



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110314167 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201910610581.3

(22)申请日 2019.07.04

(71)申请人 北京大学第三医院(北京大学第三
临床医学院)

地址 100191 北京市海淀区花园北路49号

申请人 北京大学

(72)发明人 乔杰 姜长涛 庞艳莉 齐新宇
云楚宇

(74)专利代理机构 北京维澳专利代理有限公司
11252

代理人 曾晨 逢京喜

(51)Int.Cl.

A61K 31/575(2006.01)

A61P 15/08(2006.01)

A61P 3/00(2006.01)

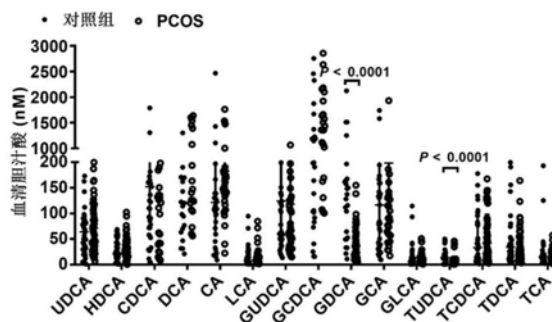
权利要求书1页 说明书11页 附图17页

(54)发明名称

胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用及药物制剂

(57)摘要

本发明公开了一种胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用及药物制剂。本公开提供了胆汁酸的新的应用领域,胆汁酸可应用在制备治疗PCOS药物中。本公开有助于开发出新型的治疗PCOS的药物。



1. 一种胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用。
2. 根据权利要求1所述的胆汁酸的应用,其特征在于,用于制备药剂,所述药剂适合全身、局部施用,或可以直接注射进卵巢部位。
3. 根据权利要求2所述的胆汁酸的应用,其特征在于,所述施用通过静脉内或动脉内、肌肉内、透皮、腹膜内、鞘内、淋巴管内给药,皮下、口服或局部区域给药来进行。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的胆汁酸的应用,其特征在于,所述胆汁酸包括甘氨酸脱氧胆酸和/或牛磺熊去氧胆酸。
5. 根据权利要求4所述的胆汁酸的应用,其特征在于,所述胆汁酸为甘氨酸脱氧胆酸。
6. 一种药物制剂,其特征在于,包括胆汁酸及一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。
7. 根据权利要求6所述的药物制剂,其特征在于,所述胆汁酸包括甘氨酸脱氧胆酸和/或牛磺熊去氧胆酸。
8. 根据权利要求7所述的药物制剂,其特征在于,所述胆汁酸为甘氨酸脱氧胆酸。
9. 根据权利要求6所述的药物制剂,其特征在于,所述载体包括固体辅料或液体辅料,所述药物制剂的剂型包括片剂、丸剂、胶囊、膏剂、散剂、溶液剂、颗粒剂、混悬剂、注射剂、缓释制剂和控释制剂。
10. 根据权利要求6至9中任一项所述的药物制剂,其特征在于,所述胆汁酸的有效剂量为20-100mg/kg。

胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用及药物制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及多囊卵巢综合征治疗领域,更具体地,涉及一种胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用及药物制剂。

背景技术

[0002] 多囊卵巢综合征(简称PCOS)是无排卵性不孕症的最常见原因之一。PCOS是一种内分泌代谢紊乱的综合征,以高雄激素血症、排卵异常和卵巢多囊样改变为特征,常伴发胰岛素抵抗。研究表明,中国人群中PCOS患者14.2%伴发胰岛素抵抗,但PCOS的病因尚不明确。由于其临床表现的高度异质性,PCOS的治疗已经成为妇科和内分泌领域共同关注的热点和难点问题。PCOS给患者带来的影响已远不局限于生殖问题,时间上也不仅仅局限于女性的育龄期:胎儿期的宫内高雄和宫内营养不良;儿童期的肾上腺功能早现;育龄期的月经紊乱、不孕不育、子宫内膜疾病等;甚至中老年期的糖尿病、心脑血管病、子宫内膜癌都可能使PCOS患者的健康受到一定的影响。

[0003] 针对PCOS,目前主要的药物治疗方法为通过口服避孕药、氯米芬、促性腺激素、促性腺激素释放类似物、二甲双胍等药物帮助患者改善月经周期、调节排卵异常及代谢异常。

[0004] 但是,口服避孕药常伴有恶心、呕吐、头晕、乳胀、白带增多等早孕反应,还会产生乏力、嗜睡、色素增加、食欲亢进、痤疮、月经过少或出血等问题。氯米芬会伴有潮热及多胎妊娠风险加大的问题。促性腺激素及促性腺激素释放类似物会增加多胎妊娠和卵巢过度刺激的风险。二甲双胍会产生胃肠道反应甚至乳酸性酸中毒。

[0005] 因此,如何提供一种可有效治疗PCOS的药物成为本领域亟需解决的技术难题。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用的新技术方案。

[0007] 根据本发明的第一方面,提供了一种胆汁酸作为制备治疗PCOS药物的应用。

[0008] 可选的,用于制备药剂,所述药剂适合全身、局部施用,或可以直接注射进卵巢部位。

[0009] 可选的,所述施用通过静脉内或动脉内、肌肉内、透皮、腹膜内、鞘内、淋巴管内给药,气管内滴注给药,皮下、口服或局部区域给药来进行。

[0010] 可选的,所述胆汁酸包括甘氨脱氧胆酸和/或牛磺熊去氧胆酸。

[0011] 可选的,所述胆汁酸为甘氨脱氧胆酸。

[0012] 根据本发明的第二方面,提供了一种药物制剂。

[0013] 该药物制剂包括胆汁酸及一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0014] 可选的,所述胆汁酸包括甘氨脱氧胆酸和/或牛磺熊去氧胆酸。

