(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104918640 B
(45)授权公告日 2019.03.19

(21)申请号 201380049249.5

(22)申请日 2013.09.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104918640 A

(43)申请公布日 2015.09.16

(30)优先权数据
61/696,277 2012.09.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.03.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/068202 2013.09.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/033330 EN 2014.03.06

(83)生物保藏信息
DSM 27123 2013.04.18 (续)

(73)专利权人 生命大地女神有限公司
地址 瑞典斯德哥尔摩S-103 64

(72)发明人 埃蒙·康诺利 沃尔夫冈·孔泽 约翰·宾斯托克

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 黄登高

(51)Int.Cl.
A61K 49/00(2006.01) (续)

(56)对比文件

Wang B et al..Luminal administration ex vivo of a live Lactobacillus species moderates mouse jejunal motility within minutes.《The FASEB Journal》.2010,第24卷(第10期),

Wim JEP Lammers et al..Simulation and analysis of spatio-temporal maps of gastrointestinal motility.《BioMedical Engineering OnLine》.2008,第7卷(第2期),

Rachael R. Roberts et al..Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps.《Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol》.2006,第292卷

审查员 张丽芳

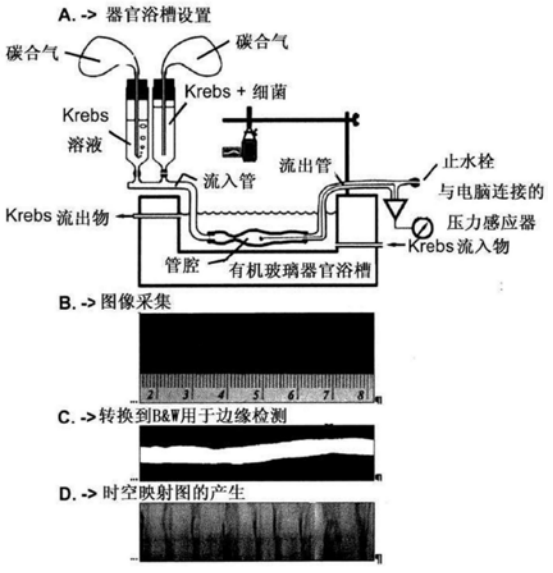
权利要求书1页 说明书17页 附图9页

(54)发明名称

一种用于选择影响肠道蠕动紊乱和疼痛的试剂的方法

(57)摘要

本发明提供了一种评估用于治疗不同的肠道蠕动紊乱试剂的方法,该方法利用与胃肠道的肌肉组织和神经系统相关的不同的方法论部分,所述胃肠道与大脑相通信。尤其是,本发明提供了一种用于选择有效治疗肠道蠕动紊乱的试剂的方法,其中所述方法包括:a)在胃肠段上进行时空(ST)映射步骤,分析所述试剂对胃肠蠕动的影响;和b)在胃肠段上进行体外神经束记录步骤,分析所述试剂对肠系膜传入神经放电的影响。本发明还提供了在肠道蠕动紊乱的治疗中,通过本发明的方法选出的菌株及其菌株的用途。



CN 104918640 B

[转续页]

[接上页]

(83)生物保藏信息

DSM 27126 2013.04.18

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)
A61K 35/747(2015.01)
A61P 1/10(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
C12R 1/225(2006.01)

1.一种用于选择有效治疗肠道蠕动紊乱的试剂的方法,其中,所述方法包括:

a)在胃肠段进行时空(ST)映射的步骤,以分析所述试剂对胃肠蠕动的影响;和

b)在胃肠段进行体外神经束记录的步骤,以分析所述试剂对肠系膜传入神经放电的影响。

2.如权利要求1所述的方法,其中,在步骤a)中的所述时空(ST)映射是通过视频图像进行。

3.如权利要求2所述的方法,其中,步骤a)包括使用ST映射图来测量在所述胃肠段中的移行性复合运动(MMC)频率和/或移行性复合运动(MMC)速率。

4.如权利要求3所述的方法,其中,步骤a)进一步包括管腔内压力的测量。

5.如权利要求4所述的方法,其中,所述管腔内压力测量的是管腔内峰值压力(PPr)。

6.如权利要求1到5任一项所述的方法,其中,步骤b)包括测量肠系膜传入神经束的自发放电频率。

7.如权利要求1到5任一项所述的方法,其中,所述胃肠段是空肠和结肠段的体外段。

8.如权利要求7所述的方法,其中,所述胃肠段来自于老鼠。

9.如权利要求1到5任一项所述的方法,其中,在管腔内施用试剂之前和之后进行步骤a)和b)。

10.如权利要求1到5任一项所述的方法,其中,所述试剂是全细胞、微生物、蛋白质、多肽、或酶。

11.如权利要求10所述的方法,其中,所述微生物是菌株。

12.如权利要求11所述的方法,其中,所述菌株是通过如权利要求1到11任一项所述的方法选择出来的。

13.如权利要求12所述的方法,其中,肠道蠕动紊乱是需要降低物料通过胃肠道的传送时间,并且其中在步骤a)中,所述菌株表现出增加胃肠蠕动的能力,在步骤b)中所述菌株表现出减少肠系膜传入神经放电的能力。

14.如权利要求13所述的方法,其中,在步骤a)中,所述菌株表现出增加MMC频率或增加MMC速率或增加管腔内压力的能力,在步骤b)中所述菌株表现出减少发送疼痛信号的能力。

15.如权利要求13或14所述的方法,其中,所述菌株是LG345A(DSM 27123)。

16.如权利要求12所述的方法,其中,肠道蠕动紊乱是需要增加物料通过胃肠道的传送时间,并且其中在步骤a)中,所述菌株表现出减少胃肠蠕动的能力,在步骤b)中所述菌株表现出减少肠系膜传入神经放电的能力。

17.如权利要求16所述的方法,其中,在步骤a)中,所述菌株表现出降低MMC频率或降低MMC速率或降低管腔内压力的能力,在步骤b)中所述菌株表现出降低发送疼痛信号的能力。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中,所述菌株是LG621A(DSM 27126)。

19.如权利要求15所述的方法,其中,所述菌株LG345A(DSM 27123)用于治疗治疗肠道蠕动紊乱、便秘或肠绞痛的用途。

20.如权利要求19所述的方法,其中,所述便秘是老年患者或孕妇中,或其中所述肠绞痛是婴儿肠绞痛。

21.如权利要求18所述的方法,其中,所述菌株LG621A(DSM 27126)用于治疗肠易激综合症。

一种用于选择影响肠道蠕动紊乱和疼痛的试剂的方法

背景技术

技术领域

[0001] 胃肠蠕动紊乱的术语适用于通常与疼痛，便秘或腹泻有关的异常的肠道收缩。这个词语用来描述多种紊乱，在紊乱中由于各种原因导致肠道没有正确发展或失去了协调肌肉活动能力。这种紊乱可以多种方式显现，并且包括但不限于下述情况：

[0002] • 腹胀

[0003] • 复发性梗阻

[0004] • 肠绞痛

[0005] • 便秘

[0006] • 胃食管返流疾病

[0007] • 顽固、复发性呕吐

[0008] • 腹泻

[0009] • 肠易激综合征(IBS)

[0010] • 炎症性肠病

[0011] • 大便失禁

[0012] • 婴幼儿肠绞痛

[0013] • 经常反复发作的腹痛(FRAP)

[0014] • 反胃

[0015] • 食物不耐受

[0016] 广义上讲，在将食物和分泌物运输至消化道中任何重大的改变都可认为是一种胃肠蠕动紊乱。

[0017] 需要对胃和肠道进行适当的协调运动以沿着消化道消化和推进肠内容物。胃肠道(GI)适当蠕动所必需的收缩和放松的模式是复杂的，并且这种模式使用胃肠道(GI)壁内的神经和肌肉。每天，在任何时候，许多因素都会影响胃肠道(GI)的蠕动(如，体能锻炼、情绪困扰)。新生婴儿必须发展在胃肠道(GI)中的蠕动的复杂系统。胃肠蠕动紊乱的发病机理大部分是在多因素情况下产生的。

[0018] 遍及小肠和大肠中，虽然神经和肌肉系统的整体组织结构相似，但是每个部分都有不同的运动行为。伴随偶尔较长时间蠕动和逆蠕动复合物的固定或短传播的收缩发生在喂食期间和之后，这使得食物团分解并与消化液相混合以进行适当的吸收。消化后运动肌动程序更改到具有较长传播的收缩程序，这个收缩程序将消化后的产品移动到肛门方向。发生其他的更频繁的运动行为，使得蠕动波(即小肠环肌的收缩)允许未消化的食物通过肠道的进程。

[0019] 衰老、痴呆、中风、帕金森症、脊髓损伤、在分娩期间的直肠撕裂、糖尿病、手术并发症和神经肌肉紊乱(如，重症肌无力)可能会导致蠕动紊乱。

[0020] IBS，一种常规诊断的肠道蠕动紊乱，数十年以来已被认为是一种结肠的疾病，但

是关于胃肠道(GI)蠕动的研究已证明潜在的蠕动失调也可能在小肠中发生。IBS可伴有腹痛。

[0021] 肠易激综合症(IBS)的成因仍然未知。根据一些报道,患有肠易激综合症(IBS)的病人的小肠和结肠比普通人的小肠和结肠对温和的刺激更加敏感和活跃。

[0022] 偶尔,摄取某些食物之后可能会发生大便失禁。糖、不溶性纤维和淀粉(大米除外)通常是在肠道内分解,形成可变量的必须排出的气体。大多数患有乳糖酶缺乏的人不能消化乳糖,所述乳糖是在一些食品(如牛奶、蛋糕)中常见的糖。患有乳糖缺乏的人在摄取乳糖后可能会出现失控的液体腹泻。

[0023] 在美国便秘是最常见的消化疾病,但是尽管直到病人发展到二级紊乱,例如肛肠紊乱或憩室疾病,它的频率往往无法确认。

[0024] 没有广泛接受的在临床上有用的便秘的定义。卫生保健提供者通常利用排便的频率(即每周排便少于3次)来定义便秘。然而,罗马标准(最初于1988年引入,并随后修改了两次生成罗马III标准)已成为便秘的研究标准定义。

[0025] 根据针对便秘的罗马III标准,患者必须在之前的3个月中经历至少2种下述症状:

[0026] • 每周排便少于3次

[0027] • 绷紧

[0028] • 块状或硬的粪便

[0029] • 肛肠梗阻的感觉

[0030] • 排便不完全的感觉

[0031] • 排便需手动操纵

[0032] 便秘是频繁的慢性的,能够显著影响个人的生活质量,并且可能与数量相当大的卫生保健费用有关。在过去的一年期间,如果便秘发生至少12周(总计,未必是连续地),便可认为是慢性的。

[0033] 无论是原发性或继发性,便秘通常有几种原因。这些原因中最常见的有以下几种:

[0034] • 缺乏纤维的饮食

[0035] • 怀孕

[0036] • 与生活方式变化(如,旅游、新工作或离婚)相关的心理便秘和临床抑郁,患者忽略了排便的欲望

[0037] • 甲状腺功能减退

[0038] • 电解质不平衡,尤其是如果涉及到Ca^{++}或K^{+}

[0039] • 肿瘤在肠道上产生机械性压迫,或者内部或者外部

[0040] • 神经系统损伤

[0041] • 衰老

[0042] • 帕金森症

[0043] • 铅、汞、磷或砷中毒

[0044] 便秘在怀孕期间是很常见的。由于更高水平的孕酮激素和可能是作为产前维生素的额外的铁,肌肉收缩通常使食物缓慢移动通过肠道。有时这也伴随有下腹部疼痛。

[0045] 便秘也与增加的年龄有关,所谓的“肠道老化”常见于尤其是超过70岁并且在慢性病护理机构中的人。这种情况伴随着:

