



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116726139 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 12

(21) 申请号 202310662801.3

A61K 31/205 (2006.01)

(22) 申请日 2023.06.06

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

(71) 申请人 南京峦创生物科技有限公司

A61P 3/04 (2006.01)

地址 210000 江苏省南京市江宁区横溪街道狮山路49号

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(72) 发明人 王强 葛娟 祝帅

C12N 5/075 (2010.01)

(74) 专利代理机构 北京深川专利代理事务所  
(普通合伙) 16058

专利代理师 李焕焕

(51) Int. Cl.

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 35/748 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

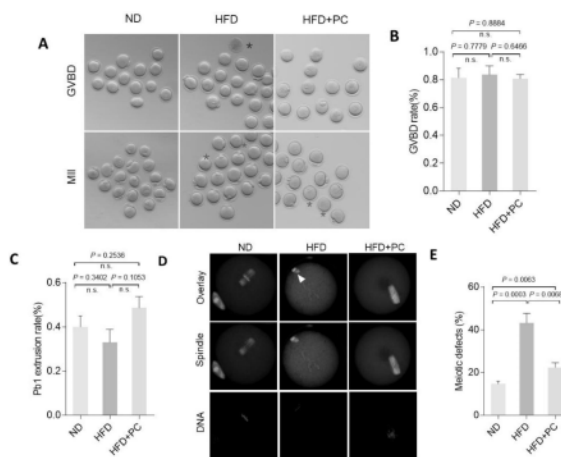
权利要求书2页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

一种含棕榈酰肉碱组合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提出了一种含棕榈酰肉碱组合物及其制备方法和应用,属于棕榈酰肉碱技术领域。包括以下步骤:S1.大蒜多糖的制备;S2.复合藻粉的反复冻融;S3.酶解;S4.发酵培养基的制备;S5.菌种活化;S6.发酵;S7.包埋。本发明发现棕榈酰肉碱可减少肥胖小鼠卵母细胞减数分裂缺陷,改善肥胖小鼠卵母细胞的基因组完整性,促进胚胎发育,制得的含棕榈酰肉碱组合物具有很好的抗氧化、消炎、调节血脂、减肥和促进卵巢功能、促进胚胎发育的效果,具有广阔的应用前景。



1. 棕榈酰肉碱在制备治疗和/或预防肥胖女性生育障碍的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,棕榈酰肉碱在制备治疗和/或预防肥胖女性卵子和/或胚胎质量下降的药物中的应用。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,棕榈酰肉碱在制备调节减数分裂结构和能量代谢的药物中的应用。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,棕榈酰肉碱在制备降低肥胖女性卵母细胞氧化应激水平的药物中的应用。
5. 一种卵母细胞体外培养液,其特征在于,为添加0.01-0.2 $\mu$ M棕榈酰肉碱的M16培养液,优选地,所述棕榈酰肉碱的添加量为0.1 $\mu$ M。
6. 一种胚胎体外培养液,其特征在于,为添加0.01-0.2 $\mu$ M棕榈酰肉碱的KSOM培养液,优选地,所述棕榈酰肉碱的添加量为0.1 $\mu$ M。
7. 一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,加热沸腾提取,过滤,滤渣留用;加入乙醇沉淀,离心,洗涤,干燥,制得大蒜多糖;
  - S2. 复合藻粉的反复冻融:将葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉加水浸泡,置于-25至-20 $^{\circ}$ C冷冻后,室温融解,反复2-3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;
  - S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热酶解,灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;
  - S4. 发酵培养基的制备:将步骤S1中的滤渣和步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为20-30wt%,灭菌,得到发酵培养基;
  - S5. 菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,活化培养,制得菌种种子液;
  - S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,发酵培养,冷冻干燥,得到发酵产物;
  - S7. 包埋:将步骤S1制得大蒜多糖、步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、步骤S6制得发酵产物、棕榈酰肉碱、菊粉和食品乳化剂混合均匀,加入含有海藻酸钠、羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合均匀,加入食用油中,乳化,滴加金属盐溶液,常温固化,离心,洗涤,干燥,制得含棕榈酰肉碱组合物。
8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述加热沸腾提取的时间为2-3h,所述大蒜粉和水的固液比为1:3-5g/mL,所述加入乙醇至体系乙醇含量为70-80wt%,沉淀时间为5-7h;步骤S2中所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的质量比为5-7:10-12,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:5-10g/mL,所述冷冻的时间为2-3h;步骤S3中所述复合酶选自纤维素酶、果胶酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶中的至少一种,优选地,为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2-3:5-7,所述加热酶解的温度为40-45 $^{\circ}$ C,时间为2-3h。
9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤S4中所述步骤S1中的滤渣和步骤S2中的滤渣的质量比为3-5:10-15,所述灭菌为紫外线灭菌;步骤S5中所述活化培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C,50-70r/min,活化培养18-24h,所述菌种种子液的含菌量为 $10^8$ - $10^9$ cfu/mL;步骤S6中所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2-3%和1-2%,所述发酵

培养的条件为37-39℃,50-70r/min,发酵培养48-72h;步骤S7中所述大蒜多糖、藻胆蛋白提取物、发酵产物、棕榈酰肉碱、菊粉和食品乳化剂的质量比为1-2:5-7:15-20:0.01-0.02:2-3:0.5-1,所述食品乳化剂选自卵磷脂、大豆卵磷脂、葵花磷脂、吐温-20、吐温-40、吐温-60、吐温-80、甘油硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯中的至少一种,所述含有海藻酸钠、羧甲基纤维素钠的水溶液中海藻酸钠的含量为12-15wt%,羧甲基纤维素钠的含量为5-7wt%,余量为水,所述食用油选自大豆油、玉米油、花生油、菜籽油、花生油、亚麻籽油、芝麻油、橄榄油中的至少一种,所述金属盐选自氯化钙、氯化镁、氯化铝、氯化铁、氯化亚铁、硝酸铁、硝酸钙、硝酸铝、硝酸镁中的至少一种,所述常温固化的时间为20-30min。

10.一种如权利要求7-9任一项所述的制备方法制得的含棕榈酰肉碱组合物。

## 一种含棕榈酰肉碱组合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及棕榈酰肉碱技术领域,具体涉及一种含棕榈酰肉碱组合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 随着生活水平的提高及生活方式的改变,全球肥胖症发生率迅速增加,并呈年轻化趋势。肥胖在多个方面影响着人类的生殖健康。多数肥胖妇女存在与排卵异常相关的不孕症。另一方面,肥胖患者卵子内的物质和能量代谢也出现异常改变,对卵子质量产生不利影响。即使是进行辅助生育治疗的人群,肥胖患者促排卵时间、促性腺激素的使用量及因反应不良的周期取消率均增加,而获卵数目减少,此外肥胖可增加流产及多种产科合并症的发病率。肥胖会使卵子以及受精后的早期胚胎出现多种异常表型,这包括减数分裂装置的异常、线粒体功能紊乱、氧化应激损伤以及早期胚胎的发育阻滞。

[0003] 棕榈酰肉碱(Palmitoylcarnitine,简称PLC)是一种脂肪酸的长链基团与肉碱形成的化合物,广泛存在于动植物的细胞膜、血液和体液中。它主要参与脂类代谢过程,在细胞内可促进脂肪酸和能量的转运和代谢,提高身体能量利用效率;同时在细胞外可改善血液循环,增强心肌功能,具有保护心脏的作用。此外,棕榈酰肉碱还可以促进体内肝糖原合成,降低血糖、血脂和胆固醇水平,对预防和治疗心脑血管疾病、糖尿病、肥胖症等具有一定的作用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提出一种含棕榈酰肉碱组合物及其制备方法和应用,发现棕榈酰肉碱可减少肥胖小鼠卵母细胞减数分裂缺陷,改善肥胖小鼠卵母细胞的基因组完整性,促进胚胎发育,制得的含棕榈酰肉碱组合物具有很好的抗氧化、消炎、调节血脂、减肥和促进卵巢功能、促进胚胎发育的效果,具有广阔的应用前景。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0006] 本发明提供棕榈酰肉碱在制备治疗和/或预防肥胖女性生育障碍的药物中的应用。