[0015] 可选的,所述胆汁酸为甘氨脱氧胆酸。

[0016] 可选的,所述载体包括固体辅料或液体辅料,所述药物制剂的剂型包括片剂、丸

剂、胶囊、膏剂、散剂、溶液剂、颗粒剂、混悬剂、注射剂、缓释制剂和控释制剂。液体辅料可例如为生理盐水。生理盐水的浓度可例如为0.9wt%。

[0017] 可选的,所述胆汁酸的有效剂量为20-100mg/kg。

[0018] 本公开提供了胆汁酸的新的应用领域,胆汁酸可应用在制备治疗PCOS药物中。本公开有助于开发出新型的治疗PCOS的药物。

[0019] 通过以下参照附图对本发明的示例性实施例的详细描述,本发明的其它特征及其优点将会变得清楚。

附图说明

[0020] 被结合在说明书中并构成说明书的一部分的附图示出了本发明的内容,并且连同其说明一起用于解释本发明的原理。

[0021] 图1为对照组与PCOS组肠道菌群在科水平上不同菌群的丰度图。

[0022] 图2为对照组与PCOS组肠道菌群在属水平上不同菌群的丰度图。

[0023] 图3为对照组与PCOS组肠道菌群在物种水平上不同菌群的丰度图。

[0024] 图4为KEGG分析图。

[0025] 图5为对照组与PCOS组志愿者血清的胆汁酸定量分析图。

[0026] 图6为对照组与PCOS组志愿者粪便的胆汁酸定量分析图。

[0027] 图7为*B. vulgatus*与血清胆汁酸的相关性分析图。

[0028] 图8为*B. vulgatus*与粪便胆汁酸的相关性分析图。

[0029] 图9为*B. vulgatus*菌体外水解GDCA效率图。

[0030] 图10为对照组与PCOS组志愿者粪便*B. vulgatus*菌Bsh基因的表达图。

[0031] 图11为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠口服糖耐量统计图。

[0032] 图12为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠胰岛素抵抗统计图。

[0033] 图13为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠口服糖耐量曲线下面积统计图。

[0034] 图14为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠胰岛素抵抗曲线下面积统计图。

[0035] 图15为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠空腹血糖统计图。

[0036] 图16为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠胰岛素水平统计图。

[0037] 图17为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠胰岛素抵抗指数统计图。

[0038] 图18为对照组小鼠的典型动情周期。

[0039] 图19为*B. vulgatus*组小鼠的典型动情周期。

[0040] 图20为DHEA小鼠的典型动情周期。

[0041] 图21为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠动情周期的各期所占比例统计图。

[0042] 图22为对照组小鼠的典型卵巢HE染色图。

[0043] 图23为*B. vulgatus*组小鼠的典型卵巢HE染色图。

[0044] 图24为DHEA组小鼠的典型卵巢HE染色图。

[0045] 图25为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠黄体数统计图。

[0046] 图26为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠囊状卵泡数统计图。

[0047] 图27为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠的睾酮水平统计图。

- [0048] 图28为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠的黄体生成素水平统计图。
- [0049] 图29为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠肠上皮胆汁酸水平统计图。
- [0050] 图30为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠口服糖耐量统计图。
- [0051] 图31为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠胰岛素抵抗统计图。
- [0052] 图32为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠口服糖耐量曲线下面积统计图。
- [0053] 图33为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠胰岛素抵抗实验曲线下面积统计图。
- [0054] 图34为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠空腹血糖统计图。
- [0055] 图35为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠胰岛素水平统计图。
- [0056] 图36为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠胰岛素抵抗指数统计图。
- [0057] 图37为对照组小鼠的典型动情周期。
- [0058] 图38为*B. vulgatus*组小鼠的典型动情周期。
- [0059] 图39为GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠的典型动情周期。
- [0060] 图40为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠各动情周期各期所占比例统计图。
- [0061] 图41为对照组小鼠的典型卵巢形态图。
- [0062] 图42为*B. vulgatus*组小鼠的典型卵巢形态图。
- [0063] 图43为GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠的典型卵巢形态图。
- [0064] 图44为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠卵巢黄体数统计图。
- [0065] 图45为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠卵巢黄体数囊状卵泡数统计图。
- [0066] 图46为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠睾酮水平检测图。
- [0067] 图47为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠LH水平统计图。
- [0068] 图48为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠第一窝子代数统计图。
- [0069] 图49为对照组小鼠的典型动情周期。
- [0070] 图50为GDCA灌胃小鼠的典型动情周期。
- [0071] 图51为对照组及GDCA灌胃小鼠各动情周期各期所占比例统计图。
- [0072] 图52为对照组、移植*B. vulgatus*菌小鼠及DHEA小鼠皮下脂肪棕色化相关分子表达量图。

[0073] 图53为对照组、移植*B. vulgatus*菌小鼠及DHEA小鼠棕色脂肪棕色化相关分子表达量图。

[0074] 图54为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠皮下脂肪棕色化相关分子表达量图。

[0075] 图55为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠棕色脂肪棕色化相关分子表达量图。

具体实施方式

[0076] 现在将参照附图来详细描述本发明的各种示例性实施例。应注意到：除非另外具体说明，否则在这些实施例中阐述的部件和步骤的相对布置、数字表达式和数值不限制本发明的范围。

[0077] 以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的，决不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。

[0078] 对于相关领域普通技术人员已知的技术、方法和设备可能不作详细讨论，但在适当情况下，所述技术、方法和设备应当被视为说明书的一部分。

[0079] 在这里示出和讨论的所有例子中，任何具体值应被解释为仅仅是示例性的，而不是作为限制。因此，示例性实施例的其它例子可以具有不同的值。

[0080] 应注意到：相似的标号和字母在下面的附图中表示类似项，因此，一旦某一项在一个附图中被定义，则在随后的附图中不需要对其进行进一步讨论。

[0081] 图1至图3体现了PCOS患者及对照肠道菌群差异。对照组与PCOS组肠道菌群宏基因组分析结果，两组之间*Bacteroides vulgatus*在科(图1)、属(图2)和物种水平(图3)上不同菌群的丰度(其中，对照组的 $n=43$ ，PCOS组的 $n=50$ ， n 为每组病例数， P 表示两组之间的统计学意义， $P<0.05$ 认为两组间有统计学差异)。

[0082] 图1中的Bacteroidaceae是指拟杆菌科，Lachnospiraceae是指毛螺菌科，Ruminococcaceae是指疣微菌科，Clostridiaceae是指梭菌科，Eubacteriaceae是指优杆菌科，Prevotellaceae是指普雷沃氏菌科，Veillonellaceae是指韦荣氏菌科，Selenomonadaceae是指月形单孢菌科，Rikenellaceae是指理研菌科，Tannerellaceae是指坦纳菌科。图2中的*Bacteroides*是指拟杆菌属，*Clostridium*是指梭菌属，*Faecalibacterium*是指粪杆菌属，*Eubacterium*是指优杆菌属，*Roseburia*是指氏菌属，*Prevotella*是指普氏菌属，*Ruminococcus*是指瘤胃球菌属，*Blautia*是指布劳特氏菌属，*Alistipes*是指枝菌属，*Megamonas*是指巨单胞菌属。图3中的*Bacteroides vulgatus*是指普通拟杆菌。

[0083] 由图1至图3可见，与健康人群比较，PCOS患者的肠道菌群有显著变化，其中拟杆菌科(Bacteroidaceae)及拟杆菌属(*Bacteroides*)是差异最明显、变化程度最大的菌科和菌属。普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*, *B. vulgatus*)的水平较正常对照组相比显著升高。

[0084] 图4为KEGG分析，即根据基因组学结果得出的肠道菌群相关代谢通路分析图。

[0085] 通过KEGG通路分析研究了肠道菌群所具有的代谢活性，由图4可见，胆汁酸代谢通路在PCOS与正常对照两组间有十分显著的差异，提示肠道菌群介导的胆汁酸代谢可对宿主产生着功能上的调控作用。菌群主要通过其代谢产物与机体相互作用来参与调控宿主代

