

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 2 月 27 日 (27.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/037531 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/101684
- (22) 国际申请日: 2018 年 8 月 22 日 (22.08.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号王刚, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 王刚(WANG, Gang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。陈卫(CHEN, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号王刚, Jiangsu 214122 (CN)。田培郡(TIAN, Peijun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号王刚, Jiangsu 214122 (CN)。赵建新(ZHAO, Jianxin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号王刚, Jiangsu 214122 (CN)。张灏(ZHANG, Hao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号王刚, Jiangsu 214122 (CN)。
- (74) 代理人: 南京禹为知识产权代理事务所(特殊普通合伙)(YUV (NANJING) INTELLECTUAL PROPERTY FIRM (SPECIAL GP)); 中国江苏省南京市利源南路 55 号牛首工业园 1 号楼 B 栋 2 楼王晓东, Jiangsu 211100 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

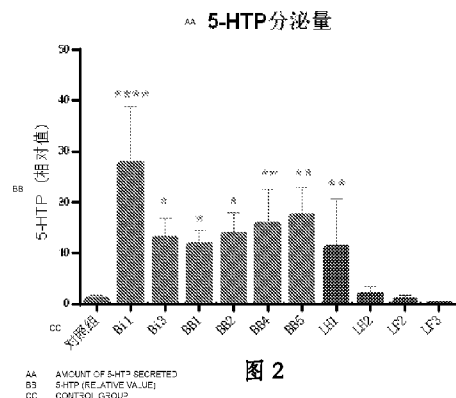
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) **Title:** CELL LEVEL-BASED METHOD FOR SCREENING PROBIOTICS THAT ACHIEVE ANTIDEPRESSANT FUNCTION BY MEANS OF 5-HYDROXYTRYPTOPHAN RELATED-PATHWAY

(54) 发明名称: 一种基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法



(57) **Abstract:** A cell level-based method for screening probiotics that achieve an antidepressant function by means of a 5-hydroxytryptophan related pathway. RIN14B cells are used as a screening model, and by means of the co-incubation of probiotics and cells, the amount of 5-hydroxytryptophan secreted in a cell supernatant and the mRNA level of tryptophan hydroxylase 1 in the cells are measured so as to determine probiotics which may exert an antidepressant effect by means of 5-hydroxytryptophan.

(57) **摘要:** 一种基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法。利用 RIN14B 细胞作为筛选模型, 通过益生菌与细胞共孵育, 检测细胞上清中 5-羟色氨酸的分泌量和细胞中的色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平, 以确定能够通过 5-羟色氨酸发挥抗抑郁功效的益生菌。

WO 2020/037531 A1

一种基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法

技术领域

本发明涉及益生菌筛选技术领域，具体涉及一种基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法。

背景技术

抑郁症又称抑郁障碍，以显著而持久的情绪低落为主要临床特征。目前全球有超过 3.5 亿人患有抑郁症，预计到 2030 年，抑郁症将在全球疾病负担中居第 1 位。大量研究表明，抑郁症的发生与脑中单胺类神经递质失调有关，主要表现为大脑神经突触间隙的 5-羟色胺（5-HT）浓度降低。目前针对抑郁的治疗方式主要集中在提高脑中 5-HT 的水平，例如临床一线的抗抑郁药物——选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂（SSRI）。此外，服用 5-HT 的前体——5 羟色氨酸（5-HTP）也具有一定的抗抑郁效果，但因其在人体内半衰期较短，不能用作临床药物。目前针对抑郁的治疗方式主要集中在提高脑中 5-HT 的水平上。

“脑肠轴”是近年来提出的一个新概念，作为肠内细菌与大脑间的双向通信系统，主要通过神经途径、内分泌途径和免疫途径来调节大脑的功能以及行为。研究表明，抑郁患者的肠道菌群会发生改变，而在动物实验中发现，无菌小鼠的抑郁症状能够减轻，这证明肠道菌群和抑郁的发生、发展存在联系。通过益生菌调节肠道菌群，可成为缓解抑郁症的一种新途径。

目前报道的对抑郁具有缓解作用的益生菌，均通过动物实验证明。然而采用动物作为抗抑郁益生菌的筛选模型，耗时长、成本高，且无法解释其发挥作用的具体机制。细胞模型具有耗时短、成本低、通量高等优点，但目前尚未有抗抑郁益生菌的细胞筛选模型。因此，开发一种基于细胞水平测定来筛选抗抑郁功能益生菌的方法，具有十分重要的科学和实践意义。

发明内容

本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊，而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

为解决上述技术问题，本发明提供了如下技术方案：一种基于细胞水平筛

选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其包括，

细胞培养：所述细胞能够表达色氨酸羟化酶 1 并分泌 5-羟色氨酸；

所述细胞用牛血清白蛋白和氟西汀处理后与益生菌共孵育，筛选具有抗抑郁功能的益生菌。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述细胞包括大鼠胰岛瘤细胞 RIN14B。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述细胞培养，其中，细胞培养基包括 RPMI1640 培养基。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述益生菌，包括双歧杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、乳球菌属、明串珠菌属、丙酸杆菌属、片球菌属、芽孢杆菌属。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述筛选具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌，包括，将传代细胞以 $10^5 \sim 10^6$ /mL 接种于 24 孔板，用含有 0.1% 牛血清白蛋白和 $1-4 \mu\text{mol/L}$ 氟西汀的 Hank's 平衡盐溶液清洗细胞，后加入含有不同益生菌的 HBSS 悬液，益生菌的浓度调整到 10^7-10^9cfu/mL ， 37°C 孵育 20min 后，收集悬液， $5000 \sim 6000g$ 离心 5~10min 去除沉淀，取上清液待测。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述筛选具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌，包括，与益生菌共同孵育后的所述细胞分泌的 5-羟色氨酸和细胞中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平的检测。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：将所述细胞 5-羟色氨酸的分泌量提高 10 倍以上的益生菌菌株作为筛选的有效菌株。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述 5-羟色氨酸的分泌量采用荧光高效液相色谱进行检测分析。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：将色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 提高 50% 以上的益生菌菌株作为有效菌株。

作为本发明所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法的一种优选方案：所述色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平用 qPCR 进行检测。

本发明有益效果：本发明采用 RIN14B 细胞作为筛选模型，在经过氟西汀处理之后，加入益生菌共孵育后，取细胞上清检测 5-HTP 的含量，并裂解细胞检测其色氨酸羟化酶 1 (Tryptophan hydroxylase 1, TPH1) mRNA 的表达量，以确定益生菌能否促进肠道细胞产生神经递质前体 5-羟色氨酸 (5-hydroxytryptophan, 5-HTP)，进而发挥抗抑郁功效。

