3）和花生四烯酸（ARA，n-6）有效降低了肠紧密连接渗透性。因此，特别适于改进肠屏障完整性的本组合物包含 EPA、DHA 和 ARA。

本发明人发现，较低浓度的 LC-PUFA's 能有效降低紧密连接渗透性（参看实施例 vs. Usami 等人）。因此，含 20 和 22 个碳原子的 LC-PUFA 在本组合物中的含量优选不超过总脂肪含量的 15wt%，优选不超过总脂肪含量的 10wt%，再优选不超过 5wt%。优选地，本发明的组合物包含占总脂肪含量的至少 0.1wt%，优选至少 0.25wt%，更优选至少 0.5wt%，再优选至少 0.75wt%的含 20 和 22 个碳原子的 LC-PUFA。出于相同原因，EPA 含量优选不超过总脂肪的 5wt%，更优选不超过 1wt%，但是优选为总脂肪的至少 0.05wt%，更优选至少 0.1wt%。DHA 含量优选不超过总脂肪的 5wt%，更优选不超过 1wt%，但至少为 0.1wt%。由于 ARA 据发现特别有效地降低了紧密连接渗透性，本组合物包含相对较高量，优选为总脂肪的至少 0.1wt%，再优选至少 0.25wt%，最优选至少 0.5wt%。ARA 含量优选不超过总脂肪的 5wt%，更优选不超过 1wt%。在本发明的含 ARA 的经肠组合物中，有利地添加 EPA 和 DHA

以平衡 ARA 的作用，例如降低 ARA 代谢的潜在促炎性作用。ARA 的过量代谢物可能造成炎症。因此，本组合物优选包含 ARA、EPA 和 DHA，其中重量比 ARA/DHA 优选高于 0.25，优选高于 0.5，更优选高于 1。该比率优选低于 25。重量比 ARA/EPA 优选为 1 至 100，更优选 5 至 20。

本组合物优选包含占总脂肪的 5 至 75wt%，优选 10 至 50wt%的聚不饱和脂肪酸。

如果本组合物用作婴儿配方（例如喂养婴儿的方法，所述方法包括给婴儿喂食本组合物），LU-PUFA，特别是含 20 和 22 个碳原子的 LC-PUFA 的含量优选不超过总脂肪含量的 3wt%，因为需要尽可能接近地模拟人乳。出于相同的原因，Ω-3 LC-PUFA 含量优选不超过总脂肪含量的 1wt%；Ω-6 LC-PUFA 含量优选不超过总脂肪含量的 2wt%；ARA（Ω-6）含量优选低于总脂肪含量的 1wt%；和/或重量比 EPA/DHA 优选为 1 或更低，更优选小于 0.5。

含 20 和 22 个碳原子的 LC-PUFA 可以作为游离脂肪酸、以甘油三酯形式、以磷脂形式、或作为一种或多种上述形式的混合物提供。本组合物优选包含至少一种磷脂形式的 ARA 和 DHA。

本营养组合物优选还提供了 Ω-9（n-9）脂肪酸（优选油酸，18:1），以提供足够营养。优选地，本组合物提供了占总脂肪酸重量的至少 15wt%的 n-9 脂肪酸，更优选至少 25wt%。n-9 脂肪酸的含量优选低于 80wt%。

低聚糖

本发明的合适的低聚糖是具有至少 2 个单糖单元的聚合度（DP）的糖类，其不会或仅部分通过人类上消化道（小肠和胃）中存在的酸或消化酶的作用在肠内消化，但是其可被人类肠内菌丛发酵。术语单糖单元是指具有闭环结构的单元，优选己糖，例如吡喃糖或呋喃糖形式。低聚糖的聚合度通常低于 60 单糖单元，优选低于 40，再优选低于 20。

本组合物包含至少两种不同的低聚糖，其中低聚糖具有低于大约 90%，优选低于 50%，再优选低于 25%，再优选低于 5%的单糖单元同

源性。本发明中使用的术语“同源性”是不同低聚糖中相同单糖单元的百分比累积。例如，低聚糖 1（OL1）具有结构果糖（fruc）-fruct-葡萄糖（glu）-半乳糖（gal），并由此包含 50% 果糖，25%半乳糖和25%葡萄糖。低聚糖 2（OL2）具有结构果糖-果糖-葡萄糖，并由此包含 66%果糖，33%葡萄糖。不同的低聚糖因此具有 75%的同源性（50%果糖＋25%葡萄糖）。

在优选实施方案中，本组合物包含低聚半乳糖和选自低聚果糖和菊粉的至少一种。

本低聚糖各自优选包含至少 66%，更优选至少 90%（在其中所含的单糖单元总量的基础上计算）选自甘露糖、阿糖、果糖、岩藻糖、鼠李糖、半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、核糖、葡萄糖、木糖、糖醛酸及其衍生物的单糖单元。

根据进一步实施方案，本组合物的至少一种低聚糖选自果聚糖、低聚果糖、难消化糊精低聚半乳糖（包括反式低聚半乳糖）、低聚木糖、低聚阿糖、低聚葡萄糖、低聚甘露糖、低聚岩藻糖、酸性低聚糖（见下文，例如糖醛酸低聚糖，例如果胶水解产物）和它们的混合物。优选地，本组合物包含至少一种，优选至少两种选自低聚果糖或菊粉、低聚半乳糖和果胶水解产物的低聚糖。

为了良好的粘液量和质量，本组合物优选包含至少一种包含至少66%半乳糖或果糖作为单糖单元的低聚糖。在优选实施方案中，该组合物包含至少一种包含至少 66%半乳糖作为单糖单元的低聚糖和至少一种包含至少 66%果糖作为单糖单元的低聚糖。在特别优选的实施方案中，本组合物包含半乳低聚糖和选自低聚果糖和菊粉的低聚糖。低聚果糖在人类菌丛相关大鼠的远端结肠中刺激硫粘蛋白生成（Kleessen等人（2003）Brit J Nutr 89:597-606），低聚半乳糖刺激了酸粘蛋白生成（Meslin 等人，Brit. J. Nutr（1993），69:903-912）。