谢。

[0086] 图5至图10体现了对照组与PCOS组胆汁酸代谢的变化。运用胆汁酸代谢组学方法对两组志愿者血清(图5,spearman correlation coefficient是指斯皮尔曼关联系数)及粪便(图6)中的胆汁酸进行定量分析。*B.vulgatus*与血清(图7)及粪便(图8)胆汁酸的相关性分析。图9为*B.vulgatus*菌体外水解GDCA(Glycodesoxycholic Acid,甘氨脱氧胆酸)的效率($n=3/\text{组}$)。图10为两组志愿者粪便*B.vulgatus*菌Bsh(胆汁酸水解酶)基因的表达情况(其中,图5-8及图10中,对照组 $n=43$,PCOS组 $n=50$)。UDCA是指熊去氧胆酸,HDCA是指去氧胆酸,CDCA是指鹅脱氧胆酸,DCA是指脱氧胆酸,CA是指胆酸,LCA是指石胆酸,GUDCA是指氧胆酸,GCDCA是指甘氨鹅脱氧胆酸,GDCA是指甘氨脱氧胆酸,GCA是指甘氨胆酸,GLCA是指甘氨石胆酸,TUDCA是指牛磺熊去氧胆酸,TCDCA是指牛磺鹅去氧胆酸,TDCA是指牛磺去氧胆酸,TCA是指牛黄胆酸。

[0087] 由图5至图10可见,血清及粪便中的甘氨脱氧胆酸(Glycodesoxycholic Acid, GDCA)及牛磺熊去氧胆酸(Tauroursodeoxycholic Acid, TUDCA)在PCOS组都有显著性的降低(图5和图6)。在进一步对*B.vulgatus*与胆汁酸的相关性分析中表明:*B.vulgatus*与血清及粪便中的GDCA和TUDCA存在很强的负相关性(图7和图8)。更重要的是,GDCA等结合型胆汁酸在肠道里的水解过程主要由胆汁酸水解酶BSH介导。体外培养*B.vulgatus*菌并提取菌体蛋白进行胆汁酸水解实验,结果表明*B.vulgatus*菌蛋白提取液水解GDCA的效率高达95%以上(图9)。为了进一步确认PCOS患者结合型胆汁酸的降低与*B.vulgatus*的关系,检测Bsh基因的丰度,结果显示PCOS患者中Bsh的丰度显著升高(图10)。以上结果说明:PCOS患者肠道菌群中*B.vulgatus*显著升高,这可影响宿主TUDCA或者GDCA的代谢;*B.vulgatus*丰度的增加和Bsh基因水平的增加为导致GDCA降解而使其水平减少的主要原因。

[0088] 因为胆汁酸水解酶是蛋白类物质,主要存在于菌体蛋白中,提取菌体蛋白主要是为了获得胆汁酸水解酶BSH,其主要作用是水解胆汁酸。正常情况下,拟杆菌多了,其BSH增多,水解胆汁酸增多,GDCA这种结合型胆汁酸就会减少,所以二者呈负相关关系。也说明GDCA减少是因为拟杆菌增多的关系,Bsh基因丰度增加也说明了同样的问题。

[0089] 图11至图17体现了*B.vulgatus*灌胃小鼠糖耐量。对照组、*B.vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠(图11)口服糖耐量实验,图12为胰岛素抵抗实验,图13为口服糖耐量曲线下面积,图14为胰岛素抵抗实验曲线下面积,图15为空腹血糖,图16为胰岛素水平,图17为胰岛素抵抗指数(其中, $n=8/\text{组}$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs.对照组,一个*代表P值小于0.05,两个**代表P值小于0.01,差异更显著)。

[0090] 由图11至图17可见,用*B.vulgatus*灌胃的小鼠及公认的PCOS小鼠模型之一—DHEA小鼠可出现了糖耐量受损的表现:在给予葡萄糖或注射胰岛素后,两组小鼠的血糖水平较对照组有明显升高,且血糖下降较慢,其口服糖耐量实验(GTT)、胰岛素抵抗实验(ITT)的曲线下面积都有明显升高(图11-图14)。此外,小鼠的空腹血糖、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数均显著高于对照组。这表明*B.vulgatus*灌胃有与DHEA类似的诱发小鼠胰岛素抵抗的作用,小鼠糖耐量受损(图15-图17),这也是PCOS患者常见的临床表现之一。

[0091] 图18至图21体现了对照组、*B.vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠的动情周期。对照组小鼠的典型动情周期(图18),*B.vulgatus*组小鼠的典型动情周期(图19),DHEA小鼠的典型动情周期(图20),对照组、*B.vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠动情周期的各期所占比例(图

21) (其中P为动情前期、E为动情期、M为动情后期、D为动情间期, $n=8$ /组)。动情周期是评价小鼠性周期的一个重要指标, 正常小鼠的动情为4-5天, 动情前期(P)、动情期(E)、动情后期(M)及动情间期(D)重复出现, 动情周期紊乱是PCOS小鼠的一个重要特征。

[0092] 由图18至图21可见, DHEA小鼠主要表现为停留在持续的动情期, *B. vulgatus*灌胃小鼠的动情周期以间期为主(图18-20), 但二者都存在动情周期紊乱表现为特定的动情周期所占的比例异常升高(图21)。

[0093] 图22至图26体现了对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠卵巢形态。图22为对照组小鼠的典型卵巢HE染色, 图23为*B. vulgatus*组小鼠的典型卵巢HE染色, 图24为DHEA组小鼠的典型卵巢HE染色, 图25为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠黄体数, 图26为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠囊状卵泡数(其中,*表示黄体,#表示囊状卵泡, $n=8$ /组)。

[0094] 由图22至图26的卵巢形态学检查显示, 正常小鼠的卵巢黄体数目正常, 没有囊状卵泡(图22), *B. vulgatus*灌胃小鼠的卵巢黄体数目减少, 囊状卵泡增多(图23、25和26), 这都是PCOS样小鼠卵巢形态的典型表现, 与DHEA建立的PCOS动物模型表现类似(图24-26)。

[0095] 图27和图28为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠的睾酮(Testosterone, T)(图27)和黄体生成素(Luteinizing Hormone, LH)(图28)水平(其中, $n=8$ /组)。

[0096] 由图27和图28可见, 在激素水平上, *B. vulgatus*灌胃小鼠的睾酮(Testosterone, T)和黄体生成素(Luteinizing Hormone, LH)较对照组都有显著升高。此外, *B. vulgatus*灌胃的小鼠雌激素与对照组相比没有显著变化, 与PCOS患者的内分泌谱类似。

[0097] 图29体现了小鼠肠上皮胆汁酸水平。对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠肠上皮的胆汁酸水平, 运用胆汁酸代谢组学方法对小鼠肠上皮的胆汁酸进行定量分析(其中, $n=8$ /组)。肠道菌群与胆汁酸代谢密切相关, 微生物的特定组合可能会导致胆汁酸出现明显的变化, 以调节宿主代谢。

[0098] 在PCOS患者体内已经发现*B. vulgatus*与GDCA和TUDCA的负相关性最强。由于小鼠中缺乏GDCA, 所以在小鼠的肠组织中所检测到的胆汁酸里, 不能检测到类似人类胆汁酸的GDCA, 但和对照组比, 由图29可见, *B. vulgatus*灌胃小鼠及DHEA小鼠肠上皮中TUDCA明显减少。

