



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109106893 B

(45) 授权公告日 2021.04.20

(21) 申请号 201811340664.7

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.11.12

A61P 1/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 37/04 (2006.01)

申请公布号 CN 109106893 A

A61K 35/57 (2015.01)

(43) 申请公布日 2019.01.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 上海市中西医结合医院

CN 103908610 A, 2014.07.09

地址 200082 上海市虹口区保定路230号

JP 2018058859 A, 2018.04.12

(72) 发明人 钟蕙 付淑娟 吴婷婷 周张杰

吴婷婷等. 健脾固肠方改善Ⅲ、Ⅳ期肿瘤化疗患者肠道屏障功能的临床观察.《上海中医药大学学报》.2017,

杨蕴 张士强

吴婷婷等. 肠益煎对裸鼠结肠癌移植瘤抑瘤作用的实验研究.《现代中西医结合杂志》.2015,

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253

审查员 陈笑宇

代理人 冯子玲

(51) Int. Cl.

A61K 36/90 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

A61K 36/896 (2006.01)

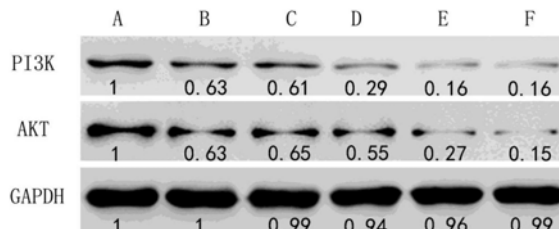
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

一种调节肠道屏障功能的中药复方制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂及其制备方法。该中药复方制剂由下列重量份的中药原料药制成：黄芪30~45份，党参10~30份，茯苓10~20份，白术10~20份，土茯苓10~15份，菝葜10~30份，八月札10~20份，鸡内金5~20份，藤梨根10~30份。本发明的中药复方制剂具有益气健脾，化湿散结的功效，在化疗所致以脾虚为主症的肿瘤患者中，可以起到保护肠道屏障损伤，并提高患者生活质量功效，成本低，安全有效，无毒副作用，调节肠道肿瘤微环境中PI3K/AKT表达，显著降低结直肠癌术后转移。



1. 一种改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂,其特征在于,所述中药复方制剂由下列重量份的中药原料药制成:黄芪30~45份,党参10~30份,茯苓10~20份,白术10~20份,土茯苓10~15份,菝葜10~30份,八月札10~20份,鸡内金5~20份,藤梨根10~30份。

2. 如权利要求1所述的中药复方制剂,其特征在于,所述中药复方制剂由下列重量份的中药原料药制成:黄芪30份,党参20份,茯苓15份,白术15份,土茯苓10份,菝葜15份,八月札15份,鸡内金12份,藤梨根15份。

3. 一种如权利要求1所述的中药复方制剂的制备方法,包含以下步骤:

(1) 称取处方量的中药原料药备用;

(2) 取步骤(1)中各中药原料药的一半量,加水煎煮两次,过滤、合并煎煮液,浓缩干燥得干浸膏,对干浸膏粉碎得到浸膏细粉;

(3) 取步骤(1)中各中药原料药的另一半量,粉碎后灭菌,与步骤(2)中制得的浸膏细粉混和后,进一步加入药学上可接受的辅料,以常规的中药制剂方法,制备成中药复方制剂。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中第一次煎煮时加水3~8倍量,浸泡半小时后,煎煮45分钟;第二次煎煮时加水3~8倍量,煎煮30分钟。

5. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中的灭菌方法为Co60辐照灭菌。

一种调节肠道屏障功能的中药复方制剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及中药领域,特别涉及一种改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 结直肠癌是我国发病率总排名第五的恶性肿瘤,在胃肠道恶性肿瘤中位居第3位,且发病率近年呈现不断上升的趋势。最新CONCORD-3数据显示我国结肠癌的五年生存率明显低于美国、加拿大、冰岛、挪威等欧美国家,在亚洲国家和地区中处于中下水平。目前结肠癌的首选根治方法常规仍为手术治疗,但患者因为手术后受静脉回流和解剖部位等因素影响,会出现不同比例的复发与转移。非转移性大肠癌患者的5年生存率可以超过75%,转移性大肠癌的5年生存率为10%。根治术后的复发与转移,成为大肠癌患者的首要死因,严重影响患者的远期生存率。

[0003] 肠道肿瘤本身及手术后极易出现肠黏膜屏障功能障碍、炎症、肠道菌群失衡等,均会导致免疫监视功能丧失,患者免疫功能下降,肠道粘膜炎症发生甚至加重,降低肠道通透性,从而发生恶性肿瘤的转移或复发。化疗是肿瘤根治术后的一线辅助治疗方法,为了杀死肿瘤细胞,运用化学药物来抑制肿瘤细胞的增殖、浸润、转移,在治疗原发灶的同时,可以消灭可能存在的残余肿瘤细胞或有恶变倾向的病灶,从而在一定程度上起到的防止复发转移作用。但化疗药物对机体不可避免具有相当的毒副作用,其中肠道屏障损伤正是某些抗癌药物的毒性反应。因此,化疗造成的肠道微环境的改变,包括肠道菌群紊乱、肠道屏障功能损伤,还会进一步引起免疫应答改变如免疫逃避等,乃至全身性的炎症反应加重。因此,保护肠道屏障功能,防治化疗引起的肠道损伤,可以起到改善患者症状作用之外,也起到调节全身免疫的作用,对于化疗的疗效以及恶性肿瘤的进展起到一定的影响。

[0004] 中医药因不同于西医的整体观念及辨证论治理念,在治疗结直肠癌患者术后复发转移方面,弥补西医疗法的局限与不足,往往起到很好的疗效。前期临床课题中验证了一种改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂在改善恶性肿瘤患者化疗后肠道功能紊乱、降低手术后复发与转移、提高机体免疫功能方面有着良好的疗效。在课题组前期临床课题中已经验证其对中晚期恶性肿瘤脾虚化疗患者有效,能够保护恶性肿瘤化疗患者肠道屏障功能,改善患者临床症状,减少化疗毒副反应,提高患者生存质量,且安全性良好。我们基础实验也表明这种改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂联合化疗能保护肠道屏障、调节肠道肿瘤微环境中PI3K/AKT表达抑制转移。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种安全有效、配制简便、价格适度的能够改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂制备方法。

[0007] 本发明所提供的改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂,由下列重量份的中药原料药制成:黄芪30~45份,党参10~30份,茯苓10~20份,白术10~20份,土茯苓10~15份,菝葜10~30份,八月札10~20份,鸡内金5~20份,藤梨根10~30份。

[0008] 本发明组方严谨、科学、合理,符合中医理论。其中党参健脾宜肺、茯苓益脾和胃、白术和中,三药为臣药共奏益气健脾的功效,加强君药黄芪补气之功。四药基础上再加以八月札、土茯苓、菝葜、藤梨根为佐药,八月札和胃疏肝理气、略有活血功效,软坚散结,土茯苓、藤梨根化湿,解化疗之毒,菝葜利湿去浊、解毒散瘀,鸡内金为使药,健胃消食。全方药力凸显于益气健脾,方中补气之中佐以疏散,疏散之中以补气为主,凉温并用,补而不腻。此方在化疗所致以脾虚为主症的患者中,可以起到保护肠道屏障损伤并提高患者生活质量功效,临床疗效良好。

[0009] 本发明所涉及的原料药均为天然中草药,均为中国药典2000年版一部所收载中药,并符合药典质量要求。取材容易,配制简便,药源广,成本低。本发明遵循中医处方用药原则,各种组分药物采用水煎服用。

[0010] 本发明还提供上述改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的中药复方制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 称取处方量的各中药原料药备用;

[0012] (2) 取步骤(1)中各中药原料药的一半量,加水煎煮两次,过滤、合并煎煮液,浓缩干燥得干浸膏,对干浸膏粉碎得到浸膏细粉;