为了进一步改进整个结肠区域上粘液层的厚度，本组合物中至少10wt%的低聚糖具有 2 至 5 的 DP（即 2、3、4 和/或 5），且至少 5wt%具有 10 至 60 的 DP。优选地，至少 50wt%，更优选至少 75wt%的低聚糖具有 2 至 9（即，2、3、4、5、6、7、8 和/或 9）的 DP，因为这些被认为在整个回肠和在结肠的近端和中间部位发挥作用，并降低了为

实现所需作用而需要并入组合物中的低聚糖的重量百分比。

优选重量比：

a.（DP 为 2 至 5 的低聚糖）:（DP 为 6、7、8 和/或 9 的低聚糖）>1；和

b.（DP 为 10 至 60 的低聚糖）:（DP 为 6、7、8 和/或 9 的低聚糖）>1，

两者均大于 1。

优选两种重量比均大于 2，更优选均大于 5。

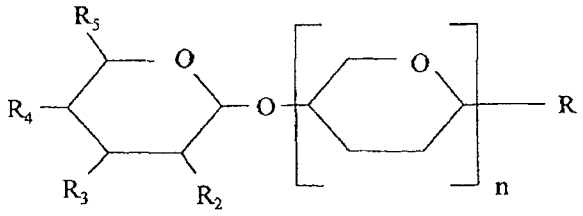
为了进一步改进整个结肠区域上的粘液层厚度和质量，优选以不同链长提供至少两种不同的低聚糖，以各自低聚糖的总重量为基础，每种低聚糖的优选至少 10wt%具有 2 至 5 的 DP（即，2、3、4 和/或 5），且至少 5wt%具有 10 至 60 的 DP。以该低聚糖总重量为基础，该低聚糖的优选至少 50wt%，更优选至少 75wt%具有 2 至 10 的 DP，因为这些被认为在整个回肠和在结肠的近端和中间部位发挥作用。

酸性低聚糖

为了进一步改进屏障完整性，本组合物优选包括 DP 为 2 至 60 的酸性低聚糖。术语酸性低聚糖是指包含至少一个选自 N-乙酰基神经氨酸、N-乙醇酰基神经氨酸、游离或酯化羧酸、硫酸基团和磷酸基团的酸性团的低聚糖。酸性低聚糖优选包含糖醛酸单元（即糖醛酸聚合物），更优选半乳糖醛酸单元。酸性低聚糖可以是均质或异质碳水化合物。合适的例子是果胶和/或藻酸盐的水解产物。在肠道中，将糖醛酸聚合物水解成糖醛酸单体，这刺激了肠内乙酸盐的生成，其又刺激了肠粘液分泌（Barcelo 等人，Gut 2000；46:218-224）。

优选地，酸性低聚糖具有下列结构 I，其中末端己糖（左侧）优选包含双键。末端己糖单元以外的己糖单元优选为糖醛酸单元，更优选为半乳糖醛酸单元。这些单元上的羧酸基团可以为游离或（部分）酯化的，并优选至少 10%甲基化（见下文）。

结构 I：聚合酸性低聚糖



其中：

R 优选选自氢、羟基或酸基，优选羟基；且

R_2、R_3、R_4 和 R_5 中的至少一个代表 N-乙酰基神经氨酸、N-乙醇酰基神经氨酸、游离或酯化羧酸、硫酸基团和磷酸基团，且 R_2、R_3、R_4 和 R_5 中的其余基团代表羟基和/或氢。优选地，R_2、R_3、R_4 和 R_5 中的一个代表 N-乙酰基神经氨酸、N-乙醇酰基神经氨酸、游离或酯化羧酸、硫酸基团或磷酸基团，且其余基团代表羟基和/或氢。更优选地，R_2、R_3、R_4 和 R_5 中的一个代表游离或酯化羧酸，且 R_2、R_3、R_4 和 R_5 中的其余基团代表羟基和/或氢；且

n 是整数并是指已糖单元数（也参见下文聚合度），其可以是任何已糖单元。合适地，n 是 1-5000 的整数。优选地，已糖单元是糖醛酸单元。

最优选地，R_1、R_2 和 R_3 代表羟基，R_4 代表氢，R_5 代表羧酸，n 是 1 至 250，优选 1 至 10 的任何数，已糖单元是半乳糖醛酸。

本方法中使用的优选酸性低聚糖的检测、测量和分析在申请人关于酸性低聚糖的在先专利申请（即 WO 0/160378）中给出。

对于整个结肠区域上粘液层厚度的刺激改进，本组合物优选包含至少 10wt% DP 为 2 至 5（即 2、3、4 和/或 5）的酸性低聚糖和至少 5wt% DP 为 10 至 60 的酸性低聚糖，所述 wt%是以低聚糖的总重量为基础的。

本发明中所用的酸性低聚糖优选由果胶、果胶酸盐、藻酸盐、软骨素、透明质酸、肝素、heparane、细菌碳水化合物、sialoglycans、岩藻依聚糖、fucooligosaccharides 或角叉菜胶，更优选由果胶和/或藻酸盐制成。

低聚糖含量

当在即食液体形式中时，本组合物优选每升包含 0.1 至 100 克难消化低聚糖，更优选每升 0.5 至 50 克，再优选每升 1 至 25 克。过高的低聚糖含量可能会由于过度发酵而造成不适，而非常低的含量可能导致粘液层不足。

至少两种不同低聚糖的重量比优选为 1 至 10，更优选 1 至 5。这些重量比最适合刺激不同类型的粘蛋白在肠中的不同位置生成。

本发明的本组合物中优选包含占组合物总干重的超过 0.1wt%，优选超过 0.2wt%，更优选超过 0.5wt%，再优选超过 1wt%的低聚糖。本组合物优选具有低于 20wt%，更优选低于 10wt%，再优选低于 5wt%的低聚糖含量。

在本组合物中添加核苷酸和/或核苷进一步改进了肠粘膜屏障功能，特别是因为其抑制和/或降低了细菌易位的发生率并降低肠损伤。因此，本组合物还优选每 100 克干配方包含 1 至 500 毫克核苷和/或核苷酸，更优选 5 至 100 毫克。

