



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104780783 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201380052341. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 09. 10

A23L 1/30(2006. 01)

(30) 优先权数据

1251019-4 2012. 09. 11 SE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/068656 2013. 09. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/040962 EN 2014. 03. 20

(71) 申请人 西拉比索公司

地址 瑞典隆德

(72) 发明人 佩尔-奥克·阿尔贝特松

夏洛特·埃兰松阿尔贝特松

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张国梁

权利要求书2页 说明书11页

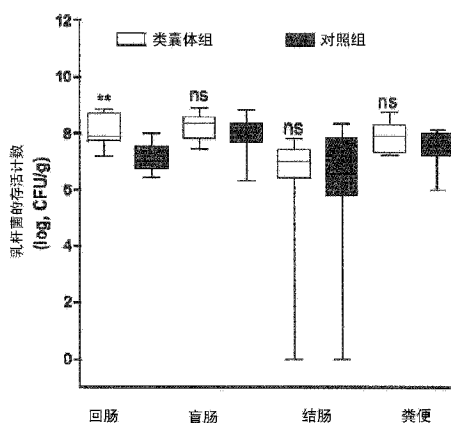
序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

益生元类囊体组合物

(57) 摘要

本发明提供一种包含类囊体的组合物,所述组合物调节肠道微生物群,导致增加的益生菌定殖和减少的潜在有害细菌的生长。根据一个实施方案,包含类囊体的组合物是益生元试剂。



1. 包含分离的、富集的一类囊体或其部分的组合物作为益生元试剂的非治疗性应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述应用用于促进哺乳动物肠内的乳酸细菌。
3. 根据权利要求 2 所述的应用,其中所述应用用于促进回肠内的乳酸细菌。
4. 根据权利要求 2 或 3 中任一项所述的应用,其中被促进的所述细菌是乳杆菌属 (*Lactobacilli*) 和 / 或双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的应用,其中所述组合物还包含益生菌。
6. 根据权利要求 5 所述的应用,其中所述益生菌是双歧杆菌属或乳杆菌属。
7. 根据权利要求 6 所述的应用,其中所述益生菌是胚乳乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 或婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的应用,其中所述类囊体或其部分是从绿色叶子或绿藻富集的。
9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中所述类囊体或其部分是从菠菜富集的一类囊体或其部分。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的应用,其中所述组合物中的叶绿素含量为约 1mg 至 75mg 叶绿素 /g 组合物。
11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的应用,其中所述应用用于促进哺乳动物肠内乳酸细菌;并且其中要施用的类囊体的每日剂量为 2.4mg-240mg 类囊体 /kg 哺乳动物体重。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的应用,其中所述组合物是食品的一部分。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的应用,其中所述组合物是口服的营养保健组合物,其包括含有所述类囊体或其部分的生理学耐受的水包油乳液。
14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述组合物包含 20-30wt. % 的类囊体和 20-30wt. % 的油。
15. 包含分离的、富集的一类囊体或其部分的组合物,其应用于治疗或预防与紊乱的肠道微生物群相关的病症,其中所述应用包括给哺乳动物如人口服施用所述组合物,以促进所述哺乳动物的肠内,如回肠内和盲肠内,例如,回肠内的乳酸细菌,如乳杆菌属和双歧杆菌属。
16. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中与紊乱的肠道微生物群相关的病症是抗生素相关的腹泻、旅行者腹泻、小儿腹泻或肠易激综合征。
17. 根据权利要求 15 或 16 所述的组合物,其还包含益生菌。
18. 根据权利要求 17 所述的组合物,其中所述益生菌是双歧杆菌属或乳杆菌属。
19. 根据权利要求 18 所述的组合物,其中所述益生菌是胚乳乳杆菌或婴儿双歧杆菌。
20. 根据权利要求 15-19 中任一项所述的组合物,其中所述类囊体是从绿色叶子或绿藻富集的。
21. 根据权利要求 20 所述的组合物,其中所述类囊体或其部分是从菠菜富集的一类囊体或其部分。
22. 根据权利要求 15-21 中任一项所述的组合物,所述组合物中的叶绿素含量为约 1mg 至 75mg 叶绿素 /g 组合物。
23. 根据权利要求 15-22 中任一项所述的组合物,其中要施用的类囊体的每日剂量为

2. 4mg-240mg 类囊体 /kg 哺乳动物体重。

24. 根据权利要求 15-23 中任一项所述的组合物,其中所述组合物是食品或药物的一部分。

25. 根据权利要求 15-24 中任一项所述的组合物,其中所述组合物是口服的药物或营养保健组合物,其包括含有类囊体的生理学耐受的水包油乳液。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物,其中所述组合物包含 20-30wt. % 的类囊体和 20-30wt. % 的油。

27. 包含分离的、富集类囊体或其部分和益生菌的组合物。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述益生菌是双歧杆菌属或乳杆菌属。

29. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述益生菌是胚乳乳杆菌或婴儿双歧杆菌。

30. 根据权利要求 27-29 中任一项所述的组合物,其中所述类囊体是从绿色叶子或绿藻富集的。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中所述类囊体或其部分是从菠菜富集类囊体或其部分。

32. 根据权利要求 27-31 中任一项所述的组合物,其中所述组合物中的叶绿素含量为约 1mg 至 75mg 叶绿素 /g 组合物。

33. 根据权利要求 27-32 中任一项所述的组合物,其中所述组合物是食品或药物的一部分。

34. 根据权利要求 27-33 中任一项所述的组合物,其中所述组合物是口服的药物或营养保健组合物,其包括含有类囊体的生理学耐受的水包油乳液。

35. 根据权利要求 34 所述的组合物,其中所述组合物包含 20-30wt. % 的类囊体和 20-30wt. % 的油。

益生元类囊体组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及益生元 (prebiotics) 领域, 并且特别涉及刺激哺乳动物消化系统中益生菌 (probiotic bacteria)、典型地是乳酸细菌的生长和 / 或活性的组合物。

[0002] 背景

[0003] 益生菌在本领域中是公知的, 并且其健康益处也记载于文献中。为了增加益生菌的益处, 它们可以补充有促进细菌的益生元物质。益生元是对微生物群 (microbiota) 具有有益效果的非细菌产物。它们作用为结肠微生物群的肥料, 由此增强有益的共生生物体, 如双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的生长。益生元典型地是选择性发酵的成分, 其允许对宿主舒适和健康有益的胃肠微生物群 (也称为肠道微生物群或共生菌群) 的组成和 / 或活性中的特定变化。

[0004] 促进益生菌, 如典型地乳酸细菌, 例如, 乳杆菌属和双歧杆菌属, 可以对于紊乱的肠道微生物群有关的疾病的治疗有益。例如, 抗生素相关的腹泻、旅行者腹泻、小儿腹泻和肠易激综合征 (irritable bowel syndrome) 是已知与紊乱的肠道微生物群相关的病症。此外, 益生元试剂的使用已经与减少的结肠直肠癌的危险有关。此外, 共生菌群的紊乱可能由于多种其他因素而发生, 包括, 但不限于, 放射疗法或偶然辐射, 抗生素和其他影响细菌生长的药剂的应用, 肠道疾病, 如谷蛋白不耐受性。此类不需要的变化可能引起疾病和紊乱的免疫功能, 并且可以通过使用益生元而进行调整, 以便能够获得共生菌群和宿主二者的正常生理学生长和功能。