本发明采用实验证明：益生菌能够通过定植肠道，刺激肠道嗜铬细胞持续而缓慢的分泌 5-HTP，进而为脑中 5-HT 的合成提供前体物质，实现抗抑郁效果。具体来说，本发明利用“模拟肠嗜铬细胞”（即 RIN14B 细胞），通过益生菌刺激，检测其 5-HTP 的分泌量和 TPH1 mRNA 的表达量，以此筛选具有抗抑郁功能的益生菌，并在动物试验中验证了筛选模型的有效性。本发明提供了一种基于 5-HTP 途径快速、高效地筛选抗抑郁功能益生菌株的方法。

附图说明

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

图 1 为 5-HTP 的色谱保留时间和标准曲线示意图。(A) 5-HTP 和 5-HT 的色谱保留时间；(B) 5-HTP 标准曲线。

图 2 为益生菌刺激 RIN14B 细胞分泌 5-HTP 的含量示意图；其中* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，**** $P<0.0001$ (vs 对照组)。

图 3 为益生菌刺激后，RIN14B 细胞中 TPH1 mRNA 水平示意图；其中* $P<0.05$ ，**** $P<0.0001$ (vs 对照组)。

图 4 为益生菌干预抑郁小鼠六周后，各组小鼠的行为学变化示意图。(A) 强迫游泳实验；(B) 糖水偏好实验；(C) 跳台实验；其中* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，

*** $P < 0.0001$ (vs 模型组)。

图 5 为益生菌干预抑郁小鼠六周后, 各组小鼠的海马组织中 5-HT (A) 和 5-HTP (B) 的水平变化示意图; 其中* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs 模型组)。

图 6 为益生菌干预抑郁小鼠六周后, 各组小鼠前额叶皮质中 BDNF 的水平变化示意图; 其中* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (vs 模型组)。

图 7 为本菌株干预抑郁小鼠六周后, 小鼠血清中 ACTH 和皮质酮水平变化示意图; 其中* $P < 0.05$ (vs 模型组)。

图 8 为细胞 5-HTP 和 TPH1 mRNA 检测结果与动物实验指标之间的相关性示意图; 其中蓝色代表负相关, 红色代表正相关。

图 9 为细胞模型和动物实验之间具有显著相关性的指标示意图。

具体实施方式

为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂, 下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明, 但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施, 本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广, 因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

其次, 此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例, 也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

实施例 1: 利用 RIN14B 细胞筛选具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁潜力的益生菌

细胞培养:

RIN14B(ATCC CRL-2059)细胞属于大鼠胰岛瘤细胞系, 培养基为添加 1% 双抗 (100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 和 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 完全培养液 (或 DMEM 培养液)。细胞在 37 $^{\circ}$ C、含有 5% CO₂ 的密闭孵箱中培养, 根据细胞生长状态每隔 2-3d 更换一次培养液。传代和冻存时, 采用 0.25% 胰酶消化液消化细胞。消化时间为 1-2 min。本实施例中使用的细胞代数 10-20 代。

益生菌培养：

所用菌株如表 1 所示。菌株活化后，以 1%接种量接种于 MRS 液体培养基，37℃ 静置培养 20h，3000rpm 离心 10min 收集菌体，收集的菌体经 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)洗涤 3 次，重悬于 HBSS 中，调整活菌浓度至 2×10^8 CFU/mL。

表 1 菌株名称和编号

菌株名称	编号
短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)	BB1
短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)	BB2
短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)	BB4
短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)	BB5
长双歧杆菌婴儿亚种 (<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>)	Bi1
长双歧杆菌婴儿亚种 (<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>)	Bi3
瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i>)	LH1
瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i>)	LH2
发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	LF2
发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	LF3

益生菌刺激 RIN14 细胞分泌 5-HTP：

RIN14B 细胞以 4×10^5 /mL 的密度种在 24 孔板，孵育 72h。弃去培养基，用含有 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2μM 氟西汀的 HBSS (1mL) 清洗细胞，加入 1mL 含有不同益生菌的 HBSS 悬液（对照组为不含菌体的 HBSS），37℃ 孵育 20min，收集上清，6000g 离心 5min 去除沉淀，取上清液冷冻于 -80℃ 待测。HPLC-FLD 检测细胞上清中的 5-HTP：

液相条件：在配备有荧光检测器 (Waters 2695) 的 Waters 2695 Alliance HPLC 装置上进行 5-HTP 的检测分析。色谱柱为 Inert Sustain C18 (150mm×4.6mm, 5um)。流动相 A 为乙酸盐缓冲液 (0.1M NaAC 和 0.1mM EDTA-2Na, pH 5.1)，流动相 B 为甲醇。流动相 A：B=85：15 (v/v)，流速为 1mL/min，柱温为 25℃，荧光检测器激发波长为 290nm，发射波长为 330nm。进样量为 20μL。

5-HTP 和 5-HT 混合标准液的配制：取 5-HTP、5-HT 标准品 (Sigma-Aldrich, Chemicals, USA) 溶解于 2.5%高氯酸溶液，配制成 1g/L 的 5-HTP 标准储存液。采用梯度稀释的方法，分别配制 200μg/L、100μg/L、50μg/L、25μg/L、12.5μg/L

和 6.25 μ g/L 的标准液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后转移至液相小瓶上机测定。

定性和定量: 用出峰的保留时间来定性, 采用外标法测峰面积来定量, 如图 1A 所示, 5-HTP 保留时间在 4.0min 左右, 5-HT 的保留时间在 5.8min 左右, 色谱峰型稳定, 基线平稳, 无其它杂质干扰峰出现, 两者分离效果好, 能够准确地定性 5-HTP, 且检测时间短, 在 8 分钟内即可完成测定。以 200 μ g/L、100 μ g/L、50 μ g/L、25 μ g/L、12.5 μ g/L 和 6.25 μ g/L 的系列标准液检测的峰面积值对浓度作标准曲线 (图 1B)。待测样品峰面积带入公式再乘以稀释倍数, 得到样品中 5-HTP 的含量。

不同菌株刺激 RIN14B 细胞后, 上清中 5-HTP 含量如图 2 所示。Bi1、Bi3、BB1、BB2、BB4、BB5 和 LH1 均能显著提高 RIN14B 细胞中 5-HTP 的分泌 (图 2)。5-HTP 作为神经递质 5-HT 的前体, 能够进入血液循环并穿过血脑屏障, 参与脑组织中 5-HT 的合成。因此, 能够刺激 RIN14B 细胞分泌 5-HTP 的菌株, 具有潜在抗抑郁功能。