应用

本组合物可有利地用在改进哺乳动物，特别是人类体内屏障完整性的方法中。本组合物还可有利地用在与降低的屏障完整性有关的疾病的治疗或预防方法中，所述方法包括对哺乳动物施用本组合物。本组合物优选口服。

对于病人和婴儿，本组合物优选与完全营养（包括蛋白质、碳水化合物和脂肪）结合。本组合物有利地用于 0 至 2 岁大的婴儿。该组合物可用于屏障完整性受损的患者和健康患者。本组合物有利地用在提供早产婴儿（在 37 周怀孕期满之前出生的婴儿）的营养需求的方法中。

本组合物还可通过在可能造成肠损伤的医疗治疗之前或之后对患者施用本组合物而有利地用在治疗和/或预防肠损伤的方法中。这种医疗治疗可以是，例如，外科或经肠药物治疗（例如抗生素、止痛剂、NSAID、化学治疗剂，等等）。

本组合物还可有利地用于治疗或预防下述疾病——其中肠屏障破

坏构成该疾病进程发展的基础，例如用在治疗或预防慢性炎症，特别是炎性肠病（IBD）、肠易激综合征（IBS）、乳糜泻、胰腺炎、肝炎、关节炎或糖尿病的方法中。此外，本发明还可用在为已经或正在进行腹部外科手术的患者和术后肠机能障碍患者和/或营养不良患者提供营养的方法中。

在本发明的进一步实施方案中，本组合物有利地用于获得性免疫缺陷综合征（AIDS）患者和/或感染人类免疫缺陷病毒（HIV）的患者，例如，用在治疗 AIDS 和/或 HIV 感染的方法中。所述方法包括口服本组合物，优选与选自碳水化合物、蛋白质和脂肪的营养物结合。

此外，本发明还可用于治疗或预防由降低的屏障完整性引起的并发症，特别是用在治疗和/或预防腹泻，特别是婴儿腹泻的方法中。由于婴儿腹泻发生率的降低，本组合物还可有利地用于降低尿布疹。

施用本组合物降低了饮食和微生物抗原，特别是食物过敏原从肠腔进入粘膜或体循环中，并因此可有利地用在治疗或预防过敏症和/或过敏反应的方法中，特别是用在治疗或预防食物过敏症，例如由食物摄取引起的过敏反应的方法中。

本发明人还发现，EPA、DHA 和/或 ARA 能够降低 IL-4 对肠渗透性的影响。因此，本发明的一个方面提供了与肠 IL-4 浓度提高有关的疾病（例如过敏症）的治疗和/或预防方法，所述方法包括施用优选选自 EPA、DHA 和 ARA 的，优选与本发明所选低聚糖结合的 LC-PUFA。因此，本发明还可有利地用在治疗特异性皮炎的方法中。

由于新生儿的屏障功能尚未完全形成，本组合物可有利地用于小婴儿，即 0 至 6 个月大的婴儿。该组合物可以以无人乳或与人乳混合的婴儿配方形式用于婴儿。因此，本发明还提供了包含人乳和本组合物的配方食物。包含人乳和本组合物的组合物特别适用于喂养早产婴儿。

本组合物优选作为包装粉末或包装即食配方提供。为了防止产品损坏，即食配方的包装尺寸优选不超过一次给食量，例如，优选不超过 500 毫升；粉末形式的本组合物的包装尺寸优选不超过 250 次给食量。粉末的合适包装尺寸为 2000 克或更低，优选为 1000 克或更低。

带有明确或含蓄地指示消费者根据一种或多种上述或下述目的使

用所述产品的标签的包装产品包括在本发明中。这种标签可以例如通过包含“降低的食物敏感性”、“改进肠耐受性”、“改进的食物耐受性”之类的字眼或类似字眼引用本发明的预防对食物过敏原的过敏反应的方法。类似地，可以通过包含与“改进的抵抗性”或“降低的敏感性”相当的术语来引用本发明的治疗和/或预防过敏症的方法。

制剂

本组合物据发现可有利地用于食物，例如婴儿食物和临床食物中。这种食物优选包含脂质、蛋白质和碳水化合物，并优选以液体形式施用。本发明所用的术语“流质食品”包括干燥食物（例如粉末），根据说明书可将所述干燥食品混合物与合适的液体（例如水）混合。

因此，本发明还涉及优选包含 5 至 50en%脂质，5 至 50en%蛋白质，15 至 90en%碳水化合物和本发明的低聚糖和 LC-PUFA's 的组合的营养组合物。优选地，本营养组合物优选包含 10 至 30en%脂质，7.5 至 40en%蛋白质和 25 至 75en%碳水化合物（en%是能量百分比的缩写，代表每种成分对制品总热值的相对贡献量）。

优选地，使用植物脂质和至少一种选自鱼油和 Ω-3 植物、藻类或细菌油的组合。

该营养制品中所用的蛋白质优选选自非人类的动物蛋白质（例如乳蛋白、肉蛋白和蛋蛋白）、植物蛋白质（例如大豆蛋白、谷蛋白、稻米蛋白和豌豆蛋白）、游离氨基酸和它们的混合物。牛乳衍生的氮源，特别是酪蛋白和乳清蛋白之类的牛乳蛋白特别优选。

可以在营养配方中加入可消化碳水化合物源。其优选提供营养组合物的大约 40%至大约 80%的能量。可以使用任何合适的碳水化合物（源），例如蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、玉米糖浆固体和麦芽糖糊精和它们的混合物。

本组合物优选作为婴儿配方使用并优选包含 7.5 至 12.5 能量%蛋白质；40 至 55 能量%碳水化合物；和 35 至 50 能量%脂肪。因为本组合物适用于降低婴儿的过敏反应，婴儿配方的蛋白质优选选自水解乳蛋白（例如水解酪蛋白或水解乳清蛋白）、植物蛋白和/或氨基酸。这些蛋白质的使用进一步降低了婴儿的过敏反应。

不规则排便（例如，粪便干硬、便量不足、腹泻）是困扰许多婴儿和食用流质食品的病人的重要问题。发现可以通过在具有 50 至 500 mOsm/kg，更优选 100 至 400 mOsm/kg 的重量克分子渗透浓度的流质食品中施用本发明的低聚糖来减轻排便问题。