[0013] (3) 取步骤(1)中各中药原料药的另一半量,粉碎后灭菌,与步骤(2)中制得的浸膏细粉混和后,进一步加入药学上可接受的辅料,以常规的中药制剂方法,制备成本发明的中药复方制剂的常规剂型。

[0014] 其中,上述步骤(2)中第一次煎煮时:加水3~8倍量,浸泡半小时后,煎煮45分钟;第二次煎煮时:加水3~8倍量,煎煮30分钟。

[0015] 其中,上述步骤(3)中的灭菌方法为Co60辐照灭菌,辐照剂量8k。

[0016] 本发明采用各种常规的制剂工艺,加入成型辅料或矫味辅料,可将本发明所提供的中药复方制剂制成颗粒剂、片剂、胶囊剂、口服液等药物剂型。其中,本发明所述的药用辅料选自甘露醇,乳糖,蔗糖粉,淀粉,硬脂酸镁,阿斯巴甜,薄荷脑和/或甜橙油香精。

[0017] 此外,以本发明所述重量份的中药原料药,采用常规水煎法制成的水煎剂也同样能够达到本发明的治疗效果。

[0018] 经动物药效学实验结果表明,本发明的中药复方制剂参与的治疗方案与单纯化疗相比较,HE染色后回肠上皮绒毛长度、宽度及隐窝深度,血清DAO、DLA、IFABP明显低于化疗组。以裸鼠肠癌原位接种的动物模型,结果表明本方联合化疗能有效控制瘤体大小,有效降低PI3K、AKT蛋白的表达,从而降低肿瘤转移的微环境的形成,降低了肿瘤复发转移的机会。经中医症候积分、实验指标、生活质量指标观察等临床研究结果显示:本发明的中药复方制剂效果显著可靠,药性平和,未出现毒副作用,够明显下调化疗诱发的D-LA血清含量升高,对化疗导致的肠道粘膜通透性的增加有显著抑制作用,保护肠道机械屏障功能免受损伤;此外,该方能够上调sIgA、IL-2、IFN- γ 血清含量,在肠道发挥免疫保护作用,改善肠道免疫屏障功能。能够显著降低结直肠癌术后转移和改善患者的生活质量。

附图说明：

[0019] 图1是动物实验中各组裸鼠体重比较图,各组裸鼠体重差别无统计学意义

[0020] 图2、图3是动物实验中各组裸鼠瘤重比较(图2为各组瘤重比较、图3为各组肠道肿瘤),说明该方联合两化疗药使用与单纯使用5-氟尿嘧啶相比,能使肠道肿瘤组织明显缩小,而与其他组疗效相当

[0021] 图4是动物实验中western blot检测肠道组织蛋白的蛋白电泳比较图,说明该方联合化疗能有效降低PI3K、AKT的表达

[0022] 图5~图8是动物实验中Real-Time PCR检测肠粘膜中AKT、PI3K mRNA表达图(图5为PI3K病理HE(*200倍)、图6为PCR检测肠道组织PI3K mRNA表达结果、图7为AKT病理HE(*200倍)、图8为PCR检测肠道组织AKT mRNA表达结果),说明该方联合化疗能有效降低PI3K、AKT的表达

[0023] 图9是各组回肠上皮损伤指数评定,实验组回肠上皮损伤程度明显低于其他四组,具有减轻化疗药所致肠道损伤作用

[0024] 图10是多点取材(10点)方式HE(*100倍)分析肺转移数和肝转移数,表明该方能降低肿瘤转移

具体实施方式

[0025] 以下通过试验例来进一步阐述本发明所述药物的有益效果,这些试验里包括了本发明的改善肿瘤患者肠道屏障功能、调节机体免疫的复方制剂的动物药效学实验和临床疗效观察试验。

[0026] 实施例1本发明的中药复方制剂保护肠道屏障、调节PI3K/AKT表达抑制转移的实验研究1.动物:4~5周龄BALB/c雌性裸鼠65只,NOD-SCID小鼠30只、BALB/c裸鼠30只,体质量20~24g,购自中科院上海斯莱克实验动物有限公司,SPF级环境下饲养,实验动物合格证号:SYXK(沪)2014-0008。

[0027] 2.方法:

[0028] 2.1细胞培养及皮下移植瘤

[0029] CT26.WT细胞用DMEM培养基培养,细胞生长至70%~80%融合时用0.25%胰蛋白酶、0.02%EDTA液消化传代,计数后稀释为细胞数 $1.25 \times 10^7 \text{ml}^{-1}$ 。每只裸鼠皮肤消毒后,在超净工作台内于大腿根部皮下注射0.2mL的细胞悬液,注射局部出现明显皮丘,接种完成后正常饲养14天,用游标卡尺测量肿瘤结节的长径(a)、短径(b),按公式 $V = ab^2/2$,估算肿瘤近似体积。

[0030] 2.2小鼠结肠癌皮下移植高转移模型的筛选[《小鼠结肠癌高转移模型体内筛选和建立》]

[0031] 首先选取NOD-SCID小鼠进行肿瘤体内初筛。首代切除小鼠皮下肿瘤以延长荷瘤寿命。濒死状态时取肉眼明显可见的肺转移灶移植至下一代NOD-SCID小鼠皮下进行扩增。反复进行鼠间皮下移植→肺转移→皮下扩增→肺转移筛选3次后,取肺转移灶移植到免疫系统正常的BALB/c裸鼠皮下,继续BALB/c裸鼠肿瘤体内筛选(方法步骤同NOD-SCID小鼠进行肿瘤体内初筛,筛选3次)。

[0032] 2.3皮下移植瘤原位接种

[0033] 结肠癌皮下移植高转移模型成瘤裸鼠接种完成后正常饲养14天,第15天将成瘤裸鼠的瘤体组织切成约0.1cm直径的小块,60只裸鼠术前用乙醚吸入麻醉,常规消毒皮肤,打开腹腔将肠段拉出,用注射针头划破浆膜层用生物胶粘和瘤体和肠壁,用生理盐水按压2分钟,回纳肠道,缝合腹膜(含肌层)及皮肤,术后予抗生素预防感染。

[0034] 术后分组分笼饲养(SPF级)并观察,至濒死状态时解剖取材,记录观察肿瘤浸润和转移情况,对接肿瘤观察并测量瘤体的重量。

[0035] 2.4分组及给药方法

[0036] 原位接种后24h(第16天)将裸鼠按照体重分为A组(模型组)、B组(5-氟尿嘧啶组)、C组(奥沙利铂组)、D组(5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组)、E组(中药方+5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组)、F组(谷氨酰胺+5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组)六组,每组10只,分笼饲养,每笼5只,自由饮食。

[0037] 原位移植手术第三天开始,均按照0.1ml/10g注射用量开始给药,化疗药物剂量参照成人体表面积换算,药物剂量换算计算公式: $dB = dA \times (RB/RA) \times (WA/WB)^{1/3}$ 。B组:按照25mg/kg的剂量隔天给予腹腔注射,共给予5次用药。C组:按照6.6mg/kg的剂量隔天给予腹腔注射,共给予5次用药。D组:隔天给予奥沙利铂6.6mg/kg的剂量腹腔注射,隔天给予5-氟尿嘧啶25mg/kg的剂量腹腔注射,共予5次用药。第17天(原位移植手术后第二天)到第38天共21天,连续给灌胃处理,AB C D四组给予生理盐水灌胃。E组、F组两组分别给与中药灌胃处理和谷氨酰胺腹腔2g/kg注射。第39天仅提供水禁食。第40天推椎处死,眼球取血,解剖取回肠组织,肠道肿瘤组织。

[0038] 3.检测指标

[0039] 3.1 Western Blot检测PI3K、AKT蛋白。

[0040] 3.2 Real-Time PCR检测肠粘膜中AKT、PI3K mRNA表达。

[0041] 3.3回肠上皮损伤指数评定。

[0042] 3.4免疫组化(回肠):肠粘膜中AKT、PI3K表达。

[0043] 3.5 HE多点取材(10点)分析肺转移数和肝转移数。

[0044] 4.结果

[0045] 4.1各组裸鼠体重(见图1)和肠道肿瘤的重量(见图2、3,表1)