[0007] 作为本发明的进一步改进,棕榈酰肉碱在制备治疗和/或预防肥胖女性卵子和/或胚胎质量下降的药物中的应用。

[0008] 作为本发明的进一步改进,棕榈酰肉碱在制备调节减数分裂结构和能量代谢的药物中的应用。

[0009] 作为本发明的进一步改进,棕榈酰肉碱在制备降低肥胖女性卵母细胞氧化应激水平的药物中的应用。

[0010] 本发明进一步提供一种卵母细胞体外培养液,为添加0.01-0.2 $\mu$ M棕榈酰肉碱的M16培养液,优选地,所述棕榈酰肉碱的添加量为0.1 $\mu$ M。

[0011] 本发明进一步提供一种一种胚胎体外培养液,为添加0.01-0.2 $\mu$ M棕榈酰肉碱的

KSOM培养液,优选地,所述棕榈酰肉碱的添加量为0.1 $\mu$ M。

[0012] 本发明进一步提供一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,包括以下步骤:

[0013] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,加热沸腾提取,过滤,滤渣留用;加入乙醇沉淀,离心,洗涤,干燥,制得大蒜多糖;

[0014] S2. 复合藻粉的反复冻融:将葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉加水浸泡,置于-25至-20 $^{\circ}$ C冷冻后,室温融解,反复2-3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0015] S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热酶解,灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0016] S4. 发酵培养基的制备:将步骤S1中的滤渣和步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为20-30wt%,灭菌,得到发酵培养基;

[0017] S5. 菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,活化培养,制得菌种种子液;

[0018] S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,发酵培养,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0019] S7. 包埋:将步骤S1制得大蒜多糖、步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、步骤S6制得发酵产物、棕榈酰肉碱、菊粉和食品乳化剂混合均匀,加入含有海藻酸钠、羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合均匀,加入食用油中,乳化,滴加金属盐溶液,常温固化,离心,洗涤,干燥,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0020] 作为本发明的进一步改进,步骤S1中所述加热沸腾提取的时间为2-3h,所述大蒜粉和水的固液比为1:3-5g/mL,所述加入乙醇至体系乙醇含量为70-80wt%,沉淀时间为5-7h;步骤S2中所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的质量比为5-7:10-12,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:5-10g/mL,所述冷冻的时间为2-3h;步骤S3中所述复合酶选自纤维素酶、果胶酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶中的至少一种,优选地,为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2-3:5-7,所述加热酶解的温度为40-45 $^{\circ}$ C,时间为2-3h。

[0021] 作为本发明的进一步改进,步骤S4中所述步骤S1中的滤渣和步骤S2中的滤渣的质量比为3-5:10-15,所述灭菌为紫外线灭菌;步骤S5中所述活化培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C,50-70r/min,活化培养18-24h,所述菌种种子液的含菌量为 $10^8$ - $10^9$ cfu/mL;步骤S6中所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2-3%和1-2%,所述发酵培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C,50-70r/min,发酵培养48-72h;步骤S7中所述大蒜多糖、藻胆蛋白提取物、发酵产物、棕榈酰肉碱、菊粉和食品乳化剂的质量比为1-2:5-7:15-20:0.01-0.02:2-3:0.5-1,所述食品乳化剂选自卵磷脂、大豆卵磷脂、葵花磷脂、吐温-20、吐温-40、吐温-60、吐温-80、甘油硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯中的至少一种,所述含有海藻酸钠、羧甲基纤维素钠的水溶液中海藻酸钠的含量为12-15wt%,羧甲基纤维素钠的含量为5-7wt%,余量为水,所述食用油选自大豆油、玉米油、花生油、菜籽油、花生油、亚麻籽油、芝麻油、橄榄油中的至少一种,所述金属盐选自氯化钙、氯化镁、氯化铝、氯化铁、氯化亚铁、硝酸铁、硝酸钙、硝酸铝、硝酸镁中的至少一种,所述常温固化的时间为20-30min。

[0022] 优选地,一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0023] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水

的固液比为1:3-5g/mL,加热沸腾提取2-3h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为70-80wt%,沉淀5-7h,离心,洗涤,干燥,制得大蒜多糖;

[0024] S2.复合藻粉的反复冻融:将5-7重量份葛仙米藻干粉和10-12重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:5-10g/mL,置于-25至-20℃冷冻2-3h后,室温融解,反复2-3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0025] S3.酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热至40-45℃,酶解2-3h,灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0026] 所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2-3:5-7;

[0027] S4.发酵培养基的制备:将3-5重量份步骤S1中的滤渣和10-15重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为20-30wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0028] S5.菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,37-39℃,50-70r/min,活化培养18-24h,制得含菌量为 $10^8$ - $10^9$ cfu/mL的菌种种子液;

[0029] S6.发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2-3%和1-2%,37-39℃,50-70r/min,发酵培养48-72h,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0030] S7.包埋:将1-2重量份步骤S1制得大蒜多糖、5-7重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、15-20重量份步骤S6制得发酵产物、0.01-0.02重量份棕榈酰肉碱、2-3重量份菊粉和0.5-1重量份食品乳化剂混合均匀,加入100重量份含有12-15wt%的海藻酸钠、5-7wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合均匀,加入200重量份食用油中,乳化,滴加20重量份5-7wt%的金属盐溶液,常温固化20-30min,离心,洗涤,干燥,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0031] 本发明进一步提供一种上述的制备方法制得的含棕榈酰肉碱组合物。

[0032] 本发明具有如下有益效果:本发明研究发现棕榈酰肉碱可减少肥胖小鼠卵母细胞减数分裂缺陷,改善肥胖小鼠卵母细胞的基因组完整性,并且显著降低肥胖小鼠卵母细胞中异常的线粒体定位,恢复部分线粒体活性,从而改善其卵母细胞线粒体功能。棕榈酰肉碱可通过显著阻止ROS在肥胖小鼠卵母细胞中的积累,促进ATP生成,改善能量代谢,显著提高肥胖小鼠胚胎的囊胚形成比例,降低凋亡率,从而提高早期胚胎发育潜能。

[0033] 螺旋藻和葛仙米为典型的可人工培植的蓝藻,含有丰富的藻胆蛋白,其中,藻胆蛋白能够改善糖尿病小鼠外周靶组织胰岛素抗性和调节糖脂代谢的能力。同时它还可以抑制动脉粥样硬化的形成,并且可以通过调节多个关键基因诱导细胞凋亡、调控细胞周期、阻止平滑肌细胞增殖、减少内皮细胞凋亡和降低血脂水平,还是一种是一种具有抗氧化、抗炎和清除氧自由基的天然物质。

[0034] 螺旋藻和葛仙米藻经过反复冻融的过程中,能够形成微细冰刀从而促进刺穿藻细胞壁,促进内容物的溶出,同时,采用复合酶酶解,纤维素酶能促进细胞壁的酶解,从而细胞壁的破裂,进一步采用木瓜蛋白酶酶解,促进复合的糖蛋白以及复杂蛋白质酶解成可溶性小分子蛋白肽、短肽以及氨基酸,提高产物的抗氧化、消炎效果。

[0035] 进一步将提取后的大蒜滤渣、藻粉滤渣作为发酵培养基,含有丰富的碳源、氮源以及微量元素和矿物质,能够促进益生菌增殖和产生有益产物,同时,通过发酵,能进一步产生大量的蛋白肽和有益的短链脂肪酸等小分子物质,从而进一步起到调节血脂、减肥和促进卵巢功能、促进胚胎发育的效果。