[0046] • 响应于导致肠肌层功能失调的直接刺激的在受损的肌间神经丛中的神经元的数量减少

[0047] • 左侧结肠增加的胶原沉积，导致结肠和直肠顺应性异常和蠕动不良

[0048] • 对结肠环肌层的抑制性神经输入振幅的减少，导致节段性运动协调不足

[0049] • 在60岁以及更老的人中等离子内啡肽和肠道受体的结合的增加

[0050] 在胃肠蠕动紊乱年龄谱的另一端，来自婴儿肠绞痛的持续或过度的哭泣是婴儿期最苦恼的问题之一。这对于婴儿、父母、以及所涉及的医护人员来说是苦恼的。烦躁的婴儿的父母们可能认为哭泣是对他们的照顾能力的控诉或是他们的孩子生病的证据。婴儿肠绞痛是随着时间的推移解决的情况。

[0051] 对于肠绞痛最广泛接受的定义是韦赛尔(Wessel)标准或“三法则”：每天哭泣持续多于三个小时，每周发生多于三天，并且持续多于三个星期。这个定义也需要婴儿是“健康和吃得好”。

[0052] 继发于假定的自主神经机能失调的肠能动性增强也被认为是肠绞痛的一个病因。许多调节运动行为的机制在婴儿中是不成熟的。这些机制的不成熟性可能会导致增加对喂养不耐受性的可能性。因此，肠绞痛可能是在婴儿(在一个或多个方面的蠕动规则中具有成熟障碍)的亚群体中的常见的临床表现。

[0053] 根据一些流行病学报告，多达3000万美国人具有胃肠蠕动紊乱。来自医学文献的现有数据表明，在世界范围内，所有的胃肠道(GI)情况的30-45％均与胃肠蠕动紊乱有关。

[0054] 目前的治疗和建议取决于蠕动紊乱的类型而发生变化，对于便秘的一些示例为：

[0055] • 纤维或膨胀剂(对于慢传输性便秘没有用)

[0056] • 大便软化剂

[0057] • 刺激性泻药

[0058] • 渗透性泻药(例如聚乙二醇)

[0059] • 氯化物-通道活化剂(例如鲁比前列酮(Lubiproston))

[0060] • 血清素激活剂(5-HT4受体激动剂)

[0061] 进一步研究了乳酸菌(LAB)在随机临床试验中的用途：副干酪乳杆菌-富集洋蓟在具有功能性便秘患者的治疗中的功效(Riezzo等；Aliment Pharmacol Ther.2012Feb；35(4)：441-50)

[0062] 另外，将90名母乳喂养的肠绞痛的婴儿随机分配到在实验中用罗伊氏乳杆菌或聚二甲硅氧烷的治疗中。在基线处，在两组中平均每天哭闹时间为197分钟。在完成试验的83名婴儿中，用罗伊氏乳杆菌组的平均每天的哭闹时间比聚二甲硅氧烷组要低，在7天时(159：177分钟)和28天时(51：145分钟)(Savino F等，Pediatrics.2007；119(1)：e124)。

[0063] 胃肠蠕动紊乱适用于通常与疼痛有关的异常肠道收缩，对于不同的紊乱有许多不同种类的治疗方法和建议，其中一些治疗方法和建议要比许多其他的治疗方法和建议更加有效。

[0064] 因此，存在总体需要和具体问题，解决各种运动紊乱；即如何最好地选择试剂来规范或治疗胃肠蠕动紊乱和肠/肠道疼痛。

发明内容

[0065] 本发明的发明人在此开发出一种新方法，所述新方法用于评估对于不同胃肠蠕动紊乱进行治疗的试剂，其利用涉及到胃肠道(GI)的肌肉组织和神经系统、以及它们与大脑的通信的区别方法部分。

[0066] 因此，本发明涉及一种用于选择有效治疗胃肠蠕动紊乱的试剂的方法，其中所述方法包括：

[0067] a)在胃肠段进行时空(ST)映射的步骤，以分析试剂对胃肠蠕动的效果；和

[0068] b)在胃肠段进行体外神经束记录的步骤，以分析试剂对肠系膜传入神经放电的影响。

[0069] 在优选的实施例中，在步骤a)中的ST映射是通过视频图像或录像进行的。在本发明的方法中，步骤a)优选地包括在步骤a)中使用ST映射图，以测量在胃肠段中的移行性复合运动(MMC)的频率和/或移行性复合运动(MMC)的速率。

[0070] 在本发明的方法中，步骤a)优选地进一步包括管腔内压力的测量，例如管腔内的峰值压力(PPr)。

[0071] 在本发明的方法中，步骤b)优选地包括测量肠系膜传入神经束的自发放电频率。

[0072] 在优选的方面中，本发明公开了用于选择对蠕动紊乱有效的试剂的两步法。在第一步中发明人结合管腔内压力记录和时空映射图来分析不同的试剂对蠕动的影响。在这一步骤中优选测量管腔内峰值压力(PPr)，由试剂在老鼠体外空肠和结肠段应用前和应用后的视频录像。在本方法中的第一步中也计算出移行性复合运动的频率和速率。在第二步中分析出肠神经信号并测量出肠系膜传入神经束的自发放电频率。因此，本发明公开了一种用于选择对蠕动紊乱有效的试剂的方法，所述方法包括第一步骤和第二步骤，所述第一步利用除了视频录像和时空映射图之外还利用管腔内压力变化同步记录，所述第二步骤是神经信号的分析，例如通过采用肠系膜(如细胞外肠系膜)，神经记录。

[0073] 因此，在进一步的实施例中，本发明提供了一种用于选择有效治疗胃肠蠕动紊乱的试剂的方法，包括步骤：

[0074] (a)在肠道样本中存在和缺乏试验试剂的情况下，记录管腔内的压力，创建时空(ST)映射图以启动分析不同试剂对胃肠蠕动的效果的分析，其中所述时空映射图是用来测量移行性复合运动频率和速率；和

[0075] (b)在肠道样本中存在和缺乏试验试剂的情况下，通过测量肠系膜传入神经束的自发放电频率分析肠神经信号传输。

[0076] 在该方法的优选实施例中，在步骤(a)中测量出管腔内的峰值压力(PPr)。

[0077] 本发明涉及上述两步法，也涉及新菌株。

附图说明

[0078] 图1：器官蠕动记录

[0079] 图2：来自蠕动记录的图片和数据输出

[0080] 图3：来自蠕动记录的图片和数据输出

[0081] 图4：肠系膜神经记录；肠的神经分布

[0082] 图5：细胞外记录

[0083] 图6:StMAP插入软件的详情

[0084] 图7:表示步骤a)结果的曲线图。试验试剂是(A)L.gasseri(LG)345A(DSM 27123),(B)L.gasseri(LG)621A(DSM 27126),(C)L.gasseri T1,(D)L.gasseri T2,(E)L.reuteri ATCC PTA 6475,(F)L.reuteri DSM 17938和(G)L.rhamnosus(JB-1).

[0085] 图8:表示步骤b)结果的曲线图。试验试剂是L.rhamnosus(JB-1),L.reuteri DSM 17938,L.reuteri ATCC PTA 6475,L.gasseri(LG)345A(DSM 27123),L.gasseri(LG)621A(DSM 27126),L.gasseri T1和L.gasseri T2.

[0086] 发明详细说明及其优选实施例

[0087] 为了便于理解本发明,以下定义了一些术语。

[0088] 此处所用术语“管腔内峰值压力”(PPr)是以管腔内压力记录为基础,在肠道部分的纵轴中点处测量出管腔内压力变化。分析出压力信号并且识别和测量出管腔内峰值压力(PPr)。

[0089] 此处所用术语“移行性复合运动频率”(MMC频率)是通过在时空映射图中计数暗MC带的数量而计算得出的。

[0090] 此处所用术语“移行性复合运动速率”(MMC速率)是从由移行性复合运动产生的时空映射图中每波段的斜率测量得到的。

[0091] 此处所用术语“放电频率”是用来测量通往大脑的感知脉冲序列。

[0092] 此处所用术语“试剂”用来指任何物质或材料,包括整个细胞、微生物、蛋白质、多肽、酶、分子或其他生物或化学物质,上述物质可用于影响哺乳动物的肠道系统中的蠕动和或疼痛。优选的试剂是菌株,如益生菌菌株。

[0093] 本发明的方法是一种两步法,该两步法以时空(ST)映射方法为基础(步骤1),结合用于体外神经束记录的改进的技术(步骤2),在该两步法以中切除了胃肠道部分,有或没有包含神经束的肠系膜拱道,提供了由脊髓和迷走神经纤维两者组成的部分。

[0094] 在目前优选的方法的第一步骤中,管腔内压力记录与时空映射图相结合来分析不同试剂对蠕动的效果。

[0095] ST映射图提供了用于观察时间演变和空间改变领域的工具,可用于胃肠蠕动的分析,所述胃肠蠕动包括健康和蠕动紊乱的行为。利用时空视频成像,本发明人开发出使用计算机分析肠道直径变化的时空映射图的新方法的一部分。这揭示了难以用任何其它技术检测的运动模式。这些模式的参数与具有人类肠道药理学的老鼠体外肠道部分得到的结果直接相关。实时数字记录蠕动传播复合运动(MCs)或混合运转(静止的MCs)并且存储这些图像。分析软件(在下面进一步描述)来检测肠的边缘,并且最后能够自动计算沿着该肠道部分长度方向的直径。通过程序利用该数据来构建时空映射图,所述时空映射图能够提取关于运动模式的高度特定信息;例如,移行性复合运动(MMC)频率(神经依赖MMC频率),MMC速率和肌原性(相关的慢波)收缩的收缩比率。

[0096] 进一步,肠道微生物发送信号至大脑作为所谓的微生物组-肠-大脑轴的一部分开始被接受。然而,鲜为人知的是在神经系统的发展或功能中肠微生物组的作用。目前未知的是由肠传递到中枢神经系统的神经信号的定量性质。

[0097] 单个的感觉神经元,包括在迷走神经纤维中的,把连续的物理刺激表示成可对刺激的形状和强度进行编码的图案脉冲序列。除此之外,刺激可以在总体代码中表示出来,所

述总体代码通过在束中的活性纤维的数量而确定。通过初级传入到达大脑的所有信息必须编码成神经脉冲序列语言。因此，知道感知脉冲序列如何受到共生菌株、益生菌菌株以及不同物质的影响，通过他们对初级传入放电的影响，能够使我们确定新的有益的肠道微生物和他们的活性分子，以及新的药物和其他能够在这个信号系统中干预的各种方式的化合物。

[0098] 本发明的用于评估对于不同的胃肠蠕动紊乱治疗的试剂的新方法，允许试剂的特定影响的差异性，例如益生菌菌株或其它生物或化学试剂，对肌肉和神经的影响。实验数据证实能够在胃肠道的一定部位调节(例如混合模式或推动模式)不一定是相同的试剂，这些试剂在调节与肠和/或中枢神经系统有关的疼痛中也是最有效的。

[0099] 此外，为了调查在不同疾病中某种分子的影响，我们的方法允许腔内灌注和扩散到并贯穿上皮障碍的不同研究。蠕动的两个基本模式是通过消化管指导进行的：

[0100] 推动：必须将食物沿着消化管的整个长度推动，以便使食物受到连续的一系列的涉及分解和吸收的过程。特别在食道和小肠中出现的推动运动的主要类型是蠕动-肌肉收缩环将摄取物块从口腔侧并朝向肛门移动，在这个方向上推动内腔的内容物；随着环的移动，在扩张区域的另一侧肌肉放松下来，便于形成块状物的光滑通道。

[0101] 混合：如果仅仅推动摄入材料通过消化管，人们可预料到消化和吸收会非常差，因为消化酶没有与摄取物充分混合，并且大量的摄取物不会与吸收营养物质(包括水)的上皮细胞相接触。节段性收缩是一种混合运动的常见类型，尤其可见于小肠-切碎并混合摄取物的收缩的节段环中。在肠道壁上的纵肌的交替收缩和放松也为它的内容物提供了有效的混合。

[0102] 可以检测并记录此处使用的新方法，所述新方法改变肠道运动，可视为混合模式(喂食后)或推动模式，利用ST-映射法可清楚地看到，结合由不同的蠕动紊乱引起的疼痛的变化，并集中或外围体现。

