

## 海洋鱼低聚肽螯合铁的小肠吸收特性研究

泮雯霏<sup>1</sup>, 应晓玲<sup>1</sup>, 马倩<sup>2</sup>, 徐玉英<sup>1</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 杨敏<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学医学院公共卫生系 杭州 310000

<sup>2</sup> 浙江大学化学系 杭州 310000)

**摘要** 目的:探究海洋鱼低聚肽螯合铁(MCOP-Fe)的小肠吸收特性,并与传统补铁剂硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub>)进行比较。方法:建立体外大鼠外翻肠囊模型,选取雌性 Sprague Dawley 大鼠 40 只,随机分为 8 组【低、中、高剂量(3,5,10 μg/mL)MCOP-Fe 组;低、中、高(3,5,10 μg/mL)FeSO<sub>4</sub> 组;10 μg/mL MCOP-Fe+500 μg/mL 植酸组;10 μg/mL FeSO<sub>4</sub>+500 μg/mL 植酸组】,用肠道单位面积铁累计吸收率 Q 评价不同肠段吸收铁的效力。结果:1)中、低、高浓度 MCOP-Fe 组在十二指肠、空肠及回肠的 Q 值随浓度呈现梯度增加,而 FeSO<sub>4</sub> 组没有类似的趋势;2)中、低浓度 FeSO<sub>4</sub> 组的 Q 值几乎都有高于 MCOP-Fe 组的趋势,而在高浓度时相反;3)添加 500 μg/mL 植酸后,高浓度 MCOP-Fe 组和 FeSO<sub>4</sub> 组 Q 值均有下降,高浓度 FeSO<sub>4</sub> 组下降更为显著(P<0.05)。结论:在 3~10 μg/mL 剂量范围内,FeSO<sub>4</sub> 的小肠吸收率呈现饱和的平衡趋势,而 MCOP-Fe 呈现梯度上升的趋势;同时 MCOP-Fe 受植酸的抑制作用小,相对 FeSO<sub>4</sub> 更加稳定,应用前景良好。

**关键词** 外翻肠囊法; 海洋鱼; 低聚肽螯合铁; 小肠吸收; 铁缺乏

**文章编号** 1009-7848(2023)04-0106-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.011

铁缺乏是最普遍的营养缺乏症,在世界范围内造成了巨大的疾病负担<sup>[1]</sup>,也是贫血最主要的诱因,据 2016 年的全球疾病负担分析,全球的缺铁性贫血(Iron deficiency anemia,IDA)病例超过 20 亿<sup>[2]</sup>。控制贫血一直是全球卫生的重心,据世界卫生组织(World Health Organization,WHO)估计,有 42%的儿童和 50%的妇女贫血病例适合补充铁质。目前针对 IDA 的一线治疗方式还是口服补铁剂,其金标准依然是硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub>)<sup>[3]</sup>。然而,随着口服补铁剂的广泛使用,不良事件问题也逐渐凸显,尤其是亚铁型铁补充剂。可溶性亚铁离子更容易被肠道病原菌吸收,从而容易引发类似恶心、呕吐和腹泻等情况<sup>[4-7]</sup>;同时,其日常吸收也容易受到膳食等外界因素的影响,因此需要开发和生产新型的补铁剂。

肽-铁复合物形式添加的铁强化食品因具有良好的生物利用度、高吸收性、优异的稳定性和高安全性等优点,已经逐渐成为研究的热点<sup>[7-9]</sup>。小分子肽被认为是具有与铁形成复合物能力的有益载

体,可以很大程度地避免游离铁离子的存在,减少胃肠道反应等副作用,并可以保护铁离子少受膳食中植酸(Phytic acid,PA)等抑制剂和小肠液状况的影响,使铁离子更加稳定<sup>[10-12]</sup>。本研究选用的海洋鱼低聚肽,其主要成分为 4 个氨基酸以下的小分子肽,有研究表明 2~6 个氨基酸组成的小肽更易穿越小肠黏膜,通过寡肽转运体直接被人体吸收利用<sup>[13]</sup>,同时在消化中也能保持稳定<sup>[10]</sup>,是一种良好的螯合剂。有研究提出从鱼鳞来源的胶原肽具有钙(钙类似于铁)吸收促进作用<sup>[14]</sup>,其中源自阿拉斯加鳕鱼皮肤的螯合肽(GPAGPHGPPG)能增强 Caco-2 细胞中钙、锌和铁的转运<sup>[15]</sup>,但是这些都是单纯探究小分子肽对铁等金属离子吸收的影响。目前关于鱼皮肽螯合铁作为新型补铁剂的研究相对较少。

外翻肠囊法最早在 1954 年提出<sup>[16]</sup>,后续进行多次改进以增加肠道组织的生存能力。该方法由于操作简便,经济适用,目前作为体外试验被广泛应用于药代动力学的研究<sup>[17]</sup>。大鼠外翻肠囊模型是最常用的体外模型<sup>[18-20]</sup>,同时也广泛应用于铁吸收的相关研究。有研究者通过大鼠外翻肠囊的体外试验来探究铁消化吸收的促进及抑制物质和相关机制<sup>[21-24]</sup>,并探究影响肠道铁吸收的环境等因素,如缺氧、摄食等<sup>[25-26]</sup>。

收稿日期: 2022-04-05

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF18H260009)