[0099] 图30-36体现了GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃模型小鼠糖耐量。对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠口服糖耐量实验(图30), 胰岛素抵抗实验(图31), 口服糖耐量曲线下面积(图32), 胰岛素抵抗实验曲线下面积(图33), 空腹血糖(图34), 胰岛素水平(图35), 胰岛素抵抗指数(图36)(其中, $n=6$ /组, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs. 对照组, $\#P<0.05$, $\##P<0.01$ vs. *B. vulgatus*)。

[0100] 由图30至图36可见, GDCA(30mg/kg灌胃)可以改善*B. vulgatus*灌胃造成的胰岛素抵抗, 主要表现为给*B. vulgatus*灌胃小鼠注射葡萄糖或者胰岛素后, 其升高的血糖水平可被GDCA抑制(图30和31), 口服糖耐量实验(GTT)、胰岛素抵抗实验(ITT)的曲线下面积也可恢复到正常水平(图32和33)。此外, *B. vulgatus*灌胃小鼠升高的空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数可以在额外的GDCA的添加下恢复正常(图34-36)。

[0101] 图37至图40体现了GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃模型小鼠的动情周期。对照组小鼠的典型动情周期(图37), *B. vulgatus*组小鼠的典型动情周期(图38), GDCA治疗*B. vulgatus*灌

胃小鼠的典型动情周期(图39),对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠各动情周期各期所占比例(图40)(其中,P为动情前期、E为动情期、M为动情后期、D为动情间期,n=6/组)。

[0102] 由图37至图40可见,*B. vulgatus*小鼠的动情周期紊乱,持续停留在动情间期。在给予*B. vulgatus*小鼠GDCA治疗(30mg/kg灌胃)后,小鼠紊乱的动情周期可以恢复正常,以4-5天为一个循环周期(图37-39),各期所占的比例也恢复至正常(图40)。

[0103] 图41至图45体现了GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃模型小鼠的卵巢功能。对照组小鼠的典型卵巢形态(图41),*B. vulgatus*组小鼠的典型卵巢形态(图42),GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠的典型卵巢形态(图43),对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠卵巢黄体数(图44),对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠卵巢黄体数囊状卵泡数(图45)(其中,n=6/组)。

[0104] 由图41至图45可见,*B. vulgatus*小鼠的异常卵巢形态,包括出现的囊状卵泡及减少的黄体数,在给予GDCA(30mg/kg灌胃)后,可观察到其囊状卵泡消失,黄体数有所增加,表明GDCA可以使*B. vulgatus*小鼠的卵巢形态恢复正常。

[0105] 图46和图47体现了GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃模型小鼠的激素水平。对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠睾酮(图46)、LH(图47)水平(其中,n=6/组)。

[0106] 睾酮T和黄体生成素LH升高是PCOS患者内分泌异常的典型表现,T和LH水平的下降也被认为是PCOS改善的标志之一。由图46和图47可见,*B. vulgatus*小鼠升高的T、LH水平在给予GDCA治疗(30mg/kg灌胃)后可以恢复正常。

[0107] 图48为对照组、*B. vulgatus*灌胃小鼠、GDCA治疗*B. vulgatus*灌胃小鼠第一窝子代数(其中,n=6/组)。

[0108] 由图48可见,在生育力方面,GDCA治疗可使*B. vulgatus*小鼠降低的每窝产仔数恢复至正常水平。

[0109] 图49至图51体现了GDCA治疗DHEA小鼠模型的动情周期。对照组小鼠的典型动情周期(图49),GDCA灌胃小鼠的典型动情周期(图50),小鼠动情周期不同时期的统计图(图51)(其中,P为动情前期、E为动情期、M为动情后期、D为动情间期,对照组为DHEA小鼠,GDCA,DHEA小鼠采用GDCA灌胃3周,n=6/组)。

[0110] 由图49至图51可见,在DHEA诱导的PCOS小鼠模型上,通过给予GDCA(30mg/kg灌胃),发现小鼠紊乱的动情周期可以得到恢复。

[0111] 图52和图53体现了小鼠脂肪棕色化相关分子表达量。对照组、移植*B. vulgatus*菌小鼠及DHEA小鼠皮下脂肪棕色化相关分子表达量(图52),棕色脂肪脂肪棕色化相关分子表达量(图53)(其中,n=8/组)。

[0112] 白色脂肪棕色化可以改善PCOS小鼠的代谢水平及胰岛素抵抗,给PCOS大鼠移植棕色脂肪可以显著改善PCOS大鼠的卵巢多囊样改变及生育力下降等问题。由图52和图53可见,*B. vulgatus*灌胃小鼠皮下脂肪的Ucp1,Pgc1a,Cited1,Cox8b及棕色脂肪Ucp1,Pgc1a和Cox8b的表达水平显著下降。

[0113] 图54和图55为小鼠脂肪组织棕色化相关分子表达量。

[0114] 由图54和图55可见,给予GDCA治疗(30mg/kg灌胃)的*B. vulgatus*小鼠皮下脂肪

Ucp1, Pgc1a, Cited1, Cox8b及棕色脂肪Ucp1, Pgc1a, Cox8b的表达明显升高。

[0115] 实验小鼠:3周龄或6-8周龄大雌性小鼠,购自北京大学医学部实验动物中心,SPF级。用于生育力实验的雄鼠为10周龄大,生育力正常的雄鼠,购自北京大学医学部实验动物中心,SPF级。

[0116] 小鼠饲养:所有小鼠饲养于北京大学医学部动物房,3-5只/笼,饲养温度维持在25-25℃,光照时间为12L:12D的人工昼夜节律,自由摄食饮水。实验中所使用动物均经北京大学医学部和北京大学第三医院动物伦理委员会审核批准。

[0117] 实验细菌:普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*, ATCC8482)。所有细菌均购自美国ATCC公司。

[0118] 临床样本收集:

[0119] PCOS组:22-45周岁,2015年9月到2016年12月在北医三院生殖中心初诊的女性患者,符合鹿特丹PCOS诊断标准。

[0120] 对照组:22-45周岁,本院体检中心体检正常的健康正常的女性,无胰岛素抵抗,高血压、高血脂,无PCOS。

[0121] 排除标准:

[0122] (1) 入组前三个月未接受过治疗,未进行过肥胖性的外科手术及影响免疫系统的治疗;

[0123] (2) 无常规使用抗生素类药物或接受治疗史,三个月内未参与其他研究;

[0124] (3) 三个月内未服用过肝毒性药物,无关节炎、风湿性关节炎、肾脏和肝脏疾病;

[0125] (4) 无腹痛、便秘或腹泻等胃肠道症状;

[0126] (5) 非哺乳期、孕期妇女。

[0127] 所有入组对象签署知情同意书,填写调查问卷,测量身高、体重、腰围和臀围,实验过程通过北京大学第三医院伦理委员会审查。

[0128] 饮食要求:正常饮食,采样前一个月内不能服用任何药物及酸奶或其它含有益生菌类食物。

[0129] 标本收集:所有志愿者于月经第2-4天早晨空腹采血,离心1500rpm,10min,分装为500ul/管,-80℃保存。非经期嘱志愿者来本实验室留取适量粪便,立即分装为250mg/管,-80℃保存。