[0046] 表1各组裸鼠体重和肠道肿瘤的重量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	裸鼠体重 (g)	肠道肿瘤重量 (g)
A	8	24.34±0.84	1.95±0.53●
B	8	23.63±1.53	1.53±1.02●
[0047] C	8	24.80±1.32	1.27±0.54#
D	8	24.40±1.26	1.11±0.92
E	8	25.06±1.43	0.62±0.29#
F	8	23.73±1.89	1.19±0.57

[0048] 注:与A组(模型组)比较,#p<0.05;与E组比较,•p<0.05

[0049] 4.2 WB检测肠道组织蛋白表达结果(见图4)

[0050] 采用RIPA裂解液裂解肠道组织,依据试剂盒步骤方法进行蛋白定量,加入一抗,二抗孵育,洗涤,最后进行半定量分析。

[0051] 4.3 PCR检测肠道瘤组织中PI3K、AKT mRNA表达(见图5~图8,表3)

[0052] 上下游引物序列由上海基尔顿公司设计(见表2)。按照试剂盒说明书步骤进行。

[0053] 表2小鼠上、下游引物

基因	mRNA 序列	引物序列	产物/bp
Genes	mRNA_ID	Forward primer;Reverse primer	Product size
PI3k	NM_001024955.2	上游: 5' ACACCACGGTTTGGACTATGG 3' (SEQ ID NO. 1) 下游: 5' GGCTACAGTAGTGGGCTTGG 3' (SEQ ID NO. 2)	140
AKT	NM_001165894.1	上游: 5' ATGAACGACGTAGCCATTGTG 3' (SEQ ID NO. 3) 下游 5' TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT 3' (SEQ ID NO. 4)	116
GAPDH	NM_001289726.1	上游 5' CTGCCAGAACATCATCC 3' (SEQ ID NO. 5) 下游: 5' CTCAGATGCCTGCTTCAC 3' (SEQ ID NO. 6)	197

[0055] 表3各组肠道瘤组织中PI3K、AKT表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	A	B	C	D	E	F
PI3K	0.16±0.02*	0.09±0.02*	0.10±0.02*	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
AKT	0.06±0.01*	0.03±0.01*	0.03±0.01*	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01

[0057] 注:与A组(模型组)比较,p<0.05;与E组(扶正健脾方+5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组)比较,*p<0.05。

[0058] 4.4回肠上皮损伤指数评定(见图9,表4)

[0059] 根据Chiu氏6级评分法通过测定回肠上皮损伤指数,评定回肠粘膜损伤的程度:0级为正常;1级为绒毛顶端上皮间隙增宽;2级为绒毛顶端上皮间隙进一步扩大,绒毛尖端上皮抬高与固有膜剥离;3级为绒毛上皮成块脱落;4级为上皮完全脱落,仅有固有膜;5级为固有层崩解,出现出血和溃疡。并利用显微镜标尺对回肠肠绒毛长度、宽度及隐窝深度进行测量,每张切片由3名病理科医生随机观察10个视野,取其平均值,在显微镜下读片并拍摄照片。

[0060] 表4各组裸鼠回肠上皮比较 $\bar{x} \pm s$

	组别	n	回肠上皮损伤指数	绒毛长度 (μm)	绒毛宽度 (μm)	隐窝深度 (μm)
	A	8	4 \pm 0.93	139.72 \pm 39.45	40.82 \pm 10.49	76.63 \pm 22.40
	B	8	2.88 \pm 0.64#	182.54 \pm 27.73	53.47 \pm 9.90	115.55 \pm 31.27
[0061]	C	8	3.13 \pm 0.84#	145.69 \pm 23.11	51.00 \pm 10.43	98.36 \pm 24.50
	D	8	2.5 \pm 0.54#	159.36 \pm 23.67	53.73 \pm 5.22	96.60 \pm 19.26
	E	8	1.63 \pm 0.52#	182.24 \pm 16.65	47.47 \pm 8.91	113.73 \pm 23.67
	F	8	2 \pm 0.54#●	185.05 \pm 35.04	55.76 \pm 9.89	103.27 \pm 23.76

[0062] 注:与A组(模型组)比较,# $p < 0.05$;与E组比较,• $p > 0.05$;

[0063] 4.5肺转移数和肝转移(见图10)

[0064] 肺脏、肝脏组织常规脱水,石蜡包埋,切片HE染色后行组织病理学检查。采用多点取材切片法计算肺转移数及肝脏转移数(每例组织取10点)。

[0065] 5.统计学处理:

[0066] 统计分析软件使用SPSS20.0。计量资料若符合正态分布且方差齐则数据以 \pm 计表示,组间比较采用方差分析,重复测量资料采用重复测量设计的方差分析;不符合正态分布、方差不齐用非参数检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0067] 6.讨论:

[0068] 该方能抑制肿瘤细胞增殖,减少肠道炎症细胞因子表达,减轻化疗药所致肠道损伤,联合化疗能有效控制瘤体大小,有效降低PI3K、AKT的表达。证实该方保护肠道屏障、调节肠道肿瘤微环境中PI3K/AKT表达抑制转移。

[0069] 实施例2本发明与肠益煎方疗效比较

[0070] 1.动物:4~5周龄BALB/c裸鼠20只,体质量20~24g,购自中科院上海斯莱克实验动物有限公司,SPF级环境下饲养,实验动物合格证号:SYXK(沪)2014-0008。

[0071] 2.方法:

[0072] 2.1细胞培养及皮下移植瘤

[0073] 方法同动物实验1

[0074] 2.2小鼠结肠癌皮下移植高转移模型的筛选[《小鼠结肠癌高转移模型体内筛选和建立》]

[0075] 方法同动物实验1

[0076] 2.3皮下移植瘤原位接种

[0077] 方法同动物实验1

[0078] 2.4分组及给药方法

[0079] 原位接种后24h(第16天)将裸鼠按照体重分为A组(中药方+5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组)、B组(肠益煎+5-氟尿嘧啶+奥沙利铂组),每组10只,分笼饲养,每笼5只,自由饮食。肠益煎处方组成:党参10份,茯苓15份,白术10份,土茯苓15份,菝葜15份,八月扎12份,鸡内金12份,陈皮9份。

[0080] A、B组:隔天给予奥沙利铂6.6mg/kg的剂量腹腔注射,隔天给予5-氟尿嘧啶25mg/

kg的剂量腹腔注射,共予5次用药。AB组两组分别给与中药方和肠益煎灌胃处理。第39天仅提供水禁食。第40天推椎处死,解剖取肠道肿瘤组织。

[0081] 3.结果

[0082] 3.1各组裸鼠体重和肠道肿瘤的重量(见表5)

[0083] 表5各组裸鼠体重和肠道肿瘤的重量比较 $\bar{x} \pm s$

	组别	n	裸鼠体重 (g)	肠道肿瘤重量 (g)
[0084]	A	10	26.34±0.81#	0.71±0.23#
	B	10	23.80±1.27	1.29±0.51

[0085] 注:与B组(模型组)比较,# $p < 0.05$ 。

[0086] 该方与肠益煎方比较,小鼠的体重及去瘤体重均高于肠益煎组,差异有统计学意义($P < 0.05$),小鼠瘤重比较,模型组高于A组($P < 0.05$)。提示该方可调节荷瘤动物免疫功能,在提高小鼠体重、抑制瘤体方面的疗效优于肠益煎方。

[0087] 实施例3临床试验研究

[0088] 1.病例选择:

[0089] 选择2017年06月-2018年03月期间,在上海交通大学附属新华医院诊断为大肠癌的住院期间的患者,以及我院(上海中医药大学附属上海市中西医结合医院)诊断为大肠癌的患者,共60例,所有患者此期间均进行化学治疗。