益生菌刺激 RIN14B 细胞色氨酸羟化酶 1 (TPH1) 的基因表达:

细胞 RNA 的提取: 取步骤 3 中的细胞, 在经过益生菌刺激后, 用 HBSS 洗涤孔板中的贴壁细胞三次, 加入 1mL Trizol, 置于冰上孵育 5-10min, 吹打使细胞脱落, 将裂解液转移至无酶 EP 管。加入 200 μ L 氯仿, 震荡使充分乳化后, 室温静置 15min, 然后 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 15min。吸取 300-400 μ L 上清转移至新的无酶 EP 管, 加入等体积的异丙醇, 轻轻颠倒混匀, 室温静置 10min, 然后 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 10min。小心弃去上清, 缓慢沿着管壁加入 1mL 75%的冰乙醇, 混匀后 4 $^{\circ}$ C、8000g 离心 10min。小心弃去上清, 短暂离心后吸去残留液体, 在超净台中干燥 5min 使乙醇挥发。最后, 加入 20 μ L DEPC 水, 50 $^{\circ}$ C 孵育 10min 使沉淀溶解。取 1 μ L RNA 样品经过超微量分光光度计 (NanoDrop 2000C) 检测其浓度和纯度 (A_{260}/A_{280}), 其余样品 -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

细胞 cDNA 的合成: 根据反转录试剂盒的说明进行 cDNA 的合成 (Prime Script RT reagent Kit gDNA Eraser, Takara)。合成的 cDNA 样品经过超微量分光光度计 (NanoDrop 2000C) 检测其浓度和纯度 (A_{260}/A_{280}), -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

TPH1 的 mRNA 测定: 用荧光染料 SYBR Green super mix (Qiagen, Germany) 混合样本, PCR 体系为 5 μ L mix、1 μ L cDNA、1 μ L 正向和反向引物, 用 dd 水补至总体积为 10 μ L。在实时荧光定量基因扩增仪器 CFX96™ Real-Time System

(Bio-Rad, USA) 上进行检测, 每个样本设立 3 个平行孔, 并以管家基因 β -Actin 为内参, 所得结果用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 的方法进行分析; 所用的引物序列见表 2。不同益生菌刺激 RIN14B 细胞的 TPH1 mRNA 表达量见图 3。结果表明, 益生菌 Bi1 和 BB4 不仅能够提高 5-HTP 的分泌, 还能提高 RIN14B 细胞 TPH1 的 mRNA 水平。TPH1 的实验结果, 进一步缩小了有效菌的范围。本实施例中将能够同时显著提高 RIN14B 细胞的 TPH1 mRNA 表达和 5-HTP 分泌的益生菌, 认定为具有潜在的抗抑郁功能的菌株, 即 Bi1 和 BB4。接下来进行动物实验验证。

表 2 qPCR 引物序列

基因	序列
TPH1	Forward-5
	-GCCTGTTACACATCGAGTCCC-3'
	Reverse-5
	-ACAGTCTCCATAACGTCTTCCTT-3'
β -Actin	Forward-5
	-CAGTCGGTTGGAGCGAGCAT-3'
	Reverse-5
	-GGACTTCCTGTAACAACGCATCT-3'

实施例 2: 细胞筛选的有效菌株的动物实验验证

1. 慢性应激抑郁小鼠模型的建立及处理方法

6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 78 只, 适应环境一周后, 根据体重随机分为四组: 对照组、模型组、氟西汀干预组、益生菌干预组 (分别灌胃表 1 所示的 10 株益生菌), 每组含 6 只小鼠。动物分组及处理方法见表 2。

表 2 动物实验分组及处理方法

组别	处理方法	实验周期
对照组	自由饮食饮水, 灌胃对照溶剂	6 周
模型组	慢性不可预知应激;	6 周
	自由饮食饮水, 灌胃对照溶剂	
氟西汀干预组	慢性不可预知应激;	6 周
	自由饮食饮水, 灌胃 10mg/kg 氟西汀	
益生菌干预	慢性不可预知应激;	6 周

组 自由饮食饮水，灌胃 10^9 cfu 活的益生菌
(表 1)

慢性不可预知应激抑郁小鼠模型：每天随机采用 1-2 种刺激，每天刺激的时间随机决定，避免昼夜节律。每种方法不超过三次，为期五周。刺激因素包括：(1) 禁食 24h；(2) 禁水+空瓶刺激 24h；(3) 夹尾 3min；(4) 潮湿垫料 24h；(5) 制动 1~2h；(6) 45°C 倾斜笼盒 24h；(7) 持续光照 24h；(8) 无垫料 24h；(9) 强迫游泳 15 分钟；(10) 孤养 24h。

益生菌灌胃剂：取活化 2 代的益生菌并于 37°C 下培养至 24h，于 4°C、8000r/min 离心 3min 收集菌体，弃去上清并用 5% 灭菌脱脂乳液重悬菌体，使益生菌浓度达到 5×10^9 CFU/mL。灌胃体积为 0.2mL/只/天。

2. 益生菌对小鼠抑郁行为的改善作用

第五周开始，停止每日的慢性不可预知应激以及药物和益生菌的干预，同时对所有小鼠进行行为学测试。包括强迫游泳实验、糖水偏好实验和跳台实验。具体实施方法和结果如下：

(1) 强迫游泳实验：

强迫游泳实验是一种行为绝望实验法，是用于评价药物抗抑郁作用的经典实验模型。实验桶内装入大约 20cm 高的清水，水温在 $24 \pm 1^\circ$ 左右，在正式实验前 24 小时，每只小鼠均进行 15 分钟的游泳训练测试。正式实验时，每只小鼠进行 6 分钟测试。使用摄像头对实验全程录像。记录不动(漂浮)时间，即四肢不动或仅后肢轻微运动。实验结果如图 4A 所示，抑郁组小鼠在水中的游泳时间显著降低，表现出行为绝望的特点。而服用 Bi1 和 BB4 能够显著改善这一现象，证明了 Bi1 和 BB4 的抗抑郁功效。实施例 1 中已经证明，Bi1 和 BB4 能够提高 RIN14B 细胞中 TPH1 mRNA 的表达和 5-HTP 的分泌，该动物实验的结果与细胞模型的筛选结果具有一致性。