[0005] 因此, 可以通过促进益生菌而治疗或预防有益肠道细菌群紊乱的病症。

[0006] 存在庞大种类的潜在的益生元物质。例如, EP 1 056 358 B1 中描述了口服摄入在益生元食品中的特定的单糖刺激人结肠中有益细菌的生长。然而, 需要发现易于制备并且安全摄入的具有附加益处的新的改善的益生元物质。

[0007] 概述

[0008] 因此, 本发明优选地寻找克服上文指出的本领域中的单个或任意组合的缺点, 并且通过提供易于制备并且安全摄入的具有附加益处的新的改善的益生元组合物而至少解决上文提及的问题。

[0009] 按照本发明的一个方面, 提供给包含分离的、富集的类型体或其部分的组合物作为益生元试剂的非治疗性应用。所述应用典型地用于促进哺乳动物肠道 (如回肠和盲肠) 中的乳酸细菌, 如乳杆菌和双歧杆菌。

[0010] 按照本发明的另一个方面, 提供用于治疗或预防与紊乱肠道微生物群相关的病症的包含分离的、富集的类型体或其部分的组合物, 其中所述应用包括对哺乳动物, 如人口服给药, 以促进所述哺乳动物肠道 (如回肠和盲肠, 例如回肠) 中的乳酸细菌, 如乳杆菌和双歧杆菌。

[0011] 按照本发明的另一个方面, 提供包含分离的、富集的类型体或其部分和益生菌的组合物。

[0012] 按照本发明的另一个方面, 提供治疗哺乳动物中与紊乱的肠道微生物群相关的病

症的方法,通过口服施用包含分离的、富集的一类囊体或其部分的组合物进行。

[0013] 本发明的其他有利特征在从属权利要求中定义。另外,在本文公开的实施方案中详细描述本发明的有利特征。

[0014] 附图简述

[0015] 通过下述本发明的实施方案的描述,参考附图,本发明能够具有的这些和其他方面、特征和优点将是清楚的,并得以阐明,在所述附图中,

[0016] 图 1 是显示按照本发明的实施方案的血浆胰岛素的浓度 (pM) 的图表;

[0017] 图 2 和 3 是显示按照本发明的实施方案的乳杆菌属存活计数 (CFU/g 组织) 的图表;

[0018] 图 4 是显示按照实施方案的细菌存活计数 (CFU/g 组织) 的图表;和

[0019] 图 5 和 6 是显示按照本发明的实施方案的 T-RFLP 数据的主要成分分析 (PCA) 的图表。

[0020] 详述

[0021] 为了使本领域技术人员能够实施本发明,以下参考附图更详细地描述本发明的一些实施方案。然而,本发明可以以多种不同的形式体现,并且不应该解释为局限于本文所述的实施方案。相反,提供这些实施方案,以使本公开内容全面和完整,并且将完全向本领域技术人员传达本发明的范围。所述实施方案不限制本发明,而是本发明仅受附上的专利权利要求的限制。此外,在附图示例的具体的实施方案的详细描述中所用的术语不意欲限制本发明。

[0022] 类囊体可以从绿色叶子的叶绿体膜提取,并且包含蛋白、脂质和色素(例如,叶绿素和类胡萝卜素)。在一些研究中已经发现其在人和动物受试者中都能增加饱食感、减少饥饿信号并且促进体重减轻(参见 WO 2006/132586 和 WO 2010/008333 以及其它文献)。促进饱食感的作用以两种方式解释:类囊体与饮食三酰甘油和脂肪酶/共脂肪酶复合物相互作用,并且结果引起物理阻碍 (physical hindrance),由此延长对饮食脂肪的消化以及肠壁对营养物的摄取。

[0023] 类囊体由机体消化,因此可以使用它们,而没有任何毒性作用。然而,类囊体较其他细胞区室(如线粒体)消化更缓慢,这是有利的。本领域技术人员认识到,益生元试剂是允许对宿主的舒适和健康赋予益处的胃肠微生物群的组成和/或活性中的特异性变化的成分。

[0024] 本发明人在大鼠中研究了类囊体对肠道微生物群的作用和葡萄糖耐量测试后的结果。他们令人惊讶地发现类囊体调节肠道微生物群(参见图 2-4),因此作为益生元试剂行使功能。此外,他们发现类囊体增加胰岛素敏感性(参见图 1)。

[0025] 简言之,将 Sprague-Dawley 大鼠分成两组,分别喂饲正常大鼠食物的富含类囊体的饮食或对照饮食 10 天。10 天后,进行葡萄糖耐量测试,与对照相比,在喂饲类囊体的大鼠中产生显著更低的胰岛素浓度(参见图 1)。细菌分析表明,添加类囊体诱导了回肠中乳杆菌的显著增加,这得到了肠道样品的细菌培养和 qPCR 二者的证实。并且,通过 qPCR 分析在类囊体组中观察到显著减少量的粪便乳杆菌,这表明在补充类囊体 10 天后,乳杆菌可能更加粘附肠黏膜。

[0026] 其他细菌分析表明,与对照相比,在类囊体组中,结肠、盲肠和粪便中革兰氏阳性

细菌显著减少。当比较类囊体和对照动物时,通过末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 的主要成分分析进行的粪便微生物群分析证明独特的微生物群体。综上所述,这些发现表明类囊体可以调节肠道微生物群,由此作为一种益生元试剂行使功能。这又可能对于体重和代谢病症的调节是重要的。

[0027] 因此,本发明人已经发现给哺乳动物口服施用包含类囊体或其部分的组合物增强肠道益生菌群并且促进乳酸细菌。包含分离的、富集类囊体的组合物由此可以作为益生元试剂行使功能。此外,已经表明不同益生菌菌株,特别是乳杆菌,可用于预防或治疗受损的免疫功能,以及抗生素相关的腹泻、旅行者腹泻、小儿腹泻和肠易激综合征。

[0028] 按照一个实施方案,由此提供包含分离的、富集类囊体或其部分的组合物,以促进哺乳动物肠道中的乳酸细菌,如乳杆菌属和双歧杆菌属。所述哺乳动物可以是人。典型地,口服施用所述组合物,以到达肠道。通过促进肠道(尤其是回肠和盲肠,更优选是回肠)中的乳酸细菌,可以预防或治疗与紊乱的肠道微生物群相关的病症,包括,但不限于,受损的免疫功能,以及抗生素相关的腹泻、旅行者腹泻、小儿腹泻和肠易激综合征。