[0130] 粪便DNA提取(康为世纪提取粪便DNA试剂盒):

[0131] (1) 取250mg粪便样本,置于1.5mlEP管中,加入1mlBufferSW,涡旋振荡3-5分钟,使样本均匀分散于溶液中。12,000rpm离心1min,弃上清。

[0132] (2) 加入1mlBufferSL,涡旋振荡3-5min,使样本均匀分散于溶液中,65℃水浴20min,12,000rpm离心3min,将上清移至新的1.5mlEP管中。

[0133] (3) 向上清液中加入等体积BufferGL,颠倒混匀15-25次,冰上放置5min。12,000rpm离心5min,所得上清加入到已装入收集管的吸附柱中,12,000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

[0134] (4) 向吸附柱中加入500μlBufferGW1,12,000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中,重复一遍。

[0135] (5) 向吸附柱中加入500μlBufferGW2,12,000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,

将吸附柱重新放回收集管中。

[0136] (6) 12,000rpm离心2min,倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟,以彻底晾干。

[0137] (7) 将吸附柱置于一个新的1.5mlEP管中,向吸附柱的中间部位悬空滴加50-100 μ l灭菌水,室温放置2-5min,12,000rpm离心1min,收集DNA溶液,-20℃保存DNA。

[0138] DHEA动物模型的建立:21天大小的C57BL/6J雌性小鼠连续21天DHEA(6mg/100g体重,溶于0.05ml芝麻油内)皮下注射。对照组为连续21天芝麻油皮下注射。

[0139] 普通拟杆菌灌胃实验:将普通拟杆菌5000rpm,离心5min,弃上清,PBS重悬沉淀至 5×10^8 CFU/ml。给予21天大小鼠灌胃, 2×10^8 CFU/只,一周两次。对照组给予高压蒸汽灭活的普通拟杆菌灌胃,持续处理3周。

[0140] 胆汁酸灌胃实验:GDCA按30mg/kg体重灌胃,0.9wt%生理盐水配制,一天一次。

[0141] 小鼠动情周期检测:从给药第10天开始,每日上午9点行阴道涂片,直至造模完成。

[0142] 沾取:将消毒的细棉签用生理盐水润湿,轻轻插入小鼠的阴道内,慢慢转动一下取出。

[0143] 涂片:将带有阴道内含物的细棉签在载玻片上均匀的转动做成涂片,然后将涂片散在空气中自然干燥(以载玻片上发白为准)。

[0144] 固定:将玻片置于95%乙醇中固定30-60min。

[0145] 染色:将玻片置于绍氏液中10min左右,95%乙醇两遍,每遍数秒,纯乙醇两遍,3-5min/次;二甲苯两遍,5min/次。

[0146] 结果观察:将涂片置于显微镜下,观察阴道涂片的组织学变化,确定动情周期变化的不同阶段。

[0147] 动情前期(P):显微镜下可见阴道涂片中有核上皮细胞占优势,有的是单个的,有的呈片状,可伴有少量白细胞。

[0148] 动情期(E):涂片中有很多无核的角化鳞状细胞,细胞大而扁平,边缘不整齐,视野中看不到或很少白细胞与上皮细胞。

[0149] 动情后期(M):阴道腔内角化上皮细胞减少,出现许多白细胞及有核上皮细胞。

[0150] 动情间期(D):小鼠阴道粘膜薄,白细胞从粘膜内游离出来,使阴道涂片中几乎全是白细胞。

[0151] 糖耐量试验:

[0152] (1) 将小鼠换入干净的笼子禁食8h(禁食期间保证正常的饮水)后,称取每只小鼠的体重,并逐一对小鼠进行标记,以便在实验过程中能快速辨认所测小鼠。

[0153] (2) 用剪刀剪去小鼠尾巴末端约1-2mm,轻轻挤压尾巴让血液富集成一滴后,用血糖测试仪测定小鼠血糖水平,记为空腹血糖。

[0154] (3) 向每只小鼠腹腔注射剂量为2g/kg的葡萄糖溶液。

[0155] (4) 测定其空腹血糖值及注射葡萄糖后15min,30min,60min,120min采用尾静脉取血的方式测定小鼠的血糖值。

[0156] 胰岛素抵抗实验:

[0157] (1) 将小鼠换入干净的笼子禁食4h(禁食期间保证正常的饮水)后,称取每只小鼠的体重,并逐一对小鼠进行标记,以便在实验过程中能快速辨认所测小鼠。

[0158] (2) 用剪刀剪去小鼠尾巴末端约1-2mm,轻轻挤压尾巴让血液富集成一滴后,用血糖测试仪测定小鼠血糖水平,记为空腹血糖。

[0159] (3) 向每只小鼠腹腔注射剂量为1.5IU/kg的胰岛素。

[0160] (4) 测定其空腹血糖值及注射葡萄糖后15min,30min,60min,120min采用尾静脉取血的方式测定小鼠的血糖值。

[0161] 血激素检测:

[0162] 将所得血液3000g离心10min,取上层血清分装后-80℃冻存,根据胰岛素免疫分析试剂盒、睾酮定量测定试剂盒、LH定量测定试剂盒说明,用放射性免疫分析技术分析各激素含量。

[0163] 卵巢形态检测:

[0164] 取卵巢置于Bollin固定剂中固定24h,按常规梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等步骤制备石蜡切片,37℃烤干后常温保存备用。

[0165] 二甲苯洗2次,每次5min

[0166] 100%、95%、90%、80%、70%酒精梯度水化,每梯度5min,2次,结束后用蒸馏水洗两遍。

[0167] 苏木素复染15min后,蒸馏水5min洗2次;

[0168] 1%盐酸酒精浸30s,蒸馏水5min洗2次;

[0169] 1%伊红溶液染色5min后蒸馏水5min洗2次;

[0170] 70%、80%、90%、95%、100%酒精梯度脱水,每梯度5min,2次;

[0171] 二甲苯洗2次,每次5min;

[0172] 中性树胶封片。

[0173] 制片完成后,在光镜下观察卵巢形态,评估各组小鼠卵巢组织的形态结构学变化。

[0174] 总RNA提取:

[0175] (1) 准备细胞样品时,弃去培养液,用PBS洗3次,加入1mlTrizol吹打细胞;准备组织样品时,将组织块直接放入研钵中,加入少量液氮,迅速研磨。组织变成细粉状,加入Trizol50-100mg组织/ml,继续研磨,直到Trizol和组织充分混匀,静置5-10min,等融化了用枪吹打壁上残留,转移入1.5mlEP管,加入Trizol使总体积达到1ml。