(2) 糖水偏好实验：

糖水偏好测试是检测抑郁症快感缺失的模型。在开始测试之前，笼内放置两个相同的饮水瓶，使小鼠适应性饮水至少 3 天。适应结束后，将其中一瓶水替换为含有 1% 蔗糖的水溶液。通过称量瓶子重量来检测水和蔗糖溶液的摄入量。每天更换两个瓶子的位置，以减少因水量不同引起的饮水偏好。蔗糖偏好计算公式为：蔗糖偏好 = $V(\text{蔗糖溶液}) / [V(\text{蔗糖溶液}) + V(\text{水})] \times 100\%$ ，

总共测试 3 天，取平均值。实验结果如图 4B 所示，抑郁小鼠的糖水偏好程度显著下降，服用 Bi1、BB2、BB4 和 LH1 后，小鼠恢复至正常的糖水偏好程度。其中 Bi1 和 BB4 符合细胞模型筛选的结果。

(3) 跳台实验：

抑郁通常伴随着一定程度的焦虑和记忆障碍。跳台实验能反映小鼠对被动伤害的记忆程度和记忆重现时的焦虑程度。第一阶段为电击训练阶段。将小鼠放入跳台反应箱的平台上，反应箱底部电栅通电（38V），当小鼠从平台上跳下时，即遭受一次电击刺激。训练时间为 3min，若个别小鼠 3 分钟内没有跳下平台，则人为将其赶下，确保所有动物均遭受到电击伤害，造成伤害感受性记忆。训练完毕后放回原笼饲养。第二阶段（电击训练后 24h）为记忆再现测试阶段。将小鼠放入反应箱平台上，测试时间为 3 分钟，本次测试不通电，记录小鼠从站上平台到第 1 次跳下的时间（在平台上停留的时间）即跳台潜伏期，如果小鼠一直未跳下平台则以 180s 计算。整个实验过程中尽量避免对动物行为的人为干扰。实验结果表明（图 4C），抑郁小鼠的跳台潜伏期显著升高，代表抑郁和焦虑程度增加，而服用 Bi1、Bi3、BB2、BB4 和 BB5 能显著减少抑郁小鼠的跳台潜伏期，表明这些菌株不仅能缓解抑郁症状，而且能改善抑郁伴随的焦虑症状。其中 Bi1 和 BB4 符合细胞模型筛选的结果。

3. 益生菌对抑郁小鼠脑中神经递质和神经营养因子的影响

实施例 2 中的小鼠于第六周末安乐处死，取小鼠脑组织，并于冰上分离海马和前额叶皮质。分别取一定质量的新鲜海马和前额叶皮质组织（重量不低于 50mg），加入 9 倍体积的无菌 PBS 缓冲液（相当于 1g 组织加 9ml 的匀浆液），用组织匀浆器进行匀浆，组织液经过 3000g、20min 离心后取上清，用 ELISA 试剂盒检测 5-HT 和 BDNF 含量。海马组织液上清液中加入等体积的 5%高氯酸沉淀蛋白，10000g 离心 10min，吸取上清液经 0.22 μ m 水系滤膜过滤后，采用高效液相色谱-荧光检测法（HPLC-FLD）进行 5-HTP 的含量测定。实验结果如图 2 所示，结果表明，服用 Bi1、LF3 能够显著逆转应激造成的海马组织 5-HT 和 5-HTP 水平降低（图 5）。其中 Bi1 和细胞实验结果一致。此外，服用 Bi1、BB4 和 BB5 能够显著提高小鼠前额叶皮质中脑源神经营养因子的浓度（图 6），其中 Bi1 和 BB4 符合细胞筛选的结果。

4. 益生菌对小鼠 HPA 亢进的缓解作用：

实施例 2 中的小鼠于第六周末安乐处死，收集小鼠血液，1000g 离心 15min 获得血清。用 ELISA 试剂盒检测血清中促肾上腺皮质激素 (adreno-cortico-tropic-hormone, ACTH) 和皮质酮 (Corticosterone) 的含量。实验结果表明 (图 7)，抑郁小鼠由于持续的慢性应激，出现下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 功能亢进，血清中 ACTH 和皮质酮水平 ($P < 0.05$) 升高，服用 BB1、BB2 能显著降低血清中 ACTH 的浓度，服用 Bi3、BB4 和 LF2 能显著降低血清中皮质酮的水平。其中 BB4 符合细胞实验的预期的结果。

实施例 3 细胞筛选结果和动物实验结果的相关性分析：

为了进一步验证细胞筛选模型的有效性，将细胞实验结果 (5-HTP 和 TPH1) 与动物实验的各个检测指标做皮尔森相关性分析。结果如图 8 所示，其中蓝色代表正相关，红色代表负相关，圆点面积大小反映相关性系数的大小。可以看出，RIN14B 细胞 TPH1 mRNA 的表达量和 5-HTP 的分泌量，与动物实验中行为学表现 (抑郁症状的减轻)、前额叶皮质中 BDNF 水平呈正相关，与 HPA 功能亢进呈负相关。其中，RIN14B 细胞 5-HTP 分泌量与小鼠糖水偏好性、跳台潜伏期的缩短、脑中 BDNF 的水平呈显著正相关。RIN14B 细胞中 TPH1 mRNA 的表达量和小鼠游泳时间、脑中 BDNF 的水平呈显著正相关 (图 9)。以上结果均表明，通过 RIN14B 细胞模型筛选出的具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁潜力的益生菌，能够在动物实验中验证其有效性，且动物实验的结果与细胞模型筛选的结果具有明显相关性。因此，以 RIN14B 细胞为模型，基于 5-HTP 相关途径的测定 (TPH1 和 5-HTP)，能够成为一种快速有效的通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁益生菌的筛选方法。

应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

11
权 利 要 求 书

1、一种基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：包括，

细胞培养：所述细胞能够表达色氨酸羟化酶 1 并分泌 5-羟色氨酸；

所述细胞用牛血清白蛋白和氟西汀处理后与益生菌共孵育，筛选具有抗抑郁功能的益生菌。

2、根据权利要求 1 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述细胞包括大鼠胰岛瘤细胞 RIN14B。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述细胞培养，其中，细胞培养基包括 RPMI1640 培养基。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述益生菌，包括双歧杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、乳球菌属、明串珠菌属、丙酸杆菌属、片球菌属、芽孢杆菌属。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述筛选具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌，包括，将传代细胞以 $10^5 \sim 10^6$ /mL 接种于 24 孔板，用含有 0.1% 牛血清白蛋白和 1-4 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀的 Hank's 平衡盐溶液清洗细胞，后加入含有不同益生菌的 HBSS 悬液，益生菌的浓度调整到 $10^7 \sim 10^9$ cfu/mL，37°C 孵育 20min 后，收集悬液，5000~6000g 离心 5~10min 去除沉淀，取上清液待测。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述筛选具有通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌，包括，与益生菌共同孵育后的所述细胞分泌的 5-羟色氨酸和细胞中色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平的检测。