[0029] 尽管分离的、富集类囊体或其部分可以用于调节肠道微生物群,但是,按照一个实施方案,益生菌包含在组合物中。通过包含益生菌,可以提高对肠道微生物群的作用,并且补充已有的益生菌。要包含在所述组合物中的益生菌可以是双歧杆菌属,例如,婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*),和乳杆菌属,例如,胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

[0030] 分离和富集类囊体的一般原理在本领域中是已知的(参见 PCT/SE2006/000676, WO/SE2009/000327 和 Emek, SC, Szilagyi A, Akerlund H E, 等.(2010)A large scale method for preparation of plant thylakoids for use in body weight regulation(用于制备用于体重调节的植物类囊体的大规模方法)Prepar biochem&biotech 40(1), 13-27.)。

[0031] 典型地,所述组合物的类囊体由绿色叶子或绿藻富集。优选地,类囊体由菠菜分离并富集。在将类囊体加入到组合物中之前,可以以某种方式浓缩类囊体,以使所述分离的、富集类囊体的叶绿素含量为约 8mg-150mg 叶绿素/g。类囊体在组合物中的含量可以对应于每克组合物 1mg-75mg 叶绿素的叶绿素含量。

[0032] 用于促进肠道中的乳酸细菌,如乳杆菌属和双歧杆菌属的组合物可以是食品或药物。按照一个实施方案,所述组合物是口服的药物或营养保健组合物 (nutraceutical composition),其包括含有类囊体的生理学耐受的水包油乳液。在这样的实施方案中,类囊体的量为 20-30wt. %,如约 25wt. %。此外,油含量可以为 20-30wt. %,如约 25wt. %。所用的油可以是食品级的植物油,如油菜籽油、橄榄油、葵花籽油等。

[0033] 由于所述组合物可以以多种形式施用,所以,要施用的类囊体的每日剂量可能不同。作为指导原则,要施用的组合物的量可以以这样的方式选择,以使剂量与 2.4mg-240mg 类囊体/kg 哺乳动物体重的每日剂量相关。

[0034] 按照另一个实施方案,提供本文公开的类囊体的组合物用于作为益生元试剂的非治疗性应用。由于本文公开的类囊体的组合物可以改变胃肠微生物群的组成和/或活性,因此其可以对宿主舒适和健康赋予益处。

[0035] 另一个实施方案涉及治疗或预防哺乳动物中与紊乱的肠道微生物群相关的病症

的方法。在这样的方法中,对患有与紊乱的肠道微生物群相关的病症的哺乳动物口服施用有效量的本文公开的组合物。此外,所述方法还包括对哺乳动物口服施用本文公开的组合物,以防止所述组合物发展紊乱的肠道微生物群。与紊乱的肠道微生物群相关的病症的实例包括抗生素相关的腹泻、旅行者腹泻、小儿腹泻和肠易激综合征。

[0036] 当用于本文时,“防止/预防”不应该解释为意指,为获得预防在使用本文公开的实施方案所述的组合物后病症和/或疾病可能永远不再发生。此外,该术语不应该解释为意指,在所述预防所述病症的应用之后,病症至少在某种程度上不可能发生。相反,“防止/预防”意欲意指,要预防的病症,如果尽管在所述应用的存在下仍然发生,与没有所述应用相比,严重性较小。按照一个实施方案,“防止/预防”涉及预防性处理。

[0037] 另一个实施方案涉及本文公开的组合物用于施用到哺乳动物(如人)的肠中,以增加胰岛素敏感性。为了治疗或预防2型糖尿病(非胰岛素依赖性糖尿病),可以增加胰岛素敏感性。

[0038] 通常存在于人胃肠道中的益生菌(统称为肠道微生物群)在营养获取和能量调节方面具有重要的作用。今年来,已经提议在体重正常的人与超重或肥胖的人之间所述微生物群是不同的。人和动物研究的多种发现已经揭示肠道细菌的两个主要的门(即,革兰氏阳性厚壁菌门(Firmicutes)和革兰氏阴性拟杆菌门(Bacteroidetes))的量通过改变宿主能量获取效率而与肥胖症的病理生理学紧密相关。因此,在肥胖的动物和患者中,已经证明了肠道中厚壁菌门的增加和拟杆菌门的减少。当肥胖患者以低卡路里饮食减轻体重时,发生这些特殊细菌的比例的相反的改变。另一方面,关于胖人中肠道微生物群的这种变化的证据是矛盾的。关于厚壁菌门和拟杆菌门,发现在肥胖和非肥胖个体之间没有区别,尽管在胖人中,与正常体重的人相比,已经记录了拟杆菌门的显著的丰富性。这些发现提出肠道微生物群在调节体重中起重要作用并且可能是发生肥胖的因素的可能性。

[0039] 其他的代谢疾病,如糖尿病,现在也证明与微生物群的组成改变有关。已经提议不良调节的肠屏障,渗漏的肠道,可能导致胰岛素耐受性,并且最终导致糖尿病的发生。因此,加强肠屏障将成为预防并且可能还治疗糖尿病和预防肥胖的新的治疗方法。

[0040] 摄入称为益生元的低血糖食物(low-glycemic foods),如纤维,通过减缓碳水化合物的肠道消化而增强饱食感是被充分接受的。益生元是对微生物群具有有益作用的非细菌产品。它们作用为结肠微生物群的肥料,由此增加细菌共生生物体(如双歧杆菌属和乳杆菌属)的生长。然而,来自延长的碳水化合物的消化的饱食感信号显然是不充足的。

[0041] 现在,世界上超过十亿成年人是超重的,其具有25-30kg/m²的体重指数(BMI),并且超过三亿人是肥胖的,BMI > 30kg/m²。并且,超重和肥胖与高血脂(hyperlipidemia)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)和心血管病强烈相关。

[0042] 现在,在西方社会中我们有增加的美味食品(即,富含脂肪和蔗糖的食品)的可获得性。这可能促进较过去的几十年间所观察到的体重的整体增加。为了帮助患有超重和肥胖的个体,因此,找到加强饱食感信号并且抑制饥饿信号。我们已经发现,在向食品中饮食补充了来自绿色叶子的类囊体膜后,影响了一些食欲激素,如饥饿激素(ghrelin)和胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)(未公布的数据)以及胰岛素和瘦素。

[0043] 没有进一步详细解释,相信利用前述描述,本领域技术人员可以以其最充分的程度应用本发明。因此,下述优选的具体的实施方案应该解释为仅是举例说明性的,并不以任

何方式限制本公开内容的其余部分。

[0044] 尽管已经参考一个或多个具体的实施方案描述了本发明,但是其不意欲局限为本文所述的具体形式。相反,本发明仅由附上的权利要求限制,并且,除了上述具体的实施方案之外的实施方案同等可能的存在于这些附上的权利要求的范围之内,例如,不同于上文所述的那些的实施方案。

[0045] 在权利要求书中,术语“包括/包含”不排除存在其他元件或步骤。另外,尽管不同的权利要求可能包含个体特征,但是这些可以有利地组合,并且包含在不同的权利要求中不暗示特征的组合是不可行的和/或不利的。