[0103] 一种疼痛是由于腹部脏器(器官)的伤害感受器的激活而产生的内脏疼痛。内脏结构对膨胀(拉伸)、缺血和炎症是高度敏感的，但相对于其他正常引起疼痛的刺激并不敏感。内脏疼痛是分散性的，难以定位并且经常关联到远处，通常在表面的结构。它可能伴随有如恶心、呕吐、生命体征变化以及情感表现的症状。可以将疼痛描述为令人作呕、通彻、郁闷和迟钝。不同的结构病变或生化异常仅在部分患者中解释了这种类型的疼痛。这些疾病有时被分组为胃肠神经肌肉疾病(GINMD)。人们也可以体验内脏疼痛，通常实际上非常强烈，没有任何结构、生化或组织病理学的证据解释这种症状。

[0104] 疼痛感受器是一种感观感受器，其通过向特定的疼痛感受神经元(Aδ或C)发送动作电位，响应潜在的疼痛刺激，所述疼痛感受神经元(Aδ或C)传送到脊髓的前外侧束(加上小的迷走神经突起)，然后传送到丘脑和包括岛叶皮质和扣带回皮质的前脑。源自于肠道病理的疼痛感的关键是，疼痛信息从肠经由外在的初级传入纤维到达中枢神经系统的活化，所述初级传入纤维在肠系膜传入神经束中行进。

[0105] 在本发明的系统中，人们读出蠕动和疼痛的变化，作为对于肠道的特定和选定的部分的蠕动模式(例如PPr、MMC速率和/或MMC频率)或收缩振幅或增加的传入肠系膜神经脊髓传输的改变。令人惊讶的发现不同的试剂可以促进在胃肠道的一部分中混合和在另一部分中的推动，或者根本没有影响，并且不同的试剂在胃肠道的一部分中影响疼痛信号系统，

但不会影响胃肠道的另一部分，并经由不同的神经通路如迷走神经或用于穿过背根神经节的内脏痛。这种精确的区域特异性突出了我们的方法在评估试验分子的影响方面的能力和特异性。

[0106] 因此本发明的目的是通过利用此模型，寻找适合治疗、预防或调节特定的蠕动紊乱的试剂。

[0107] 在本方法中呈现的两个步骤将提供在胃肠蠕动和肠系膜传入神经放电上的数据。分析这些参数将导致选择对胃肠蠕动紊乱的治疗有效的试剂的方法。因此，使用在所提供的方法中的步骤a)和步骤b)的试剂的效果分析来确定试剂是否对胃肠蠕动紊乱的治疗有效。

[0108] 在步骤a)中测量的优选参数是MMC频率和/或MMC速率，并且这可很方便地通过ST映射图来完成，所述ST映射图优选地由视频图像生成，例如利用视频录像，并且优选地包括亮色和暗色的交替带模式，其包含3组信息：沿着肠的位置(纵坐标)，时间(横坐标)和肠直径(应用或z轴)。利用这些变量，时空映射图可以成为蠕动“指纹”，它的灵敏度在定义详细的和有细微差别的影响方面是很重要，特定的益生菌菌株和其他试剂对蠕动具有影响，还具有区分他们的能力。

[0109] 在步骤a)中测量的其他优选参数是管腔内压力，特别是管腔内峰值压力(PPr)。其他参数，例如实施例中所描述的，可任意从方法中的ST映射图和在步骤a)中测出。

[0110] 在步骤b)中测量的优选参数是肠系膜传入神经束的自发放电频率。这种技术可用于确定由不同的治疗方法诱发的肠系膜神经纤维的可激发性的变化。

[0111] 分析这些参数中的一个或多个将产生选择对蠕动紊乱有效的试剂的方法。在实验的实施例和附图中描述用于生成ST映射图和测量这些参数的适当的方法和设备。

[0112] 因此，在优选的方法中，在呈现的方法中的两个步骤将给出管腔内峰值压力(PPr)、MMC频率、MMC速率和肠系膜传入神经束的自发放电频率的数据。分析所有这些参数会产生选择对蠕动紊乱有效的试剂的优选方法。

[0113] 本发明的方法可以用来寻找用于不同蠕动紊乱的合适的试剂。选择试剂以一种有益的方式去影响患者的MMC速度和/或MMC频率和/或PPr和神经放电频率，以便影响、预防或治疗蠕动紊乱。

[0114] 本方法的步骤a)使用胃肠段的ST映射(ST分析)来分析试剂对胃肠蠕动的影响。为了做到这一点，优选地，使用ST映射图来测量MMC频率和/或MMC速率。ST映射图方便地显示了MC波段的图像，从图像中可以测量出频率和速率，例如实验的实施例中所描述的。此外，优选地管腔内压力和，更优选地，在胃肠段内测量的管腔内峰值压力(PPr)。

[0115] 在本发明的方法中使用的胃肠段可来自胃肠道的任何适当的部分，例如可以是小肠(例如空肠)或是大肠(例如结肠)的一段。用于本方法步骤b)的适当的段需要存在合适的神经束，以能够测量肠系膜传入神经放电。这可以通过带有附加肠系膜组织的胃肠段来方便地提供，例如实验实施例中所描述的。因此，本发明的方法可方便地在从合适的实验动物的体外段上进行，例如在小鼠胃肠段(如小鼠结肠段或空肠段)。令人惊讶的是，本发明的方法能够检测相同试剂对肠道部分的两种类型的活性差异。进行试剂对小肠与大肠的影响的比较的能力可能是有利的，尤其是，根据待治疗的肠道蠕动紊乱和临床阶段和其症状，有区域特异性的治疗，例如针对小肠或大肠的特异性是有益的。

[0116] 试剂诱发的胃肠蠕动变化可以检测出来作为本方法步骤a)的解读，例如蠕动模式或收缩振幅的改变。一些试剂没有任何效果。能够增加胃肠蠕动的试剂，例如通过增加MMC频率和/或MMC速度和/或管腔内压力(如PPr)，可能会对治疗如便秘和肠绞痛的紊乱有用，它将有利于提高沿着消化管的有推进力的蠕动。如果试剂显示出减少或没有显著改变胃肠蠕动，例如通过减少或不显著改变MMC频率和/或MMC速率和/或如PPr的管腔内压力，那么这样的试剂不可能对治疗这种紊乱有用，并且人们也不会去选择，尤其是如果所有测量的参数存在减少或没有显著变化。然而，能够导致胃肠蠕动减少的试剂，例如通过减少MMC频率和/或MMC速率和/或如PPr的管腔内压力的一个或多个，可能会有助于治疗如肠易激综合症或腹泻的紊乱，它将有利于降低沿着消化管的有推进力的蠕动。

[0117] 特别优选通过本发明方法的试剂来增加胃肠蠕动，例如增加大肠段的MMC频率和/或MMC速率和/或如PPr的管腔内压力，以选择用于治疗便秘或肠绞痛的试剂。

[0118] 本发明方法的步骤b)分析了试剂对肠系膜传入神经放电的影响(疼痛信号)，并由此可以用作对疼痛的解读，即不论试剂是否可能对疼痛有影响，如内脏疼痛。对传入神经放电有增加或无显著影响分别表明试剂可能会导致疼痛的增加，或对疼痛无显著影响，而传入神经放电的减少表明试剂将会减少疼痛。因此那些优选的试剂会导致传入神经放电的减少，如减少传入神经束的自发放电频率。另外，如果由方法的步骤b)测量的菌株显示出有益的性能，可以选择对神经放电没有引起显著变化的试剂。

[0119] 将待试验的试剂以任何适当的方式添加到选好的肠胃段。将试剂方便地添加到该段的管腔内空间中，即管腔内施用。为了分析试剂对蠕动(在步骤a中)或发送疼痛信号(在步骤b中)的影响，所述步骤在存在和缺少试剂的情况下方便地进行。例如，步骤a)和步骤b)在施用试剂之前和之后进行。因此，在这些方法中，将试剂的效果与适当的控制相比较，例如将在试验试剂存在下的结果与缺少试验试剂下的结果相比较，如单独加缓冲液相对于加有试剂的缓冲液(例如加有菌株的缓冲液)的结果。

[0120] 因此，本发明的进一方面提供了通过本发明的方法选择的试剂。优选的试剂是微生物，更优选地是菌株，优选的是益生菌菌株。通过本发明的方法选择的试剂可采取药物化合物或组合物或营养化合物或组合物的形式。

[0121] 如上所述，根据期望得到治疗的蠕动紊乱，选择标准会有所不同。例如，如果胃肠蠕动紊乱是一种想要降低材料穿过肠道的通过时间(或增加沿着消化管的有推动力的蠕动)，如便秘、返流或肠绞痛，然后在方法的步骤a)中，所关注的试剂表现为增加胃肠蠕动，例如通过增加MMC频率或MMC速率或管腔内压力(如PPr)。优选的试剂会增加两个或更多个的这些参数，例如会增加MMC频率和MMC速率或增加MMC频率和管腔内压力(如PPr)，或增加MMC速率和管腔内压力(如PPr)。最优选的试剂会增加所有的这些参数，例如会增加MMC频率、MMC速率和管腔内压力(如PPr)。本方法的步骤a)可以在从小肠或大肠的适当的胃肠段作出评估，例如小肠的空肠段或大肠的结肠段。在一些实施例中，优选大肠，如结肠段。

[0122] 对于这类紊乱的治疗，人们会选择不影响或不增加发送疼痛信号，或优选作用于减少发送疼痛信号的试剂。在方法的步骤b)中，这样的试剂将不影响或优选表现为降低或减少肠系膜传入神经放电。优选的所述试剂会不影响或优选表现为降低肠系膜传入神经束的自发放电频率。方法的步骤b)可以在小肠或大肠的任何适当的胃肠段作出评估，例如用小肠的空肠段或用大肠的结肠段。在一些实施例中，优选小肠，例如空肠段。

[0123] 使用本发明的方法，本发明人选择了一种新的菌株，加氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)345A(LG345A)，所述菌株通过显示出可增加MMC频率、MMC速率和管腔内峰值压力的方式，而显示出可增加胃肠蠕动。这种菌株通过减少肠系膜传入神经放电(通过减少肠系膜传入神经束的放电频率)，也显示出能够减少发送疼痛信号。这种分离的菌株(和其他菌株，例如加氏乳杆菌菌株，具有保藏菌株的特征，如对胃肠蠕动和发送疼痛信号诱发上述影响的能力)形成本发明的一个优选方面，并且可用于治疗胃肠蠕动紊乱，尤其是那些想要减少材料通过肠道的传送时间。因此，用这个菌株进行治疗的优选状况是便秘或肠绞痛。例如加氏乳杆菌菌株，能够通过具有增加MMC频率、MMC速率和管腔内峰值压力中的每一个的能力，来增加胃肠蠕动，并且还能够减少发送疼痛信号，例如通过具有减少肠系膜传入神经放电的能力(例如通过减少肠系膜传入神经束的放电频率)，形成本发明的优选方面。

[0124] 可选择地，如果例如，对胃肠蠕动紊乱的治疗是一种期望增加材料通过肠道的传送时间(如涉及快速通道传送的紊乱)的治疗，例如IBS或腹泻，然后在方法的步骤a)中，所关注的试剂是减少胃肠蠕动，例如通过减少MMC频率或MMC速率或如PPr的管腔内压力。优选的试剂至少会减少MMC速率。优选的试剂会减少两个或更多个这些参数，例如会减少MMC速率和MMC频率或会减少MMC频率和管腔内压力(如PPr)或会减少MMC速率和管腔内压力(如PPr)。最优选的试剂会减少所有的这些参数，例如会减少MMC频率、MMC速率和管腔内压力(如PPr)。方法的步骤a)可以在小或大肠适当的胃肠段进行评估，例如用小肠的空肠段或用大肠的结肠段。在一些实施例中，优选如结肠的大肠段。

[0125] 对于这类紊乱的治疗，人们会选择不影响或不增加发送疼痛信号，或优选表现为减少发送疼痛信号的试剂。在方法的步骤b)中，这类试剂会不影响或优选表现为降低或减少肠系膜传入神经放电。优选的所述试剂会不影响或优选表现为降低肠系膜传入神经束的自发放电频率。方法的步骤b)可以在小肠或大肠的适当的胃肠段进行评估，例如用小肠的空肠段或用大肠的结肠段。在一些实施例中，优选小肠段，如空肠。