[0036] 另外,大量益生菌,包括长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌,输送到胃肠道,能会改变肠道环境,包括抑制脂多糖的产生,增加肠道上皮细胞的紧密连接。其中长双歧杆菌的增殖和代谢能显著阻止体质量增加、脂肪积累和促炎基因的表达,鼠李糖乳杆菌的增殖和代谢能降低肝脏甘油三酯水平和减少脂肪基因表达,从而调节脂质代谢,抑制肥胖,两者的协同作用,还能明显促进卵巢形态规范化,改善卵子质量,促进胚胎发育。

[0037] 益生元通过选择性的刺激肠道中一种或少数种益生菌的增长或活性而对宿主有利。益生元发酵产生的短链脂肪酸是刺激有益菌增长的重要因素。本发明添加的菊糖和大蒜多糖加速恢复肠道菌群失调,这两种益生元对内毒素的清理、免疫力的恢复也有积极的效果。

[0038] 本发明通过复合多糖(海藻酸钠、羧甲基纤维素钠)的包埋,金属离子存在下交联,从而实现混合物的包埋,能够有效避免在胃酸条件下的降解,具有一定的耐酸性能,在碱性肠道中缓慢降解,促进混合物在肠道溶出,促进益生菌在肠道定殖,提高益生菌到肠道的存活率,从而显著提高含棕榈酰肉碱组合物的综合效果。

[0039] 本发明发现棕榈酰肉碱可减少肥胖小鼠卵母细胞减数分裂缺陷,改善肥胖小鼠卵母细胞的基因组完整性,促进胚胎发育,制得的含棕榈酰肉碱组合物具有很好的抗氧化、消炎、调节血脂、减肥和促进卵巢功能、促进胚胎发育的效果,具有广阔的应用前景。

## 附图说明

[0040] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0041] 图1为卵母细胞收集流程图;

[0042] 图2为棕榈酰肉碱对肥胖小鼠卵母细胞减数分裂进程的结果;A为各组卵母细胞生发泡破裂(GVBD)以及MII成熟卵母细胞代表性图片,深色星号标示出死亡细胞,浅色星号标示出未能排出极体的卵母细胞,标尺20 $\mu$ m;B为各组卵母细胞GVBD率统计结果;C为各组卵母细胞成熟率统计结果;D为各组卵母细胞纺锤体和染色体免疫荧光染色的代表性图片;E为各组卵母细胞减数分裂装置异常率的统计结果,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,n.s.表示无显著性差异。

[0043] 图3为体外添加棕榈酰肉碱降低肥胖小鼠染色体非整倍性的结果;A为各组卵母细胞整倍性和非整倍性变化代表性图片;B为各组卵母细胞非整倍性率。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,n.s.表示无显著性差异。

[0044] 图4为体外添加棕榈酰肉碱改善肥胖小鼠线粒体分布及功能的结果;A为各组卵母细胞线粒体分布免疫荧光染色的代表性图片;B为各组卵母细胞线粒体异常分布率;C为各组卵母细胞线粒体膜电位的代表性图片,暗色荧光表明卵母细胞线粒体膜电位活跃,亮色荧光表明线粒体膜电位迟钝;D为各组卵母细胞暗/亮荧光强度率,暗/亮荧光强度一般代表膜电位强度,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,n.s.表示无显著性差异,标尺20 $\mu$ m。

[0045] 图5为体外添加棕榈酰肉碱降低肥胖小鼠卵子中ROS水平及提高ATP水平的结果;A为各组卵母细胞ROS免疫荧光染色的典型图片,标尺50 $\mu$ m;B为各组卵母细胞ROS荧光值的统

计结果;C为各组卵母细胞ATP水平的统计结果,数据表示为平均值±标准差,\*表示差异显著性,n.s.表示无显著性差异。

[0046] 图6为各组囊胚收集和棕榈酰肉碱处理流程图,各组MII卵母细胞体外受精形成双原核后置于添加0.10μM棕榈酰肉碱的KSOM培养液中培养至囊胚阶段,并进行收集。

[0047] 图7为体外添加棕榈酰肉碱促进肥胖个体胚胎发育的结果;A为各组受精胚胎发育至二细胞和囊胚阶段的典型图片,\*表示培养过程中发育异常的二细胞胚胎,标尺20μm;B为各组受精胚胎发育至二细胞阶段的统计结果,C为各组受精胚胎发育至囊胚阶段的统计结果,数据表示为平均值±标准差,n.s.表示无显著差异;D为各组囊胚凋亡的免疫荧光典型图片,红色信号代表凋亡信号。E为各组囊胚的凋亡率,数据表示为平均值±标准差,\*表示差异显著性,n.s.表示无显著性差异。

### 具体实施方式

[0048] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范畴。

[0049] 葛仙米藻干粉购于湖南炎帝生物工程有限公司,含水量<5%;螺旋藻干粉木瓜蛋白酶,FDG-2203,10万U/g,纤维素酶,SDG-2425,1万U/g,购于夏盛(北京)生物科技开发有限公司;长双歧杆菌,BLG-19,100亿cfu/g,鼠李糖乳杆菌,JYLR-005,100亿cfu/g,购于中科嘉亿生物工程技术有限公司。

[0050] 实施例1肥胖小鼠模型的构建

[0051] 将3-4周龄的雌性ICR小鼠随机分为两组,分别饲喂高脂饲料(high fat diet, HFD)和标准饲料(normal diet, ND),自由采食饮水。饲养16周后,HFD小鼠的平均体重显著高于ND小鼠( $56.2 \pm 5.2\text{g}$  vs  $37.9 \pm 3.1\text{g}$ ,  $P < 0.05$ ),且HFD小鼠的空腹血糖水平显著高于ND小鼠( $9.1 \pm 1.6\text{mM}$  vs  $4.5 \pm 1.0\text{mM}$ ,  $P < 0.05$ ),这表明肥胖小鼠造模成功。ND小鼠作为对照。

[0052] 实施例2卵母细胞体外培养液

[0053] 一种卵母细胞体外培养液为添加0.1μM棕榈酰肉碱的M16培养液。以不添加棕榈酰肉碱的M16培养液作为对照。

[0054] 实施例3肥胖小鼠卵母细胞的获取与体外成熟培养

[0055] 如图1,将实施例1中建模的肥胖小鼠腹腔注射5IU孕马血清促性腺激素(PMSG)腹腔注射雌性小鼠,进行超排卵,获得发育完全的GV期卵母细胞,将其在实施例2中所述的培养液中,37℃,培养至MII卵母细胞。

[0056] 实施例4补充棕榈酰肉碱可减少肥胖个体卵母细胞减数分裂缺陷、改善肥胖个体卵母细胞的基因组完整性

[0057] 棕榈酰肉碱处理后的肥胖小鼠卵母细胞、未经过棕榈酰肉碱处理后的肥胖小鼠卵母细胞与正常肥胖小鼠卵母细胞相比,生发泡破裂(GVBD)和第一极体(MII)排出率基本无差异(图2A-C)。肥胖小鼠卵母细胞纺锤体和染色体组装异常高达45%,补充棕榈酰肉碱后,可以显著降低肥胖小鼠卵母细胞中纺锤体缺陷和染色体异常比例(图2D-E)。

[0058] 实施例5补充棕榈酰肉碱可改善肥胖个体卵母细胞的基因组完整性



[0059] 与正常小鼠卵母细胞相比,肥胖小鼠卵母细胞的基因组异常发生率显著升高,特别是染色体非完整性及姐妹着丝粒过早分离现象普遍。体外补充棕榈酰肉碱后,肥胖小鼠卵母细胞的非整倍性从42.24%降低至29.05%,在一定程度上改善了肥胖小鼠卵母细胞减数分裂缺陷(图3A-B)。