考虑到上述问题，重要的还包括，流质食品不具有过度热量密度但仍然提供足以供养对象的热量。因此，流质食品优选具有 0.1 至 2.5 千卡/毫升的热量密度，更优选 0.5 至 1.5 千卡/毫升的热量密度，最优选 0.6 至 0.8 千卡/毫升的热量密度。

实施例

实施例 1：LC-PUFA 对屏障完整性的影响

将单层（MC）肠上皮细胞系 T84（American Type Culture Collection（ATTC），Manassas，USA）在能够进行粘膜和浆膜取样和刺激人类肠上皮细胞的 transwell 滤器（Corning，Costar BV，The Netherlands）上培养。汇合后两周，将这些单层在 luminal compartment 中用聚不饱和脂肪酸 ARA（花生四烯酸；5,8,11,14-二十碳四烯酸）、DHA（顺式-4,7,10,13,16,19 二十二碳六烯酸）、EPA（二十碳五烯酸）或对照物棕榈（C 16:0）酸（Palm）（Sigma，St. Louis，USA）培养。选择后者的程序以模拟饮食化合物的体内施用途径。将细胞用 ARA、DHA、EPA 或棕榈酸以不同浓度（10 μM 和 100 μM）培养 0、24、48 和 72 小时。进行实验以评测基础（basal）屏障完整性。通过用上皮电压电阻计（EVOM；World Precision Instruments, Germany）测得跨上皮电阻（TER，$\Omega.cm^2$）和 4kD FITC 葡聚糖（细胞旁渗透性标记，Sigma，USA）的渗透性，确定上皮屏障功能。如下测定电阻（4kDa FITC 葡聚糖的上皮渗透性）。在葡聚糖流出（fluxes）之前，将培养基用不含酚红的培养基补充 1 小时，然后在 lumenal compartment 中加入 5 微升（储量 100 毫克/毫升）4kDa FITC 葡聚糖。在 30 分钟培养之后，从浆膜隔室中收集 100 微升样品并以 485 纳米激励波长和 520 纳米发射波长测量荧光信号（FLUOstar Galaxy®，BMG Labtechnologies, USA）。以 pmol FITC-葡聚糖/平方厘米/小时计算 FITC-葡聚糖通量。使用 ANOVA（SPSS 版本 10）进行统计分析。

在培养 72 小时之后，脂肪酸（100μM）对自发屏障完整性的影响列在表 1 中。表 1 表明 LU-PUFA's ARA、EPA 和 DHA 降低了分子通量并改进了上皮电阻。相反，对照实验表明，棕榈酸具有相反作用，即损害了屏障完整性。这些结果表明，EPA、DHA 和 ARA，特别是 ARA 在本发明的组合物中的有利用途，和在本发明的方法，例如在改进屏障完整性的方法中的用途。这些结果进一步证明本发明的脂肪酸和难消化低聚糖的组合的协同效应。

图 1 显示了各种脂肪酸（棕榈酸、DHA、GLA 和 AA）对基础屏障完整性（TER）的时间和剂量（10 μM 和 100 μM）依赖性作用。图 1 表明，如提高的电阻（TER）所示，LC-PUFA's AA、DHA 和 GLA 改进了上皮屏障完整性。这些结果表明 EPA、DHA、GLA 和 ARA，特别是 ARA 在本发明的组合物中的有利用途，和在本发明的方法，例如在改进屏障完整性的方法中的用途。这些结果进一步证明本发明的脂肪酸和难消化低聚糖的组合的协同效应。

表 1

成分（LC-PUFA）	通量	电阻（TER）
对照物	79	1090
棕榈酸	161	831
DHA	72	1574
ARA	28	1816
EPA	65	1493

实施例 2：LC-PUFA 对 IL-4 介导的屏障破坏的影响

将单层（MC）肠上皮细胞系 T84（ATTC，USA）在能够进行粘膜和浆膜取样和刺激人类肠上皮细胞的 transwell 滤器（Corning，Costar BV，The Netherlands）上培养。汇合后两周，将这些单层在 IL-4（2 纳克/毫升，浆膜隔室，Sigma，USA）存在下在含或不含聚不饱和脂肪酸 ARA、DHA、GLA、EPA 或对照棕榈酸（10 μM 或 100 μM，粘膜隔室，Sigma，St. Louis，USA）的情况下培养。在 IL-4 培养之前，将细胞用 ARA、DHA、EPA 或棕榈酸预培养 48 小时。PUFA's 和棕榈酸

与 IL-4 的共培养再持续 48 小时；每 24 小时改变培养基和添加剂。通过如实施例 1 中所述测量跨上皮电阻（TER）和渗透性来确定上皮屏障功能。如实施例 1 中所述进行统计评测。

ARA、DHA、EPA 和棕榈酸（100μM）对 IL-4 介导的屏障破坏的影响的结果列在表 2 中。表 2 表明，LC-PUFA's ARA、DHA 和 EPA 抑制了 IL-4 引起的通量提高。相反，棕榈酸具有有害影响并与对照物相比降低了屏障破坏。这些结果表明 ARA、DHA 和 EPA 在临床和婴儿营养配方中预防或降低 IL-4 介导的屏障破坏（如在食物或牛奶过敏中发生的屏障破坏）的有利用途。这些结果进一步证明本发明的脂肪酸和难消化低聚糖的组合的协同效应。

图 2 显示了各种 FA's（棕榈酸、DHA、GLA 和 ARA）对 IL-4 介导的屏障破坏（通量）的时间和剂量（10 μM 和 100 μM）依赖性保护作用。图 2 表明，如降低的 4kD 葡聚糖通量所示，ARA、DHA 和 GLA 抑制了 IL-4 介导的屏障破坏。这些结果表明 ARA、DHA 和 EPA 在临床和婴儿营养配方中预防或降低 IL-4 介导的屏障破坏（如在食物或牛奶过敏中发生的屏障破坏）的有利用途。这些结果进一步证明本发明的脂肪酸和难消化低聚糖的组合的协同效应。