[0126] 使用本发明的方法，本发明人选择了一种新的菌株，加氏乳杆菌621A(LG621A)，所述菌株通过显示出可减少MMC速率、以及对MMC速率和管腔内峰值压力没有影响的方式，而显示出可减少胃肠蠕动。这种菌株通过减少肠系膜传入神经放电(通过减少肠系膜传入神经束的放电频率)，也显示出减少发送疼痛信号。这种分离的菌株(和其他菌株，例如加氏乳杆菌菌株，具有保藏菌株的特征，如对胃肠蠕动和发送疼痛信号诱发上述影响的能力)形成本发明的一个优选方面，并且可用于治疗胃肠蠕动紊乱，尤其是那些想要增加材料通过肠道的传送时间(如涉及快速通道传送的紊乱)。因此，用这个菌株进行治疗的优选状况是肠易激综合症或腹泻。例如加氏乳杆菌菌株，能够通过具有减少MMC频率、MMC速率和管腔内峰值压力(优选是MMC速率)中的一个或多个的能力，来减少胃肠蠕动，并且还能够减少发送疼痛信号，例如通过具有减少肠系膜传入神经放电的能力(例如通过减少肠系膜传入神经束的放电频率)，形成本发明的优选方面。

[0127] 以上清楚的是，本发明的方法也可以用来选择或识别不适合治疗胃肠蠕动紊乱的试剂，例如对MMC速率或MMC频率或管腔内压力中的一个或多个，或两个或两个以上，或所有三个都没有显示出影响的试剂，可能不适合用于治疗胃肠蠕动紊乱，特别是如果这类试剂对减少发送疼痛信号没有有益效果。特别是那些没有显示出对任何这些参数具有影响的试剂，不太可能适合胃肠蠕动紊乱的治疗。此外，那些对增加疼痛信号有影响的试剂(通过在

在方法的步骤b)中肠系膜传入神经放电的增加来测量),不太可能适合胃肠蠕动紊乱的治疗。

[0128] 因此,本发明的进一步优选的方面提供了一种试剂,优选地是通过本发明的方法选择的菌株用于治疗,更尤其是用于治疗诸如那些本文所描述的胃肠蠕动紊乱。在本文的其他地方描述适当的待治疗的胃肠蠕动紊乱。通过本发明的试剂或菌株治疗的优选的胃肠蠕动紊乱,是那些期望减少物料通过肠道的传送时间,例如肠绞痛、返流或便秘。其他优选的胃肠蠕动紊乱是那些期望增加物料通过肠道的传送时间,例如肠易激综合症或腹泻。

[0129] 本发明提供了对患有胃肠蠕动紊乱的受试者的治疗方法,所述方法包括试剂的施用,优选向所述受试者施用有效量的通过本发明的方法选择的菌株,来治疗所述胃肠蠕动紊乱。

[0130] 本发明提供了对患有胃肠蠕动紊乱的受试者的治疗方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明的菌株来治疗所述胃肠蠕动紊乱。优选的菌株是用于治疗如本文其他地方所描述的胃肠蠕动紊乱的LG345A或LG621A。

[0131] 优选的胃肠蠕动紊乱和其他优选的特征是如本文的其它地方描述的用于本发明的其他方面。

[0132] 本发明也提供了试剂的应用,优选的是通过本发明的方法选择的菌株,以组合物或药物的产品形式用于治疗胃肠蠕动紊乱。

[0133] 由本发明还提供了本发明的菌株的应用,以组合物或药药物的产品形式用于治疗肠道蠕动障碍。优选的菌株用于治疗如本文其他地方所描述的胃肠蠕动紊乱的LG345A或LG621A。

[0134] 优选的胃肠蠕动紊乱和其他优选的特征是如本文的其它地方所描述的用于本发明的其他方面。

[0135] 在本文描述的本发明的方法和应用中,术语“增加”、“减少”,“降低”等,是指可测量的变化水平,优选是显著变化水平,更优选是统计上的显著变化,最好具有≤0.05的概率值。

[0136] 使用本发明的方法治疗的受试者对象是哺乳动物,更优选的是人类。当待治疗的胃肠蠕动紊乱治疗是便秘时,然后优选的受试者是老年病人或孕妇。老年患者通常会被理解为是70岁或以上的患者。当待治疗的胃肠蠕动紊乱时绞痛时,优选的小儿疝气。

[0137] 发明的进一步的方面了提供包括有本发明的试剂或菌株(如通过本发明的方法选择出的试剂或菌株)的产品作为如本文的其他地方定义的治疗剂的应用,其中所述应用进一步包括施用至少一个进一步的治疗试剂或营养试剂。在这样的实施例中,进一步的治疗试剂可以是任何对于治疗为让蠕动紊乱问题有用的进一步的试剂。进一步的营养试剂可以是任何适当的营养成分,如食品或食品补充剂。

[0138] 所述进一步的试剂可以与本发明的试剂或菌株(如组合物)一起施用,或可以单独施用。此外,所述进一步的试剂可以与本发明的试剂或菌株同时施用或者在不同的时间点施用。合适的施用条件和时间可以很容易地由技术人员根据所讨论的进一步的试剂进行确定。

[0139] 本发明还提供了一种组合物,所述组合物包括:

[0140] (1)试剂,优选是通过本发明的选择方法获得的菌株,或本发明另外定义的菌株;

和

[0141] (2)至少一种附加成分，所述附加成分选从由药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂、食品或食品补充剂、或进一步的治疗剂或营养剂组成的组。因此，所述组合物可以配制成药物组合物或营养组合物，例如食物产品。

[0142] 本发明定义的试剂、菌株和组合物的治疗应用包括降低、预防或缓和相应的紊乱或紊乱的症状(如可导致疾病症状的调节)。这种紊乱及其症状的降低、预防或缓和可由任何适当的分析进行测量。优选是紊乱和症状的降低或缓和是统计显著地，优选具有＜0.05的概率值。与适当的控制个体或群体相比，这种紊乱和症状的降低或缓和通常是确定的，例如健康的受试者或未经治疗或安慰剂治疗的受试者。

[0143] 根据疾病的位置选择适当的给药模式和试剂、菌株、组合物等的配制方式。优选的给药模式是口服，然而，同样地一些静脉注射治疗或肌内注射也是合适的。

[0144] 本发明定义的试剂、菌株和组合物的适当剂量可由技术人员根据待治疗的紊乱、给药模式和相关的配制很容易地进行选择或确定。

[0145] 如上所述，本发明人使用本发明得到两种新的菌株，加氏乳杆菌(LG)345A和加氏乳杆菌(LG)621A。这些菌株于2013年04月18日保藏在DSMZ(德国微生物菌种保藏中心，德国布伦瑞克D-38124英霍夫恩街7B)，加氏乳杆菌(LG)345A和加氏乳杆菌(LG)621A指定的保藏号分别是DSM 27123和DSM 27126。

[0146] 本发明人发现，影响蠕动紊乱的试剂的作用，在大多数情况下是多因素的，并且在胃肠道的各部分是不同的，因此在那种方式下必须研究去寻找用于特定紊乱的最好的试剂，从而引出本发明的方法。

[0147] 因此本发明的一个目的是通过使用本文的模型，来寻找适合治疗、预防或调节特定蠕动紊乱疾病的试剂。

[0148] 在本发明的一个实施例中，目的是选择具有作为营养化合物或药物的潜在用途的化合物或其他试剂，有效预防或治疗人体的便秘，特别是老年人。

[0149] 在本发明的一个实施例中，目的是选择一种益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效预防或治疗人体便秘，尤其是老年人和孕妇。

[0150] 在另一个实施例中，本发明的目的是选择一种试剂，例如益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效预防或治疗婴儿肠绞痛。

[0151] 在另一个实施例中，本发明的目的是选择一种试剂，例如益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效预防或治疗腹泻或其他蠕动紊乱，其中它有利于降低速率，从而增加了传送时间。

[0152] 在本发明的一个实施例中，目的是选择一种试剂，例如益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效治疗或调节肠易激综合症(IBS)的症状。选择这种试剂来增加传送时间，优选的是不会造成任何疼痛并且优选的是降低疼痛。

[0153] 在另一个实施例中，本发明的目的是选择一种试剂，例如益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效预防大便失禁。

[0154] 在另一个实施例中，本发明的目的是选择一种试剂，例如益生菌菌株，所述益生菌菌株可有效提高在小肠或大肠中的混合，不会产生任何疼痛且优选的是降低疼痛，以促进或导致受试者更好的营养吸收，尤其是老年人。

[0155] 以下是本发明的一些例子，这些例子不意味是本发明的应用的限制，而是详细体现本发明如何使用的实际例子，实施例1涉及是时空映射(StMap)软件插件的描述，实施例2涉及的是有效试剂的选择步骤，实施例3涉及用于特定蠕动紊乱的试剂的选择。

[0156] 实施例1

[0157] 用于NIH ImageJ软件的StMap插件的说明书

[0158] ImageJ是一种公共领域的Java图像处理程序，其灵感来自于用于Macintosh的NIH Image。无论是作为在线小应用程序还是作为可下载的应用程序，它可以在任何具有Java 1.4的计算机或更高版本的虚拟机上运行。可下载的版本适用于Windows、Mac OS、Mac OS X和Linux等系统。

[0159] ImageJ设计为具有可通过Java插件提供扩展性的开放式架构。自定义的采集、分析和处理插件可以使用内置于编辑器和Java编译器中的ImageJ的来开发。用户编写的插件使得它可以解决几乎所有的任何图像处理或分析问题。

[0160] 我们根据图6中的细节开发了在下面说明的软件中可用的插件(http://rsbweb.nih.gov)(美国国立卫生研究院(NIH)，9000洛克维尔大道，贝塞斯达，马里兰州，美国)。

[0161] ROI代表“所关注的区域”

[0162] 实施例2

[0163] 对蠕动紊乱有效的药剂的选择

[0164] 这种选择由两步法组成。第一步除了视频记录和时空映射图，使用管腔内压力变化的同步记录。第二步是神经信号的分析。

[0165] 将所有药剂与对照样相比较，而药剂之间不进行相互比较，这样导致每种试验的药剂有一张图。

[0166] 第一步，时空分析

[0167] 我们使用购买自Charles River Laboratories(威尔明顿，MA，USA)的成年雄性瑞士韦伯斯特鼠。通过颈椎错位处死小鼠，以符合麦克马斯特的动物使用和护理指南。所有的后续程序都是在体外。

[0168] 器官浴槽蠕动记录

[0169] 将4厘米长的空肠或末端结肠段切除，使用克雷布斯(Krebs)盐水在2hPa重力压头下冲洗空肠或末端结肠段以排空内容物。将每个空肠或末端结肠段安装在20毫升的器官浴槽中并淹没在含氧的Krebs溶液中(图1)。口腔和肛门末端都是中空的，使用多个马利欧特瓶将充有气体(95％O_2和5％CO_2)的Krebs溶液重力灌注至内腔，并使用。以0.5ml/min的速度将室温(19至22℃)缓冲液灌注至管腔隔室。将预热(34℃)的碳合气和Krebs溶液以5ml/min的速度灌注到器官室(浆膜隔室)中。含氧的Krebs缓冲液具有以下组分(mM)：118NaCl，4.8KCl，25$NaHCO_3$，1.0NaH_2PO_4，1.2$MgSO_4$，11.1葡萄糖，以及2.5富含碳合气(95％O_2和5％CO_2)的$CaCl_2$。在实验开始时，将管腔内的压力调整到3hPa并在此填充压力下进行记录。如图1所示，通过关闭和打开响应的旋塞，通过切换口服管腔从含有Krebs溶液的Marriotte瓶到含有添加有细菌的Krebs溶液的Marriotte瓶来应用细菌。在肠段的纵轴的中点处测量管腔内的压力变化。将压力信号放大、数字化、存储在PC电脑中并使用PClamp 9软件(分子设备，硅谷，CA，美国)离线分析。