[0060] 实施例6补充棕榈酰肉碱可改善肥胖个体卵母细胞线粒体功能

[0061] 很多研究报道,母源肥胖可诱导卵母细胞内质网应激和线粒体功能障碍。线粒体是氧化磷酸化和ATP产生的重要场所,在卵母细胞成熟中发挥核心作用。有效的氧化磷酸化需要较高的线粒体膜电位,并且随着卵母细胞的生长和成熟而增加。为了了解肥胖小鼠卵母细胞的线粒体动力学,本发明采用共聚焦显微镜观察了线粒体的分布和形态。结果表明,肥胖小鼠卵母细胞中的线粒体分布不均匀,特别是聚集性分布显著增加。补充棕榈酰肉碱可以显著降低肥胖小鼠卵母细胞中异常的线粒体定位(图4A-B)。同时,本发明用荧光染料JC-1分析了线粒体状态(图4C-D),红/绿荧光强度的比值是线粒体活性的一个重要指标。棕榈酰肉碱作为一种细胞代谢物,可以催化脂肪酸从细胞质转运到线粒体,增加线粒体膜电位。定量分析显示,肥胖小鼠卵母细胞线粒体与正常小鼠卵母细胞线粒体相比,其膜电位明显降低。补充棕榈酰肉碱后,肥胖小鼠卵母细胞线粒体膜电位活性得到了部分恢复。综上所述,棕榈酰肉碱对肥胖小鼠卵母细胞质量有很大改善作用,尤其是线粒体功能方面。

[0062] 实施例7补充棕榈酰肉碱可改善肥胖个体卵母细胞能量代谢

[0063] 本发明采用CM-H2DCFDA对成熟卵母细胞进行免疫荧光染色,用以评估卵母细胞活性氧(ROS)水平。荧光成像和强度测量显示肥胖小鼠卵母细胞中ROS含量显著增加,补充棕榈酰肉碱可显著降低ROS在肥胖小鼠卵母细胞中的积累(图5A-B)。此外,充足的ATP是卵母细胞受精和胚胎发育所必需的,通过ATP含量测定发现,补充棕榈酰肉碱可以提高肥胖小鼠卵母细胞ATP含量。

[0064] 实施例8胚胎体外培养液

[0065] 一种胚胎体外培养液为添加0.1 $\mu$ M棕榈酰肉碱的KSOM培养液。以不添加棕榈酰肉碱的KSOM培养液作为对照。

[0066] 实施例9囊胚收集和棕榈酰肉碱处理

[0067] 将实施例1中建模的肥胖小鼠腹腔注射5IU孕马血清促性腺激素(PMSG)腹腔注射雌性小鼠,进行超排卵,获得发育完全的GV期卵母细胞,将其在M16培养液中,37 $^{\circ}$ C,培养至MII卵母细胞。

[0068] 如图6,将各组MII卵母细胞体外受精形成双原核后置于添加0.10 $\mu$ M棕榈酰肉碱的KSOM培养液中培养至囊胚阶段,并进行收集。

[0069] 实施例10补充棕榈酰肉碱可促进肥胖个体早期胚胎发育

[0070] 分别对正常小鼠、肥胖小鼠卵母细胞进行体外受精,并对受精卵进行体外培养,用以检测受精卵的发育潜能。实验表明,肥胖小鼠细胞质碎片化明显高于正常小鼠胚胎,胚胎发育迟缓(图7A)。补充棕榈酰肉碱可显著提高肥胖小鼠卵母细胞2-细胞形成率(图7B-C)。凋亡细胞数量是判断胚胎质量的重要指标,通过TUNEL(Terminal dUTP Nick End Labeling)分析,肥胖组很容易检测到凋亡囊胚(图7D)。补充棕榈酰肉碱显著提高了肥胖组胚胎中囊胚形成比例,并降低其凋亡率(图7D-E)。结果表明,棕榈酰肉碱可通过改善卵母细胞质量来促进肥胖小鼠早期胚胎发育潜能。

**[0071] 实施例11**

[0072] 本实施例提供一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0073] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水的固液比为1:3g/mL,加热沸腾提取2h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为70wt%,沉淀5h,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得大蒜多糖;

[0074] S2. 复合藻粉的反复冻融:将5重量份葛仙米藻干粉和10重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:5g/mL,置于-25℃冷冻2h后,室温完全融解,反复2次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0075] S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热至40℃,酶解2h,紫外线灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0076] 所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2:5;

[0077] S4. 发酵培养基的制备:将3重量份步骤S1中的滤渣和10重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为20wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0078] S5. 菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,37℃,50r/min,活化培养18h,制得含菌量为 $10^8$ cfu/mL的菌种种子液;

[0079] S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2%和1%,37℃,50r/min,发酵培养48h,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0080] S7. 包埋:将1重量份步骤S1制得大蒜多糖、5重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、15重量份步骤S6制得发酵产物、0.01重量份棕榈酰肉碱、2重量份菊粉和0.5重量份卵磷脂混合均匀,加入100重量份含有12wt%的海藻酸钠、5wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份花生油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份5wt%的氯化镁溶液,常温固化20min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

**[0081] 实施例12**

[0082] 本实施例提供一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0083] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水的固液比为1:5g/mL,加热沸腾提取3h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为80wt%,沉淀7h,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得大蒜多糖;

[0084] S2. 复合藻粉的反复冻融:将7重量份葛仙米藻干粉和12重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:10g/mL,置于-20℃冷冻3h后,室温完全融解,反复3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0085] S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热至45℃,酶解3h,紫外线灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0086] 所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为3:7;

[0087] S4. 发酵培养基的制备:将5重量份步骤S1中的滤渣和15重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为30wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0088] S5. 菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,39℃,70r/min,活化培养24h,制得含菌量为 $10^9$ cfu/mL的菌种种子液;

[0089] S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为3%和2%,39℃,70r/min,发酵培养72h,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0090] S7. 包埋:将2重量份步骤S1制得大蒜多糖、7重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、20重量份步骤S6制得发酵产物、0.02重量份棕榈酰肉碱、3重量份菊粉和1重量份葵花磷脂混合均匀,加入100重量份含有15wt%的海藻酸钠、7wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份菜籽油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份7wt%的氯化铝溶液,常温固化30min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0091] 实施例13

[0092] 本实施例提供一种含棕榈酰肉碱组合物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0093] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水的固液比为1:4g/mL,加热沸腾提取2.5h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为75wt%,沉淀6h,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得大蒜多糖;

[0094] S2. 复合藻粉的反复冻融:将6重量份葛仙米藻干粉和11重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:7g/mL,置于-22℃冷冻2.5h后,室温完全融解,反复3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0095] S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热至42℃,酶解2.5h,紫外线灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0096] 所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2.5:6;

[0097] S4. 发酵培养基的制备:将4重量份步骤S1中的滤渣和12重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为25wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0098] S5. 菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,38℃,60r/min,活化培养21h,制得含菌量为 $10^9$ cfu/mL的菌种种子液;

[0099] S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2.5%和1.5%,38℃,60r/min,发酵培养56h,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0100] S7. 包埋:将1.5重量份步骤S1制得大蒜多糖、6重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、17重量份步骤S6制得发酵产物、0.015重量份棕榈酰肉碱、2.5重量份菊粉和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0101] 实施例14

[0102] 与实施例13相比,不同之处在于,复合酶为单一的木瓜蛋白酶。

[0103] 实施例15

[0104] 与实施例13相比,不同之处在于,复合酶为单一的纤维素酶。

[0105] 对比例1

[0106] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S2中未进行反复冻融。

[0107] 具体如下:

[0108] S2.复合藻粉的浸泡:将6重量份葛仙米藻干粉和11重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:7g/mL,得到固液混合物。

[0109] 对比例2

[0110] 与实施例13相比,不同之处在于,未进行步骤S3。

[0111] 具体如下:

[0112] S1.大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水的固液比为1:4g/mL,加热沸腾提取2.5h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为75wt%,沉淀6h,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得大蒜多糖;

[0113] S2.复合藻粉的反复冻融:将6重量份葛仙米藻干粉和11重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:7g/mL,置于-22℃冷冻2.5h后,室温完全融解,反复3次,室温解冻后,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0114] S3.发酵培养基的制备:将4重量份步骤S1中的滤渣和12重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为25wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0115] S4.菌种活化:将长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于高氏培养基中,38℃,60r/min,活化培养21h,制得含菌量为 $10^9$ cfu/mL的菌种种子液;

[0116] S5.发酵:将步骤S4制得的长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量分别为2.5%和1.5%,38℃,60r/min,发酵培养56h,冷冻干燥,得到发酵产物;

[0117] S6.包埋:将1.5重量份步骤S1制得大蒜多糖、6重量份步骤S2制得的藻胆蛋白提取物、17重量份步骤S5制得发酵产物、0.015重量份棕榈酰肉碱、2.5重量份菊粉和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0118] 对比例3

[0119] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S4中未添加步骤S1中的滤渣。

[0120] 具体如下:

[0121] S4.发酵培养基的制备:将16重量份步骤S2中的滤渣加水使得其含水量为25wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基。

[0122] 对比例4

[0123] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S4中未添加步骤S2中的滤渣。

[0124] 具体如下:

[0125] S4.发酵培养基的制备:将16重量份步骤S1中的滤渣加水使得其含水量为25wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基。

[0126] 对比例5

[0127] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S6中未接种长双歧杆菌菌种种子液。

[0128] 具体如下:

[0129] S6. 发酵:将步骤S5制得的鼠李糖乳杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述鼠李糖乳杆菌菌种种子液的接种量为4%,38℃,60r/min,发酵培养56h,冷冻干燥,得到发酵产物。

[0130] 对比例6

[0131] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S6中未接种鼠李糖乳杆菌菌种种子液。

[0132] 具体如下:

[0133] S6. 发酵:将步骤S5制得的长双歧杆菌菌种种子液接种至发酵培养基中,所述长双歧杆菌菌种种子液的接种量为4%,38℃,60r/min,发酵培养56h,冷冻干燥,得到发酵产物。

[0134] 对比例7

[0135] 与实施例13相比,不同之处在于,未进行步骤S6。

[0136] 具体如下:

[0137] S1. 大蒜多糖的制备:将大蒜干燥,粉碎,制得大蒜粉,加入水中,所述大蒜粉和水的固液比为1:4g/mL,加热沸腾提取2.5h,过滤,滤渣留用;加入乙醇至体系乙醇含量为75wt%,沉淀6h,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得大蒜多糖;

[0138] S2. 复合藻粉的反复冻融:将6重量份葛仙米藻干粉和11重量份螺旋藻干粉加水浸泡,所述葛仙米藻干粉和螺旋藻干粉的总质量与水的固液比为1:7g/mL,置于-22℃冷冻2.5h后,室温完全融解,反复3次,室温解冻后,得到冻融固液混合物;

[0139] S3. 酶解:向步骤S2得到的冻融固液混合物中加入复合酶,加热至42℃,酶解2.5h,紫外线灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到藻胆蛋白提取物;

[0140] 所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶的混合物,质量比为2.5:6;

[0141] S4. 发酵培养基的制备:将4重量份步骤S1中的滤渣和12重量份步骤S2中的滤渣混合,加水使得其含水量为25wt%,紫外线灭菌,得到发酵培养基;

[0142] S5. 包埋:将1.5重量份步骤S1制得大蒜多糖、6重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、0.015重量份棕榈酰肉碱、2.5重量份菊粉和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0143] 对比例8

[0144] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S7中未添加大蒜多糖。

[0145] 具体如下:

[0146] S7. 包埋:将6重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、17重量份步骤S6制得发酵产物、0.015重量份棕榈酰肉碱、4重量份菊粉和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0147] 对比例9

[0148] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S7中未添加菊粉。

[0149] 具体如下:

[0150] S7. 包埋:将4重量份步骤S1制得大蒜多糖、6重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取

物、17重量份步骤S6制得发酵产物、0.015重量份棕榈酰肉碱和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。。

[0151] 对比例10

[0152] 与实施例13相比,不同之处在于,步骤S7中未添加大蒜多糖和菊粉。

[0153] 具体如下:

[0154] S7.包埋:将6重量份步骤S3制得的藻胆蛋白提取物、17重量份步骤S6制得发酵产物、0.015重量份棕榈酰肉碱和0.7重量份吐温-80混合均匀,加入100重量份含有13.5wt%的海藻酸钠、6wt%的羧甲基纤维素钠的水溶液中,搅拌混合20min,加入200重量份玉米油中,12000r/min乳化15min,滴加20重量份6wt%的氯化钙溶液,常温固化25min,3000r/min离心15min,去离子水洗涤,105℃干燥1h,制得含棕榈酰肉碱组合物。

[0155] 测试例1对肥胖小鼠卵巢功能的影响

[0156] 分组:选取4周龄ICR雌性小鼠,分为对照组、模型组、阳性药组、实施例11-15组、对比例1-10组,每组6只。

[0157] 模型建立:

[0158] 对照组:饲喂8周普通饲料后,开始持续灌胃生理盐水6周,每天灌胃剂量2mL/kg。灌胃生理盐水期间仍给小鼠保持饲喂普通饲料。

[0159] 模型组:饲喂8周高脂饲料后,开始持续灌胃生理盐水6周,每天灌胃剂量2mL/kg。灌胃生理盐水期间仍给小鼠保持饲喂高脂饲料。

[0160] 阳性药组:饲喂8周高脂饲料后,开始持续灌胃生理盐水6周,每天腹腔注射雷帕霉素2mg/kg。注射期间仍给小鼠保持饲喂高脂饲料。

[0161] 实施例11-15组和对比例1-10组:饲喂8周高脂饲料后,开始持续灌胃生理盐水6周,每天灌胃剂量1g/kg相应组制得的含棕榈酰肉碱组合物。灌胃期间仍给小鼠保持饲喂高脂饲料。

[0162] 实验方法:

[0163] 1、卵巢GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)、SOD(超氧化物歧化酶)活力和MDA(丙二醛)的含量的测定

[0164] 颈椎脱臼方法处死小鼠后,解剖小鼠身体收集小鼠的卵巢器官。将收集的小鼠卵巢按1:9(卵巢重量/生理盐水体积)的比例,加入生理盐水,破碎并离心,离心后取上清液用生理盐水按1:9(v/v)的比例稀释成1%的匀浆。使用试剂盒测量GSH-Px、SOD和MDA的含量。

[0165] 结果见表1。

[0166] 表1

[0167]

组别	GSH-Px (U/mg)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
对照组	2.78±0.34	82.42±22.1	69.84±17.4
模型组	2.21±0.21*	61.45±16.7*	98.25±30.2*
阳性对照组	2.45±0.24#	70.23±17.2#	82.13±28.5#
实施例11	2.56±0.23#	73.39±18.4#	76.52±21.2#