7、根据权利要求 6 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：将所述细胞 5-羟色氨酸的分泌量提高 10 倍以上的益生菌菌株作为筛选的有效菌株。

8、根据权利要求 7 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现

抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述 5-羟色氨酸的分泌量采用荧光高效液相色谱进行检测分析。

9、根据权利要求 6 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：将色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 提高 50% 以上的益生菌菌株作为有效菌株。

10、根据权利要求 9 所述的基于细胞水平筛选通过 5-羟色氨酸相关途径实现抗抑郁功能的益生菌的方法，其特征在于：所述色氨酸羟化酶 1 的 mRNA 水平用 qPCR 进行检测。

A

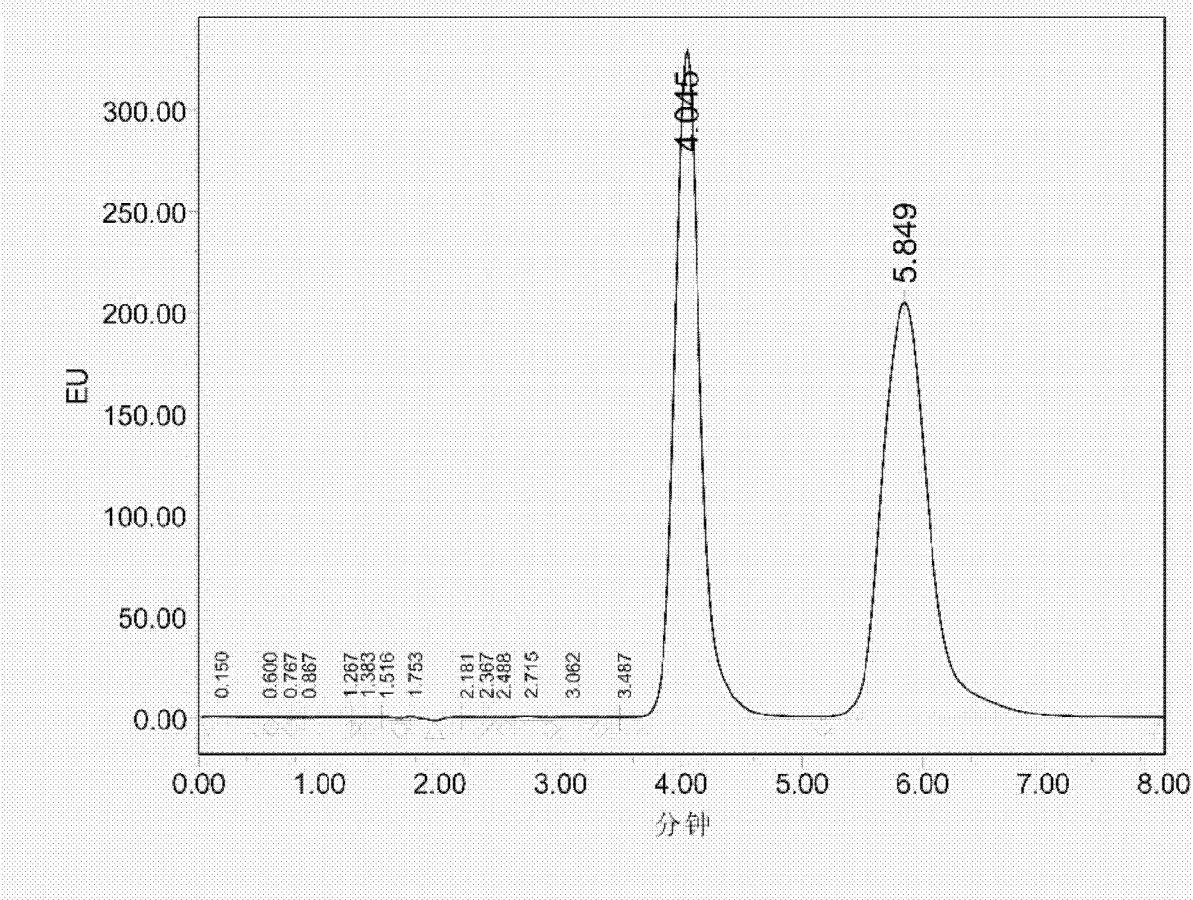


图 1

B

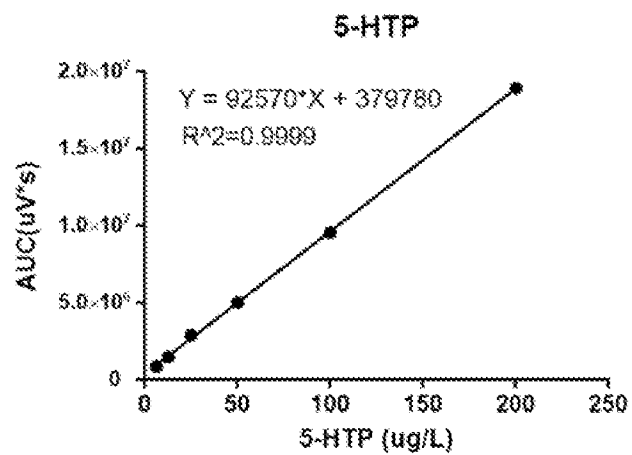


图 1

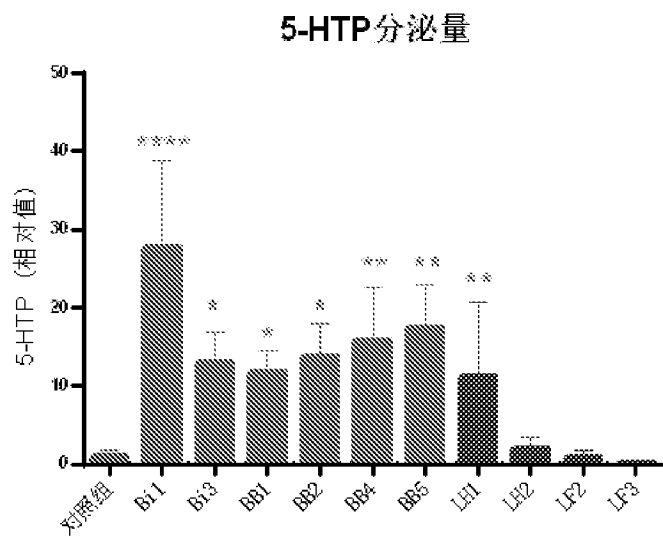


图 2

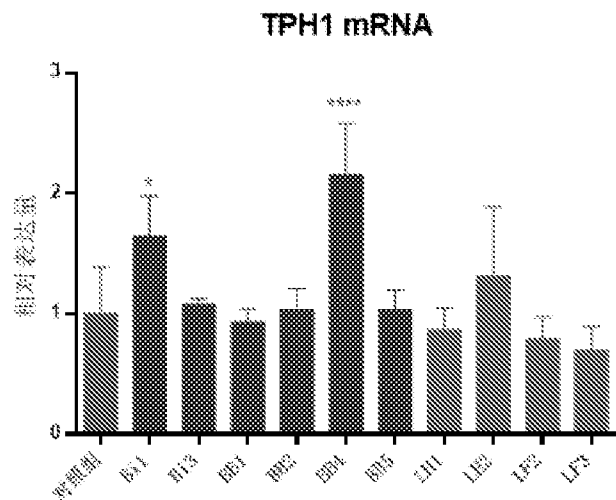


图 3

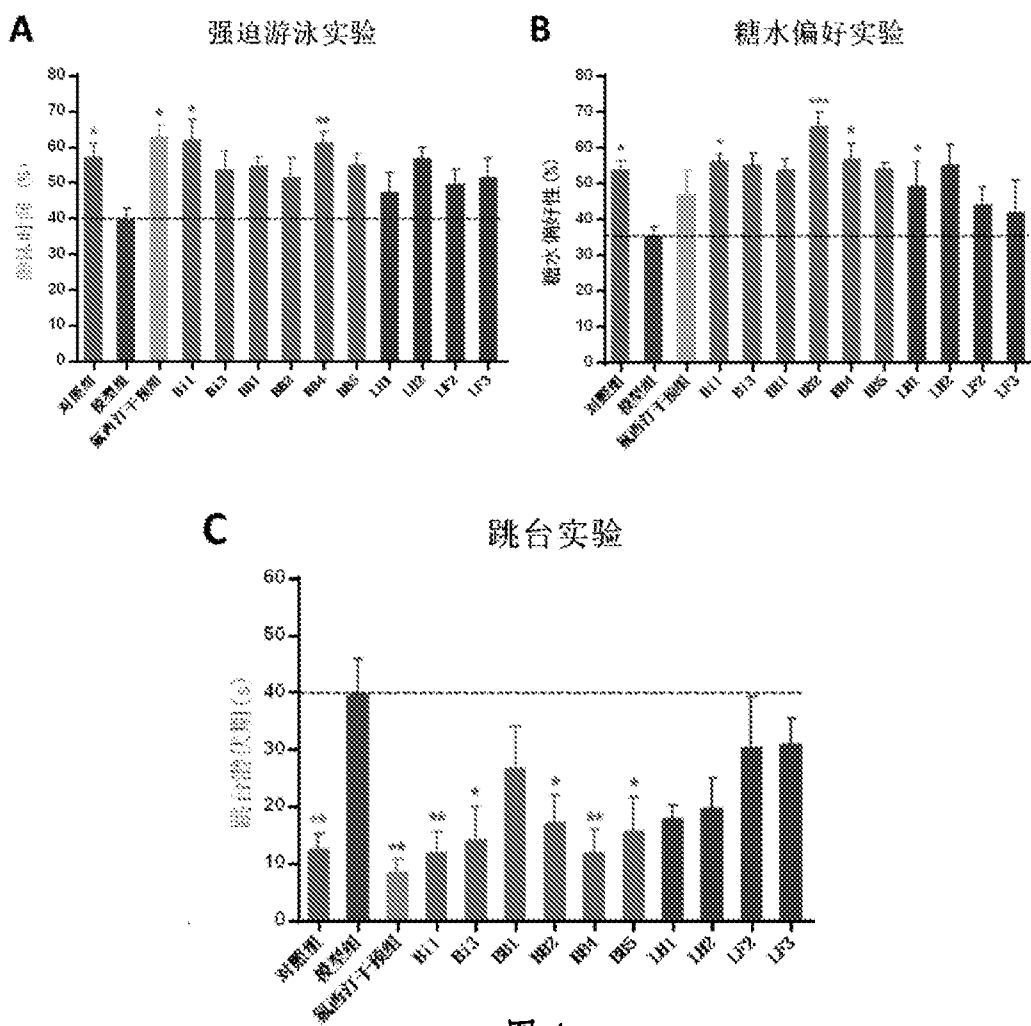


图 4

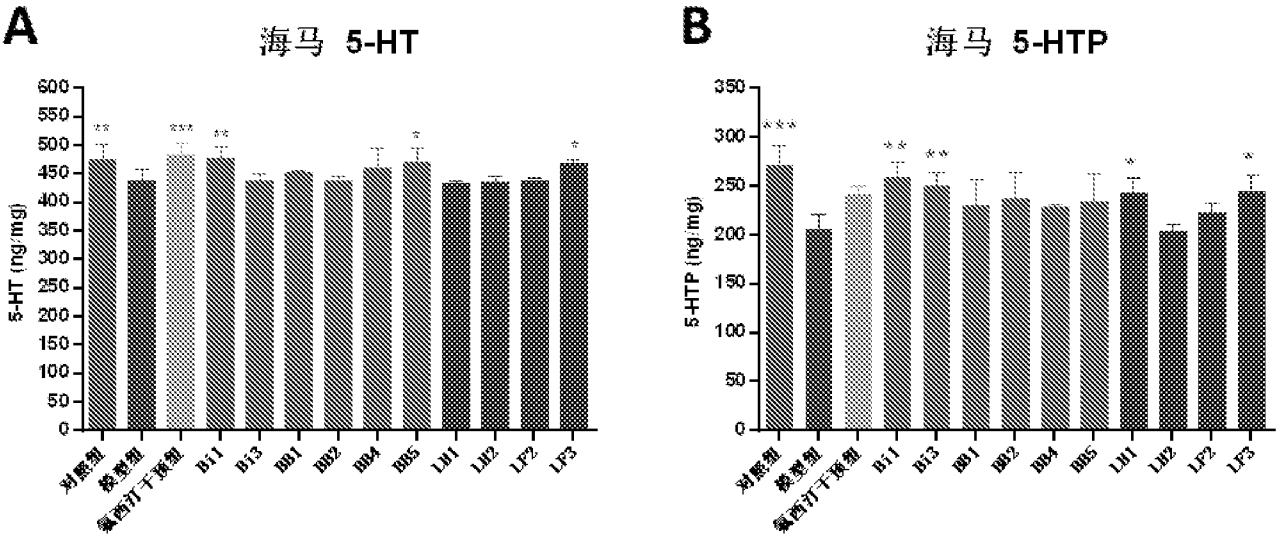


图 5

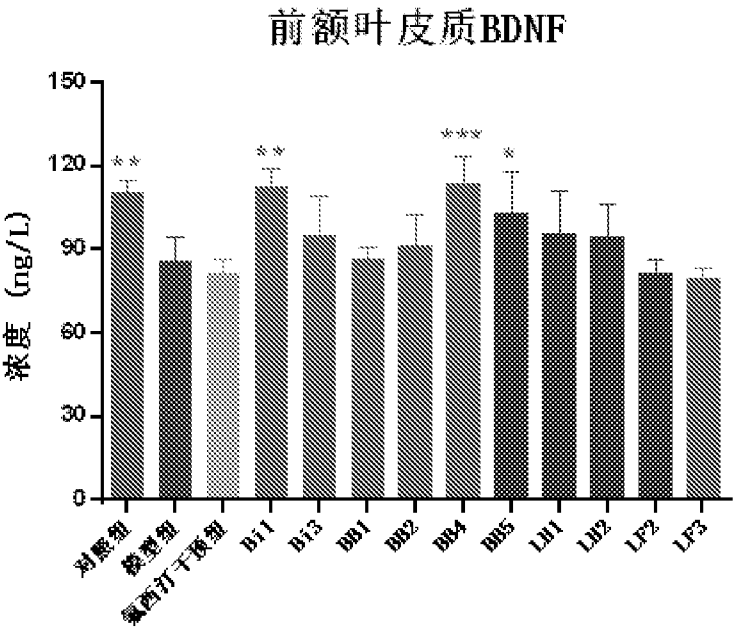


图 6

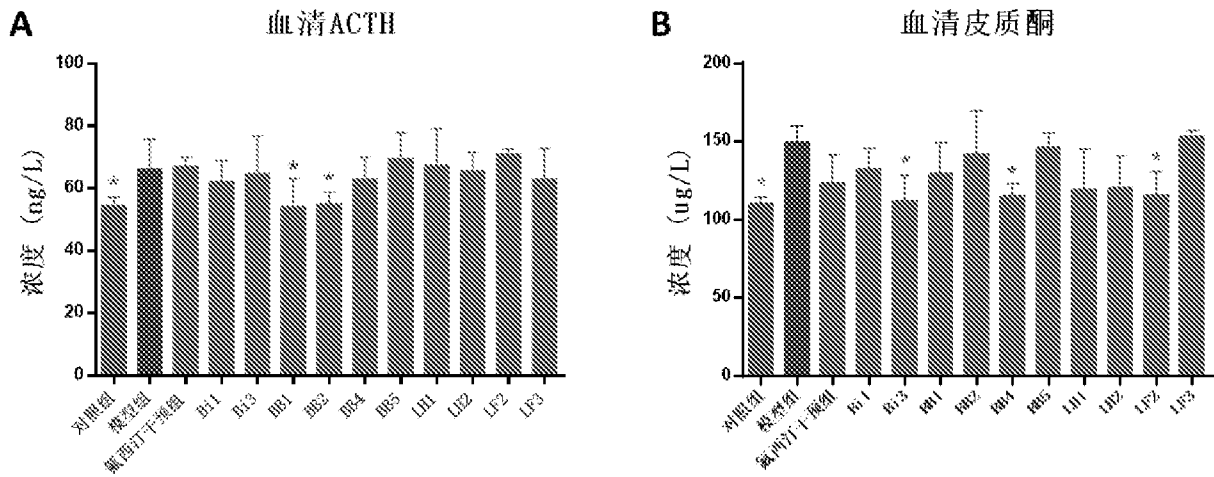


图 7

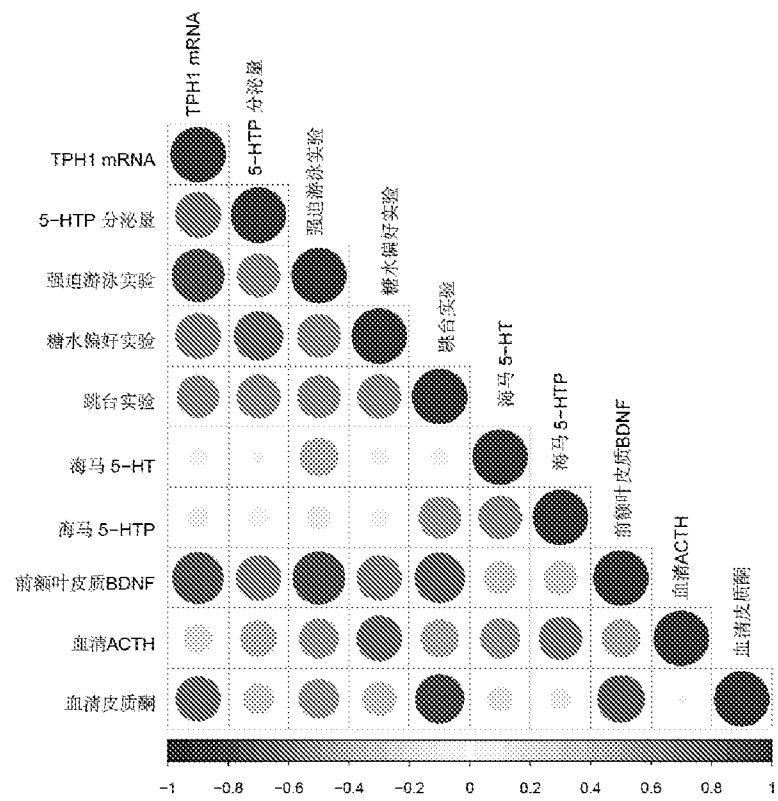


图 8

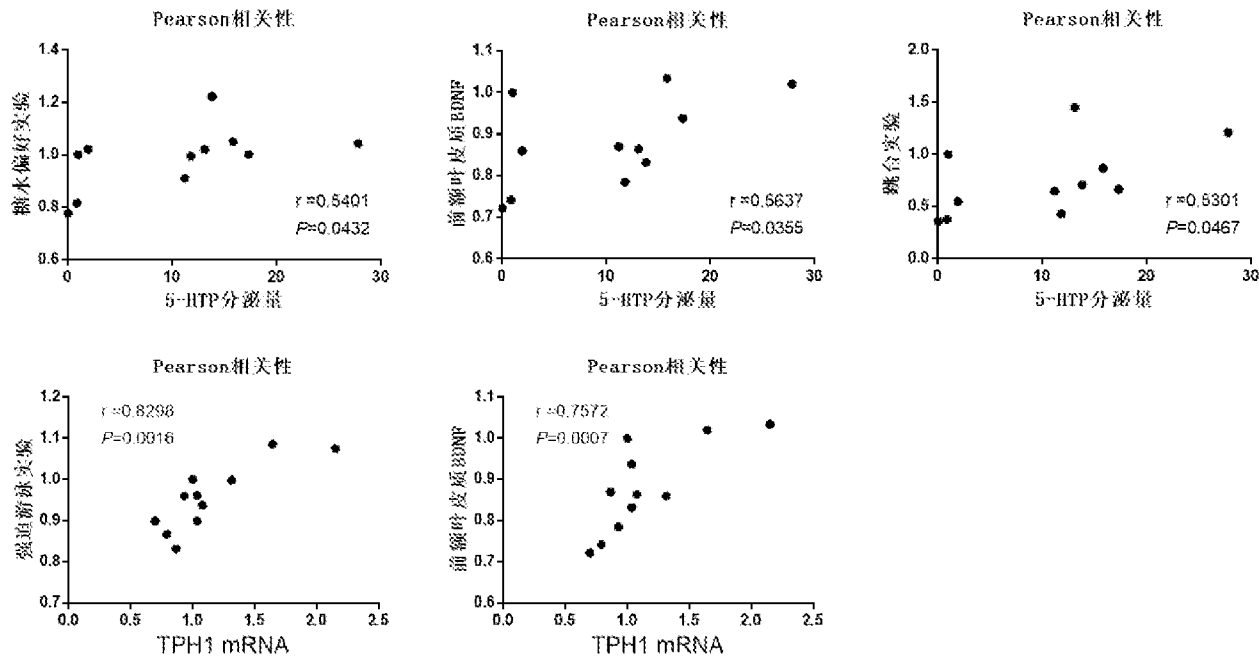


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N,C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 色氨酸羟化酶, 5-羟色氨酸, 益生菌, TPH-1, 抑郁, 细菌, 细胞, 筛选, gut, bacteria, 5-HT, depressed, screen