[0046] 另外,单数引用不排除复数。术语“一个”、“第一”、“第二”等不排除复数。

[0047] 实验

[0048] 下述实验工作的目的是研究类囊体对健康大鼠中的肠道微生物群的影响,及其对血液胰岛素的作用。通过培养和独立于培养的技术来分析微生物群的组成。基于其代谢需要的特定细菌的存活计数作为培养技术,并且定量 PCR(q-PCR)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和16S rDNA测序作为独立于培养的技术。

[0049] 然而,下述实施例仅是实施例,不应该以任何方式解释为限制本发明的范围。相反,本发明仅由附上的权利要求所限制。

[0050] 动物和实验步骤

[0051] 在Sprague-Dawley品系(Mol:SPRD Han;Taconic M&B A/S, Ry, 丹麦)大鼠(褐家鼠(*Rattus norvegicus*))上进行该研究,大鼠在具有可控环境(20°C ±1°C, 50% ±10%相对湿度, 12:12-小时光暗循环)的特定的无病原体的条件下并用开放的笼系统养育。适应7天后,将总共16只大鼠单独保持,并且喂饲对照饮食(8只大鼠)或富含类囊体的饮食(8只大鼠)10天。

[0052] 类囊体膜从新鲜的幼菠菜叶提取并纯化,如前所述(Emek, SC, Szilagyi A, Akerlund H E, 等.(2010)A large scale method for preparation of plant thylakoids for use in body weight regulation(用于制备用于体重调节的植物类囊体的大规模方法)Prepar biochem&biotech 40(1),13-27;Montelius C, Gustafsson K, Westrom B, 等.(2011)Thylakoids reduce glucose uptake and decrease intestinal macromolecular permeability(类囊体减少葡萄糖摄入并减少肠大分子通透性). Br J Nutr 106(6),836-44)。

[0053] 标准大鼠食物(R 36, **Lantmännen**, Stockholm, 瑞典)仅用油菜籽油加富(对照饮食),或用类囊体-油混悬液加富(类囊体饮食)。通过使用Ultraturrax混合器混合4g类囊体粉末(对应132mg叶绿素)、5g油菜籽油和10g水而制备类囊体饮食。通过每克正常食品摄入物(22g食物/大鼠/天)加入6ng叶绿素,计算补充的类囊体的量。两种饮食是等热量的,并且具有25E%碳水化合物、60E%脂肪和15E%蛋白的能量(E)分布。

[0054] 在10天的实验时间内每天记录体重。在早上,每只大鼠给予25g正常的大鼠食物供其在一天内自由食用。在接下来的下午,取走剩余的大鼠食物,并且测量食用的量。然后,每只大鼠给予15g实验饮食。在第11天,在进行葡萄糖耐量测试之前,在早上,在不含特定病原体的条件下收集粪便样品。

[0055] 作为大剂量(bolus-dose)给予体积为其体重的10%的15%的葡萄糖溶液。通

过在 0, 15, 30, 45, 60, 90 和 120min 的时间点扎刺尾部而测量血浆葡萄糖的浓度, 而仅在 120 分钟后测量胰岛素。然后, 在进行剖腹之前, 将大鼠用异氟烷 (Schering-Plough a/s, Ballerup, 丹麦) 麻醉。收集来自回肠、盲肠和结肠的肠黏膜样品, 并且立即放置在含有 3ml 冷冻介质的无菌管中。该研究得到兰德大学动物实验伦理审查委员会的核准, 并且按照欧洲学会关于实验动物的保护规章进行。

[0056] 细菌计数分析

[0057] 对于来自回肠、盲肠和结肠以及来自粪便样品的肠黏膜样品中的乳杆菌属、双歧杆菌属和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的存活计数, 使用常规的稀释方法。将来自适当的稀释液的样品涂抹在 Rogosa 琼脂、改性的 Wilkins-Chalgren (MW) 琼脂和紫罗兰红胆汁葡萄糖琼脂 (均购自 Oxoid, Malmo, 瑞典) 上, 并在计算每克组织或粪便的菌落形成单位 (CFU) 之前, 在 37°C 厌氧温育 72 小时和有氧温育 24 小时。

[0058] 16S rDNA 测序

[0059] 总共随机挑取 169 个来自结肠和回肠样品的分离株 (每只大鼠 4-6 个分离株) 进行 16S rDNA 测序 (MW 琼脂平板 :52 个结肠分离株, rogosa 平板 :53 个结肠分离株, Rogosa 平板 :64 个回肠分离株)。粗细胞提取物用作聚合酶链式反应 (PCR) 的模板。通过正向引物 ENV1 和反向引物 ENV2 (表 1) (Applied Biosystems, Stockholm, 瑞典) 扩增 16S rRNA 基因。总共 25 μ l 的 PCR 反应混合物包含 0.4 μ M 引物 ENV1, 0.2 μ M 引物 ENV2, 2.5 μ l 10x PCR 反应缓冲液 (500mM Tris-HCl, 100mM KCl, 50mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgCl₂, pH 8.3), 0.2 μ M 脱氧核糖核苷酸三磷酸, 2.5U FastStart Taq DNA 聚合酶 (Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 和 2 μ l 模板 DNA。使用下述程序, 在 Eppendorf Master 循环仪 (Eppendorf, Hamburg, 德国) 中进行 PCR :95°C 3min, 94°C 3min, 30 个循环 :94°C 1min, 50°C 45sec 和 72°C 2min, 然后是 72°C 7min 的附加延伸。平行运行仅含有试剂不含有样品 DNA 的 PCRs 作为阴性 PCR 对照。在 1.5% 琼脂糖凝胶上验证 PCR 产物 (2 μ l)。扩增产物在 96 孔平板中寄送, 用于在 MWG-Biotech (Ebersberg, 德国) 测序。将产生的序列与 GenBank 数据库 (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA) 比较。

[0060] 粪便和肠活组织检查物的 DNA 提取

[0061] 将回肠和结肠的粪便和肠切片解冻, 并且放置在超声浴 (Millipore, Sundbyberg, 瑞典) 中 5 分钟, 涡旋 2 分钟, 然后以 12851g 离心 (Eppendorf 5804R, Hamburg, 德国) 10 分钟。弃去上清液, 并且向肠样品中加入 190 μ l 缓冲液 G2 和 15 μ l 蛋白酶 K (DNA Tissue Kit ;Qiagen, Hilden, 德国)。在将所有样品在摇动的水浴中在 56°C 温育过夜之前, 向粪便样品中加入 PBS 缓冲液 (500 μ l/50mg)。以 12851g 离心 (Eppendorf 5804R) 8 分钟后, 将溶液转移到 Qiagen 样品管中。提取总 DNA, 并且用 Biorobot EZ1 (Qiagen) 按照供应商的使用说明洗脱在 200 μ l 缓冲液中。