[0090] 西医诊断依据中国临床肿瘤学会《CSCO结直肠癌诊疗指南》(2016版)中的诊断标准作出。TNM病理分期(pTNM)采用AJCC/UICC第7版[8],详细参见“2.4结直肠癌的分期”。

[0091] 中医证型由科室主治医师以上资格的研究者依据《中药治疗脾虚证的临床研究指导原则》[9]诊断是否符合脾虚证诊断标准,或由两名医师分别辨证结论相同。临床表现中需具备大于或至少有2个脾虚主症,或者满足1个脾虚主症伴有2个脾虚次症,其中舌脉必须符合脾虚诊断标准。

[0092] 1.1病例纳入标准

[0093] (1)符合大肠癌术后的诊断标准,病理学检查已明确诊断为III、IV期;

[0094] (2)术后有辅助化疗指征;

[0095] (3)年龄18-75岁,男女不限;

[0096] (4)KPS评分 ≥ 60 分,预计生存期 ≥ 3 个月;

[0097] (5)符合脾虚证的诊断标准。

[0098] (6)接受本临床试验者。

[0099] 1.2排除标准:

[0100] (1)不符合上述纳入标准者。

[0101] (2)有严重的心脑血管等原发疾病,或有精神疾病者;

[0102] (3)患有其他严重合并症,如胰腺炎、烧伤、创伤等;

[0103] (4)入组前1月有抗生素使用史;

[0104] (5)除所患癌症外,患有或合并其他肠道疾病者,如肠炎、肠梗阻等;

[0105] (6) 研究中认为有任何不适宜入选的情况。

[0106] 3. 服药方法:

[0107] 将符合纳入标准的60例中晚期大肠癌行化疗的患者随机分为治疗组30例和对照组30例, 治疗组予本药物制剂联合化疗, 对照组予单纯化疗治疗。所有患者均进行2个疗程以上化疗。

[0108] 化疗方案包括结直肠癌临床常用化疗方案, 均按照患者个人情况依据NCCN指南制定化疗方案。21天为1个疗程, 连续使用2个疗程以上。

[0109] 治疗组同时口服本药物制剂, 每天2次, 每次1包。21天为一疗程, 共服用两个疗程。

4. 评价指标: 中医症状积分以及KPS评分, 化疗毒副反应, 同时分别采取两组患者治疗前后外周血清一份, 采用ELISA法检测两组患者外周血肠道屏障功能, 包括机械肠道屏障指标: DAO、D-LA、IFABP、ET; 免疫肠道屏障指标, sIgA、IL-2、TNF- β 、TGF- β 、IFN- γ 。

[0110] 4.1 中医证候积分

[0111] 临床证候疗效判定标准。

[0112] 显效: 治疗后临床证候总积分值比治疗前下降 $\geq 70\%$;

[0113] 有效: 治疗后临床证候总积分值比治疗前下降 $< 70\%$ 而 $\geq 30\%$;

[0114] 无效: 治疗后临床证候总积分值比治疗前下降 $< 30\%$ 。

[0115] 注: 计算公式为: $[(\text{治疗前积分} - \text{治疗后积分}) \div \text{治疗前积分}] \times 100\%$ 。

[0116] 4.2 生活质量

[0117] 4.2.1 行为状况KPS评分: 入组前及入组后参照KPS评分量表分别记录一次KPS评分。

[0118] 表6 KPS评分量表

100 分	一切正常, 无不适或病症
90 分	能进行正常活动, 有轻微病症
80 分	勉强可以进行正常活动, 有一些症状或体征
70 分	生活可以自理, 但不能维持正常活动或重的工作
60 分	生活能大部分自理, 但偶尔需要别人帮助
[0119] 50 分	需要别人更多的帮助, 并经常需要医疗护理
40 分	失去生活能力; 需住院特别照顾和帮助
30 分	严重失去生活能力, 需住院, 但暂时无死亡威胁
20 分	病重, 需要住院和积极的支持治疗
10 分	垂危
0 分	死亡

[0120] 卡氏评分疗效评价标准如下：

[0121] 提高：治疗后较治疗前积分值增加 ≥ 10 分；

[0122] 稳定：治疗后较治疗前评分增加或减少不到10分；

[0123] 下降：治疗后较治疗前评分减少 ≥ 10 分。

[0124] 4.2.2QLQ-C30各领域的计分方法(粗分RS)：参照邱彩峰、赵继军《QLQ-C30的应用及计分方法》把QLQ-C30量表分为15个领域，计算各领域分值：

[0125] 表7 QLQ-C30统计量表

领域(维度)	内容	性质	条目数	得分全距 R	计分方法
[0126] 躯体功能 PF	身体活动情：提物、步行、卧床天数及基本生活自理情况	功能型	5	3	$(Q1+Q2+Q3+Q4+Q5)/5$
角色功能 RF	日常活动、工作及爱好的进行是否受到限制	功能型	2	3	$(Q6+Q7)/2$
情绪功能 EF	紧张、担心、情绪控制能力	功能型	4	3	$(Q21+Q22+Q23+Q24)/4$
认知功能 CF	记事是否困难，及能否集中精神做事	功能型	2	3	$(Q20+Q25)/2$
社会功能 SF	家庭生活、社交活动有无受到妨碍	功能型	2	3	$(Q26+Q27)/2$
总健康状况 QL	自我评价总体健康状况和总体生活质量		2	6	$(Q29+Q30)/2$
[0127] 疲倦 FA	疲劳	症状型	3	3	$(Q10+Q12+Q18)/3$
恶心与呕吐 NV	恶心呕吐	症状型	2	3	$(Q14+Q15)/2$
疼痛 PA	疼痛	症状型	2	3	$(Q9+Q19)/2$
气促 DY	上气不接下气	症状型	1	3	Q8
失眠 SL	睡眠紊乱	症状型	1	3	Q11
食欲丧失 AP	食欲下降	症状型	1	3	Q13
便秘 CO	便秘	症状型	1	3	Q16
腹泻 DI	腹泻	症状型	1	3	Q17
经济困难 FI	疾病和治疗对患者经济造成的影响	症状型	1	3	Q28

[0128] 标准化得分(standard score,ss)：在QLQ-C30量表中，除条目29,30外均为逆向条目(取值越大，生命质量越差)。计分规则中明确规定对于功能领域和总体健康状况领域得分越高说明功能状况和生命质量越好；对于症状领域得分越高表明症状或问题越多(生命质量越差)。因此，计算功能领域的标化分时还要改变方向。按下式计算(式中R为各领域或条目的得分全距)。

- [0129] 功能领域: $SS = [1 - (RS - 1) / R] * 100$
- [0130] 症状领域和总体健康状况领域: $SS = [(RS - 1) / R] * 100$
- [0131] QLQ-C30评分疗效评价标准:
- [0132] 显效: 治疗后较治疗前积分值增加 ≥ 20 分;
- [0133] 有效: 治疗后较治疗前评分增加大于10分小于20分;
- [0134] 无变化: 治疗后较治疗前评分增加或减少10分。
- [0135] 恶化: 治疗后较治疗前评分减少 ≥ 10 分
- [0136] 4.3化疗毒副反应: 每次化疗前后予查血常规、肝肾功能, 根据实际需要增加检查次数。
- [0137] 根据WHO抗肿瘤药急性及亚急性毒性反应分度标准进行判定, 分为0、I、II、III、IV度, 化疗过程中如出现II度以上骨髓抑制, 即予相应集落细胞刺激因子治疗。
- [0138] 表8抗肿瘤药急性及亚急性毒性反应分度标准 (WHO)