[0170] 使用放置在肠段上方10厘米处的视频摄像机来记录图像(JVC Everio硬盘式摄像机GZ-MG155U)(图1)。在整个实验期间,与压力记录同步,使用8～12cm的视角开始录像。摄像机输出为每秒30帧(fps)的原始视频文件(MOD)。使用视频编辑软件(Avidemux version 2.5.0,在www.avidemux.org上可用的开源软件)从MOD文件中剪辑出10分钟长的视频短片。然后使用视频转换器(Zune转换版1.1,在http://ffmpeg.mplayerhq.hu上可用的开源软件)将短片转换成MOV格式。最终将视频短片重采样为384×256像素的分辨率和25fps的帧频。使用作为开发用于NIH图像J插件(1.43c版本,在http://rsbweb.nih.gov/ij/上可用的开源软件)的内部图像处理软件(StMap,见实施例1)分析视频记录。软件将视频的每帧的图像(1B)转变成黑白轮廓图(1C)并使用边缘检测例程生成时空映射图。该例程首先测试沿着肠道各个位置的直径,然后在肠道各个位置的直径以色调值的形式表现出来(范围从0-255,黑色到白色)。收缩时随着肠道直径减少,色调值也向着0减小并表现为朝向更暗值。当软件读取每一个10分钟的片段,其生成一个时空映射图-明调与暗调的交替带的模式,明调与暗调的交替带包含3组信息:沿着肠道的位置(纵坐标)、时间(横坐标)和肠道直径(应用或者z轴)(图1D)。使用这些变量,时空映射图变成了蠕动的“指纹”,其灵敏度在定义详细的和有细微差别的影响方面是很重要,特定的益生菌菌株和其他试剂对蠕动具有影响,还具有区分他们的能力。

[0171] 由于StMap测量各个位置的直径变化,StMap可以解释为作为众多2D直径随时间变化的图形的叠加。事实上,对于映射图,如果确定了压力传感器的位置(图2A中的虚线)并表显示出作为灰度随时间变化的图形(图2B),该图形将登记在该轨迹处相对于时间记录的同步记录的压力(图2C)。

[0172] 使用StMap插件从时空映射图直接测量蠕动参数。在这个系统中,我们能够测试(使用河豚毒素抑制神经元)收缩是依赖于肠道神经系统还是依赖于肌原性(由有节奏但神经元独立的肌肉收缩驱动)。生成神经,肛门传播,移动性复合运动MCs产生沿着由左向右的对角倾斜产生的厚的暗带;从每个暗带的斜率(s)(图3来测量传播速度(mm s^{-1}))。对于每个治疗,用3-5个连续的MCs的斜率的平均值来计算传播速度。通过计算在10分钟片段期间的暗MC带的数量来测量MC频率(mHz)。从基线直径(图2B)或压力(图2C)到下一峰值的值来直接测量MC振幅,每种疗法取3个值的平均值。直径变化率(cm/s)通过计算用于直径的时间对于自基线的最大限度地收缩(MCs的下行冲程,图2B)。

[0173] 试剂试验

[0174] 在本发明方法的第一步骤中试验鼠李糖乳酸杆菌(JB-1),罗伊氏乳酸杆菌(DSM 17938),罗伊氏乳酸杆菌ATCC PTA 6475,加氏乳酸杆菌(LG)345A(DSM 27123),加氏乳酸杆菌(LG)621A(DSM 27126),加氏乳酸杆菌T1和加氏乳酸杆菌T2

[0175] 光学上测定细胞数量并通过平铺在生长培养基琼脂平板上的生长的能力检测其生存能力。将来自冷冻储存的细胞解冻并在2000rpm的速度下离心15分钟,颗粒悬浮在相同体积的Krebs缓冲液中。然后将悬浮液再次离心机,细胞被转移悬浮在原来浓度的Krebs缓冲溶液中。在使用之前,将细菌用Krebs缓冲溶液稀释至工作浓度。

[0176] 将含有细菌的Krebs溶液供给到管腔内腔中,同时将离子通道调节药物添加到灌注到浆膜隔腔中的Krebs缓冲溶液中。药物溶液从水龙头流到记录隔腔所需的时间为30秒。将IKCa离子通道阻断剂1-[(2-氯苯基)二苯甲基]-1氢-吡唑(TRAM-34)(美国密苏里州,埃

利斯威尔,Tocris生物科学)用纯二甲基亚砜(DMSO)溶解,得到10-mM储备溶液,并在使用前30分钟用含氧的Krebs缓冲溶液稀释至工作浓度。将IKCa离子通道开放剂5,6-二氯-1-乙基-2-苯并咪唑啉酮(DCEBIO)(Tocris)溶解于DMSO中,得到10-mM储备溶液,在Krebs缓冲溶液中的最终工作浓度为0.1或1μM。

[0177] 根据上述步骤1分析药剂,结果如图7所示。

[0178] 统计学

[0179] 使用GraphPad Prism 5.0(格拉夫派得软件,圣地亚哥,,CA,USA)来计算统计数据。以平均值±SD的形式给出描述性统计,但在响应曲线中,使用扫描电镜显示抽样误差;样本大小用n表示。设定用于显著试验的显著性检验差异P=0.05;所有测试是2-尾端。

[0180] 第二步,发送神经信号的分析

[0181] 所有程序都遵循加拿大委员会的动物保护指南,并得到麦克马斯特大学的动物研究伦理委员会批准(许可证#08-08-35)。

[0182] 细胞外记录

[0183] 成年雄性瑞士韦氏小鼠(20-30g)自Charles River Laboratories(威尔明顿,MA,USA)采购。通过。接下来所有的程序都是来自体外的。从安乐死的动物中移出带有肠系膜组织的远端空肠切除段(~2.5厘米(图4),并立即放置在涂覆硅酮树脂记录陪替氏培养皿中,所述培养皿中填充有以下组分(mM):118NaCl、4.8KCl、25$NaHCO_3$、1.0NaH_2PO_4、1.2$MgSO_4$、11.1葡萄糖和2.5$CaCl_2$,且该培养皿中通入有碳合气(95%O_2/5%CO_2)。肠段的口腔端和肛门端插入塑料管,使用附加的装满充氧Krebs缓冲液的注射器轻轻地将肠段清空;然后,钉扎住肠段和肠系膜组织,如Barbara等(消化内科,132卷,1期,26-37页,2007年1月)所描述的,在立体显微镜(图5)下仔细解剖,分离肠系膜神经束。将制备物转移到倒置显微镜,使用几个M马里奥特瓶子,将室温(~22℃)的含氧Krebs液和/或添加剂内墙重力灌注。浆膜隔室以3-5ml/min的速率分别灌注预热(34℃)的Krebs溶液。通过抽吸到附连有膜片钳电极夹(CV-7B;分子设备,桑尼维尔,加利福尼亚,USA)的玻璃吸管中,轻轻地抽拽神经束。使用Multi-Clamp 700B放大器和Digidata 1440信号转换器(分子设备)记录细胞外神经。电信号在0.1到2kHz带通滤波,在20kHz处取样并存储在个人电脑,所述个人电脑运行用于因果分析的pClamp 10软件(分子设备)。

[0184] 迷走神经切断

[0185] 对于一些实验来说,进行如前所述的膈下迷走神经切断术(van der Kleij H.,Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295:1131-1137,2008)。在获取用于电生理学实验的空肠和肠系膜组织之前,允许动物恢复10-14天。在3种动物中执行假迷走神经切断术。手术完成后,每天测量小鼠的体重和总体健康状况。在迷走神经切断术组或假手术治疗组的动物中,我们没有发现在手术1周后的体重增加的显著差异的证据。在每个实验对缩胆囊素(CCK)的浆膜应用的反应之后,通过记录试验所有迷走神经切断术的小鼠对于该过程的完整性。

[0186] 当我们发现CCK没有增加肠系膜神经放电速率时,迷走神经切断术视为是有效的。

[0187] 空肠段的完整性

[0188] 在实验期间,为了测试空肠段的完整性,考虑到细菌穿过上皮组织的易位,我们用5-(6)-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记JB-1,在10^9/ml浓度的Krebs缓冲液下把这些

放入到管腔中，培养75分钟之后，在多聚甲醛中固定组织，在共焦显微镜(双激光头显微镜，LSM 510，Carl Zeiss，德国)中研究存在于上皮组织之下的部分。JB-1在PBS中清洗两次，悬浮在PBS中的5μM CFSE的最终浓度中，该PBS补充有5％胎牛血清并在37℃下培养25分钟。将组织(n＝3)固定在在4％多聚甲醛中并在4℃下过夜，然后在PBS中清洗3次，每次清洗10分钟，在10和30μm处切片，将横切面转移到显微镜载玻片上并安装好。然后在光学切片中通过Z-堆码方法审查这些。

[0189] 试剂试验

[0190] 在本发明方法的第二步骤中试验鼠李糖乳杆菌(JB-1)、罗伊氏乳杆菌(DSM 17938)、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475、加氏乳杆菌(LG)345A(DSM 27123)、加氏乳杆菌(LG)621A(DSM 27126)、加氏乳杆菌T1和加氏乳杆菌T2。

[0191] 光学确定细胞数量，在生长培养基琼脂板上种植后，通过其生长能力来检查生存能力。活的鼠李糖乳杆菌在等分1毫升冷冻液(-80℃)中培养，所述冷冻液是在Man-Rogosa Sharpe液体培养基(Difco Laboratories，Sparks，MD，USA)中由$5x10^9$细胞组成。将冷冻储存的细胞解冻并在2000rpm的速度下离心15分钟，颗粒悬浮在等体积Krebs缓冲液中。将悬浮液再次离心，在原有的浓度下，将细胞移除和再次悬浮在Krebs缓冲液中。只是在使用之前，将这些细胞用Krebs缓冲液稀释至工作浓度。对于一些实验，细菌解冻后(发酵液中)直接稀释至工作浓度；细菌总是应用于空肠段的内腔中。将胆囊收缩素(25-33)硫酸盐(CCK；AnaSpec，弗里蒙特，加州)溶解在DMSO中以制成1mM的储备溶液。在Krebs缓冲液中等分液在实验当天稀释至工作浓度，最终DMSO的浓度≤0.0001％。

[0192] 离线数据分析

[0193] 使用Clampfit 10.2(Molecular Devices)测量肠系膜传入神经束的多-单元自发放电频率和单-单元自发放电频率。测量的两种方法(多单元峰值放电和波形分析)通常用于确定肠系膜神经纤维的应激性变化，所述应激性是由不同的治疗方法诱发的。使用Clampfit的峰值检测模块确定多单元峰值的时间，并由峰值间隔计算得出平均频率。用Clampfit的峰值形自动模板检测工具(计算机波形分析)将单-单元活动从多-单元活动中分离出来。在模板检测后，总是通过目测检查区别，并且弃置在视觉上没有峰值形状的事件(＜0.2％)。

[0194] 测试结果如图8中所示。

[0195] 统计

[0196] 数据用平均数±SEM表示，n代表记录的空肠段的总数；同一动物的记录的段的最大值是2。用Wilcoxon检验对比成对数据，并且使用Prism software 5.0(GraphPad Software，Inc.，San Diego，CA)演示Friedman检验与用于重复测量方差分析的Dunn's post hoc检验。因为在多单元神经活动中自发活动的较大变动可能在一种制备方法和另一种之间发生，所有对照都与治疗前后的记录相搭配，所述治疗记录是在作为它自己的控制方式的每个神经束上完成的。如果P≤0.05则认为差异是显著的。

[0197] 实施例3

[0198] A、利用本发明定义的步骤，选择最佳的益生菌细菌试剂以有助于治疗蠕动紊乱(如老年人便秘)；

[0199] 根据实施例2的方法分析鼠李糖乳杆菌(JB-1)、罗伊氏乳杆菌(DSM 17938)、罗伊

氏乳杆菌ATCC PTA 6475、加氏乳杆菌(LG)345A(DSM 27123)、加氏乳杆菌(LG)621A(DSM 27126)、加氏乳杆菌T1和加氏乳杆菌T2。分析结果在表1中总结得出。

[0200] 表1

[0201]