[0176] (2) 按所加Trizol的1/5体积加入氯仿200μl,颠倒混匀,剧烈震荡30s呈乳状。冰上放置5min,可以看到水相和有机相慢慢分离。

[0177] (3) 离心4℃12,000rpm离心10min,吸取上层水相到新的1.5mlEP管(勿接触DNA层)。

[0178] (4) 按所加等体积的异丙醇混匀,充分混匀,-20℃过夜或者冰上放置10min。

[0179] (5) 4℃12,000rpm离心10min,弃上清,留管底沉淀RNA。

[0180] (6) 加入75%乙醇1ml(DEPC水配制)洗涤沉淀,温和振荡离心管悬浮沉淀,4℃12,000rpm离心5min,弃去上清,尽量减少残留液体。重复1遍。

[0181] (7) 室温晾干5-10min。加入20ul无菌DEPC水溶解RNA样品。

[0182] (8) 取1ul测定RNA浓度。OD值定量RNA浓度。

[0183] 生育力检测:

[0184] (1) 购买10周龄大雄性C57BL/6J小鼠,与无实验用途的性成熟雌鼠1:1合笼,雌鼠

见栓后雌雄分开；

[0185] (2) 确定雌鼠怀孕后,证明与其合笼的雄鼠性能力正常,可以使用,若不能使同笼雌鼠怀孕,则更换雄鼠；

[0186] (3) 挑选出足够数目的生育力正常的雄鼠,与待检测雌鼠1:1合笼

[0187] (4) 检验第一窝产仔数。

[0188] 虽然已经通过例子对本发明的一些特定实施例进行了详细说明,但是本领域的技术人员应该理解,以上例子仅是为了进行说明,而不是为了限制本发明的范围。本领域的技术人员应该理解,可在不脱离本发明的范围和精神的情况下,对以上实施例进行修改。本发明的范围由所附权利要求来限定。