第一作者: 泮雯霏,女,硕士生

通信作者: 杨敏 E-mail: ymin36@zju.edu.cn

本文采用大鼠离体外翻肠囊模型,探究海洋鱼低聚肽螯合铁 (Ferrous oligopeptide chelate from marine fish, MCOP-Fe) 在各小肠段的吸收特性,并与传统口服补铁剂硫酸亚铁进行比较,为其在食品营养和医学上的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料 改良 AIN-93G 纯化饲料(含铁量 40 mg/kg),北京科奥协力饲料有限公司;用于制备 Tyrode 液和供试液的所有无机盐如氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钠等均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司;海洋鱼低聚肽螯合铁,由中国食品发酵工业研究院有限公司制备;台盼蓝,北京索莱宝科技有限公司;混合气体(95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>),杭州民星化工科技有限公司;组织铁测试盒,南京建成生物工程中心。

1.1.2 主要仪器与设备 AB204-S 型分析天平、FE20 型精密 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;1530-00539C 型全自动酶标仪,赛默飞世尔科技公司;RH basic1 型磁力搅拌器,IKA;SH2-92A 型恒温水浴振荡锅,金坛市良友仪器有限公司;Centrifuge 5417R 型台式高速冷冻离心机,德国艾本德;DK-320S 型水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;Milli-Q 型纯水仪,默克密理博。

1.1.3 实验动物 SPF 级 Sprague Dawley 雌性大鼠(200~250 g)40 只,许可证号:SCXK(沪)2017-

0005,上海斯莱克公司。动物实验经浙江大学医学院实验动物伦理委员会批准。在浙江大学实验动物中心分笼饲养大鼠,室温(22±2)℃,相对湿度 50%~60%,明暗交替时间为 12 h:12 h。正式实验开始前,大鼠均使用 AIN-93 改良常规饲料和双蒸水适应性喂养 3 d。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验分组

1) L-MCOP-Fe 组:将 MCOP-Fe 溶于 Tyrode 液中制成 3 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

2) M-MCOP-Fe 组:将 MCOP-Fe 溶于 Tyrode 液中制成 5 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

3) H-MCOP-Fe 组:将 MCOP-Fe 溶于 Tyrode 液中制成 10 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

4) L-FeSO<sub>4</sub> 组:将 FeSO<sub>4</sub> 溶于 Tyrode 液中制成 3 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

5) M-FeSO<sub>4</sub> 组:将 FeSO<sub>4</sub> 溶于 Tyrode 液中制成 5 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

6) H-FeSO<sub>4</sub> 组:将 FeSO<sub>4</sub> 溶于 Tyrode 液中制成 10 μg/mL(以 Fe 计)的溶液;

7) H-MCOP-Fe+PA 组:将 MCOP-Fe 和植酸(PA)溶于 Tyrode 液中制成 10 μg/mL(以 Fe 计)和 500 μg/mL(以 PA)的溶液;

8) H-FeSO<sub>4</sub>+PA 组:将 FeSO<sub>4</sub> 和 PA 溶于 Tyrode 液中制成 10 μg/mL(以 Fe 计)和 500 μg/mL(以 PA)的溶液。

表 1 分组一览表

Table 1 List of groups

组别	<i>n</i>	铁剂	铁含量/ μg·mL <sup>-1</sup> (ppm)	添加剂	含量/ μg·mL <sup>-1</sup>
L-MCOP-Fe	5	海洋鱼低聚肽螯合铁	3	-	-
M-MCOP-Fe	5	海洋鱼低聚肽螯合铁	5	-	-
H-MCOP-Fe	5	海洋鱼低聚肽螯合铁	10	-	-
L-FeSO <sub>4</sub>	5	硫酸亚铁	3	-	-
M-FeSO <sub>4</sub>	5	硫酸亚铁	5	-	-
H-FeSO <sub>4</sub>	5	硫酸亚铁	10	-	-
H-MCOP-Fe+PA	5	海洋鱼低聚肽螯合铁	10	PA	500
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	5	硫酸亚铁	10	PA	500

1.2.2 Tyrode 液的制备 氯化钠 8.0 g,氯化钾 0.2 g,氯化镁 0.1 g,氯化钙 0.2 g,碳酸氢钠 1.0 g,磷酸

二氢钠 0.05 g,葡萄糖 1.0 g,加水至 1 L,用稀盐酸调 pH 7.4,放入 4 °C 冰箱备用,所有溶液均现配现

用<sup>[27]</sup>。

### 1.2.3 外翻肠囊实验

1.2.3.1 模型制作 大鼠禁食、不禁水 12 h,戊巴比妥钠麻醉,沿腹中线剪开,小心剥离肠段表面的肠系膜和脂肪,在幽门 1 cm,15 cm 和回盲瓣处分段用手术线结扎,迅速取出 10 cm 十二指肠,10 cm 空肠和 5 cm 回肠,迅速放入冰 Tyrode (4 ℃) 中,用自制带直径为 2 mm 细软管的针筒从结扎端小心翻转,形成管装肠囊,并注满 Tyrode 液,另一端用两个血管夹封口,留出 1 cm 的取样带,在冰 Tyrode(4 ℃)中迅速洗净表面的肠内容物。

1.2.3.2 样本采集 将制作完成的肠囊模型置于装有 Tyrode 液 400 mL 的烧瓶中,整个试验过程保持 37 ℃ 恒温水浴中振荡(100 r/min)孵育,浴槽中通入 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> 的混合气体。肠囊平衡 5 min 后,倒掉烧杯中 Tyrode 液,注入事先配好的供试液 400 mL,分别在 5,15,30,60 min 从肠囊内取样 800 μL,同时补足等温等体积的空白 Tyrode 液。