[0062] 定量 PCR (qPCR) 分析

[0063] 使用单独的定量 PCR 测定估测细菌组。每个测定反应含有 10 μ l QuantiTect[®] SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 0.5 μ M 每种引物 (表 1), 2 μ l 模板 DNA 和不含 RNA 酶的水, 达到 20 μ l 的终反应体积。样品、标准物和无模板对照一式两份运行。在 Rotor-Gene Q (Qiagen) 中以下述程序进行热循环 :95°C 15min, 接着是 40 个循环的下述 :95°C 变性 15sec, 56°C -60°C 退火 30sec 和 72°C 延伸 30sec。在每个循环的最后一步检测荧光产物。进

行解链曲线分析,以确保特异性的扩增。使用 Rotor-Gene Q 系列 (Software 1.7, Qiagen), 基于标准曲线计算 16S rRNA 基因的绝对丰度。对于所有的测定,检测的界限为 10^2 个拷贝 / 反应。为了构建标准曲线,使用来自胚乳乳杆菌 DSM9843、婴儿双歧杆菌 DSM15159、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CCUG29300 和 *Bacteroides prevotella* 的克隆产物。将一环细胞混悬液 (克隆的产物) 转移至 10ml 具有氨苄青霉素的溶原性肉汤 (LB) 培养基中,并在 37℃ 温育过夜。通过使用 QIAprep[®] (Miniprep 试剂盒, Qiagen) 进行 DNA 提取。DNA 浓度 (ng/μl) 最终用 Nanodrop ND-1000 (Saveen Werner AB, Malmo, 瑞典) 测量,并且用于拷贝数计算。在 TE 缓冲液 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 中制备 DNA 产物的 10 倍连续稀释液。细菌数表示为扩增子拷贝数 /g 粪便或组织湿重。

[0064] 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析

[0065] 如上文所述,扩增 16S rRNA 基因,不同之处在于正向引物 ENV1 在 5' 端用荧光染料 (FAM) 标记。对每份样品进行一式三份反应,并且在所有的 PCR 运行中都包含阴性对照。在 1.5% 琼脂糖凝胶上验证 PCR 产物。汇集每份样品的 PCR 产物,并且进一步通过使用 MinElute PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化。最终将 DNA 洗脱在 15 μl PE 缓冲液中,并且通过 Nanodrop ND-1000 (Saveen Werner AB) 测量 DNA 浓度。

[0066] T-RFLP 分析

[0067] 将纯化的 PCR 产物的整分试样 (200g) 在 37℃ (Mastercycler[®] 5333, Eppendorf) 用限制性核酸内切酶 MspI 消化 5 小时或用限制性核酸内切酶 AluI 消化 2 小时 (Fermentas, St. Leon-Rot, 德国)。通过在 65℃ 加热 20 分钟进行失活。消化后,将产物的整分试样在 96 孔平板中用无菌水稀释 4 倍。然后,将样品寄到 DNA-实验室 (Skane University Hospital, Malmo, 瑞典) 进行在毛细管电泳系统中的 T-RFLP 分析。用 GeneMapper[®] (版本 4.0, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 分析来自电泳的数据,并且使用 Southern 法 (GeneMapper[®]) 估测片段尺寸和峰面积。尺寸范围设定为 30 个碱基对 (bp) 至 600bp。样品的峰幅度阈值设置为 50 个相对荧光单位 (rfu), 并且内标的设置为 10rfu。通过总结样品中的所有峰的面积计算每种样品的总峰面积。个体相对峰面积表示为总面积的百分数。

[0068] 计算

[0069] 使用下述等式,利用表示为样品总面积的百分数的相对峰面积计算 Shannon-Wiener 指数 (H') :

$$[0070] \quad H' = - \sum p_i \ln p_i$$

[0071] 其中 p_i 是表示为百分数的相对面积, $\ln$ 是自然对数。以 SIMCA-P+ (12.0.1, Umetrics, Umeå, 瑞典) 进行带有主要成分分析 (PCA) 的多变量数据分析,以揭示各组间微生物群中可能的区别。

[0072] 统计学

[0073] 值表示为中值 ± SEM 或表示为 10th, 25th, 75th 和 90th 百分数。使用 Sigma-Stat 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 和 GraphPad 4.0, (Graphpad Inc, La Jolla, CA, USA) 通过 Mann-Whitney 秩和检验和 / 或 t- 检验测定各实验组之间的区别。通过 Fisher 精确检验 (Quick-Stat 版本 2.6, Sapio HB, 瑞典) 评估细菌的出现频率。认为 $P < 0.05$ 是显

著的。

[0074] 结果

[0075] 体重、血浆葡萄糖和胰岛素

[0076] 所有大鼠在研究的每个晚上完成其实验饮食。在 10 天的实验期间,在体重或正常大鼠食物 (show) 的摄入方面在类囊体和对照组之间没有发现显著区别 (数据未显示)。然而,与对照相比,类囊体组在大剂量后 120 分钟的血浆胰岛素浓度显著更低,如图 1 所示。此处,显示了在给予大鼠推注葡萄糖剂量后 120 分钟的血浆胰岛素浓度 (pM)。与对照组相比,在类囊体组中的胰岛素水平显著更低 ($p = 0.0082$)。然而,关于血浆葡萄糖浓度,在各组之间没有发现区别。

[0077] 细菌定量和鉴定

[0078] 与对照相比,在类囊体组中,在回肠黏膜中关于乳杆菌属的存活计数 (参见图 2) 和 qPCR 分析 (参见图 3) 都显著增加。图 2 显示在回肠、盲肠、结肠黏膜和粪便中乳杆菌属的存活计数 (CFU/g 组织)。与对照组相比,在类囊体组中在回肠中的乳杆菌属的量显著增加 ($p = 0.007$),而关于盲肠、结肠和粪便没有观察到区别;并且图 3 显示在回肠、结肠黏膜和粪便中的乳杆菌属含量的 qPCR 分析。与对照组相比,对于类囊体组,在回肠黏膜中的乳杆菌属显著增加 ($p = 0.032$),并且在粪便中显著减少 ($p = 0.007$)。在结肠黏膜中没有观察到区别。对于两种方法,在结肠或盲肠的黏膜样品中没有观察到区别。然而,对于类囊体组, qPCR,而不是存活计数,显示在粪便样品中乳杆菌属的显著减少,如图 3 所示。qPCR 的解链曲线分析证明粪便和黏膜乳杆菌属是不同的 (数据未显示)。对于从 Rogosa 平板上随机挑取的分离株的 16S rDNA 测序显示,与对照相比,对于类囊体组,在回肠中路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 有显著更高的出现率。使用类囊体引起的路氏乳杆菌的增加的出现率的趋势也在结肠中观察到,以及在回肠和结肠中观察到约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) 显著较低的出现率 (表 2)。