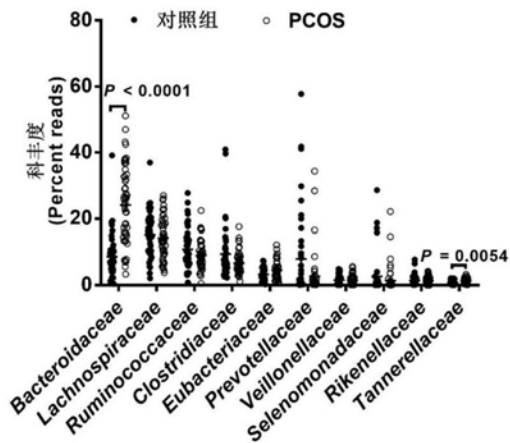


图1

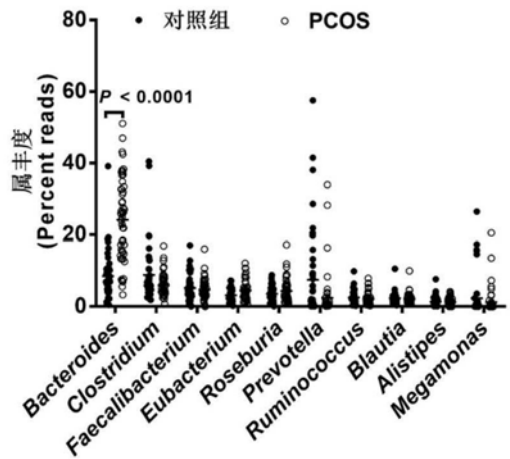


图2

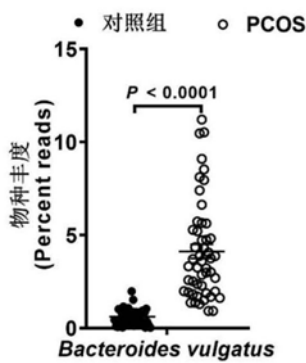


图3

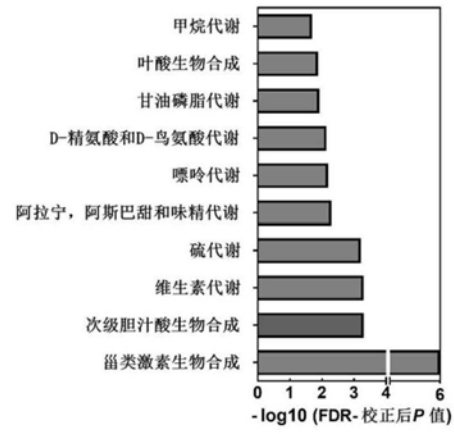


图4

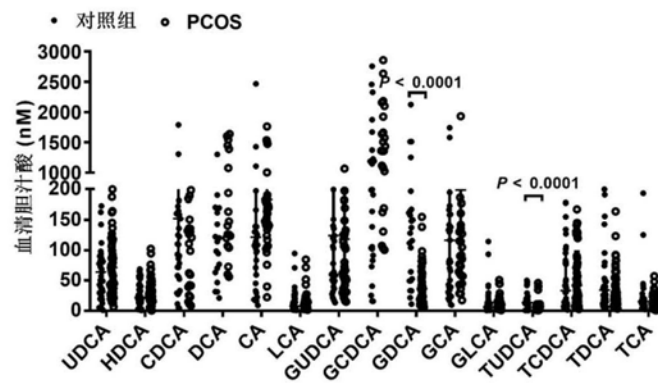


图5

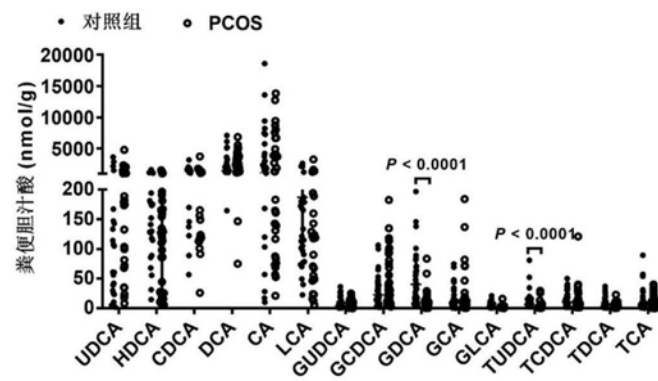


图6

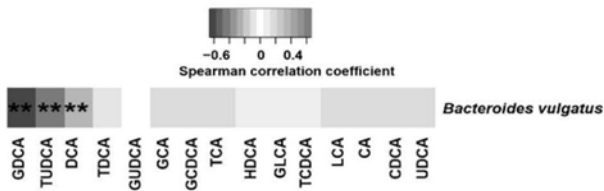


图7

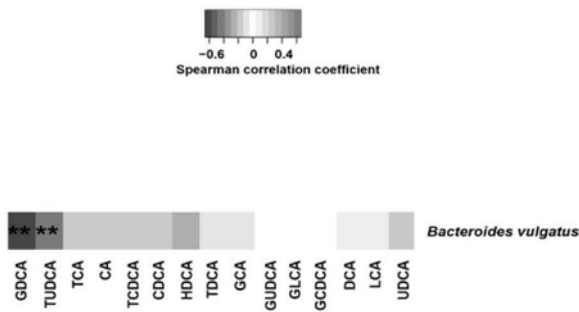


图8

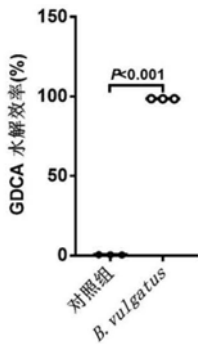


图9

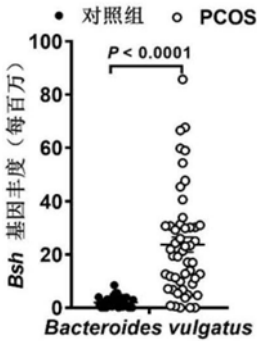


图10

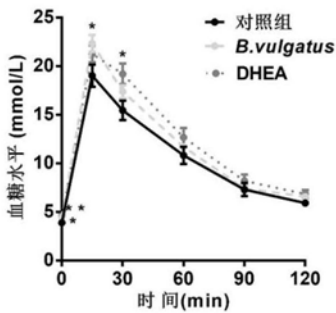


图11

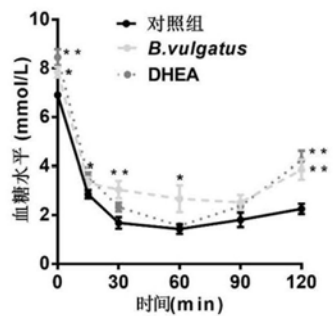


图12

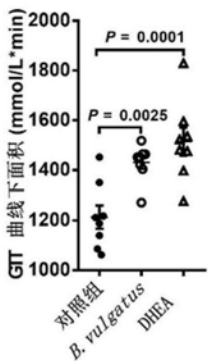


图13

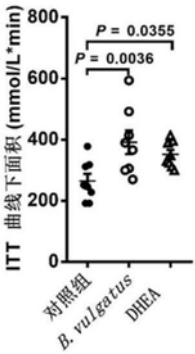


图14

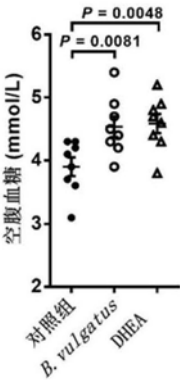


图15

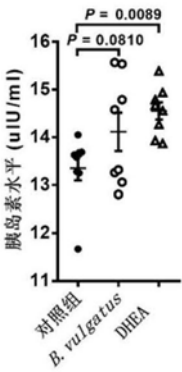


图16

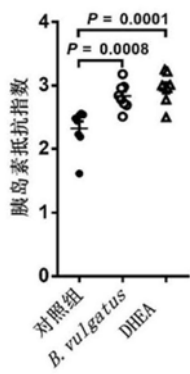


图17

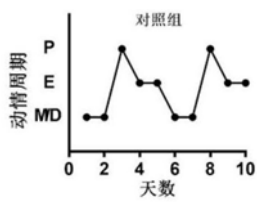


图18

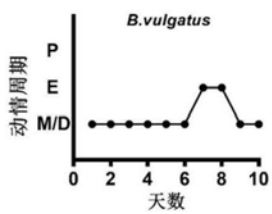


图19

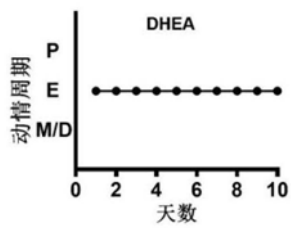


图20

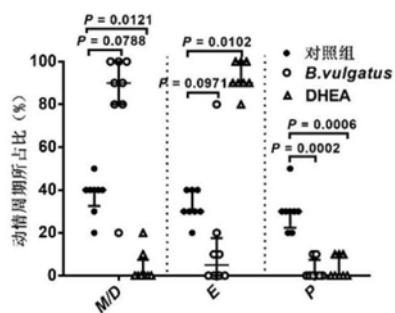


图21

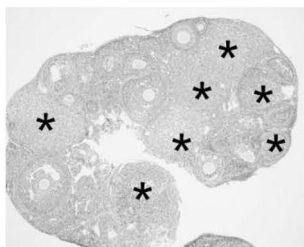


图22

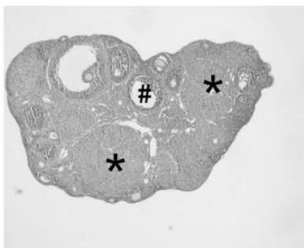


图23

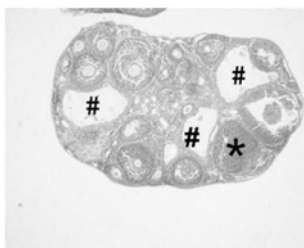


图24

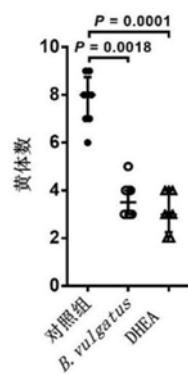


图25

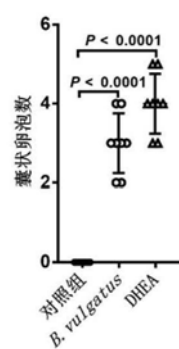


图26

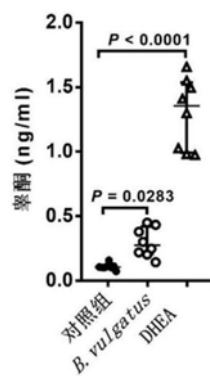


图27