### 1.2.4 大鼠外翻肠囊模型稳定性及活性测定<sup>[28]</sup>

1.2.4.1 标准曲线制作 将台盼蓝溶于 Tyrode 液,制成质量浓度为 12.6,25.2,37.8,50.4,75.6,100.8,201.6 μg/mL 的溶液,用全自动酶标仪在 620 nm 波长处测定吸光度,以不同浓度的台盼蓝溶液吸光度对台盼蓝的浓度进行线性回归,考察该浓度范围的线性相关性。

1.2.4.2 稳定性测定 将台盼蓝溶于空白 Tyrode 液及供试液(10 μg/mL 海洋鱼低聚肽螯合铁或 10 μg/mL 硫酸亚铁)中制成 25.2 μg/mL 的溶液,于 37 ℃ 孵育,分别于 0,30,60,90 min 后取样,测定台盼蓝的吸光度,根据标准曲线计算台盼蓝浓度。

1.2.4.3 活性测定 将台盼蓝溶于供试液制成 100 μg/mL 的溶液,分别于 5,15,30,60,90 min 后从肠内取出 200 μL 溶液,用等温、等体积的 Tyrode 液补足,测定台盼蓝的吸光度,根据标准曲线计算台盼蓝浓度。

1.2.5 小肠单位面积累计吸收量(Q) 实验结束后,用 4 ℃ 台氏液对外翻肠囊内部洗涤 3 次,将外翻肠囊纵向切开,测量其长度和宽度,并计算面积。实验独立重复 3 次,取平均值。样品中铁含量用组织铁试剂盒测定。根据肠囊面积和肠液中铁

含量计算小肠单位面积累计吸收量 Q,计算公式:

$$\text{累计吸收量}(Q)=\frac{C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i}{A} \quad (1)$$

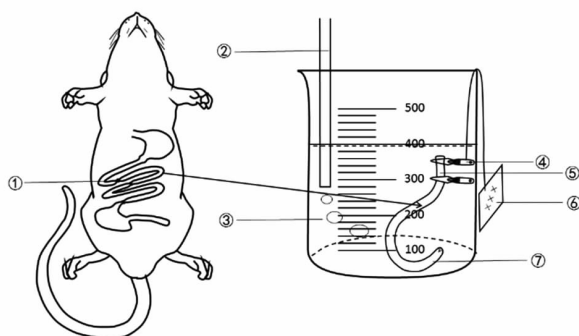
式中, $C_i$ —— $i$ 时刻肠囊中的铁含量(μg/mL); $C_n$ ——实验结束时肠囊中的铁含量(μg/mL); $A$ ——肠囊面积(cm<sup>2</sup>); $V_i$ ——每次取样的体积(μL); $V$ ——肠囊中灌液最终体积(μL)。

1.2.6 统计分析 对实验数据分组,进行 Shapiro-Wilk 正态性检验,正态分布数据以“均数±标准差”表示;非正态分布数据以中位数(四分分数间距)表示。两组比较采用独立样本  $t$  检验,多组比较采用单因素方差分析检验,组间比较采用 SNK 法。使用 R 软件(version4.2.0)进行统计分析,使用 Graphpad Prism 8 画图, $P < 0.05$  为显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 外翻肠囊的构建

将大鼠麻醉解剖,取出肠道后外翻,制成的外翻肠囊装置,结构如图 1 所示。



注:①手术线结扎处;②95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合气体;③供试液;④血管夹;⑤取样带;⑥标签;⑦外翻肠囊。

图 1 外翻肠囊装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of an everted intestinal sac

### 2.2 台盼蓝测定方法的确证

2.2.1 标准曲线 台盼蓝在 12.6~201.6 μg/mL 质量浓度范围,吸光度(A)与测定浓度(B)呈现良好的线性关系。其线性方程为: $A = 0.0223B + 0.055$ , $R^2 = 0.9995$ 。

2.2.2 台盼蓝在不同含铁溶液中的稳定性 台盼蓝在不同含铁溶液中的稳定性见图 2。台盼蓝在

空白 Tyrode 液及供试液中稳定存在,120 min 内其浓度没有显著变化 ( $P>0.05$ ),可用于后续活性检测。

### 2.3 大鼠不同小肠部位活性情况

由于各段肠道在具有活性的情况下几乎不吸收台盼蓝,肠内台盼蓝浓度极低,并不在线性范围内,因此由相应的吸光值代替浓度进行统计分析。大鼠不同小肠部位的活性情况见表 2,无论是十二指肠、空肠还是回肠,外翻的肠囊在 5~90 min 内所吸收的台盼蓝吸光度差异没有统计学意义 ( $P>0.05$ ),表明 90 min 内各个肠段的肠黏膜基本保持活性。

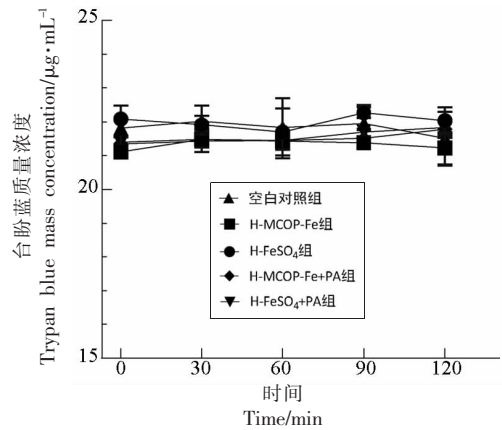


图 2 台盼蓝在不同含铁溶液中的浓度变化

Fig.2 Mass concentration variation of Trypan blue in different iron-containing solutions