表 2

成分（LC-PUFA）	IL-4 通量	IL-4 TER
对照物	582	374
棕榈酸	777	321
DHA	271	547
ARA	218	636
EPA	228	539

实施例 3：低聚糖对乙酸盐生成的影响

微生物获自奶瓶喂养的婴儿的新鲜粪便。将来自 1 至 4 个月大的婴儿的新鲜粪便材料汇集并在防腐介质中放置 2 小时。作为底物，使用益生元（TOS）；9/1（w/w）比率的 TOS/菊粉（HP）混合物；菊粉；1/1（w/w）比率的低聚果糖（OS）/菊粉混合物，或什么都不使用（空白）。反式低聚半乳糖（TOS）获自 Vivinal GOS，Borculo Domo

Ingredients，Zwolle，The Netherlands 并包含 33wt%二糖、39wt%三糖、18wt%四糖、7wt%五糖和 3wt%六-、七-en、八糖作为难消化低聚糖。菊粉（HP）Orafti Active Food Ingredients，Tienen，Belgium，即 Raftiline HP®，具有 23 的平均 DP。介质：McBain & Macfarlane 介质:缓冲胨水 3.0 克/升、酵母提取物 2.5 克/升、粘蛋白（刷状缘）0.8 克/升、胰胨 3.0 克/升、L-半胱氨酸-HCl 0.4 克/升、胆汁盐 0.05 克/升、$K_2HPO_4.3H_2O$ 2.6 克/升、$NaHCO_3$ 0.2 克/升、NaCl 4.5 克/升、$MgSO_4.7H_2O$ 0.5 克/升、$CaCl_2$ 0.228 克/升、$FeSO_4.7H_2O$ 0.005 克/升。在 500 毫升 Scott 瓶中装入介质，并在 121℃消毒 15 分钟。缓冲介质：$K_2HPO_4.3H_2O$ 2.6 克/升、$NaHCO_3$ 0.2 克/升、NaCl 4.5 克/升、$MgSO_4.7H_2O$ 0.5 克/升、$CaCl_2$ 0.228 克/升、$FeSO_4.7H_2O$ 0.005 克/升。用 K_2HPO_4 或 $NaHCO_3$ 调节至 pH 6.3±0.1。在 500 毫升 Scott 瓶中装入介质，并在 121℃消毒 15 分钟。

防腐介质：缓冲胨水 20.0 克/升、L-半胱氨酸-HCl 0.5 克/升、硫乙醇酸纳盐 0.5 克/升、resazurine 片 1/升，用 1M NaOH 或 HCl 调节至 pH 6.7±0.1。在微波中沸腾。在血清瓶中装入 25 毫升介质并在 121℃消毒 15 分钟。

将新鲜粪便样品与防腐介质混合并在 4℃保存数小时。将粪便的防腐溶液以 13,000rpm 离心 15 分钟，去除上清液，并将粪便与 McBain & Mac Farlane 介质以 1:5 的重量比混合。将 3 毫升这种粪便悬浮液在瓶中与 85 毫克葡萄糖或益生元或不与任何添加物（空白）合并并充分混合。在 t=0 时，提取样品（0.5 毫升）。将 2.5 毫升所得悬浮液引入装有 60 毫升缓冲介质的 60 毫升瓶中的渗析管中。将该瓶充分密封并在 37℃培养。在 3、24 和 48 小时后用皮下注射器从渗析管（0.2 毫升）或渗析缓冲剂（1.0 毫升）中提取样品，并立即将其置于冰上以停止发酵。使用下列样品进行实验：

1）85 毫克 TOS

2）85 毫克菊粉

3）85 毫克比率为 9/1（w/w）的 TOS/菊粉和

4）85 毫克比率为 1/1（w/w）的 OS/菊粉。

使用配有火焰电离检测器的 Varian 3800 气相色谱（GC）（Varian Inc., Walnut Creek, U.S.A）测定 SCFA（乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐）的

量。使用氦气作载气（3.0psi），在 80℃在柱（Stabilwax，15×0.53 毫米，膜厚 1.00 微米，Restek Co., U.S.A.）中注入 0.5 微升样品。注射样品之后，将该炉子以 16℃/分钟的速度加热至 160℃，然后以 20℃/分钟的速度加热至 220℃，最后在 220℃保持 1.5 分钟。注射器和检测器的温度为 200℃。使用 2-乙基丁酸作内标。

图 3 描绘了使不同低聚糖发酵而得的绝对（图 3A）和相对 SCFA 图（图 3B）。图 3A 表明，两种不同低聚糖（TOS/菊粉）的混合物（其中两种不同低聚糖具有小于 90 的单糖单元同源性和不同的链长）导致与单种组分相比明显和协同地提高的每克纤维的 SCFA（特别是乙酸盐）的量。图 3B 表明，添加 TOS/菊粉的组合物有利于产生更高比例的有益的乙酸盐（B）。乙酸盐产量在活体中变成通过杯形细胞提高的粘液产量以及肠粘液层厚度的一种测量标准（参看实施例 4）。这些结果表明本组合物的有利用途。

实施例 4：SCFA 对粘液生成的影响

将单层肠上皮 T84 细胞（ATTC，USA）在 24 或 96 孔组织培养板（Corning B.V.）中培养。将 T84 用短链脂肪酸乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐（SCFA，Merck，USA）以 0.025-4.0mM 的浓度范围培养 24 小时。收集上清液和/或细胞并测定 MUC-2（粘蛋白）的表达。使用点印迹技术测定细胞培养物中的 MUC-2 表达，因为粘蛋白是极大的糖蛋白（超过 500kDa），这使它们在蛋白印迹技术中难以操作。使用预免疫血清（T84 染色阴性物）、CCD-18Co（ATCC，USA）阴性对照细胞和牛血清白蛋白（BSA）证实该方法。在 Laemmli（蛋白质分离缓冲剂）中收集细胞样品并使用微蛋白检定法（Biorad，USA）根据制造商的指示进行蛋白质测定。在硝基纤维素膜（Schleicher & Schuell, Germany）上以点标记样品（0.3-0.7-1.0 微克/2 微升）。将膜在 TBST/5% Protivar（Nutricia，The Netherlands）中封闭，然后用抗-MUC-2 抗体（Dr. Einerhand, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands 友好地赠予）培养 1 小时。洗涤之后，将印迹用羊抗兔-HRP（Santacruz Biotechnolog, USA）培养，对于底物检测，使用 ECL（Roche Diagnostics, The Netherlands）。使用 Lumi-Imager（Boehringer Mannheim B.V., The