[0079] 通过 qPCR 分析两个组的双歧杆菌在回肠、结肠黏膜中以及在粪便中显示相似的含量 (数据未显示)。对于存活计数,在类囊体组中发现在双歧杆菌选择性培养基上生长的细菌的显著减少。然而,用 16S rDNA 鉴定显示在琼脂平板上其他革兰氏阳性细菌 (而不是双歧杆菌属) 更明显 (双歧杆菌属占不到 25%)。因此,在盲肠、结肠的黏膜和在粪便中,与对照相比,类囊体组中的革兰氏阳性细菌作为一组是显著减少的,如图 4 所示。此处,显示了回肠、盲肠和结肠黏膜中以及粪便中在双歧杆菌属选择培养基上生长的细菌的存活计数 (CFU/g 组织)。与对照组相比,在类囊体组中,在盲肠 ($p = 0.0104$)、结肠 ($p = 0.0207$) 和粪便 ($P = 0.0006$) 中,细菌的量显著减少。这些革兰氏阳性细菌鉴定为葡萄球菌属物种 (*Staphylococcus* spp)、考克氏菌属 (*Kocuria*) 和简单芽孢杆菌 (*Bacillus Simplex*) (数据未显示)。

[0080] 在各组之间的细菌分组中,用限制性核酸内切酶 MspI 对来自回肠和结肠的黏膜样品的 T-RFLP 分析没有产生区别,如用主要成分分析 (PCA) 所示的。然而,在粪便样品中,与对照相比,在类囊体组中特定的细菌分组完全彼此分开,如图 5 所示。此处,显示了在对照和类囊体组中来自结肠和回肠黏膜以及粪便的 MspI 消化的 T-RFLP 数据的主要成分分析 (PCA)。在粪便样品中 (□=来自对照组的粪便,■=来自类囊体组的粪便),在特定的细菌组之间可以观察到区别,这些特定的细菌组是彼此完全分开的。此外,通过限制性核酸内切

酶 AluI, 也通过 PCA 显示, 在来自类囊体和对照组的粪便样品中粪便发现分开的细菌群体, 如图 6 所示。此处显示了来自对照和类囊体组粪便样品的 AluI 消化的 T-RFLP 数据的主要成分分析 (PCA)。由于它们彼此是分开的, 可以观察到来自对照 (□) 和类囊体 (■) 组的粪便样品之间的区别。

[0081] 在通过存活计数和 qPCR 对肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 和拟杆菌门的分析中, 没有观察到类囊体和对照组之间的显著区别 (数据未显示), 对于通过 Shannon-Wiener 多样性指数计算后的细菌多样性也没有观察到显著区别 (数据未显示)。

[0082] 讨论

[0083] 本研究产生两个主要的发现。首先, 向饮食中补充类囊体十天影响大鼠的胰岛素敏感性。在给予大剂量的葡萄糖后 120 分钟, 对于喂饲类囊体的大鼠, 在血液中发现较低浓度的胰岛素, 即使在饮食之间没有观察到血浆 - 葡萄糖浓度的区别。当使用扩散室 (用于肠壁吸收和渗透性的体外模型) 时, 已经显示类囊体以剂量依赖性方式延长甲基 - 葡萄糖的吸收, 以及引起覆盖肠的黏膜侧的类囊体空间位阻。延长的体内葡萄糖吸收将推定导致较低浓度的分泌的胰岛素。然而。在本研究中没有观察到血液葡萄糖的区别, 但是, 对于类囊体组, 120 分钟后的胰岛素浓度仍然是显著较低的。今年来, 已经提议“渗漏的肠道”, 即, 肠的增加的渗透性, 能够导致胰岛素耐受性, 并且最终导致发展了糖尿病。因此, 对于降低浓度的胰岛素的一种解释可能是由类囊体引起的空间位阻, 使得肠壁被加强。这一现象需要进行进一步的研究, 原因在于其可能开创用于预防并且可能还是治疗糖尿病的新治疗方法。

[0084] 其次, 类囊体以多种方式调节微生物群。回肠中的乳杆菌属的浓度增加, 同时粪便中的乳杆菌属减少, 这表明类囊体引起增加的回肠乳杆菌属定殖。已知乳杆菌属的菌株具有以高浓度定殖在黏膜中的能力, 这支持我们的发现。大鼠中常见的乳杆菌属亚种是路氏乳杆菌, 与对照相比, 在类囊体组中, 其被特异性地增加。此外, 对于类囊体组, 在结肠和粪便中观察到革兰氏阳性菌的反常的定殖, 然而, 双歧杆菌属的浓度在各组之间没有区别。由于在类囊体组中发现独特的细菌群组, 而在对照中没有发现, 因此, 通过 T-RFLP 分析还观察到类囊体对微生物群的调节。

[0085] 之前的研究已经报道一些乳杆菌属和双歧杆菌属菌株通过作用为抗肥胖因子对于体重的调节是重要的。此外, 已经提议, 与苗条受试者相比, 超重受试者具有增加的革兰氏阳性细菌的生长, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的生长。由此, 消除有害的革兰氏阳性细菌, 以及细菌群的整体组成对于能量平衡似乎是重要的。并且, 已经表明路氏乳杆菌具有限制有害细菌的生长的促进健康的作用, 并且, 已经发现其他乳杆菌属物种, 如鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) GG 和加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*), 减少与肥胖症相关的脂肪过多 (adiposity) 和炎症。观察到的潜在有害的细菌 (如葡萄球菌属物种、考克氏菌属和简单芽孢杆菌) 的减少可能是类囊体的直接作用, 或者是作为增加的路氏乳杆菌的定殖的继发作用。

[0086] 所有上述发现表明, 在大鼠中向饮食中加入类囊体十天以多种方式影响微生物群。由于已经提议微生物群的组成参与体重管理, 并且早前已经表明类囊体减轻体重, 因此, 可以推定在早期研究中观察到的一些体重减轻的作用可能是由于微生物群的变化。

[0087] 总之, 我们提议本发现表明类囊体调节肠道微生物群, 导致增加的乳杆菌属的定

殖,和减少的潜在有害革兰氏阳性细菌的生长。由此,类囊体是益生元试剂。类囊体还可能通过加强肠屏障功能而增加胰岛素敏感性。

[0088] 表 1- 实施方案中所用的引物

[0089]

靶标组	序列(5'-3')	扩增子尺寸(bp)
乳杆菌属	Lact-16S-F: GGAATCTTCCACAATGGACG (SEQ ID 1) Lact-16S-R: CGCTTTACGCCCAATAAATCCGG (SEQ ID 2)	216
双歧杆菌属	Bifido-F: TCGCGTCYGGTGTGAAAG (SEQ ID 2) Bifido-R: CCACATCCAGCRTCCAC (SEQ ID 4)	243
肠杆菌科	Eco1457-F: CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC (SEQ ID 5) Eco1652-R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC (SEQ ID 6)	195
<i>Bacteroides prevotella</i>	qBacPre-F: TTTATTGGGTTTAAAGGGAGGGTA (SEQ ID 7) qBacPre-R: CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA (SEQ ID 8)	166
16S rRNA 基 因 (ENV1, ENV2)	大肠杆菌 8-27-F: AGAGTTTGATITGGCTCAG (SEQ ID 9) 大肠杆菌 1511-1492-R: CGGITACCTTGTTACGACTT (SEQ ID 10)	