项目	0度	I度	II度	III度	IV度
白细胞 ($\times 10^9/L$)	≥ 4.0	3.0-3.9	2.0-2.9	1.0-1.9	< 1.0
中性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	≥ 2.0	1.5-1.9	1.0-1.4	0.5-0.9	< 0.5
血红蛋白 (g/L)	≥ 110	95-109	80-94	65-79	< 65
血小板 ($\times 10^9/L$)	≥ 100	75-99	50-74	25-49	< 25
谷丙转氨酶	$\leq 1.25 \times N$	1.26-2.5 $\times N$	2.6-5 $\times N$	5.1-10 $\times N$	$> 10 \times N$
谷草转氨酶	$\leq 1.25 \times N$	1.26-2.5 $\times N$	2.6-5 $\times N$	5.1-10 $\times N$	$> 10 \times N$
尿素氮	$\leq 1.25 \times N$	1.26-2.5 $\times N$	2.6-5 $\times N$	5.1-10 $\times N$	$> 10 \times N$
肌酐	$\leq 1.25 \times N$	1.26-2.5 $\times N$	2.6-5 $\times N$	5.1-10 $\times N$	$> 10 \times N$
消化道反应	无	恶心	呕吐, 可控 制	频繁呕吐, 需治疗	频繁呕吐, 难以控制

- [0140] 注: N: 正常值
- [0141] 4.4肠道屏障功能: 所有入组患者治疗前及观察结束后予测肠道屏障功能并记录。
- [0142] 包括机械肠道屏障指标: DAO、D-LA、IFABP、ET; 免疫肠道屏障指标: sIgA)、IL-2、TNF- β 、TGF- β 、IFN- γ 。以上所有指标在上海中医药大学科技实验中心进行Elisa检测。
- [0143] 5. 统计分析
- [0144] 使用SPSS 22.0软件进行统计, 计量资料首先采用正态性检验, 如果符合正态分布

的计量资料则使用t检验的统计方法进行双侧检验;不符合正态分布的计量资料、等级资料采用秩和检验的统计方法进行双侧检验。 $p < 0.05$ 或者 $p < 0.001$ 则认为差异有统计学意义。

[0145] 6.结果显示:

[0146] 6.1 60例患者治疗前后中医症候积分比较(见表9)

[0147] 表9两组病例治疗后中医症状临床疗效比较 单位:例(%)

	组别	例数	显效	有效	无效	总有效率%	P
[0148]	治疗组	30	5 (16.7%)	16 (53.3%)	9 (30%)	70	0.000
	对照组	30	2 (6.7%)	4 (13.3%)	24 (80.0%)	20.0	

[0149] 注:经Mann-Whitney U检验, $Z = -4.178$, $P < 0.001$,差异有统计学意义

[0150] 6.2对照组与治疗组生活质量比较

[0151] 6.2.1对照组与治疗组治疗前后KPS评分比较(见表10)

[0152] 表10两组病例生活质量比较 单位:例(%)

	组别	例数	提高	稳定	下降	总有效率%	P
[0153]	治疗组	30	18 (60%)	10 (33.33%)	2 (6.70%)	93.33	0.004
	对照组	30	7 (23.30%)	17 (56.70%)	6 (20%)	80.00	

[0154] 注:经Mann-Whitney U检验, $Z = -2.881$, $P < 0.05$,差异有统计学意义

[0155] 6.2.2对照组与治疗组治疗前后QLQ-C30评分比较

[0156] 6.2.2.1对照组与治疗组患者生活功能比较(见表11)

[0157] 表11两组病例治疗前后QLQ-30评分疗效比较

症状	组别	显效	有效	无效	恶化	总有效率%	P
躯体功能	治疗组	7	10	9	4	56.67	0.047
	对照组	2	8	13	7	33.33	
角色功能	治疗组	2	12	13	3	46.67	0.320
	对照组	3	13	10	4	53.33	
情绪功能	治疗组	7	8	10	5	50.00	0.140
	对照组	3	6	13	8	30.00	
认知功能	治疗组	3	6	15	6	30.00	0.114
	对照组	3	5	16	6	26.67	
社会功能	治疗组	3	8	12	7	36.67	0.448
	对照组	4	7	10	9	36.67	
总健康状况	治疗组	6	12	10	2	60.00	0.026
	对照组	4	13	11	2	56.67	
疲倦	治疗组	8	10	9	3	60.00	0.002
	对照组	3	4	10	13	23.33	
恶心与呕吐	治疗组	3	5	15	7	26.67	0.001
	对照组	1	2	10	17	10.00	
疼痛	治疗组	3	4	15	8	23.33	0.806
	对照组	4	5	15	6	30.00	
气促	治疗组	5	4	12	9	30.00	0.196
	对照组	4	6	14	6	33.33	
失眠	治疗组	4	7	12	7	36.67	0.558
	对照组	3	5	12	10	26.67	
食欲丧失	治疗组	8	10	10	2	60.00	0.166
	对照组	3	3	8	16	20.00	
便秘	治疗组	4	8	12	6	40.00	0.308
	对照组	5	7	14	4	40.00	
腹泻	治疗组	8	11	6	5	63.33	0.039
	对照组	2	7	13	8	30.00	
经济困难	治疗组	6	8	11	5	46.67	0.405
	对照组	6	6	12	6	40.00	

[0160] 注:经Mann-Whitney U检验,两组比较,* $P < 0.05$,差异有统计学意义。

[0161] 在症状领域和气促、失眠、食欲丧失、便秘、腹泻方面,治疗组的疲倦、疼痛、气促、失眠、食欲丧失、便秘、腹泻分值治疗后较治疗前均降低,恶心与呕吐前后无变化,其中疲倦和食欲丧失与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),疲倦、恶心与呕吐、食欲丧失和腹泻与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$)。对照组的疼痛、便秘分值治疗后较治疗前降低,而疲倦、恶心与呕吐、气促、失眠、食欲丧失、腹泻评分均较前升高,其中疲倦、恶心与呕吐和腹泻分值较治疗前差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示该方可以改善化疗引起的疲倦、恶心与

呕吐、气促、失眠、食欲丧失、腹泻症状,其中对疲倦、恶心与呕吐、食欲丧失和腹泻的改善作用尤为明显。

[0162] 6.3对照组与治疗组化疗毒副反应比较(见表12)

[0163] 表12两组病例化疗前血常规、肝肾功能指标比较(单位:例)

不良反应	组别	0	I	II	III	IV	P
白细胞	治疗组	24	5	1	0	0	0.141
	对照组	19	8	3	0	0	
中性粒细胞	治疗组	27	1	1	1	0	0.005
	对照组	17	6	3	4	0	
血红蛋白	治疗组	15	10	4	1	0	0.026
	对照组	23	6	0	1	0	
血小板	治疗组	30	0	0	0	0	0.078
	对照组	27	2	1	0	0	
谷丙转氨酶	治疗组	28	1	1	0	0	0.655
	对照组	27	2	1	0	0	
谷草转氨酶	治疗组	27	3	0	0	0	0.690
	对照组	26	4	0	0	0	
肌酐	治疗组	29	1	0	0	0	0.317
	对照组	30	0	0	0	0	
尿素氮	治疗组	28	2	0	0	0	1.000
	对照组	28	2	0	0	0	
恶心呕吐	治疗组	20	8	2	0	0	0.028
	对照组	13	8	8	1	0	
腹泻	治疗组	22	6	2	0	0	0.025
	对照组	15	5	8	2	0	

[0166] 注:经Mann-Whitney U检验,白细胞: $Z = -1.472, P = 0.141$;中性粒细胞: $Z = -2.817, P = 0.005$;血红蛋白: $Z = -2.220, P = 0.026$;血小板: $Z = -1.762, P = 0.078$;谷草转氨酶: $Z = -0.399, P = 0.690$;谷丙转氨酶: $Z = -0.447, P = 0.655$;肌酐: $Z = -1, P = 0.317$;尿素氮: $Z = 0, P = 1.000$;恶心呕吐: $Z = -2.201, P = 0.028$;腹泻: $Z = -2.246, P = 0.025$ 。 $P < 0.05$, 差异有统计学意义

[0167] 经统计学分析,两组在中性粒细胞、血红蛋白、恶心呕吐和腹泻方面差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示该方安全性良好,能够改善化疗引起的中性粒细胞和血红蛋白的降低,且能改善化疗导致的恶心呕吐、腹泻的消化道毒副反应。