表 2 大鼠不同小肠部位台盼蓝吸收情况 (吸光值)

Table 2 Trypan blue absorption in different parts of small intestine of rats (absorbance value)

组别	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min	P
<b>十二指肠</b>						
L-MCOP-Fe	0.05 ± 0.00	0.05 (0.05, 0.05)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.315
M-MCOP-Fe	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 (0.05, 0.06)	0.06 ± 0.01	0.903
H-MCOP-Fe	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.101
L-FeSO <sub>4</sub>	0.05 (0.05, 0.05)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.628
M-FeSO <sub>4</sub>	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.545
H-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.392
H-MCOP-Fe+PA	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.680
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.309
<b>空肠</b>						
L-MCOP-Fe	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.488
M-MCOP-Fe	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.734
H-MCOP-Fe	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 (0.05, 0.05)	0.270
L-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.00	0.05 (0.05, 0.05)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.764
M-FeSO <sub>4</sub>	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.469
H-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.052
H-MCOP-Fe+PA	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.508
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.05 ± 0.01	0.06 (0.06, 0.06)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.411
<b>回肠</b>						
L-MCOP-Fe	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.084
M-MCOP-Fe	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.222
H-MCOP-Fe	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.250
L-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.164
M-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.00	0.05 (0.05, 0.05)	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.266
H-FeSO <sub>4</sub>	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.455
H-MCOP-Fe+PA	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 (0.05, 0.05)	0.229
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.916

## 2.4 吸收时间对大鼠不同小肠部位铁吸收的影响

大鼠不同小肠部位铁吸收的情况随时间的变化见表3。除了H-MCOP-Fe组空肠部位在30

min后单位面积铁累计吸收率( $Q$ 值)显著增加( $P<0.05$ )外,H-MCOP-Fe组其余部位及其它组别的 $Q$ 值并未随时间的延长而增加,在60min内差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

表3 大鼠不同小肠部位铁吸收随时间变化情况( $\mu\text{g/mL}$ )

Table 3 Iron absorption in different parts of small intestine over time in rats ( $\mu\text{g/mL}$ )

组别	5 min	15 min	30 min	60 min	$P$
十二指肠					
L-MCOP-Fe	0.36 ± 0.11	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.47 ± 0.09	0.144
M-MCOP-Fe	0.41 ± 0.07	0.44 ± 0.13	0.40 ± 0.13	0.48 ± 0.10	0.673
H-MCOP-Fe	0.58 ± 0.05	0.49 ± 0.12	0.40 ± 0.10	0.49 ± 0.09	0.058
L-FeSO <sub>4</sub>	0.49 ± 0.14	0.54 ± 0.15	0.55 ± 0.09	0.54 ± 0.03	0.822
M-FeSO <sub>4</sub>	0.56 ± 0.14	0.44 ± 0.23	0.32(0.31,0.55)	0.41 ± 0.16	0.482
H-FeSO <sub>4</sub>	0.47 ± 0.11	0.47 ± 0.15	0.38 ± 0.11	0.45 ± 0.16	0.727
H-MCOP-Fe+PA	0.43 ± 0.10	0.43 ± 0.16	0.42 ± 0.18	0.42 ± 0.08	0.994
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.35 ± 0.13	0.31 ± 0.06	0.36 ± 0.13	0.36(0.35,0.36)	0.795
空肠					
L-MCOP-Fe	0.27 ± 0.12	0.32 ± 0.16	0.41 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.287
M-MCOP-Fe	0.44 ± 0.19	0.48 ± 0.11	0.42 ± 0.13	0.46 ± 0.20	0.935
H-MCOP-Fe	0.41 ± 0.09 b	0.38 ± 0.10 b	0.53 ± 0.04 a	0.58 ± 0.09 a	0.002
L-FeSO <sub>4</sub>	0.35 ± 0.09	0.38 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.43(0.27,0.44)	0.135
M-FeSO <sub>4</sub>	0.37 ± 0.09	0.47 ± 0.13	0.53 ± 0.13	0.46 ± 0.09	0.180
H-FeSO <sub>4</sub>	0.46 ± 0.20	0.40 ± 0.07	0.43 ± 0.05	0.44(0.43,0.55)	0.441
H-MCOP-Fe+PA	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.10	0.42 ± 0.08	0.39 ± 0.05	0.311
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.42(0.15,0.44)	0.31 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.42(0.36,0.44)	0.905
回肠					
L-MCOP-Fe	0.36 ± 0.21	0.33 ± 0.15	0.27 ± 0.09	0.19(0.18,0.22)	0.720
M-MCOP-Fe	0.35 ± 0.20	0.41(0.41,0.44)	0.36 ± 0.07	0.33 ± 0.09	0.956
H-MCOP-Fe	0.53 ± 0.16	0.46 ± 0.13	0.47 ± 0.12	0.52 ± 0.13	0.808
L-FeSO <sub>4</sub>	0.39 ± 0.11	0.34 ± 0.13	0.37 ± 0.11	0.49 ± 0.06	0.155
M-FeSO <sub>4</sub>	0.34 ± 0.07	0.38 ± 0.04	0.32 ± 0.12	0.48 ± 0.18	0.163
H-FeSO <sub>4</sub>	0.44 ± 0.14	0.50 ± 0.09	0.44 ± 0.10	0.36 ± 0.09	0.315
H-MCOP-Fe+PA	0.41 ± 0.14	0.50 ± 0.18	0.34 ± 0.08	0.40 ± 0.14	0.363
H-FeSO <sub>4</sub> +PA	0.29 ± 0.14	0.26 ± 0.15	0.25 ± 0.12	0.28 ± 0.14	0.957