试剂	蠕动			发送疼痛信号
		空肠	结肠	
JB-1	MMC 频率	↓	↓	↑
	MMC 速率	↑	↓	
	PPr	↓	↓	
DSM 17938	MMC 频率	↓	↑	↓
	MMC 速率	↓	↑	
	PPr	O	O	
ATCC PTA 6475	MMC 频率	-	O	O
	MMC 速率	-	O	
	PPr	-	O	
LG345A	MMC 频率	-	↑	↓
	MMC 速率	-	↑	
	PPr	-	↑	
LG621A	MMC 频率	-	O	↓
	MMC 速率	-	↓	
	PPr	-	O	
T1	MMC 频率	-	O	O
	MMC 速率	-	O	
	PPr	-	↓	
T2	MMC 频率	-	↓	O
	MMC 速率	-	O	
	PPr	-	O	

[0202] 罗伊氏乳杆菌DSM 17938和加氏乳杆菌(LG)345A增加了结肠中MMC速率,也增加了结肠中PPr参数或MMC频率中的至少一种(罗伊氏乳杆菌DSM 17938增加了MMC频率,加氏乳杆菌(LG)345A增加了PPr)。这两种菌株都减少了肠系膜传入神经束的自发放电频率。因此选择这些菌株来治疗肠绞痛,如婴儿肠绞痛,因为这些菌株增加了MC传播流的速度,并同时减少了肠系膜传入神经束的放电频率。

[0203] 由罗伊氏乳杆菌DSM 17938和加氏乳杆菌(LG)345A引起的MMC速率的增加和肠系膜传入神经束的自发放电频率的减少,使得它们适合于治疗便秘,尤其是在需要减少便秘的孕妇中,或者在老年人中。

[0204] 鼠李糖乳杆菌JB-1和加氏乳杆菌LG621A降低了MMC速率。加氏乳杆菌LG621A也降低了肠系膜传入神经束的放电频率,因此可以用于治疗涉及快速通道传送的紊乱,例如IBS。鼠李糖乳杆菌JB-1对肠系膜传入神经束的放电频率没有影响,因此不用于治疗动力紊乱。

[0205] 罗伊氏乳杆菌ATCC 6475、加氏乳杆菌T1和加氏乳杆菌T2对MMC速率或肠系膜传入神经束放电的自发频率不显示任何影响,因此不推荐用于治疗动力紊乱。

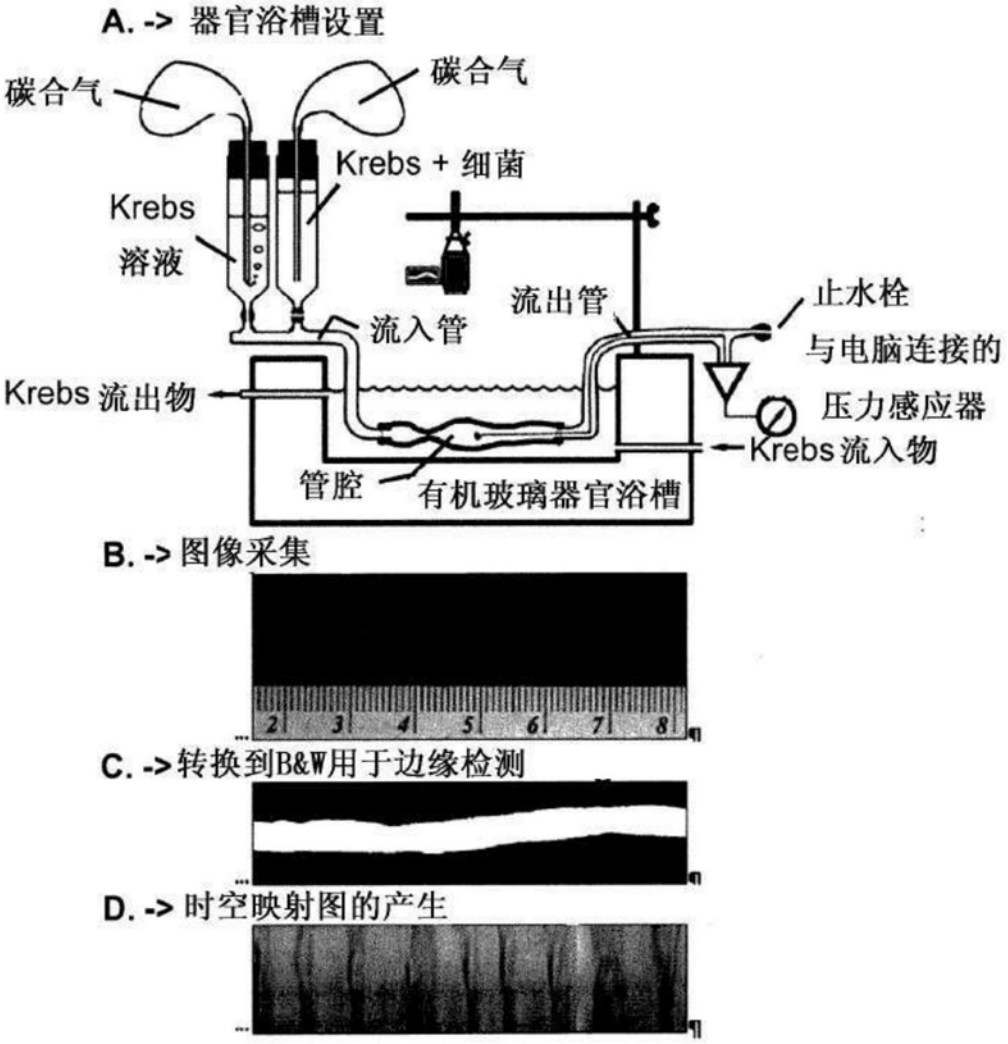

A. -> 器官浴槽设置
碳合气
碳合气
Krebs + 细菌
Krebs
溶液
流出管
止水栓
流入管
与电脑连接的
Krebs 流出物
压力感应器
Krebs 流入物
管腔
有机玻璃器官浴槽
B. -> 图像采集
C. ->转换到B&W用于边缘检测
D. -> 时空映射图的产生