[0168] 6.4两组患者治疗前后外周血清指标比较

[0169] 6.4.1肠道机械屏障功能(见表13)

[0170] 表13治疗前后两组患者DAO、D-LA、IFABP、ET血清含量($\bar{x} \pm s$)

组别		治疗组 (n=30)	对照组 (n=30)
DAO (U/ml)	治疗前	23.27±13.62	22.42±21.97
	治疗后	21.96±17.54	29.76±49.09
D-LA(umol/L)	治疗前	84.00±176.54	83.91±56.83
	治疗后	43.93±44.03*#	100.03 ±110.26△
IFABP(pg/ml)	治疗前	1169.36±859.34	1104.47±1192.09
	治疗后	949.29±918.34	1247.22±2165.06
ET(pg/ml)	治疗前	13.54±11.00	11.72±13.19
	治疗后	10.91±10.00	15.77±25.45

[0172] 注：(1) 治疗组与对照组比较：经独立t检验分析，与对照组比较，* $P < 0.001$ ，差异有统计学意义；(2) 治疗前后比较：经配对样本t检验，与治疗前比较，# $P < 0.001$ ， $\Delta P < 0.05$ ，差异均有统计学意义。

[0173] 治疗组和对照组相比，D-LA明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

[0174] 治疗组治疗前后对比，D-LA治疗后与治疗前对比显著降低，前后差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$)，DAO、IFABP、ET治疗后比治疗前均升高，但无统计学意义 ($p > 0.05$)。

[0175] 对照组治疗前后对比，DAO、D-LA、IFABP、ET均较治疗前升高，其中D-LA值治疗前后有统计学差异 ($P < 0.05$)。

[0176] 6.4.2 肠道免疫屏障功能 (见表14)

[0177] 表14治疗前后两组患者sIgA、IL-2、TNF- β 、TGF- β 、IFN- γ 血清含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别		治疗组 (n=30)	对照组 (n=30)
sIgA (ug/ml)	治疗前	66.77±57.04	49.78±57.38
	治疗后	118.02±407.61	62.34±106.95
IL-2(pg/ml)	治疗前	9.97±7.58	8.24±9.45
	治疗后	13.00±17.36	11.26±17.90
TNF- β (pg/ml)	治疗前	237.42±173.96	231.79±228.61
	治疗后	208.77±182.18	271.74±384.46
TGF- β (pg/ml)	治疗前	2833.83±2094.77	2846.22±2832.71
	治疗后	2707.96±2536.51	3677.67±5745.53
IFN- γ (pg/ml)	治疗前	215.04±281.21	183.91±56.83
	治疗后	196.49±340.95	154.26±238.26

[0179] 注：(1) 治疗组与对照组：经独立t检验分析，与对照组比较， $P > 0.05$ ，差异无统计学意义；(2) 治疗前后比较：经配对样本t检验，治疗后与治疗前比较， $P > 0.05$ ，差异无统计学意义。

[0180] 治疗组和对照组相比，治疗后sIgA、IL-2、IFN- γ 呈升高趋势，TNF- β 、TGF- β 血清含

量呈降低趋势,但对比均无统计学意义($P>0.05$)。

[0181] 治疗组治疗前后相比,sIgA、IL-2呈升高趋势,前后差异无显著统计学意义($p>0.05$),TNF- β 、TGF- β 、IFN- γ 治疗后均呈降低趋势,但无统计学意义($p>0.05$)。

[0182] 对照组治疗前后相比,IFN- γ 呈降低趋势,sIgA、IL-2、TNF- β 、TGF- β 呈升高趋势,其中sIgA指标升高趋势不如治疗组明显,对照组治疗前后所有指标对比均无统计学差异($P>0.05$)。

[0183] 7. 结论:

[0184] 化疗之后会引起中晚期大肠癌脾虚证患者血清的D-LA含量明显升高,降低sIgA、IL-2、IFN- γ 血清含量,而该方能够明显下调D-LA含量,升高sIgA、IL-2、IFN- γ 指标。提示本方能够对化疗导致的肠道粘膜通透性增加及肠道炎性反应有产生一定抑制作用,改善肠道机械屏障功能,同时在肠道中发挥免疫保护作用,提高肠道免疫屏障功能。本药物制剂联合化疗治疗能改善患者中医症候积分;本药物制剂联合化疗能提高患者行为状况KPS评分;通过对比两组患者QLQ-C30量表各项指标发现,在患者生活功能各项指标中本药物制剂干预结直肠癌化疗患者可以改善患者的躯体功能,提高患者的角色功能,缓解患者不良情绪,改善化疗引起的疲倦、恶心与呕吐、气促、失眠、食欲丧失、腹泻症状,其中对疲倦、恶心与呕吐、食欲丧失和腹泻的改善作用尤为明显。提高患者总体健康状况;本药物制剂联合化疗在结直肠癌术后患者使用中不会增加化疗毒副反应,安全性良好,对化疗患者的经济负担无明显影响,与单纯化疗相当。

[0185] 制备实施例

[0186] 以下通过实施例来进一步阐述本发明的中药复方制剂的制备方法。

[0187] 本发明的中药复方颗粒剂制备

[0188] (1) 称取黄芪30g,党参10g,茯苓10g,白术10g,土茯苓10g,菝葜10g,八月札10g,鸡内金5g,藤梨根10g,备用;(2) 取上述各中药原料药的一半量(黄芪15g、党参5g、茯苓5g、白术5g、土茯苓5g、菝葜5g、八月札5g、鸡内金2.5g、藤梨根5g),加水8倍量,浸泡半小时后,煎煮45分钟,再加水8倍量,煎煮30分钟,过滤、合并煎煮液,减压浓缩,减压干燥得干浸膏,粉碎成浸膏细粉(过80目)。

[0189] (3) 取上述各中药原料药的另一半量(黄芪15g、党参5g、茯苓5g、白术5g、土茯苓5g、菝葜5g、八月札5g、鸡内金2.5g、藤梨根5g),粉碎过80目,用Co60灭菌(辐照剂量8k),与浸膏细粉混和,加入甘露醇,乳糖,蔗糖粉,阿斯巴甜,薄荷脑,混合均匀后用70%乙醇粘合制成本发明的中药复方制剂颗粒剂。

[0190] 本发明的中药复方片剂制备

[0191] (1) 称取黄芪45g,党参30g,茯苓20g,白术20g,土茯苓15g,菝葜30g,八月札20g,鸡内金20g,藤梨根30g,备用;

[0192] (2) 取上述各中药原料药的一半量(即黄芪22.5g、党参15g、茯苓10g、白术10g、土茯苓7.5g、菝葜15g、八月札10g、鸡内金10g、藤梨根15g),加水5倍量,浸泡半小时后,煎煮45分钟,再加水3倍量,煎煮30分钟,过滤、合并煎煮液,减压浓缩,减压干燥得干浸膏,粉碎成浸膏细粉(过80目)。

[0193] (3) 取上述各中药原料药的另一半量(黄芪22.5g、党参15g、茯苓10g、白术10g、土茯苓7.5g、菝葜15g、八月札10g、鸡内金10g、藤梨根15g),粉碎过80目,用Co60灭菌(辐照剂

量8k),与浸膏细粉混和,加入甘露醇,乳糖,蔗糖粉,阿斯巴甜,薄荷脑,混合均匀后用70%乙醇粘合,干燥,加入硬脂酸镁适量,混匀,压制成本发明的中药复方片剂。

[0194] 本发明的中药复方胶囊剂的制备

[0195] (1)称取黄芪30g,党参20g,茯苓15g,白术15g,土茯苓10g,菝葜15g,八月札15g,鸡内金12g,藤梨根15g,备用;

[0196] (2)取上述各中药原料药的一半量(即黄芪15g、党参10g、茯苓7.5g、白术7.5g、土茯苓5g、菝葜7.5g、八月札7.5g、鸡内金6g、藤梨根7.5g),加水3倍量,浸泡半小时后,煎煮45分钟,再加水8倍量,煎煮30分钟,过滤、合并煎煮液,减压浓缩,减压干燥得干浸膏,粉碎成浸膏细粉(过80目)。