注:同行右上角标有相同字母视为统计学差异不显著,无相同字母的数据视为统计学差异显著,小写字母表示显著水平 $\alpha=0.05$ 。

## 2.5 大鼠不同小肠部位单位面积铁累计吸收率

### 2.5.1 铁剂浓度对大鼠小肠单位面积铁累计吸收率的影响

大鼠不同小肠部位在3,5,10  $\mu\text{g/mL}$ 的MCOP-Fe和FeSO<sub>4</sub>中的铁吸收情况见图3、图4。在十二指肠、空肠和回肠中,低、中、高浓度的MCOP-Fe组间单位面积累计吸收率( $Q$ 值)呈现

梯度增加,其中H-MCOP-Fe组在十二指肠和回肠的 $Q$ 值显著高于L-MCOP-Fe和M-MCOP-Fe组( $P<0.05$ ),L-MCOP-Fe组在空肠的 $Q$ 值显著低于M-MCOP-Fe和H-MCOP-Fe组( $P<0.05$ );而低、中、高浓度的FeSO<sub>4</sub>组间各小肠部位的 $Q$ 值没有统计学差异( $P>0.05$ )。

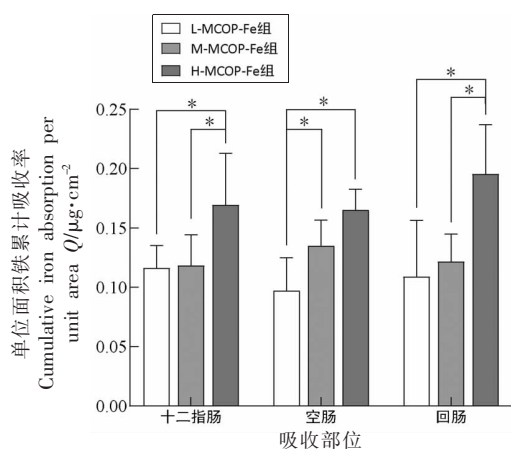


图 3 不同浓度的海洋鱼低聚肽螯合铁在大鼠小肠部位的吸收情况

Fig.3 Absorption of marine fish oligopeptide chelated iron with different concentrations in different parts of the small intestine of rats

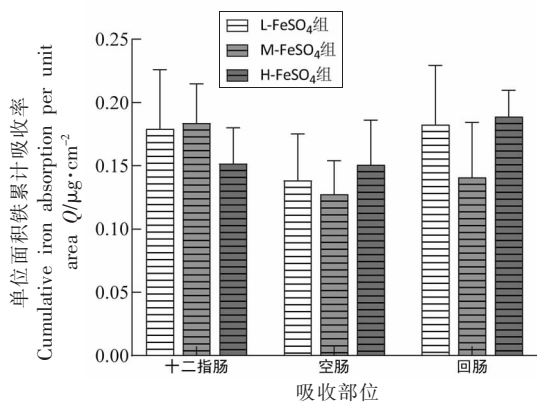


图 4 不同浓度的硫酸亚铁在大鼠小肠部位的吸收情况

Fig.4 Absorption of ferrous sulfate with different concentrations in different parts of small intestine of rats

2.5.2 不同铁剂对大鼠小肠单位面积铁累计吸收率的影响 在相同铁含量下,大鼠不同小肠部位对 MCOP-Fe 和 FeSO<sub>4</sub> 的吸收情况见图 5、图 6、图 7。除了在十二指肠中,L-FeSO<sub>4</sub> 和 M-FeSO<sub>4</sub> 组的 Q 值显著大于 L-MCOP-Fe 和 M-MCOP-Fe 组 ( $P<0.05$ )外 (见图 5),其余相同铁含量的 MCOP-Fe 和 FeSO<sub>4</sub> 组别间十二指肠、空肠及回肠的 Q 值均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。然而,随着铁含量的增加,MCOP-Fe 组别的 Q 值呈逐步上升并高于 FeSO<sub>4</sub> 组别的趋势。