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106520603 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 22 March 2017 (2017-03-22) claims 1 and 3	1-10
Y	YANO, J. M. et al. "Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis" <i>Cell</i> , Vol. 161, No. 2, 09 April 2015 (2015-04-09), p. 265, right column, last paragraph, p. 268, right column, last paragraph to p. 269, and p. 274, left column, paragraph 3	1-10
A	CN 103087963 A (EUHAN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 08 May 2013 (2013-05-08) entire document	1-10
A	CN 102181449 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 14 September 2011 (2011-09-14) entire document	1-10
A	陈彬等 (CHEN, Yi et al.). "慢性低强度应激抑郁模型大鼠组织中5-羟色胺和色氨酸羟化酶的表达变化 (Changes of 5-hydroxytryptamine and Tryptophan Hydroxylase Expressions in Tissues of Depression Model Rats Induced by Chronic Low-intensity Stress)" <i>中国药房 (China Pharmacy)</i> , Vol. 28, No. 22, 10 August 2017 (2017-08-10), pp. 3061-3064	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 April 2019

Date of mailing of the international search report

20 May 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101684

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WACLAWIKOVA, B. et al. "Role of Microbiota and Tryptophan Metabolites in the Remote Effect of" <i>Pharmaceuticals (Basel)</i> , Vol. 11, No. 3, 25 June 2018 (2018-06-25), pp. 1-19	1-10
A	郑少君等 (ZHENG, Shaojun et al.). "抑郁症和肠道微生态的关联性研究 (A Review of Association between Depression and Intestinal Microecology)" <i>中国心理卫生杂志 (Chinese Mental Health Journal)</i> , Vol. 32, No. 7, 10 July 2018 (2018-07-10), pp. 537-541	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/101684

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106520603	A	22 March 2017	None			
CN	103087963	A	08 May 2013	CN	103087963	B	04 March 2015
CN	102181449	A	14 September 2011	CN	102181449	B	10 April 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/101684

A. 主题的分类 C12N 1/20(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N, C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 色氨酸羟化酶, 5-羟色氨酸, 益生菌, TPH-1, 抑郁, 细菌, 细胞, 筛选, gut, bacteria, 5-HT, depressed, screen		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 106520603 A (江南大学) 2017年 3月 22日 (2017 - 03 - 22) 权利要求1、3	1-10