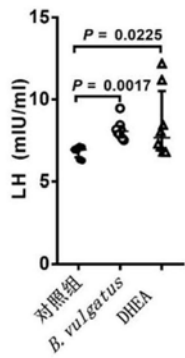


图28

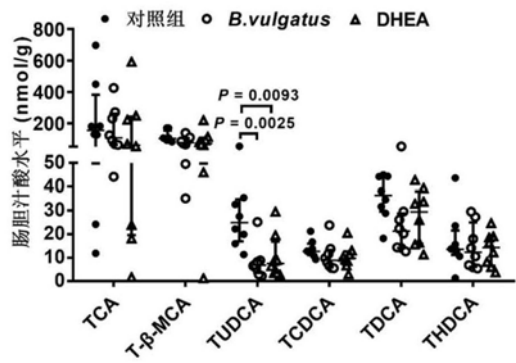


图29

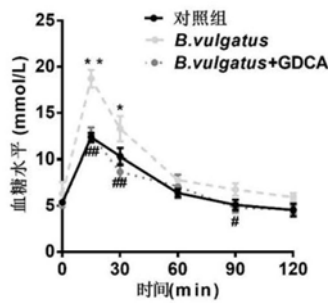


图30

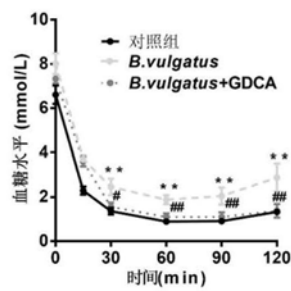


图31

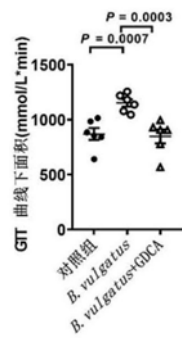


图32

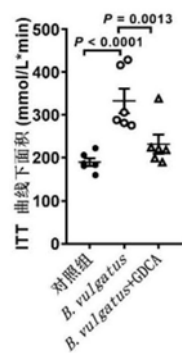


图33

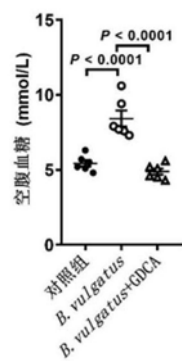


图34

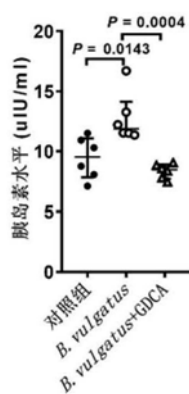


图35

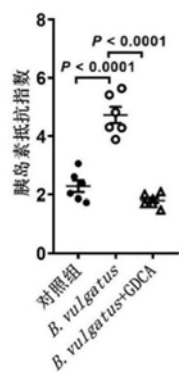


图36

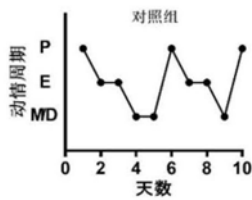


图37

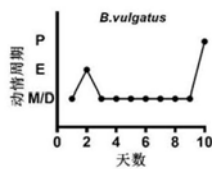


图38

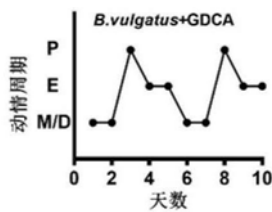


图39

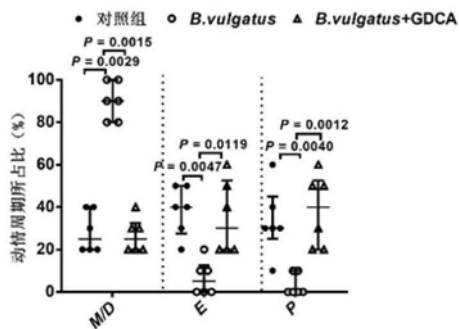


图40



图41

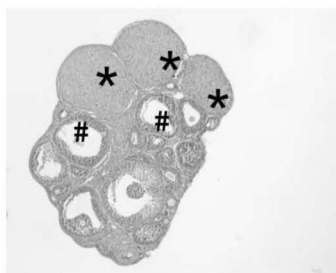


图42

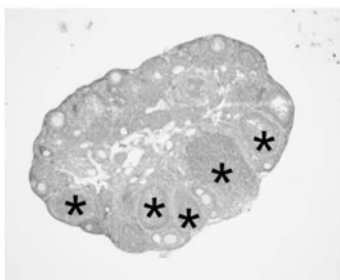


图43

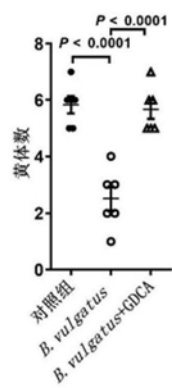


图44

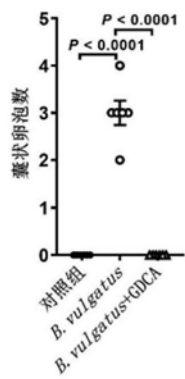


图45

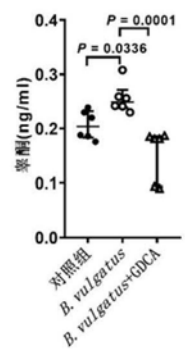


图46

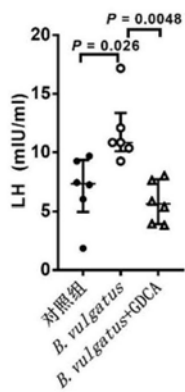


图47

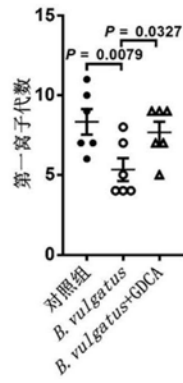


图48

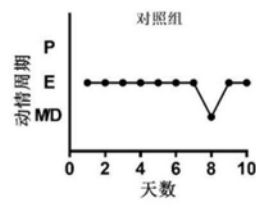


图49

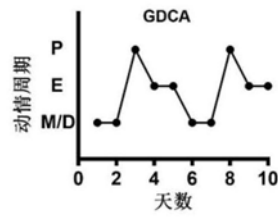


图50

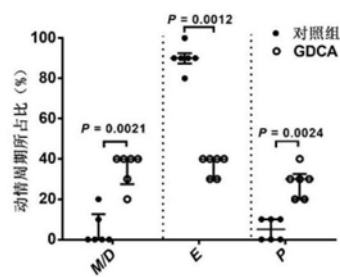


图51

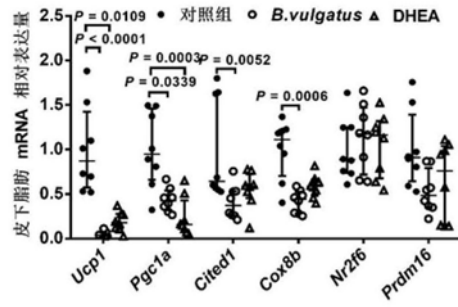


图52

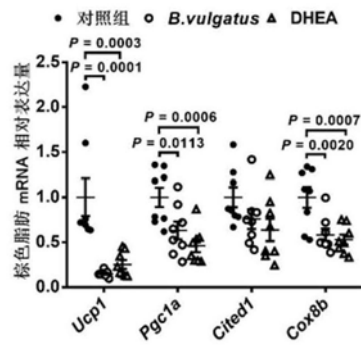


图53

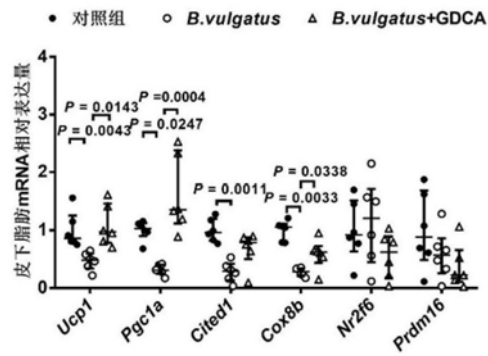


图54

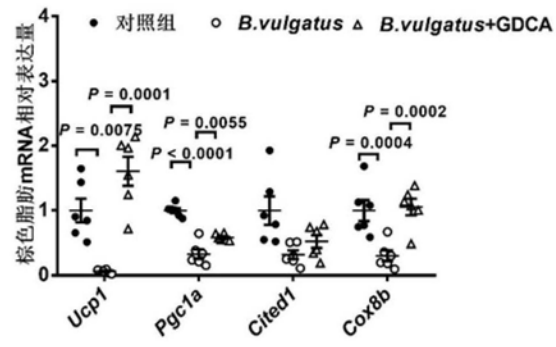


图55