实施例12	2.58±0.26#	73.41±17.9#	76.48±22.4#
实施例13	2.59±0.22#	73.45±18.5#	76.44±23.0#
实施例14	2.51±0.19	70.32±19.4	78.12±21.5
实施例15	2.49±0.26	71.18±20.1	77.95±22.9
对比例1	2.47±0.22	70.17±19.3	78.45±23.4
对比例2	2.45±0.21	70.02±20.4	78.78±21.5
对比例3	2.39±0.24	68.97±19.7	79.82±23.8
对比例4	2.31±0.18	67.52±21.2	80.21±20.4
对比例5	2.36±0.23	67.78±18.6	79.94±21.7
对比例6	2.33±0.18	67.62±18.2	80.14±19.3
对比例7	2.27±0.19	65.69±19.5	81.57±20.5
对比例8	2.40±0.22	69.10±20.7	79.42±21.6
对比例9	2.42±0.20	69.24±21.2	79.25±23.2
对比例10	2.37±0.23	68.77±20.3	80.02±19.5

[0168] 注释:\*为与对照组相比,P<0.05;#为与模型组相比,P<0.05。

[0169] 由上表可知,本发明实施例11-13制得的含棕榈酰肉碱组合物明显提高卵巢GSH-Px和SOD的水平,降低MDA含量。

[0170] 2、卵母细胞收集

[0171] 通过腹膜内注射妊娠母马血清促性腺激素6-48h后使用人绒毛膜促性腺激素对小鼠进行超排卵,在人绒毛膜促性腺激素注射后14-15h从输卵管收集卵母细胞。通过在含有0.1%透明质酸酶的M2培养基中移液来除去颗粒细胞。将卵母细胞分类为M II (具有第一极体)、成熟停滞(没有极体排出的生发泡破裂)或退化(细胞质碎片)。计算排卵数目,卵母细胞异常率。

[0172] 卵母细胞异常率(%) = 平均异常卵母细胞/平均排卵数目\*100%

[0173] 结果见表2。

[0174] 表2

[0175]

组别	平均排卵数目(个)	卵母细胞异常率(%)
对照组	17	17.6
模型组	5	60.0
阳性对照组	10	30.0
实施例11	13	23.1
实施例12	13	23.1
实施例13	14	21.4
实施例14	12	25.0
实施例15	13	30.8
对比例1	11	27.3
对比例2	11	36.4
对比例3	10	40.0
对比例4	9	44.4

对比例5	10	40.0
对比例6	9	44.4
对比例7	8	50.0
对比例8	11	27.3
对比例9	11	27.3
对比例10	10	30.0

[0176] 由上表可知,本发明实施例11-13制得的含棕榈酰肉碱组合物明显提高排卵数量,降低卵母细胞异常率。

[0177] 对比例1与实施例13相比,不同之处在于,步骤S2中未进行反复冻融。卵巢SOD、GSH-Px水平下降,MDA含量提高。螺旋藻和葛仙米藻经过反复冻融的过程中,能够形成微细冰刀从而促进刺穿藻细胞壁,促进内容物的溶出。

[0178] 对比例3、4与实施例13相比,不同之处在于,步骤S4中未添加步骤S1中的滤渣或步骤S2中的滤渣。卵巢SOD、GSH-Px水平下降,MDA含量提高,排卵数量下降,卵母细胞异常率提高。将提取后的大蒜滤渣、藻粉滤渣作为发酵培养基,含有丰富的碳源、氮源以及微量元素和矿物质,能够促进益生菌增殖和产生有益产物,同时,通过发酵,能进一步产生大量的蛋白肽和有益的短链脂肪酸等小分子物质,从而进一步起到调节血脂、减肥和促进卵巢功能、促进胚胎发育的效果。

[0179] 对比例5、6与实施例13相比,不同之处在于,步骤S6中未接种长双歧杆菌菌种种子液或鼠李糖乳杆菌菌种种子液。对比例7与实施例13相比,不同之处在于,未进行步骤S6。卵巢SOD、GSH-Px水平下降,MDA含量提高,排卵数量下降,卵母细胞异常率提高。大量益生菌,包括长双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌,输送到胃肠道,能会改变肠道环境,包括抑制脂多糖的产生,增加肠道上皮细胞的紧密连接。其中长双歧杆菌的增殖和代谢能显著阻止体质量增加、脂肪积累和促炎基因的表达,鼠李糖乳杆菌的增殖和代谢能降低肝脏甘油三酯水平和减少脂肪基因表达,从而调节脂质代谢,抑制肥胖,两者的协同作用,还能明显促进卵巢形态规范化,改善卵子质量,促进胚胎发育。

[0180] 对比例8、9与实施例13相比,不同之处在于,步骤S7中未添加大蒜多糖或菊粉。对比例10与实施例13相比,不同之处在于,步骤S7中未添加大蒜多糖和菊粉。卵巢SOD、GSH-Px水平下降,MDA含量提高。益生元通过选择性的刺激肠道中一种或少数种益生菌的增长或活性而对宿主有利。益生元发酵产生的短链脂肪酸是刺激有益菌增长的重要因素。本发明添加的菊糖和大蒜多糖加速恢复肠道菌群失调,这两种益生元对内毒素的清理、免疫力的恢复也有积极的效果。