图1

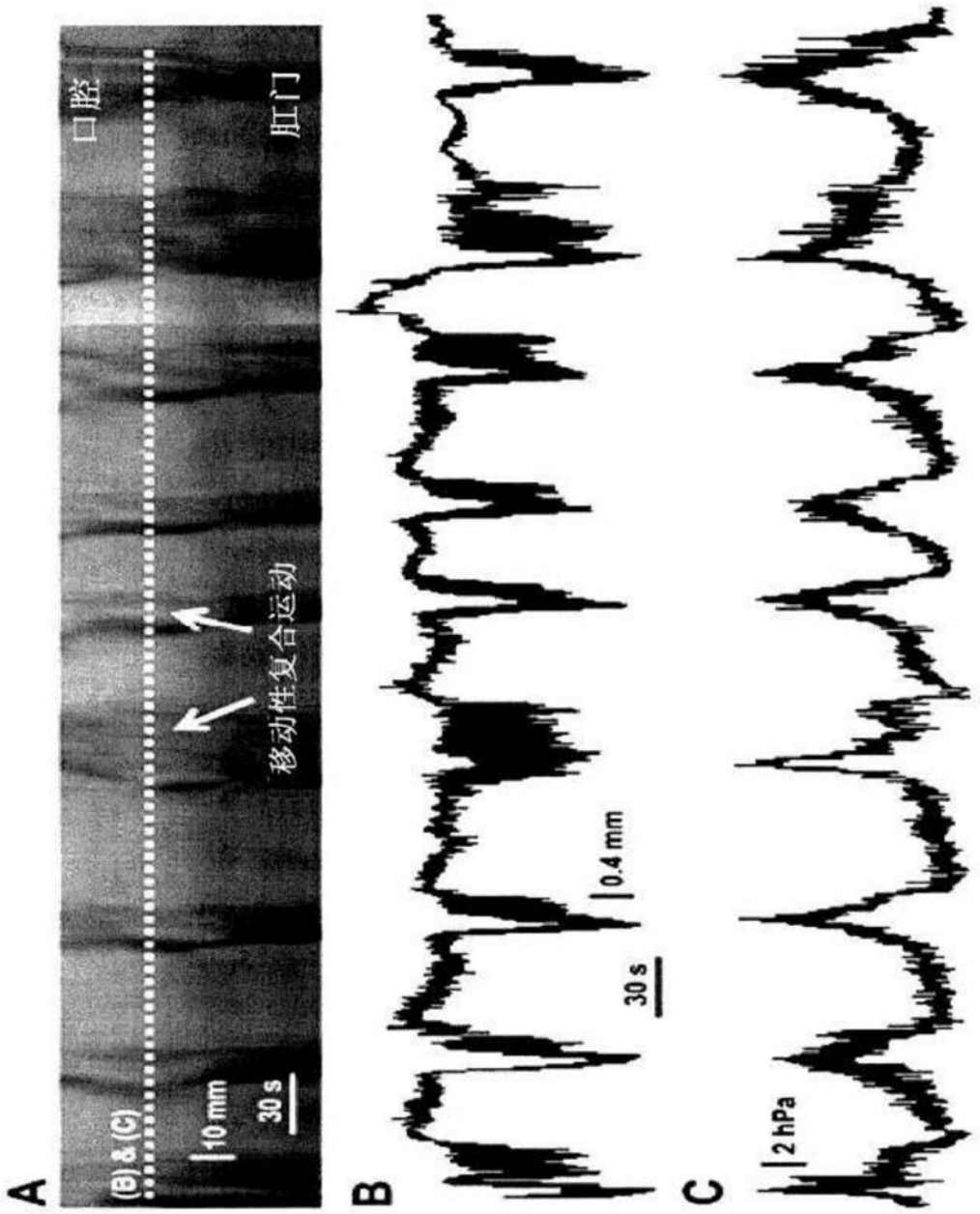


图2

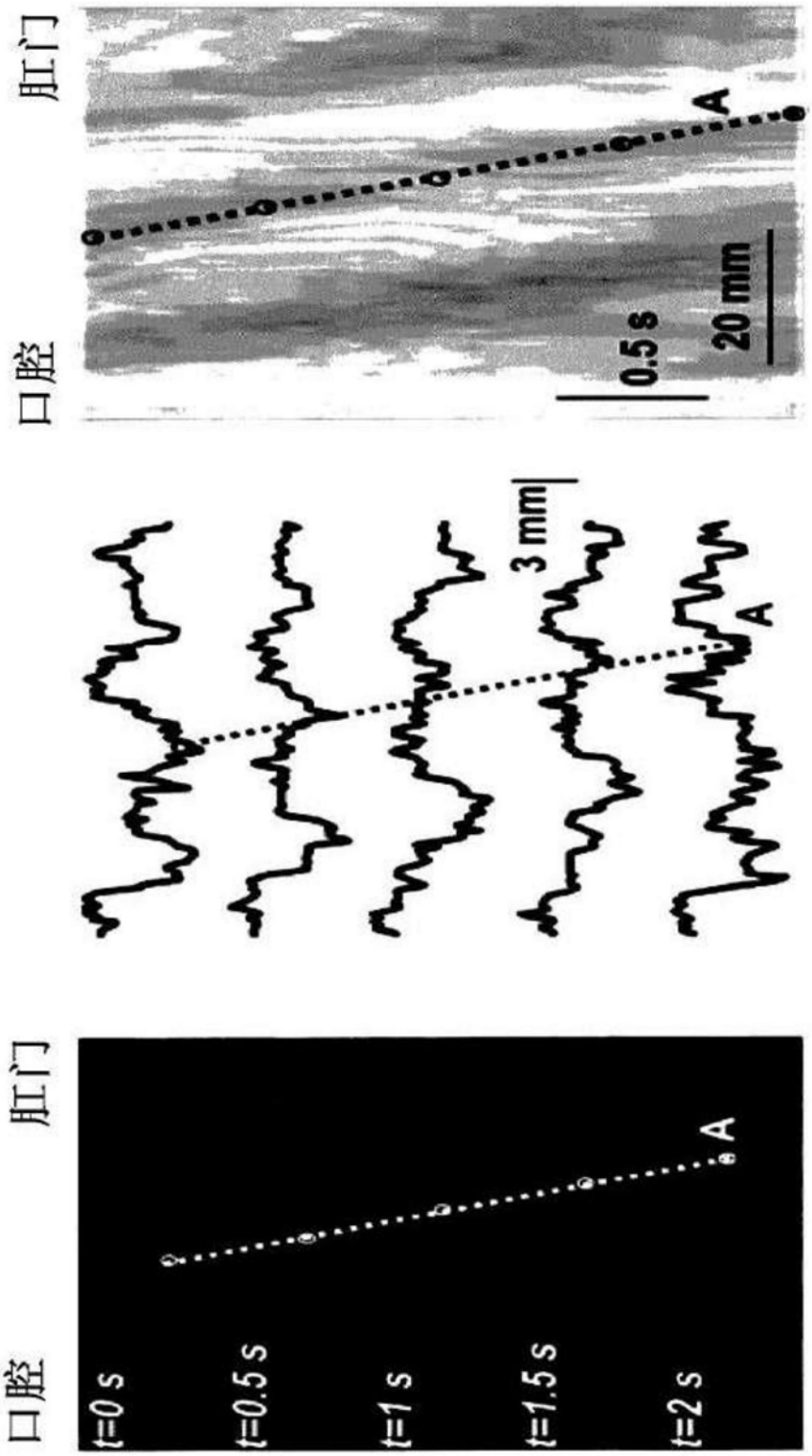


图3

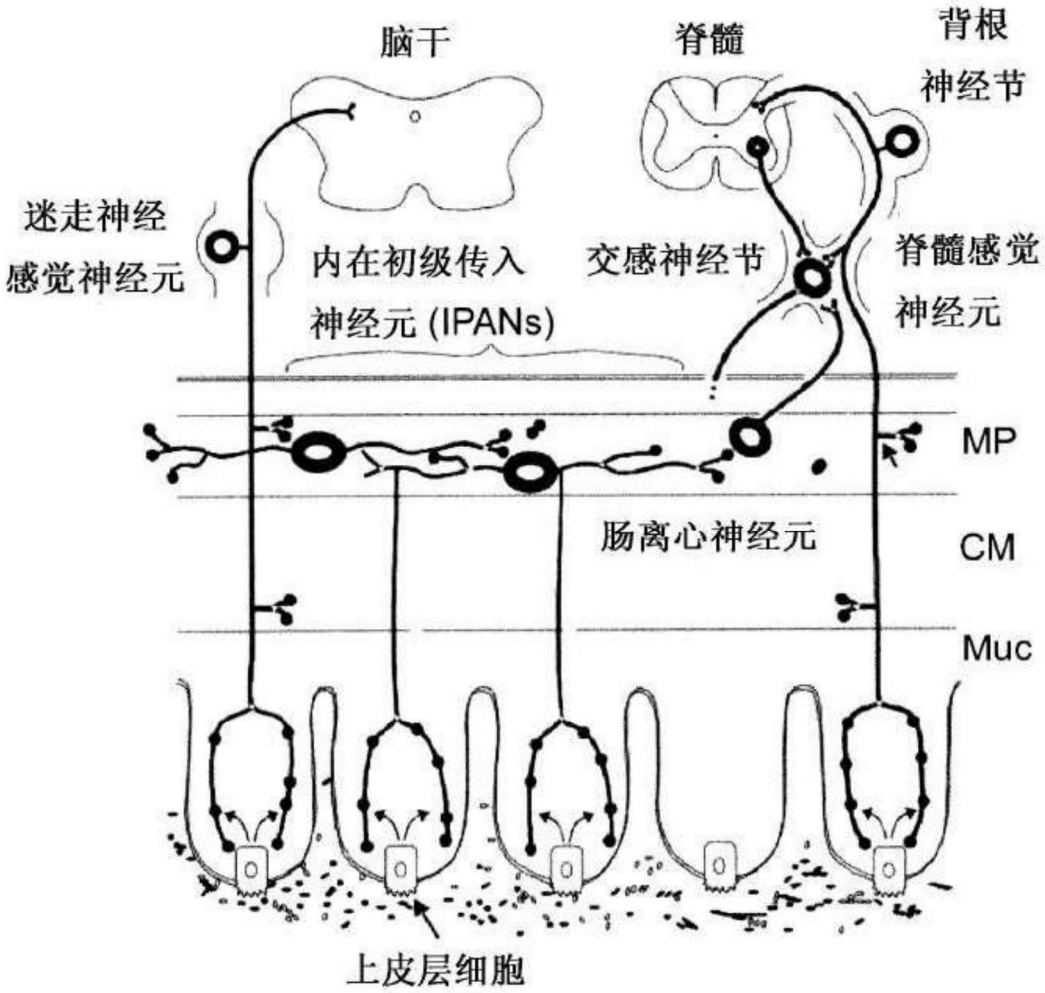

脑干
脊髓
背根
神经节
迷走神经
感觉神经元
内在初级传入
神经元 (IPANs)
交感神经节
脊髓感觉
神经元
MP
肠离心神经元
CM
Muc
上皮层细胞

图4

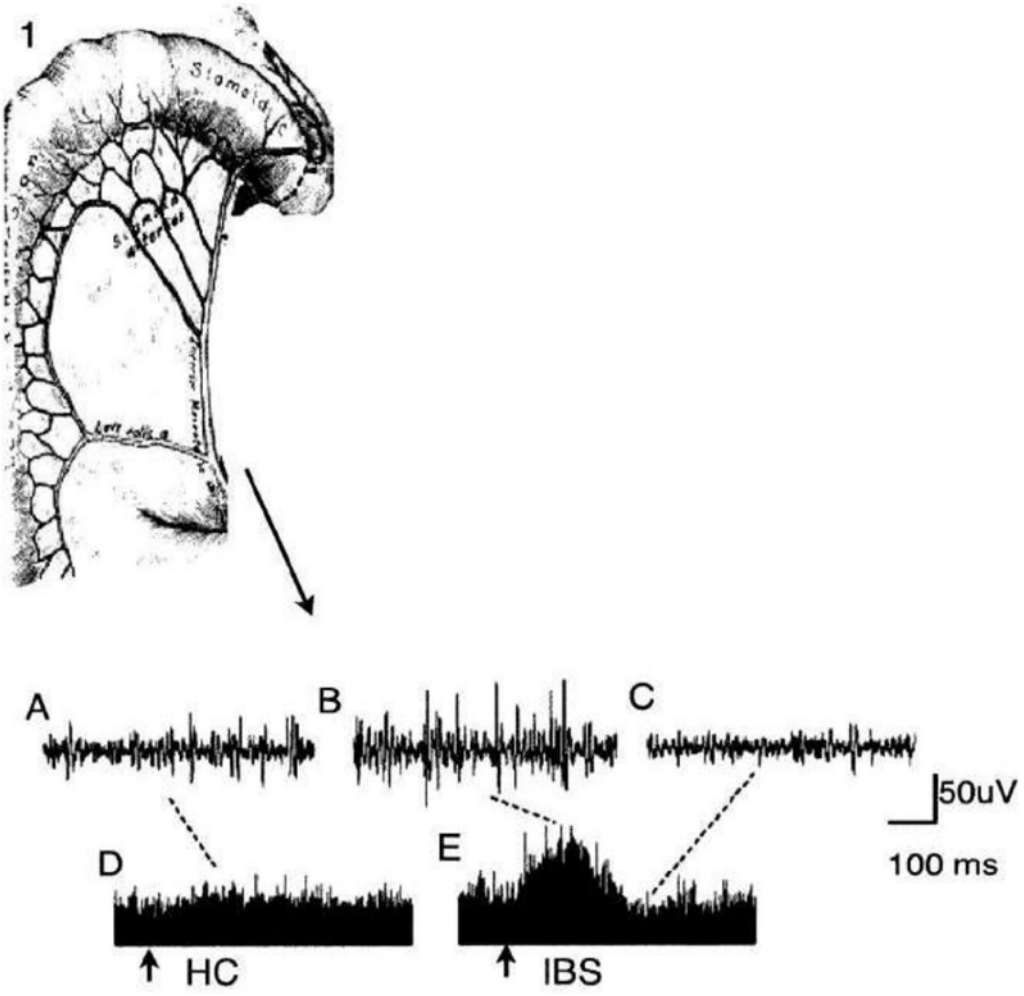


图5

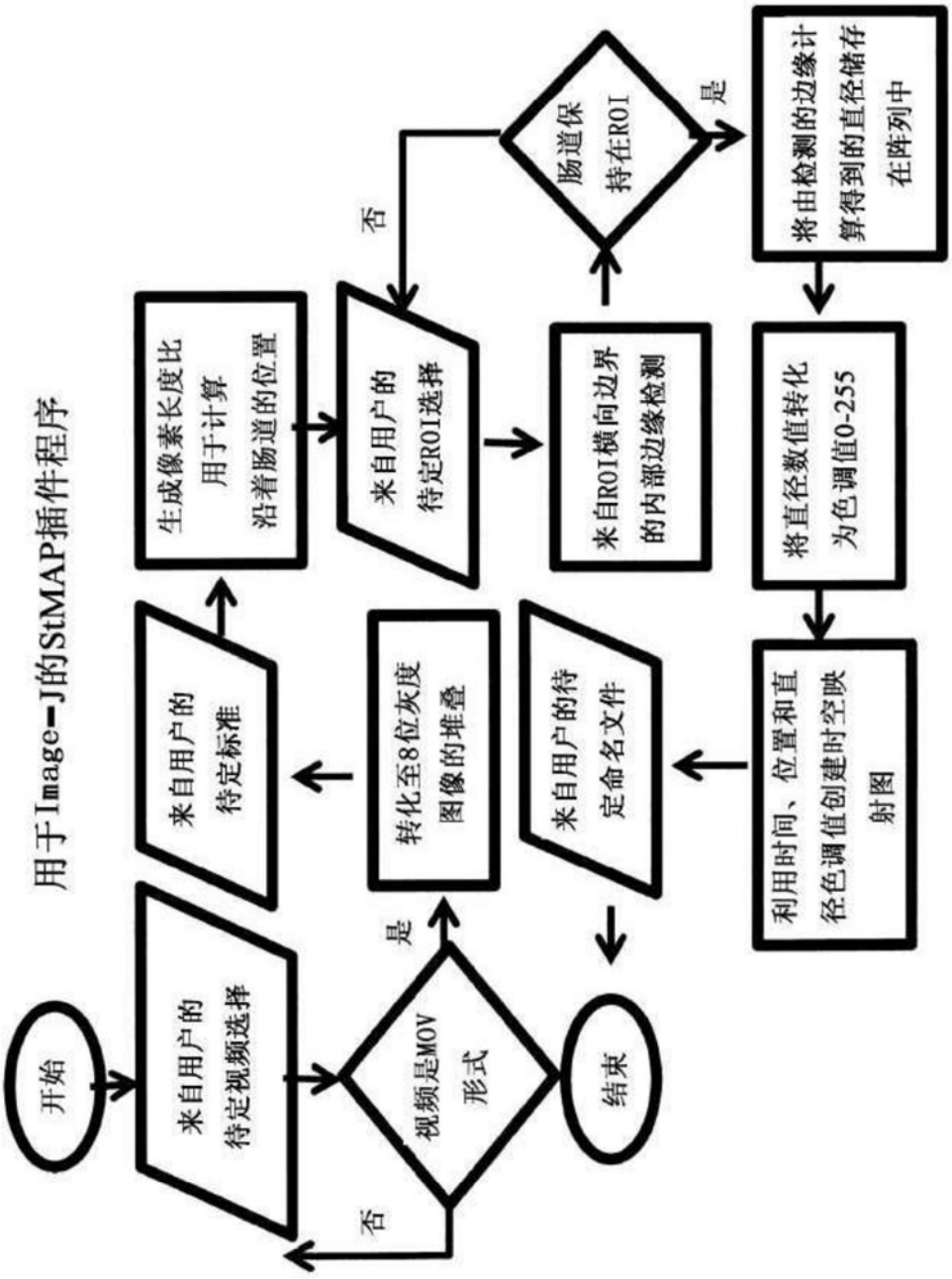

用于Image-J的StMAP插件程序
开始
来自用户的待定视频选择
视频是MOV形式
否
是
来自用户的待定标准
转化至8位灰度图像的堆叠
生成像素长度比用于计算沿着肠道的位置
来自用户的待定ROI选择
否
肠道保持在ROI
是
来自ROI横向边界的内部边缘检测
将由检测的边缘计算得到的直径储存在阵列中
将直径数值转化为色调值0-255
利用时间、位置和直径色调值创建时空映射图
来自用户的待定命名文件
结束