Netherlands）进行密度测定并用光单位（BLU）表示信号。还与对照培养相对地表示 BLU's（%BLU）。为了比较 SCFA 对 MUC-2 表达的激发作用，扣除基础 MUC-2 表达水平。

图 4 显示了 SCFA（乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐）在肠上皮细胞（MC T84）和上皮间叶细胞共培养物（CC T84）中对 MUC-2 表达的影响。图 2 还表明，乙酸盐与丙酸盐和丁酸盐相比，在刺激 MUC-2 表达（粘液生成）方面更有效。因此，本发明的低聚糖组合（其表现出提高了乙酸盐产量（参见实施例 3））特别可用于刺激粘液生成并可有利地用在激发屏障完整性的方法中。

实施例 5：婴儿奶配方 I

成分（每升），能量 672 千卡；蛋白质 15 克；乳清：酪蛋白比率 60:40；脂肪 36 克；碳水化合物 72 克；维生素 A 750 RE；混合天然 carotids 400IU；维生素 D 10.6 微克；维生素 F 7.4 毫克；维生素 K 67.0 微克；维生素 B1（硫胺素）1000 微克；维生素 B2（核黄素）1500 微克；维生素 B6（吡哆醇）600 微克；维生素 B12（cyanacobalmine）2.0 微克；烟酸 9.0 微克；叶酸 80 微克；泛酸 3000 微克；生物素 90 微克；维生素 C（抗坏血酸）90 毫克；胆碱 100 毫克；肌醇 33 毫克；钙 460 毫克；磷 333 毫克；镁 64 毫克；铁 8.0 毫克；锌 6.0 毫克；锰 50 微克；铜 560 微克；碘 100 微克；钠 160 毫克；钾 650 毫克；氯化物 433 毫克和硒 14 微克；其中脂肪含量包括 3 克鱼油和 3 克 40%花生四烯酸油（DSM Food Specialities, Delft, Netherlands）；进一步包含 4 克反式低聚半乳糖酸 Elix'or™（Borculo Domo Ingredients, Netherlands）和 4 克 Raftiline™（Orafti Active Food Ingredients, Belgium）。