[0181] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



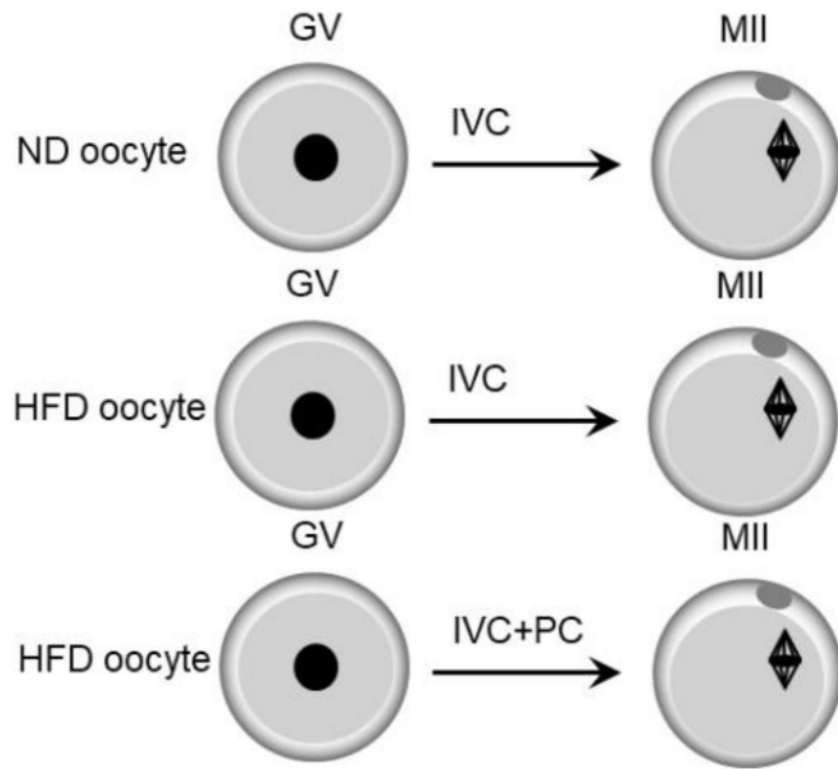


图1

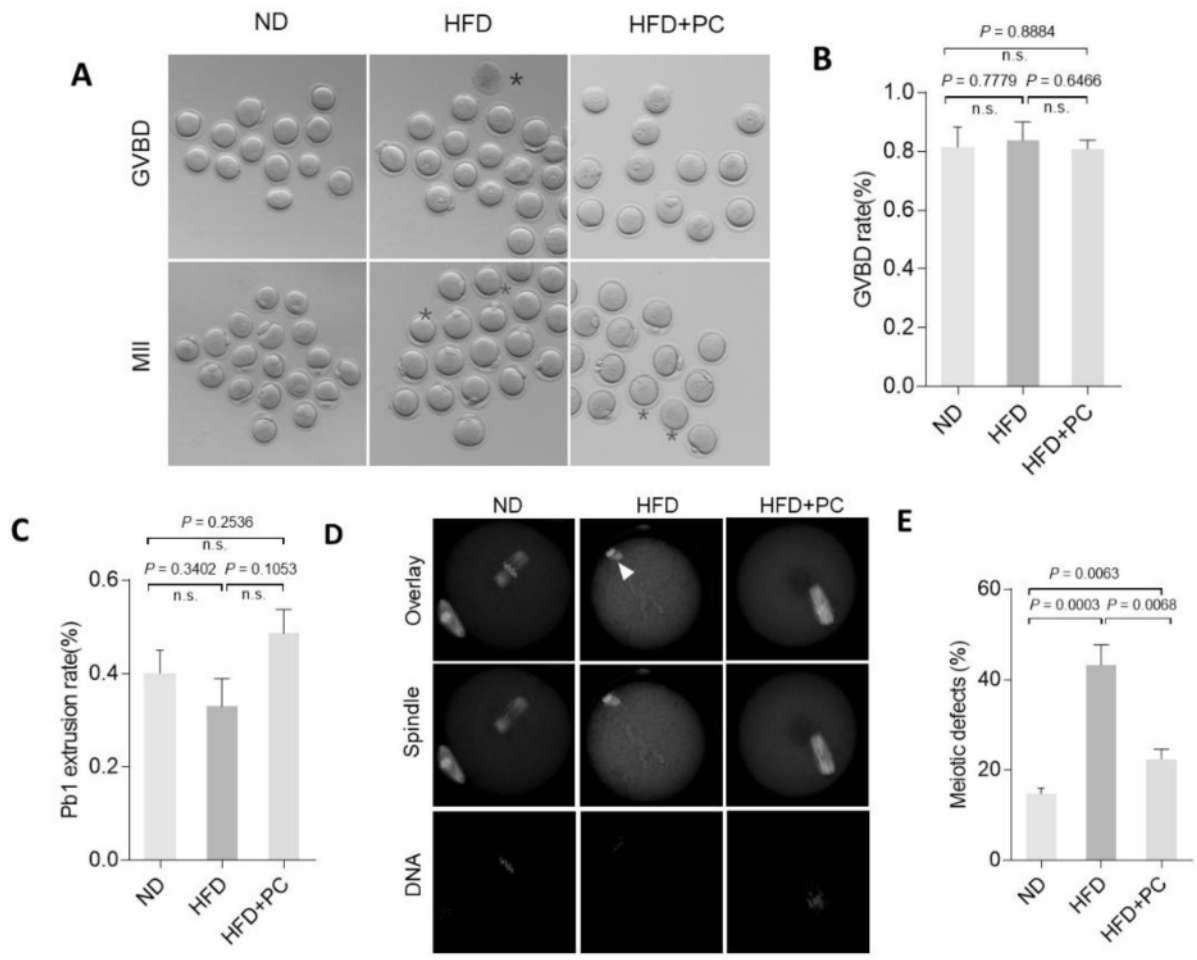


图2

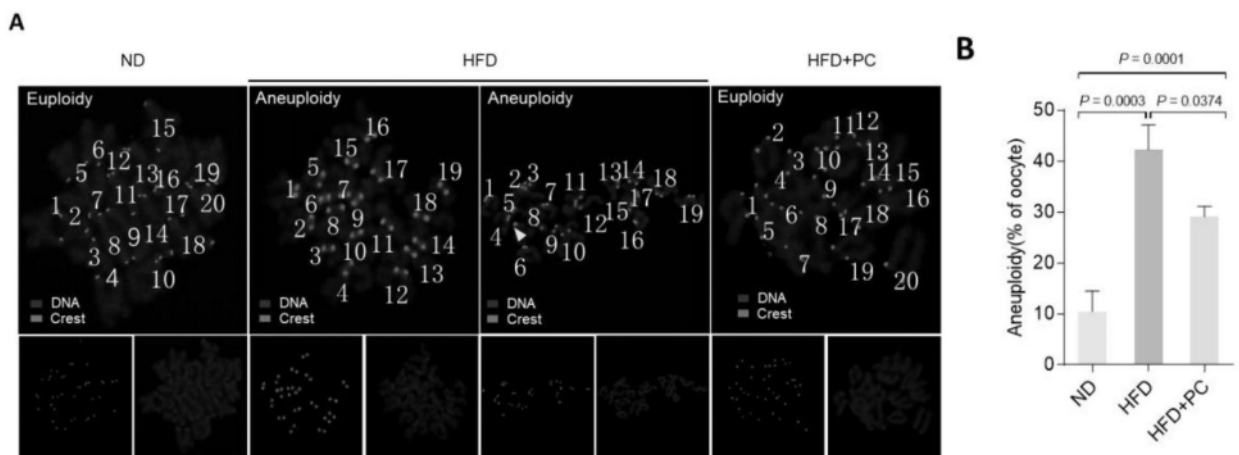