[0090] 表 2. 通过对由回肠和结肠黏膜样品的 Rogosa 平板随机挑取的分离株的 16S rDNA 测序发现的不同乳杆菌属物种的出现率。与对照相比,认为类囊体组中 $P < 0.05$ 是显著的增加。

[0091]

	对照组		类囊体组		
	计数	%	计数	%	p-值
回肠					
路氏乳杆菌	11/29	37.9	28/31	90	0.03
约氏乳杆菌	17/29	58.6	3/31	10	0.003
加氏乳杆菌	1/29	3.4	0/31	0	ns
瘤胃乳杆菌	0/29	0	0/31	0	ns
(<i>Lactobacillus</i>					
<i>ruminis</i>)					
结肠					
路氏乳杆菌	10/25	40	21/25	84	0.09
约氏乳杆菌	13/25	52	2/25	8	0.01
加氏乳杆菌	0/25	0	1/25	4	ns
瘤胃乳杆菌	2/25	8	1/25	4	ns

[0092] ns = 不显著的

[0001]

序列表

<110> 西拉比索公司
<120> 益生元类囊体组合物
<130> W87940003
<150> SEI251019-4
<151> 2012-09-11
<160> 10
<170> BiSSAP 1.2
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 乳杆菌属 (Lactobacillus)
<220>
<221> 来源
<222> 1..20
<223> /分子类型="未指定的DNA"
/生物体="乳杆菌属"
<400> 1
ggaattttcc acaatggacg 20
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> 乳杆菌属
<220>
<221> 来源
<222> 1..23
<223> /分子类型="未指定的DNA"
/生物体="乳杆菌属"
<400> 2
cgctttacgc ccaataaatc cgg 23
<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> 双歧杆菌属 (Bifidobacterium)
<220>
<221> 来源
<222> 1..18
<223> /分子类型="未指定的DNA"
/生物体="双歧杆菌属"
<400> 3
tcgcgtcygg tgtgaaag 18
<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> 双歧杆菌属
<220>
<221> 来源
<222> 1..17
<223> /分子类型="未指定的DNA"
/生物体="双歧杆菌属"
<400> 4
ccacatccag crtccac 17

[0002]

<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..25	
<223> /分子类型="未指定的DNA"	
/生物体="肠杆菌科"	
<400> 5	
cattgacgtt accgcagaa gaagc	25
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 肠杆菌科	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..21	
<223> /分子类型="未指定的DNA"	
/生物体="肠杆菌科"	
<400> 6	
ctctacgaga ctcaagcttg c	21
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 拟杆菌<属> (Bacteroides <genus>)	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..24	
<223> /分子类型="未指定的DNA"	
/生物体="拟杆菌<属>"	
<400> 7	
ttttattgggt ttaaaggag ggta	24
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 拟杆菌<属>	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..25	
<223> /分子类型="未指定的DNA"	
/生物体="拟杆菌<属>"	
<400> 8	
caatcggagt tcttcgtgat atcta	25
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..20	
<223> /分子类型="未指定的DNA"	
/生物体="大肠杆菌"	
<400> 9	
agagtttgat nntggctcag	20

[0003]

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 大肠杆菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..20
<223> /分子类型="未指定的DNA"
/生物体="大肠杆菌"