[0197] (3)取上述各中药原料药的另一半量(即黄芪15g、党参10g、茯苓7.5g、白术7.5g、土茯苓5g、菝葜7.5g、八月札7.5g、鸡内金6g、藤梨根7.5g),粉碎过80目,用Co60灭菌(辐照剂量8k),与浸膏细粉混和,加入甘露醇,乳糖,蔗糖粉,阿斯巴甜,薄荷脑,混合均匀后用70%乙醇粘合,干燥,粉碎,加入淀粉适量,混匀,装入胶囊,制成硬胶囊剂。

[0198] 本领域的普通技术人员可以理解,上述各实施方式是实现本发明的具体实施例,而在实际应用中,可以在形式上和细节上对其作各种改变,而不偏离本发明的精神和范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海市中西医结合医院
- [0003] <120> 一种调节肠道屏障功能的中药复方制剂及其制备方法
- [0004] <130> JSP11821948
- [0005] <160> 6
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] acaccacggt ttggactatg g 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] ggctacagta gtgggcttgg 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] atgaacgacg tagccattgt g 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 22
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] ttgtagccaa taaaggtgcc at 22
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 18
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] ctgcccagaa catcatcc 18
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 18

-
- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0041] <400> 6
[0042] ctcagatgcc tgcttcac 18