图3

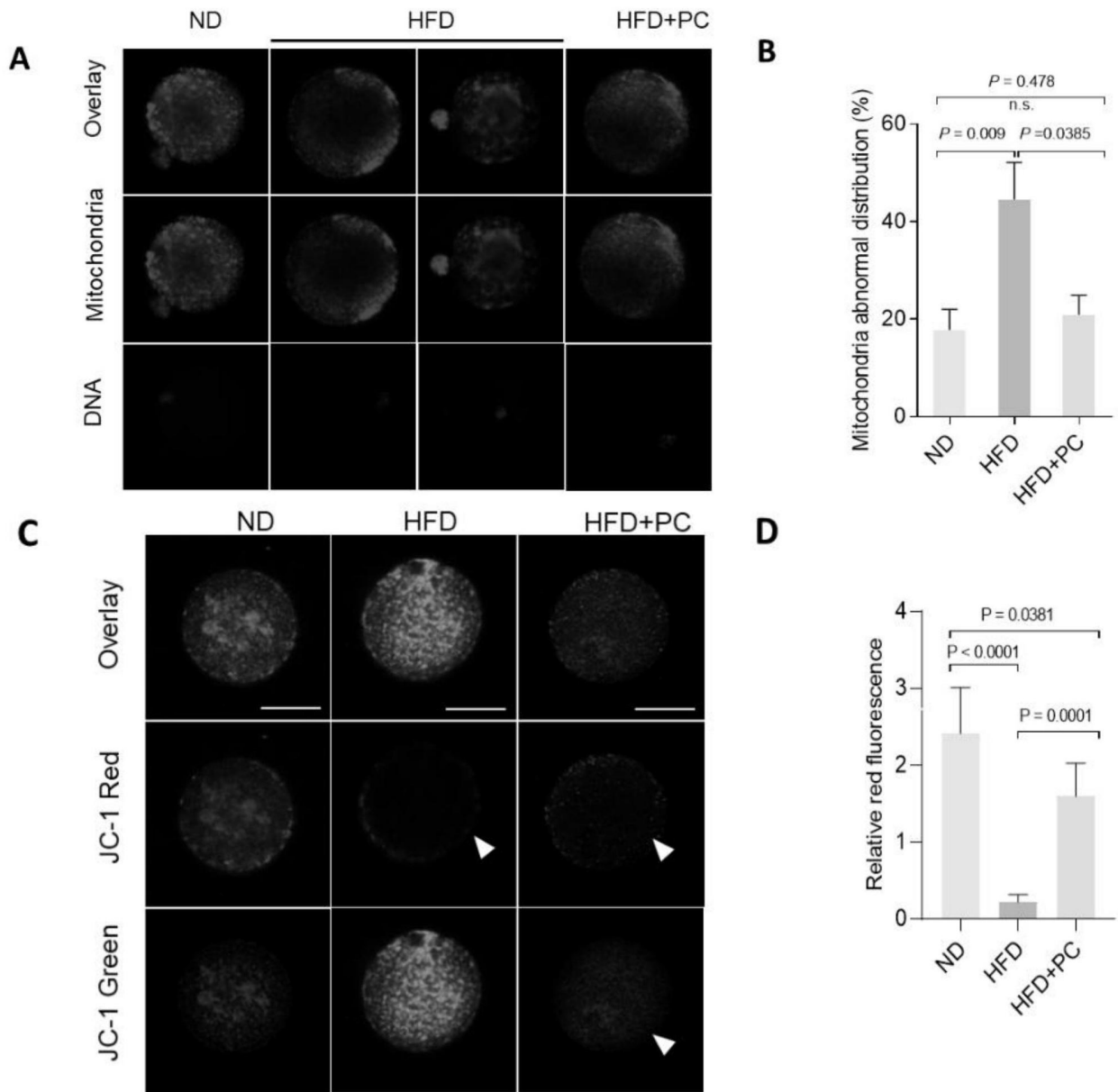


图4

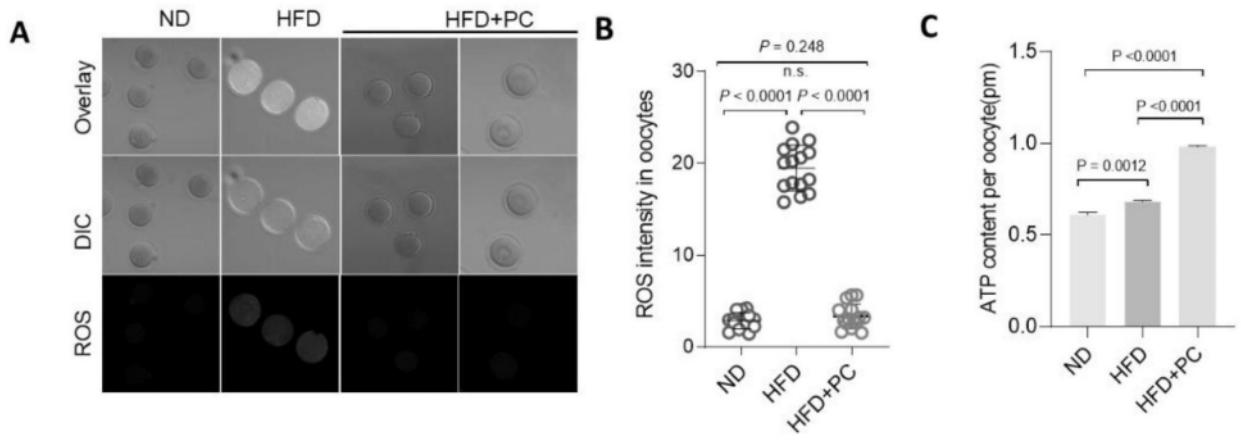


图5

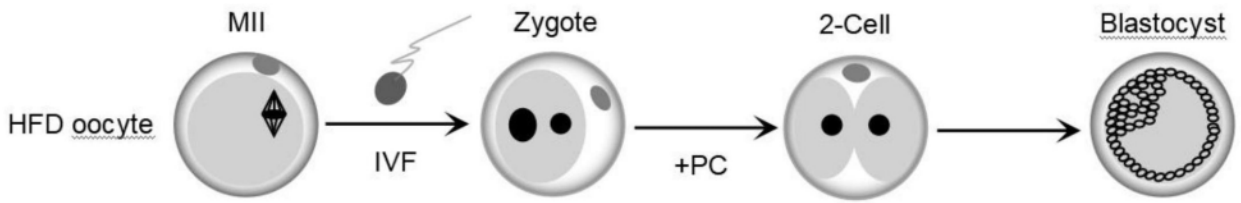


图6

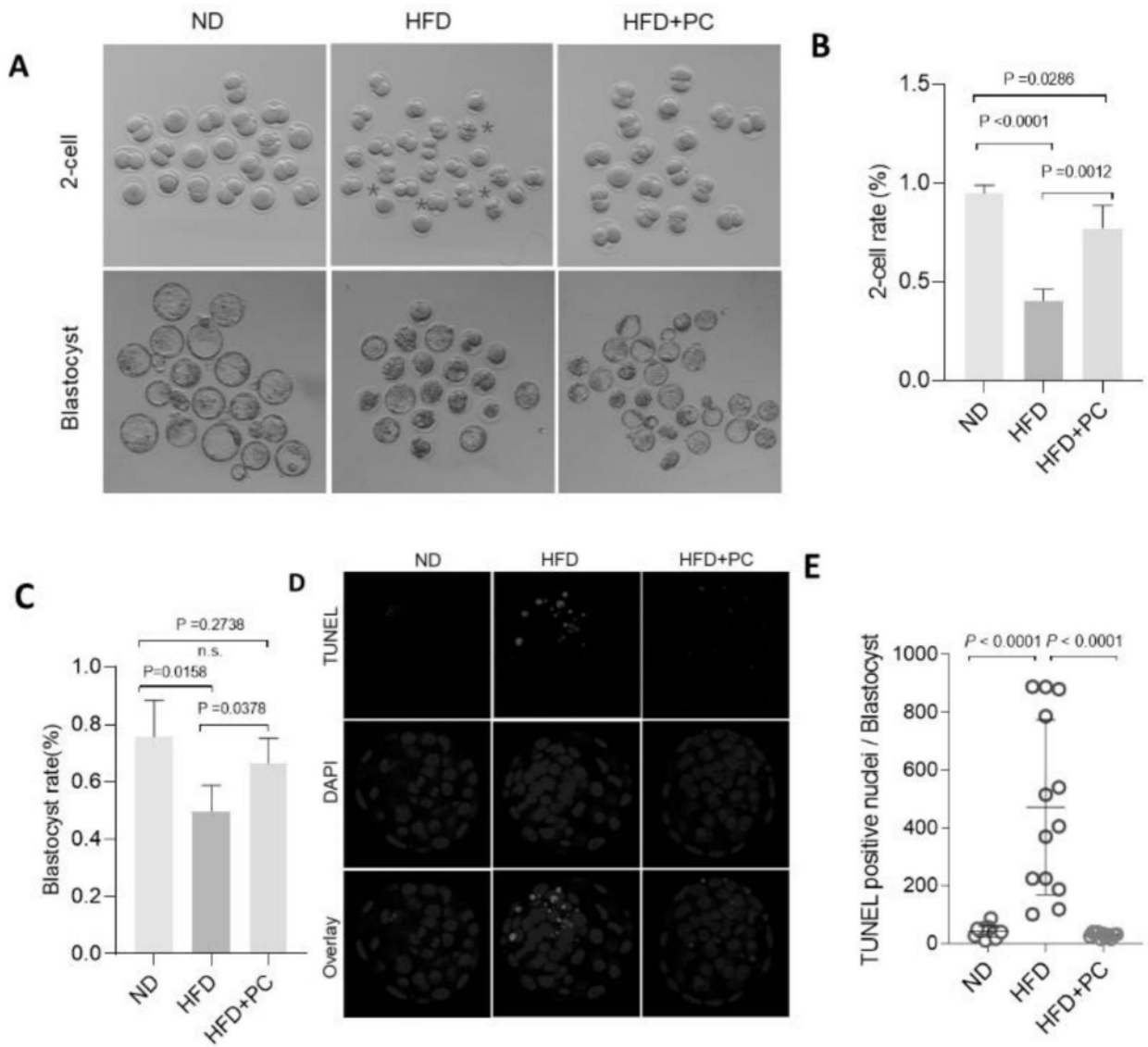


图7