图6

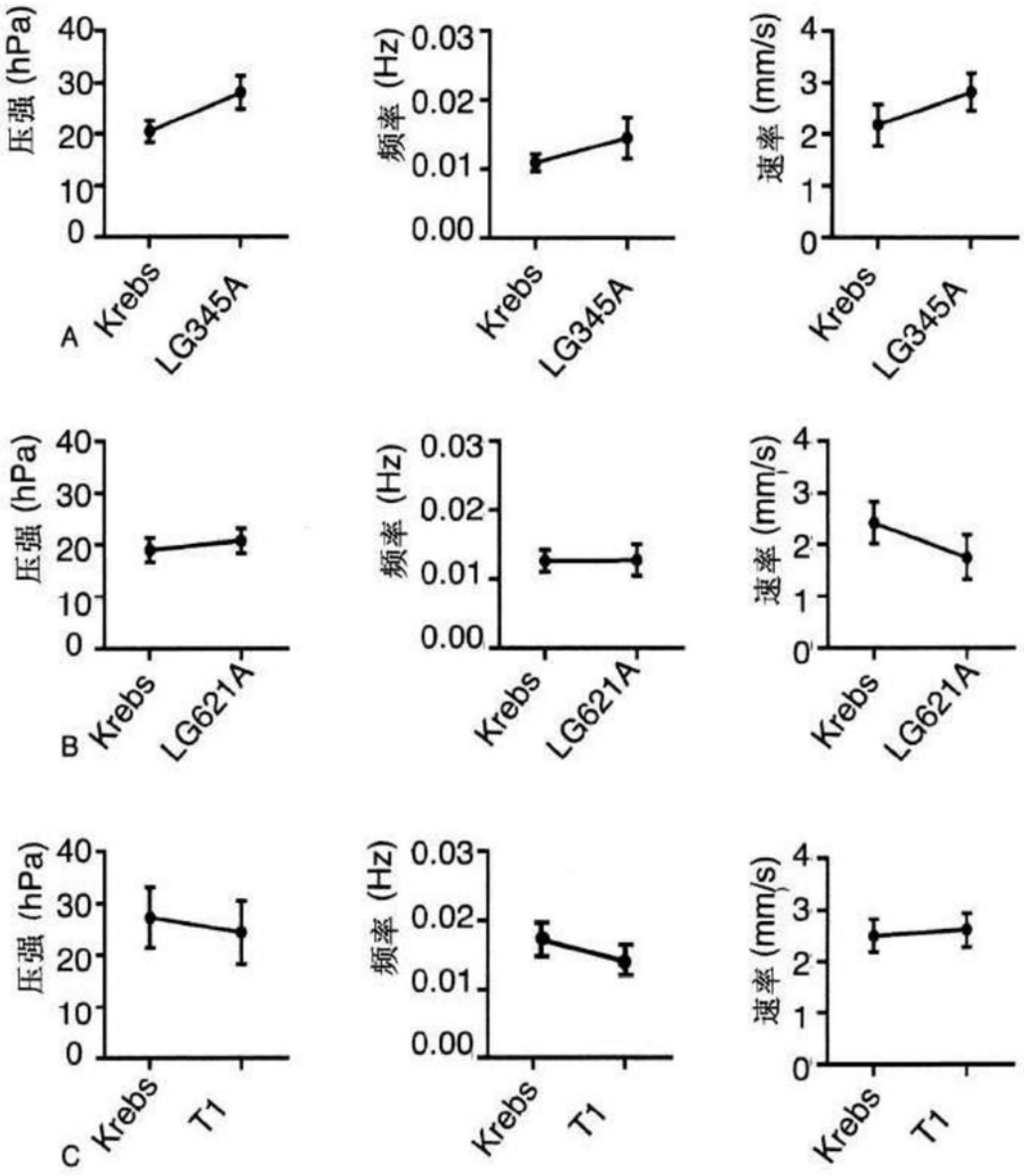

压强 (hPa)
40
30
20
10
0
A
Krebs
LG345A
频率 (Hz)
0.03
0.02
0.01
0.00
速率 (mm/s)
4
3
2
1
0
B
LG621A
C
T1

图7

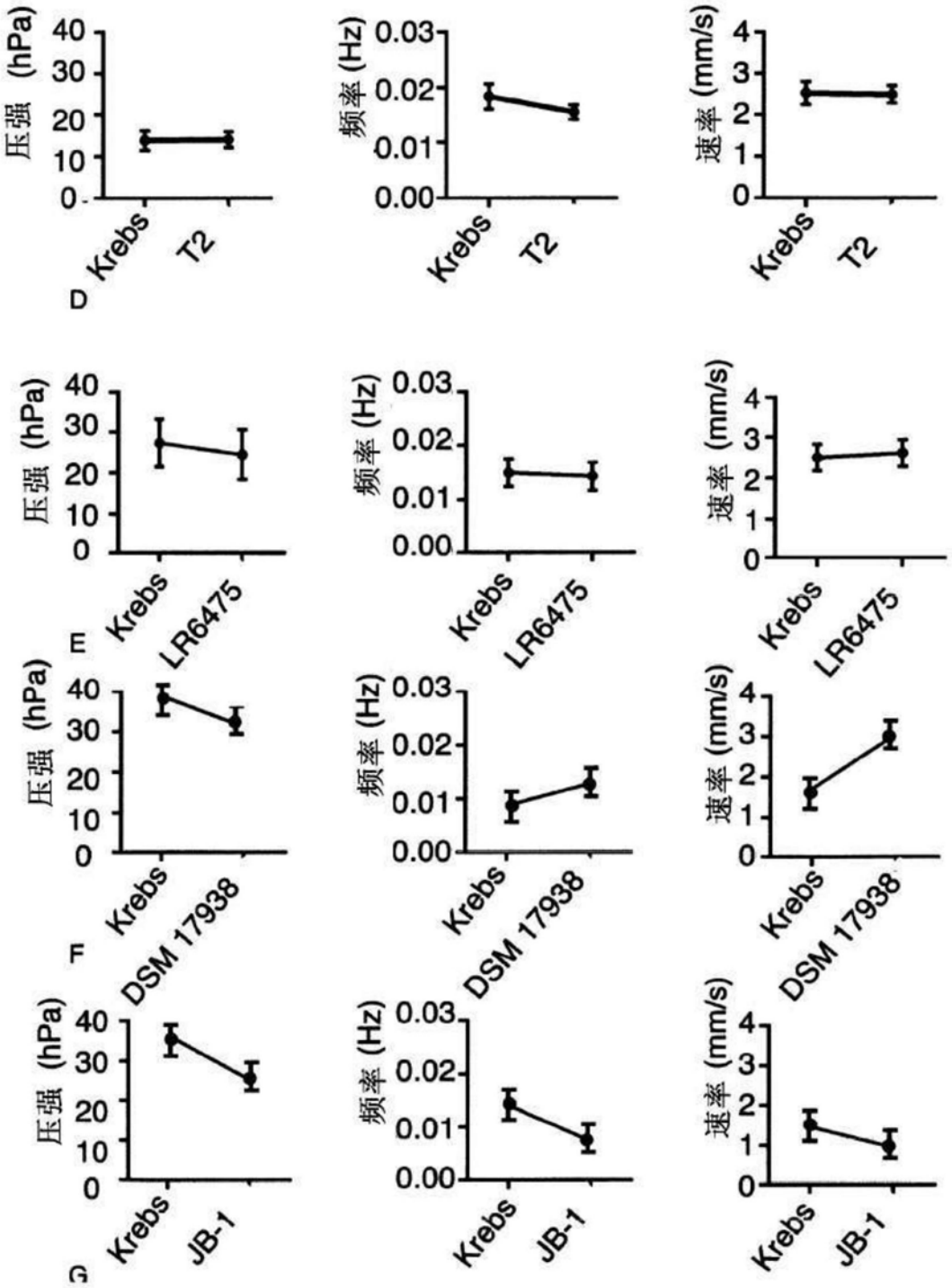


图7(续)

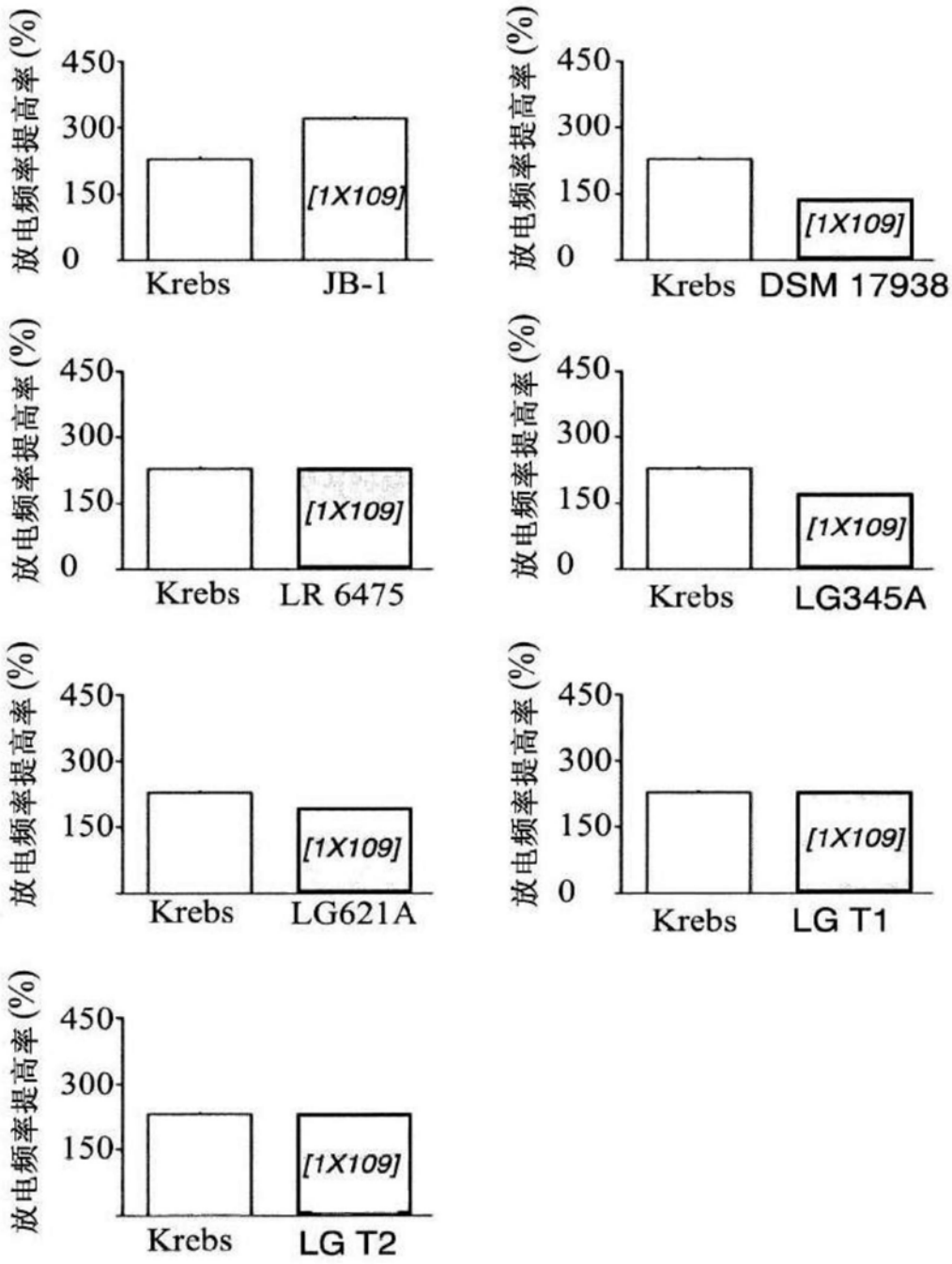

放电频率提高率 (%)
450
300
150
0
[1X109]
Krebs
JB-1
DSM 17938
LR 6475
LG345A
LG621A
LG T1
LG T2

图8