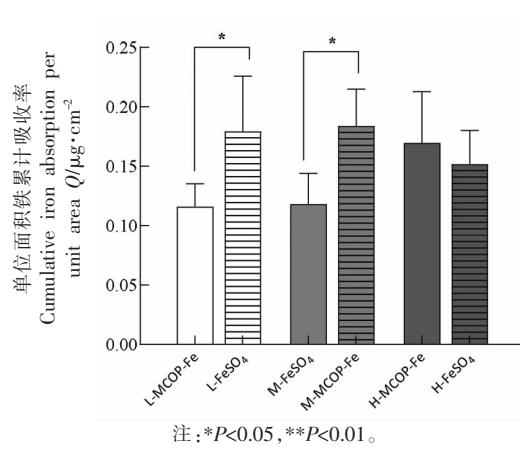


图 5 不同铁剂类型在大鼠十二指肠的吸收情况

Fig.5 Absorption of different types of iron in duodenum of rats

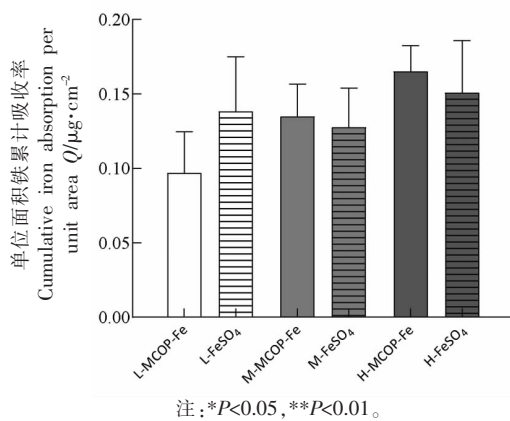


图 6 不同铁剂类型在大鼠空肠的吸收情况

Fig.6 Absorption of different types of iron in jejunum of rats

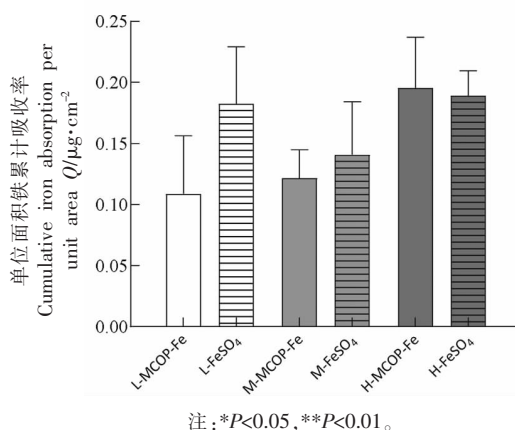


图 7 不同铁剂类型在大鼠回肠的吸收情况

Fig.7 Absorption of different types of iron in ileum of rats

2.5.3 植酸对大鼠小肠单位面积铁累计吸收率的影响 添加 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  植酸后,大鼠小肠不同部位对 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MCOP-Fe 和  $\text{FeSO}_4$  的吸收情况见图 8、图 9。在添加了植酸后,低、中、高 MCOP-Fe

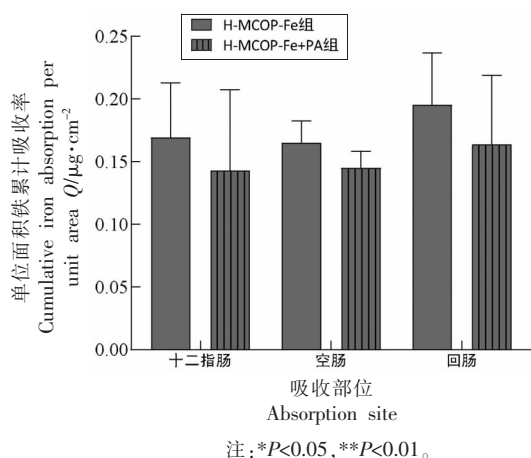


图 8 海洋鱼低聚肽螯合铁添加植酸后大鼠小肠单位面积铁累计吸收率

Fig.8 The cumulative absorption rate of iron per unit area ( $Q$ ) in small intestine of rats with addition of phytic acid to marine fish oligopeptide chelated iron

### 3 讨论

本研究建立了一个稳定的大鼠外翻肠囊模型,可用于评价 MCOP-Fe 和  $\text{FeSO}_4$  的小肠吸收。实验发现,与  $\text{FeSO}_4$  的肠道饱和和吸收特征相比,MCOP-Fe 在 3~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围,其小肠的吸收呈线性上升趋势,这可能与肠道对两种铁剂的吸收途径不同有关。有研究表明:亚铁离子通过二价金属转运蛋白 1(DMT1)进入微绒毛膜上皮细胞,并通过铁转运蛋白 1(FPN1)进入循环系统<sup>[29-30]</sup>,因此它的吸收与转运蛋白的饱和程度相关,在接近饱和状态下即使增加亚铁离子的浓度,吸收率也不会增加。目前已知的关于低聚肽螯合铁的吸收途径主要有两种:1)保持铁的溶解度或将铁离子还原为亚铁离子,从而促进铁通过 DMT1 受体进入肠细胞;2)蛋白质水解产物通过位于刷缘的肽或氨基酸转运蛋白,介导、促进铁通过肠细胞膜<sup>[12]</sup>。在本实验中发现 MCOP-Fe 是一个悬浊物,因此更倾向于后一种理论,即通过相应的低聚肽转运蛋白来促进铁的吸收,并且推断在同样转运蛋白饱

组和  $\text{FeSO}_4$  组在十二指肠、空肠、回肠的  $Q$  值都有所下降,而  $\text{FeSO}_4$  组下降更为明显(见图 9),在 3 个不同肠段均有统计学差异( $P<0.05$ ),其中回肠部位的统计学差异更为显著( $P<0.01$ )。

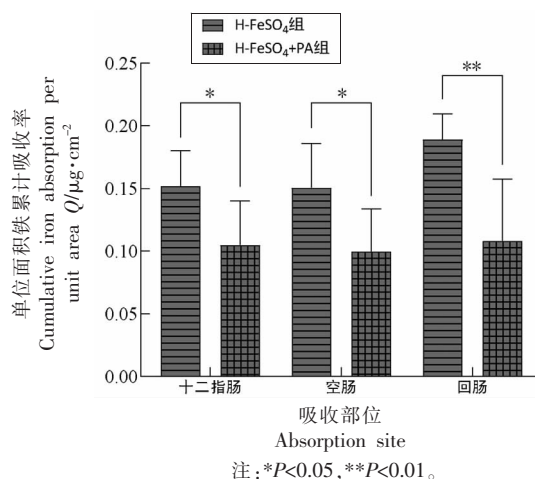


图 9 硫酸亚铁添加植酸后大鼠小肠单位面积铁累计吸收率

Fig.9 The cumulative absorption rate of iron per unit area ( $Q$ ) in small intestine of rats with addition of phytic acid to ferrous sulfate