Y	YANO, J. M. 等. "Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis" Cell, 第161卷, 第2期, 2015年 4月 9日 (2015 - 04 - 09), 第265页右栏最后1段, 第268页右栏最后1段至269页, 第274页左栏第3段	1-10
A	CN 103087963 A (武汉工业学院) 2013年 5月 8日 (2013 - 05 - 08) 全文	1-10
A	CN 102181449 A (浙江大学) 2011年 9月 14日 (2011 - 09 - 14) 全文	1-10
A	陈移等. "慢性低强度应激抑郁症模型大鼠组织中5-羟色胺和色氨酸羟化酶的表达变化" 中国药房, 第28卷, 第22期, 2017年 8月 10日 (2017 - 08 - 10), 第3061-3064页	1-10
A	WACLAWIKOVA, B. 等. "Role of Microbiota and Tryptophan Metabolites in the Remote Effect of" Pharmaceuticals (Basel), 第11卷, 第3期, 2018年 6月 25日 (2018 - 06 - 25), 第1-19页	1-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 30日		2019年 5月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		刘新蕾 电话号码 86-(10)-53962097

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	郑少君等. “抑郁症和肠道微生态的关联性研究” 中国心理卫生杂志，第32卷，第7期，2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10)， 第537-541页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/101684

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106520603	A	2017年 3月 22日	无	
CN	103087963	A	2013年 5月 8日	CN	103087963 B 2015年 3月 4日
CN	102181449	A	2011年 9月 14日	CN	102181449 B 2013年 4月 10日