PUFA（n=3）对基本屏障完整性（TER）的作用

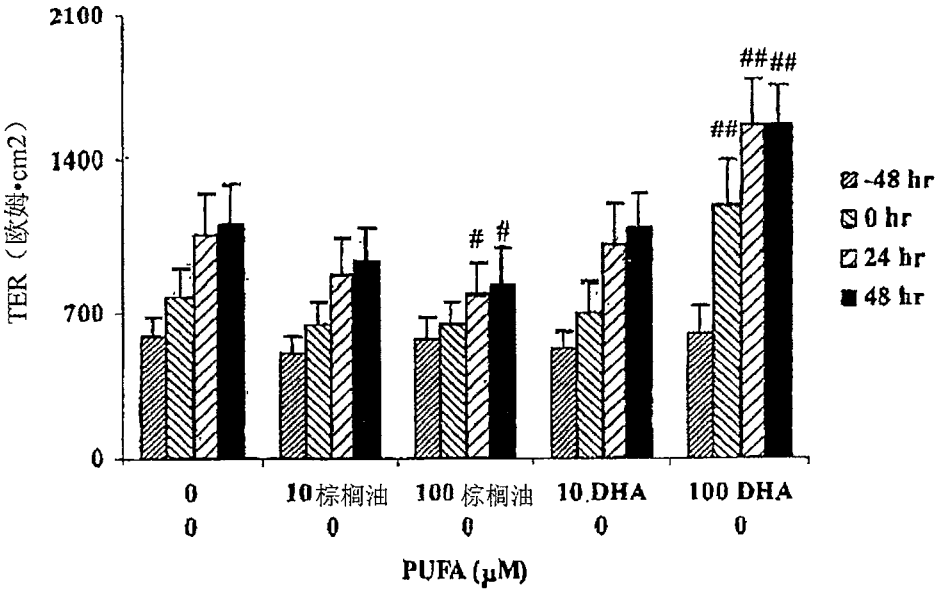


图 1a

PUFA（n=3）对基本屏障完整性（TER）的作用

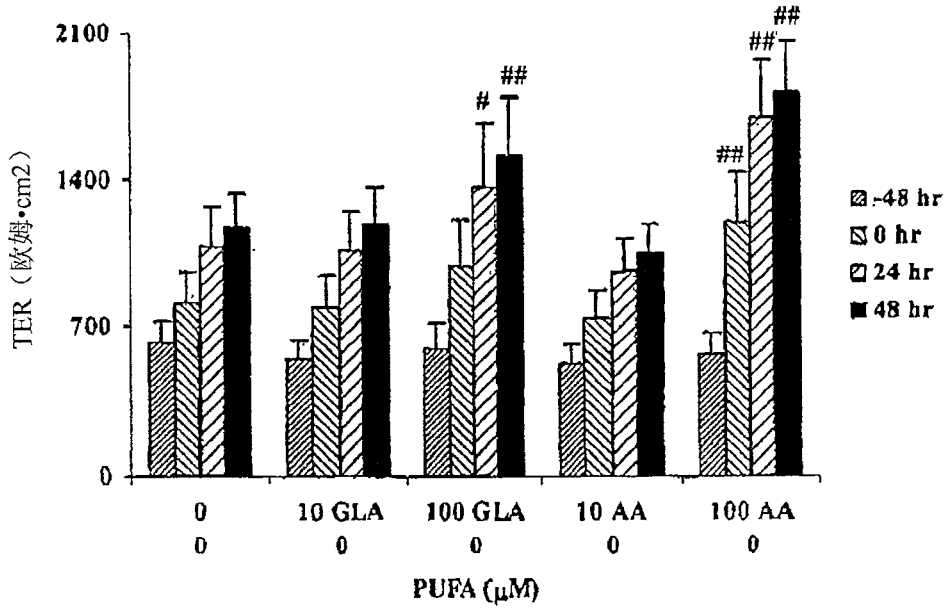


图 1b

PUFA（n=3）对IL-4介导屏障破坏的作用（通量）

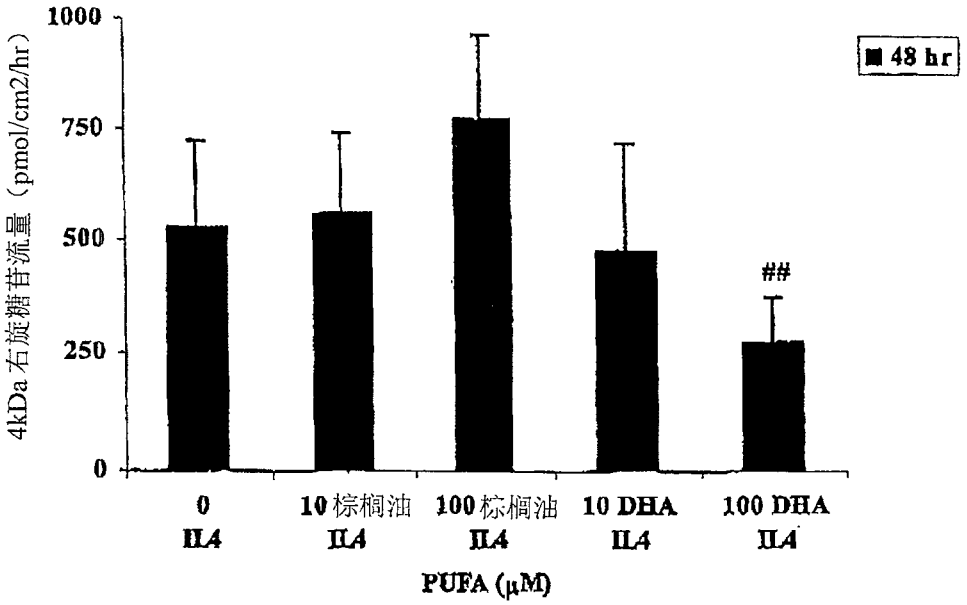


图 2A

PUFA（n=3）对IL-4介导屏障破坏的作用（通量）

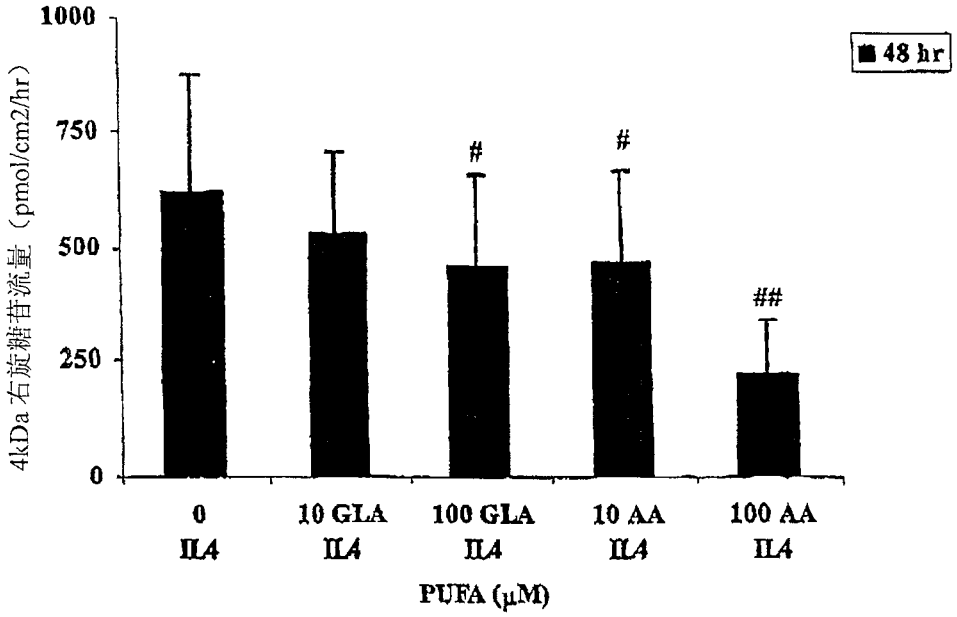


图 2B