和状态下,MCOP-Fe 相比无机铁可以携带更多的铁进入肠道。

日常饮食中存在许多影响铁吸收的抑制剂,例如:植酸、丹宁酸、草酸盐等,它们会螯合铁离子,降低其溶解度,从而影响铁的吸收<sup>[12]</sup>,这也是传统亚铁型补铁剂不可忽视的缺陷,而低聚肽可以更好地螯合铁,使其稳定存在,这和本实验中植酸对 MCOP-Fe 的肠道吸收抑制较小的结果相符。也正是因为螯合铁的稳定性的,由游离亚铁离子所引起相应的肠道反应、毒性作用可以得到有效降低<sup>[11,31]</sup>。

本文首次用大鼠外翻肠囊模型来评价 MCOP-Fe 在小肠的吸收特性,为今后类似的新型肽螯合铁剂的生物利用度评价提供了简便易行的方法。同时,此前的外翻肠囊模型主要使用雄性大鼠,考虑到缺铁性贫血风险最高的人群主要是妇女和儿童<sup>[32]</sup>,因此选用雌性大鼠建立模型对女性贫血更具有参考价值。当然本研究也存在一定的局限性,比如样本量不足导致大部分结果虽然看

到趋势,但尚未出现统计学差异。此外,关于各类蛋白质水解产物促进铁吸收的机制仍不是十分清楚,本实验也未做更加深入的探究,有待今后的深入研究。

海洋鱼低聚肽螯合铁具有补铁和补充蛋白质的双重营养价值,比硫酸亚铁更为稳定和安全,具有很好的应用前景,可为今后改善铁缺乏这一重大公共卫生问题提供新的解决策略。

### 参 考 文 献

- [1] PASRICHA S R, TYE-DIN J, MUCKENTHALER M U, et al. Iron deficiency[J]. *Lancet* (London, England), 2021, 397(10270): 233-248.
- [2] DISEASE G B D, INJURY I, PREVALENCE C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet* (London, England), 2017, 390(10100): 1211-1259.
- [3] CAMASCHELLA C. Iron deficiency: New insights into diagnosis and treatment[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 2015: 8-13.
- [4] QI X, ZHANG Y X, GUO H, et al. Mechanism and intervention measures of iron side effects on the intestine[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(12): 2113-2125.
- [5] KORTMAN G A, RAFFATELLU M, SWINKELS D W, et al. Nutritional iron turned inside out: Intestinal stress from a gut microbial perspective[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2014, 38(6): 1202-1234.
- [6] CANELO-HIDALGO M J, CASTELO-BRANCO C, PALACIOS S, et al. Tolerability of different oral iron supplements: A systematic review[J]. *Curr Med Res Opin*, 2013, 29(4): 291-303.
- [7] TOLKIEN Z, STECHER L, MANDER A P, et al. Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: A systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117383.
- [8] CAETANO-SILVA M B, BERTOLDO-PACHECO M T, PAES-LEME A F, et al. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS[J]. *Food Research International*, 2015, 71: 132-139.
- [9] PRENTICE A M, MENDOZA Y A, PEREIRA D, et al. Dietary strategies for improving iron status: Balancing safety and efficacy[J]. *Nutr Rev*, 2017, 75(1): 49-60.
- [10] WU W F, YANG Y Y, SUN N, et al. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability[J]. *Food Res Int*, 2020, 131: 108976.
- [11] CHEN K, CHAI L Y, LI H, et al. Effect of bovine lactoferrin from iron-fortified formulas on diarrhea and respiratory tract infections of weaned infants in a randomized controlled trial[J]. *Nutrition*, 2016, 32(2): 222-227.
- [12] LI Y, JIANG H, HUANG G R. Protein hydrolysates as promoters of non-haem iron absorption[J]. *Nutrients*, 2017, 9(6): 609.
- [13] 闫昌誉, 李晓敏, 余宗盛, 等. 鱼类胶原蛋白肽的研究现状与产业化应用[J]. *今日药学*, 2021, 31(4): 241-250.  
YAN C Y, LI X M, YU Z S, et al. Research progress and industrial applications of fish collagen peptides[J]. *Pharmacy Today*, 2021, 31(4): 241-250.
- [14] HUANG B B, LIN H C, CHANG Y W. Analysis of proteins and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis* spp.) processing co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database[J]. *J Funct Foods*, 2015, 19: 629-640.
- [15] CHEN Q R, GUO L D, DU F, et al. The chelating peptide (GPAGPHGPPG) derived from Alaska pollock skin enhances calcium, zinc and iron transport in Caco-2 cells[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2017, 52(5): 1283-1290.
- [16] WILSON T H, WISEMAN G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface[J]. *J Physiol*, 1954, 123(1): 116-125.
- [17] ALAM M A, AL-JENOABI F I, AL-MOHIZEA A M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(3): 326-336.
- [18] LI Y, LIU S S, GUO Z Y, et al. Discovery of potential pharmacodynamic ingredients of Dang-Gui-