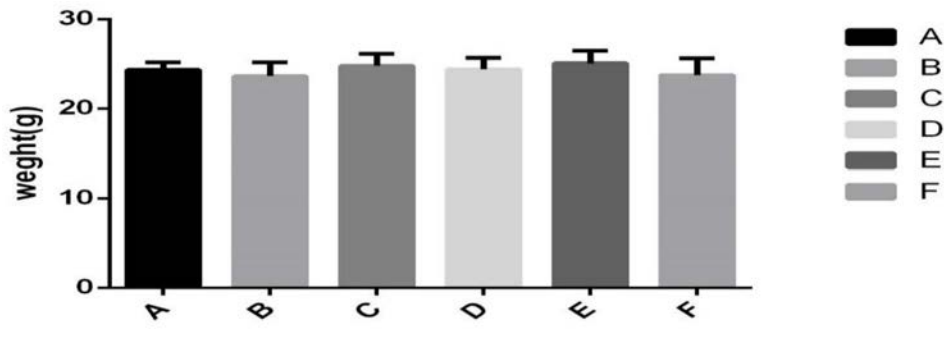


图1

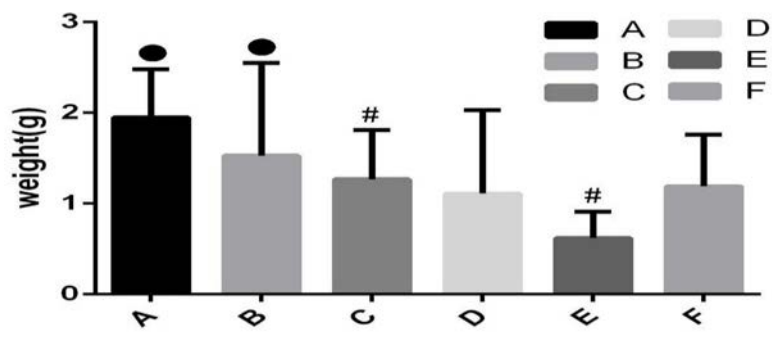


图2

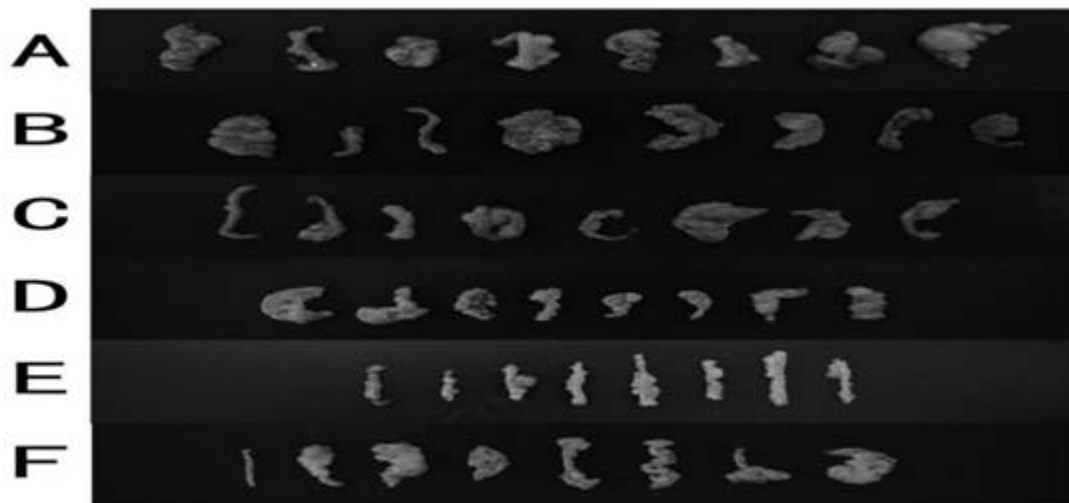


图3

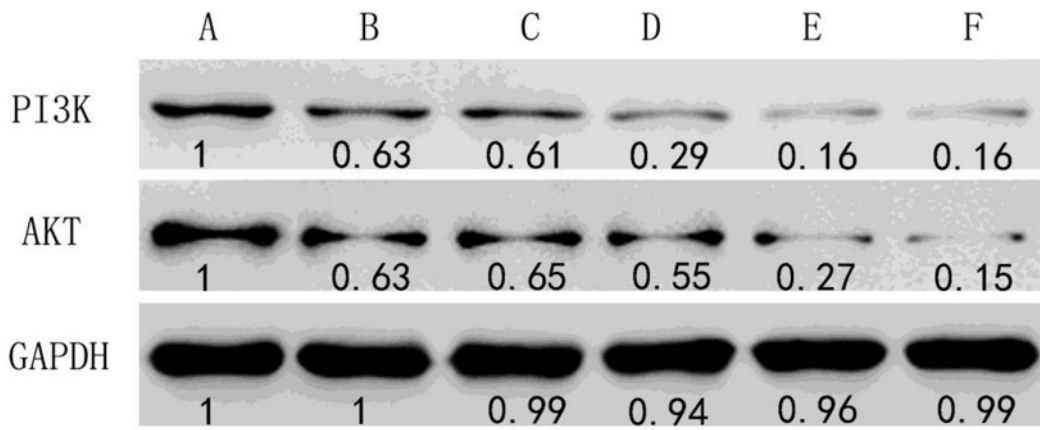


图4

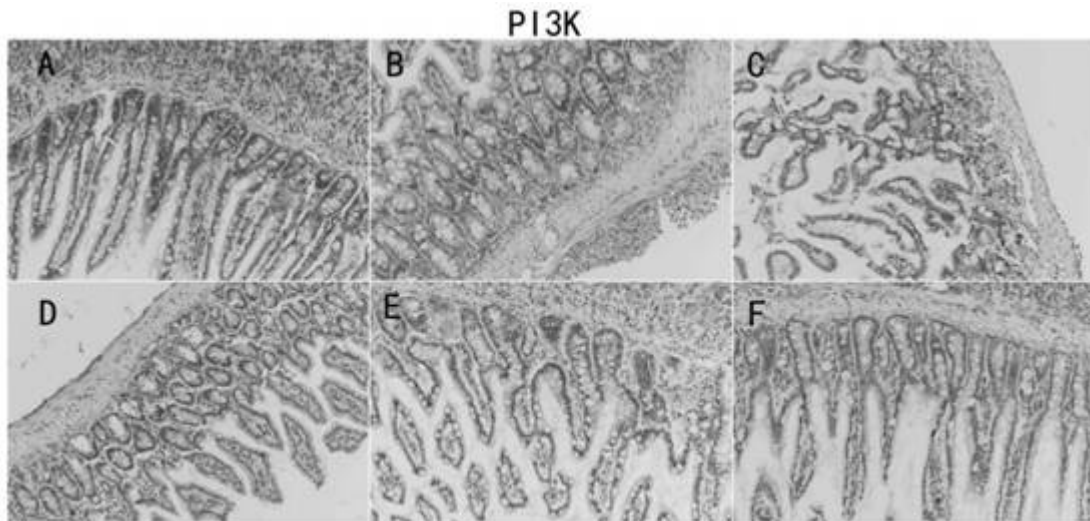


图5

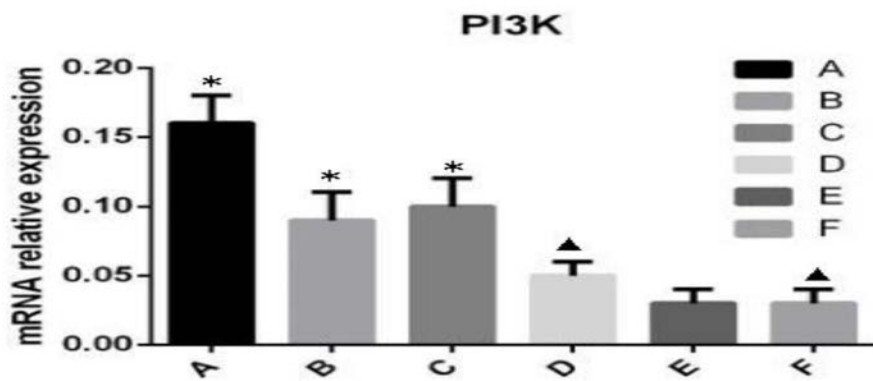


图6

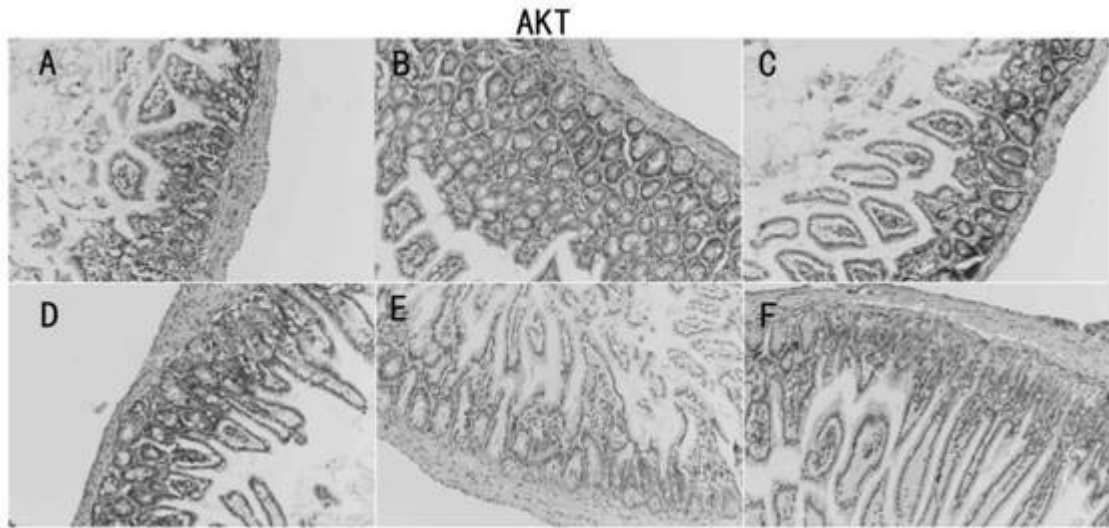


图7

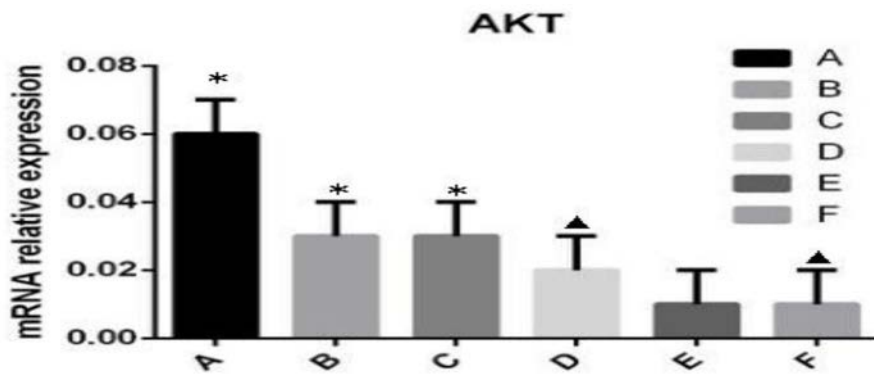


图8

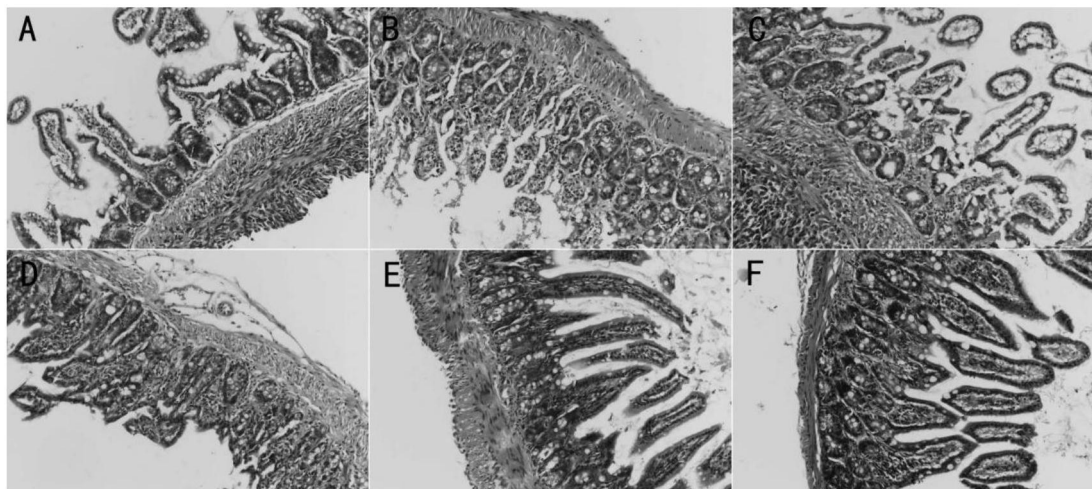


图9

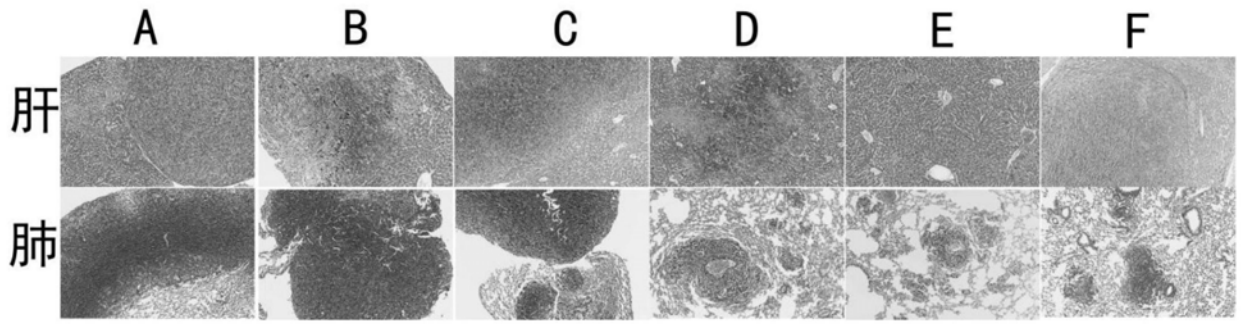


图10