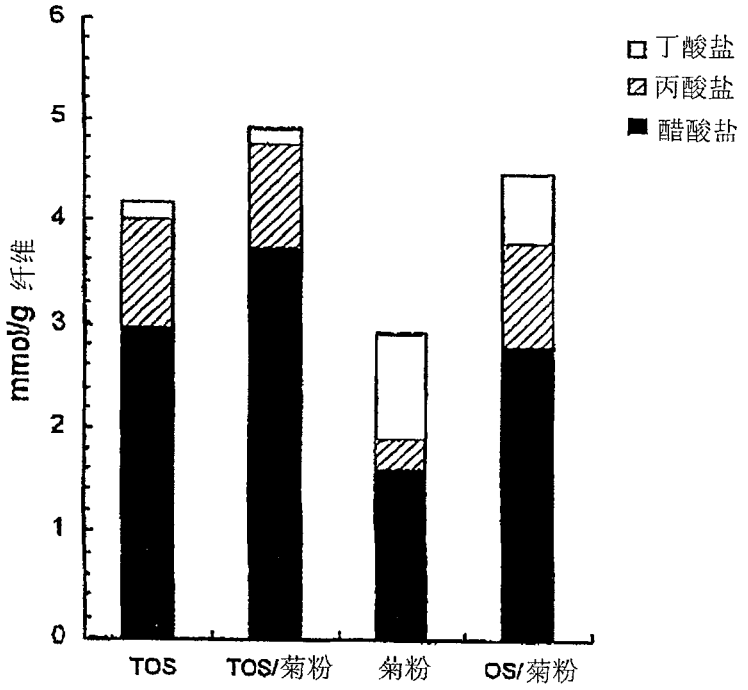

6
5
4
3
2
1
0
mmol/g 纤维
丁酸盐
丙酸盐
醋酸盐
TOS
TOS/菊粉
菊粉
OS/菊粉

图 3a

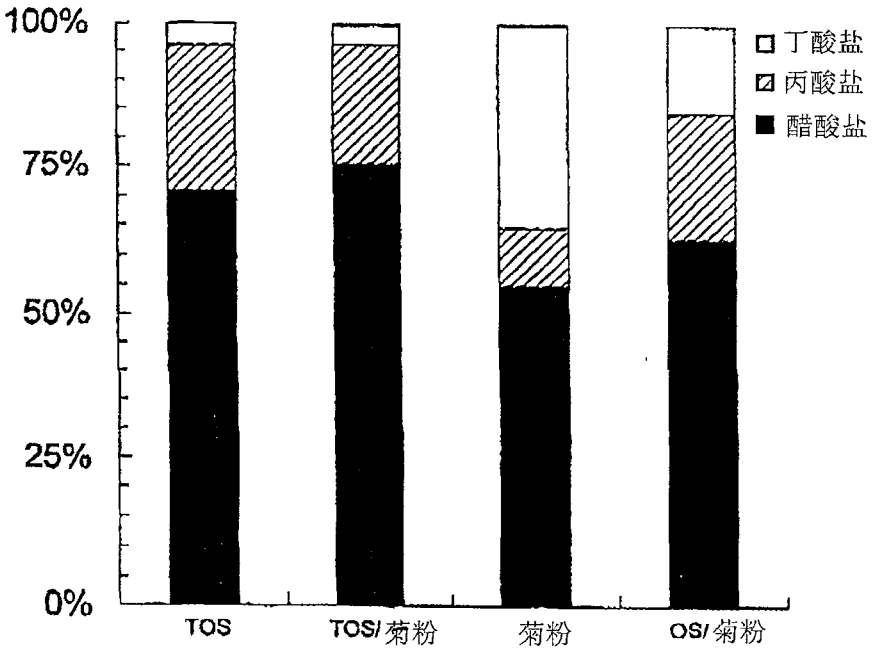

100%
75%
50%
25%
0%
丁酸盐
丙酸盐
醋酸盐
TOS
TOS/菊粉
菊粉
OS/菊粉

图 3b

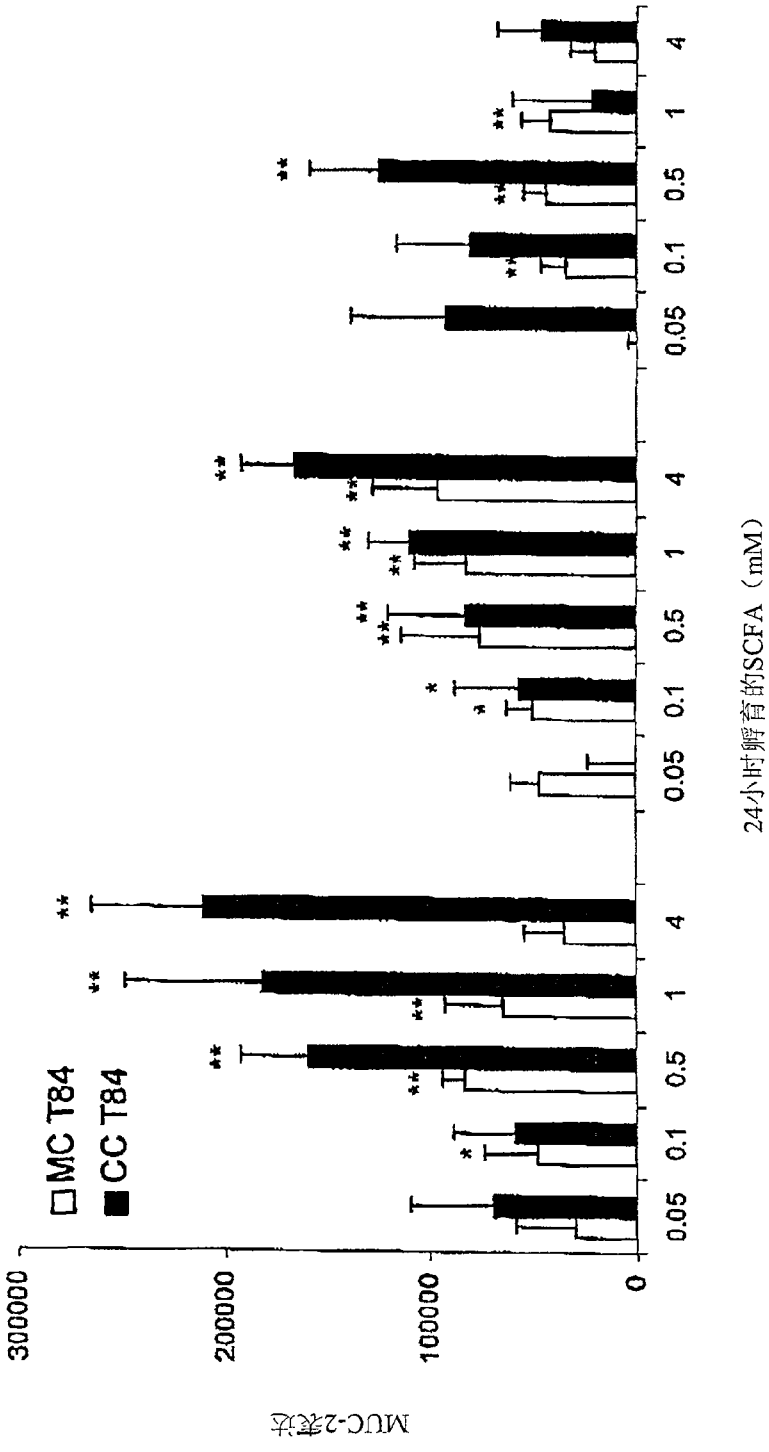

MUC-2表达
300000
200000
100000
0
MC T84
CC T84
0.05
0.1
0.5
1
4
24小时孵育的SCFA（mM）

图 4