- Si-Ni decoction based on absorbed ingredients and molecular docking[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114045.
- [19] WANG Y, CHEN Z J, CHEN S, et al. Effect of short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles on intestinal absorption of glucose by ex vivo everted rat gut sac model[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2021, 21(9): 4586-4595.
- [20] HOU Y, PIAO H, TAHARA Y, et al. Solid-in-oil nanodispersions as a novel delivery system to improve the oral bioavailability of bisphosphate, rise dronate sodium[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 155: 105521.
- [21] KHEMISS F, GHOUL-MAZGAR S, MOSHTAGHIE A A, et al. Study of the effect of aqueous extract of *Grewia tenax* fruit on iron absorption by everted gut sac[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103(1): 90-98.
- [22] AARABI M H, MOSHTAGHIE A A, MIRHASHEMI M. Comparative in vitro study of the intestinal absorption of titanium and iron in rats[J]. *Pak J Biol Sci*, 2011, 14(20): 945-949.
- [23] MOSHTAGHIE A A, BADII A A, HASSANZADEH T. Investigation of manganese and iron absorption by rat everted gut sac[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006, 9: 1346-1349.
- [24] 易湘洲, 丁保森. 干扰剂对甘氨酸螯合铁脂质体吸收效率的影响[J]. *食品科技*, 2017, 42(7): 249-252.
- YI X Z, DING B M. Effects of interference agents on absorption efficiency of ferrous glycinate liposomes[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(7): 249-252.
- [25] SMITH M W, DEBNAM E S, DASHWOOD M R, et al. Structural and cellular adaptation of duodenal iron uptake in rats maintained on an iron-deficient diet[J]. *Pflug Arch Eur J Phy*, 2000, 439(4): 449-454.
- [26] LEUNG P S, SRAI S K, MASCARENHAS M, et al. Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression[J]. *Gut*, 2005, 54(10): 1391-1395.
- [27] 黄慧辉. 蒺藜抗炎有效成分在大鼠肠外翻试验中的吸收特性考察及其药代动力学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- HUANG H H. Investigation of absorption characteristics of anti-inflammatory effective parts from smilax china in rat intestinal valgus test and pharmacokinetics in rat[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine. 2016.
- [28] 崔升森. 葛根素体内药动力学及葛根黄酮自微乳化软胶囊的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- CUI S M. Studies on the pharmacokinetics of puerarin and self-microemulsifying drug delivery systems soft capsule of Puerarialobata[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2004.
- [29] CREMONESI P, ACEBRON A, RAJA K B, et al. Iron absorption: Biochemical and molecular insights into the importance of iron species for intestinal uptake[J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91(3): 97-102.
- [30] GAO G, LI J, ZHANG Y T, et al. Cellular iron metabolism and regulation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1173: 21-32.
- [31] LOW M S, SPEEDY J, STYLES C E, et al. Daily iron supplementation for improving anaemia, iron status and health in menstruating women [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 4: CD009747.
- [32] NING S, ZELLER M P. Management of iron deficiency[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2019, 2019(1): 315-322.

### Studies on the Intestinal Absorption of Marine Fish Oligopeptide Chelated Iron

Pan Wenfei<sup>1</sup>, Ying Xiaoling<sup>1</sup>, Ma Qian<sup>2</sup>, Xu Yuying<sup>1</sup>, Li Ning<sup>2</sup>, Yang Min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000

<sup>2</sup>Zhejiang University Department of Chemistry, Hangzhou 310000

**Abstract** Objective: To explore the absorption characteristics of marine fish oligopeptide chelated iron (MCOP-Fe) in small intestine, and compare it with the traditional iron supplement-ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>). Methods: 40 female Sprague

Dawley rats were randomly divided into 8 groups (L-MCOP-Fe: 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MCOP-Fe; M-MCOP-Fe: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MCOP-Fe; H-MCOP-Fe: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MCOP-Fe; L-FeSO<sub>4</sub>: 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FeSO<sub>4</sub>; M-FeSO<sub>4</sub>: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FeSO<sub>4</sub>; H-FeSO<sub>4</sub>: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FeSO<sub>4</sub>; H-MCOP-Fe+PA: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MCOP-Fe+500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phytic acid; H-FeSO<sub>4</sub>+PA: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FeSO<sub>4</sub> + 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phytic acid). To establish the model of everted gut sac *in vitro*, the effect of iron absorption in different intestinal segments was evaluated by the cumulative iron absorption rate per unit area ( $Q$ ). Results: 1) The  $Q$  values of duodenum, jejunum and ileum in three MCOP-Fe groups increased with concentration gradient, but there was no similar trend in FeSO<sub>4</sub> groups; 2) The  $Q$  values of group L-FeSO<sub>4</sub> and M-FeSO<sub>4</sub> had a tendency to be higher than those of group L-MCOP-Fe and M-MCOP-Fe, but were opposite at high concentration (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 3) After adding 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phytic acid, the  $Q$  values of groups H-MCOP-Fe+PA and H-FeSO<sub>4</sub>+PA decreased compared with groups H-MCOP-Fe and H-FeSO<sub>4</sub>, and the decrease degree of group H-FeSO<sub>4</sub>+PA was more significant ( $P<0.05$ ). Conclusion: In the range of 3–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the absorption rate of FeSO<sub>4</sub> in small intestine showed an equilibrium trend of saturation, while the MCOP-Fe showed a gradient trend of increase; at the same time, MCOP-Fe was less inhibited by phytic acid, and was more stable than FeSO<sub>4</sub>, which has good application prospects.

**Keywords** everted gut sac; marine fish; ferrous oligopeptide chelata; intestinal absorption; iron-deficiency