<400> 10
cggtacctt gttacgactt

20

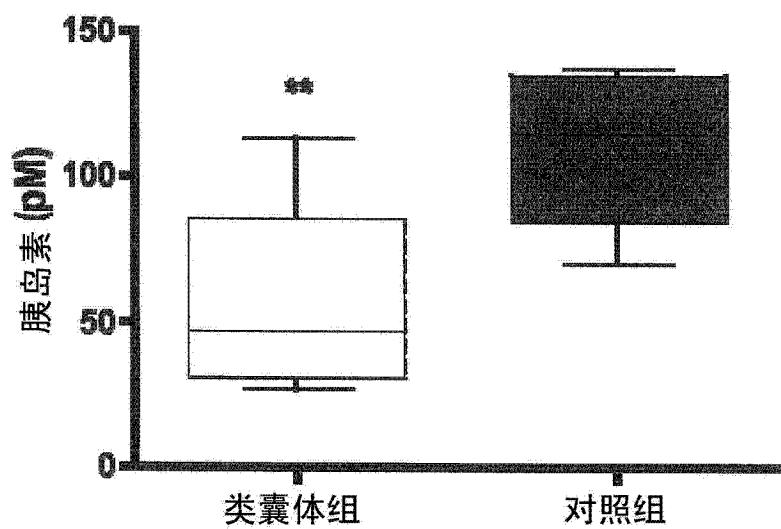


图 1

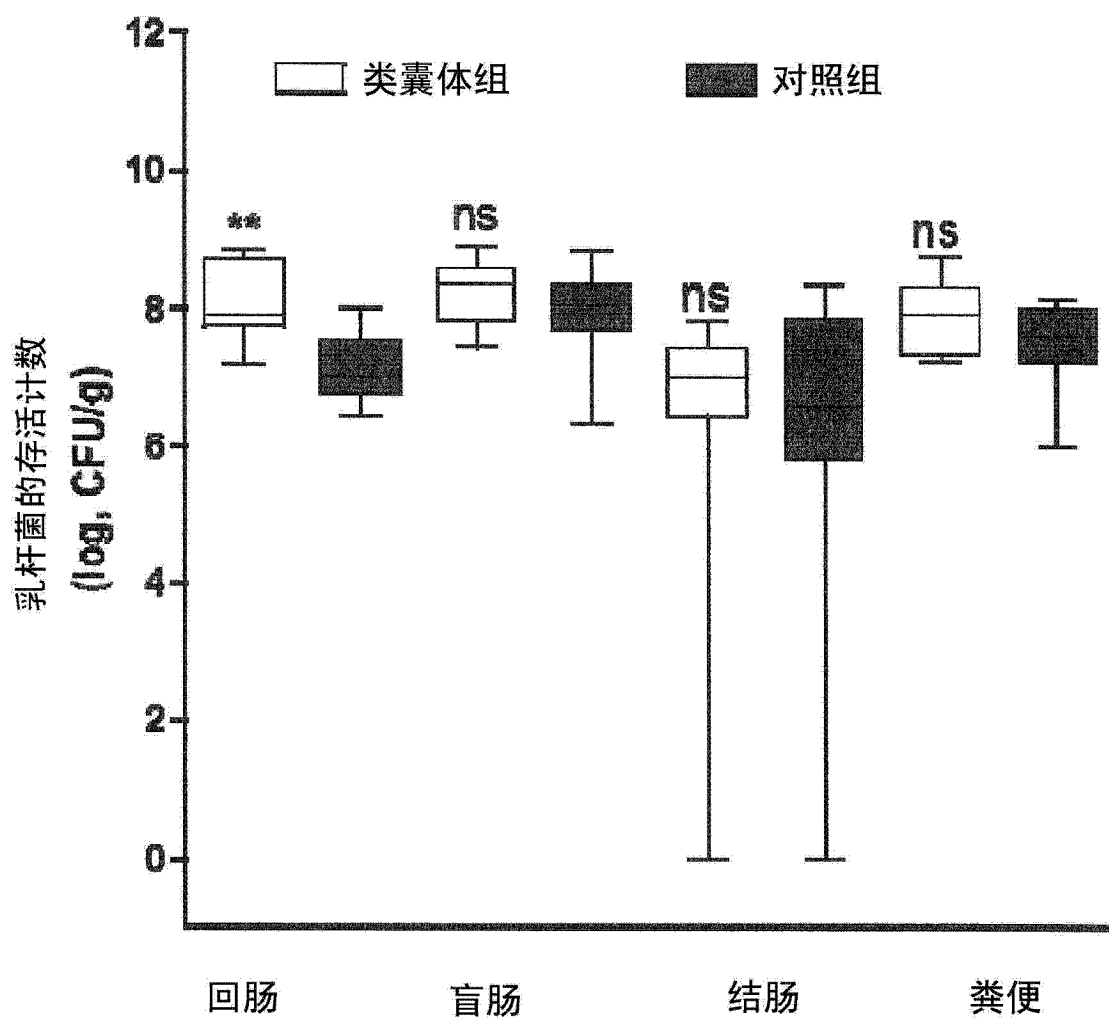


图 2

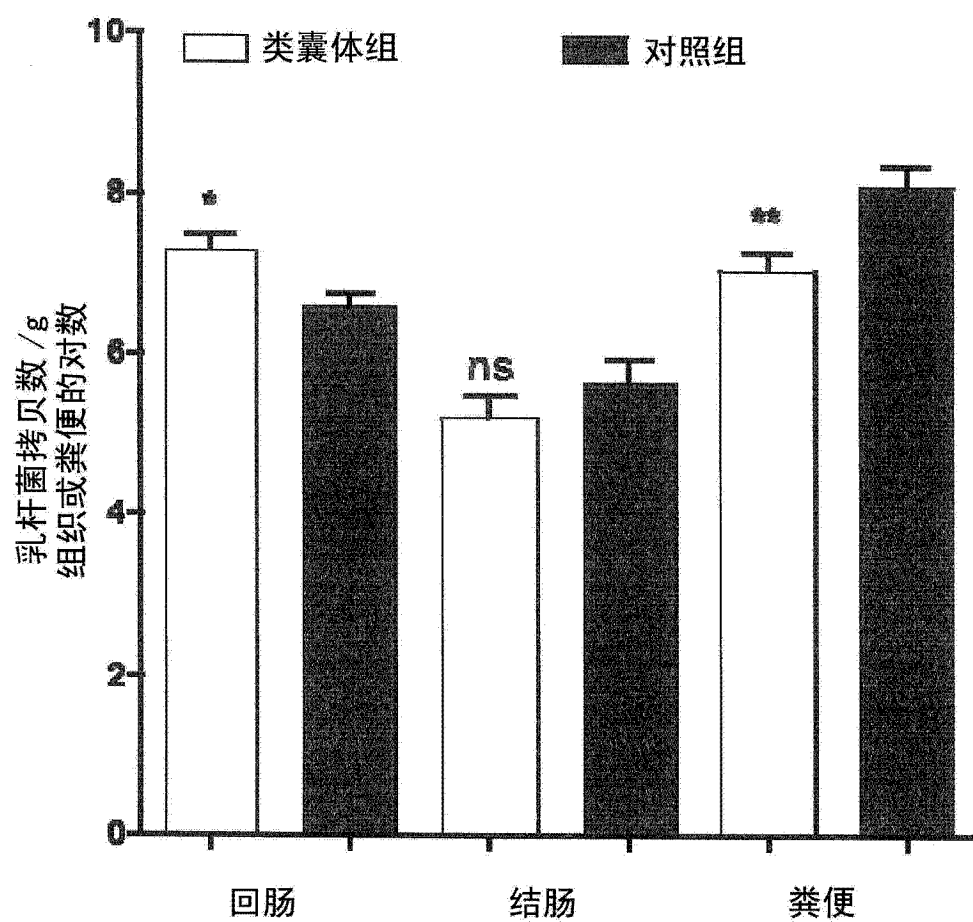


图 3

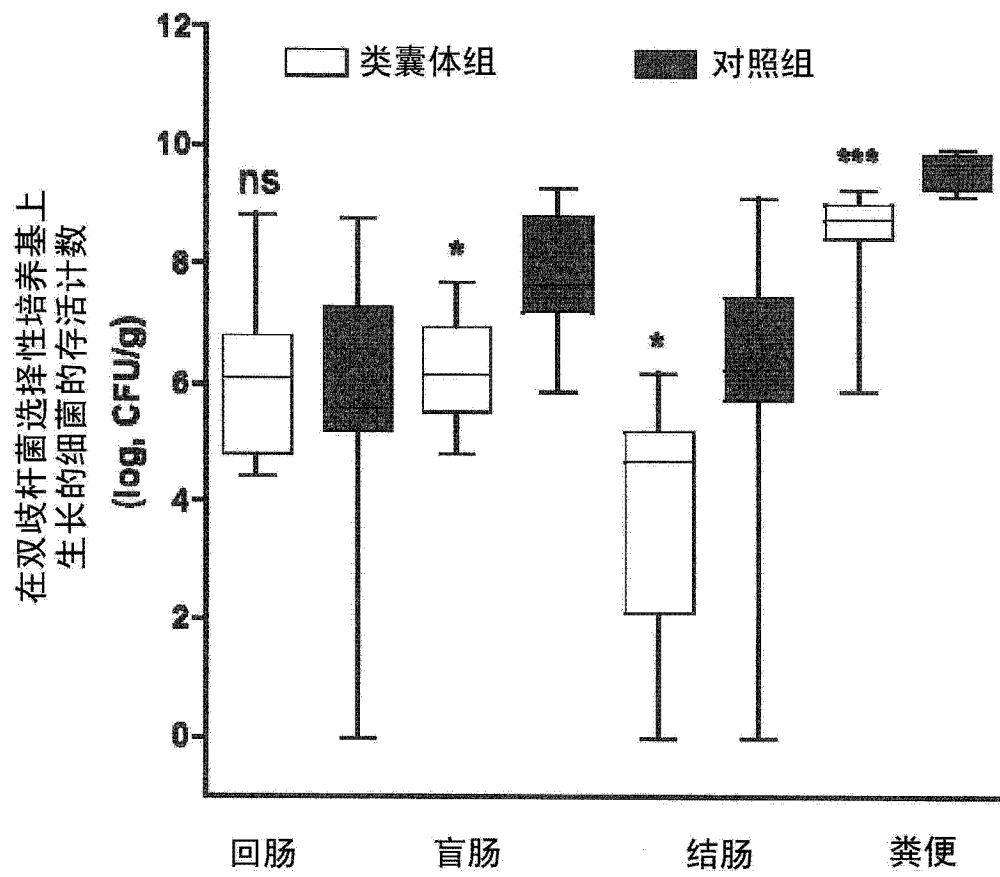


图 4

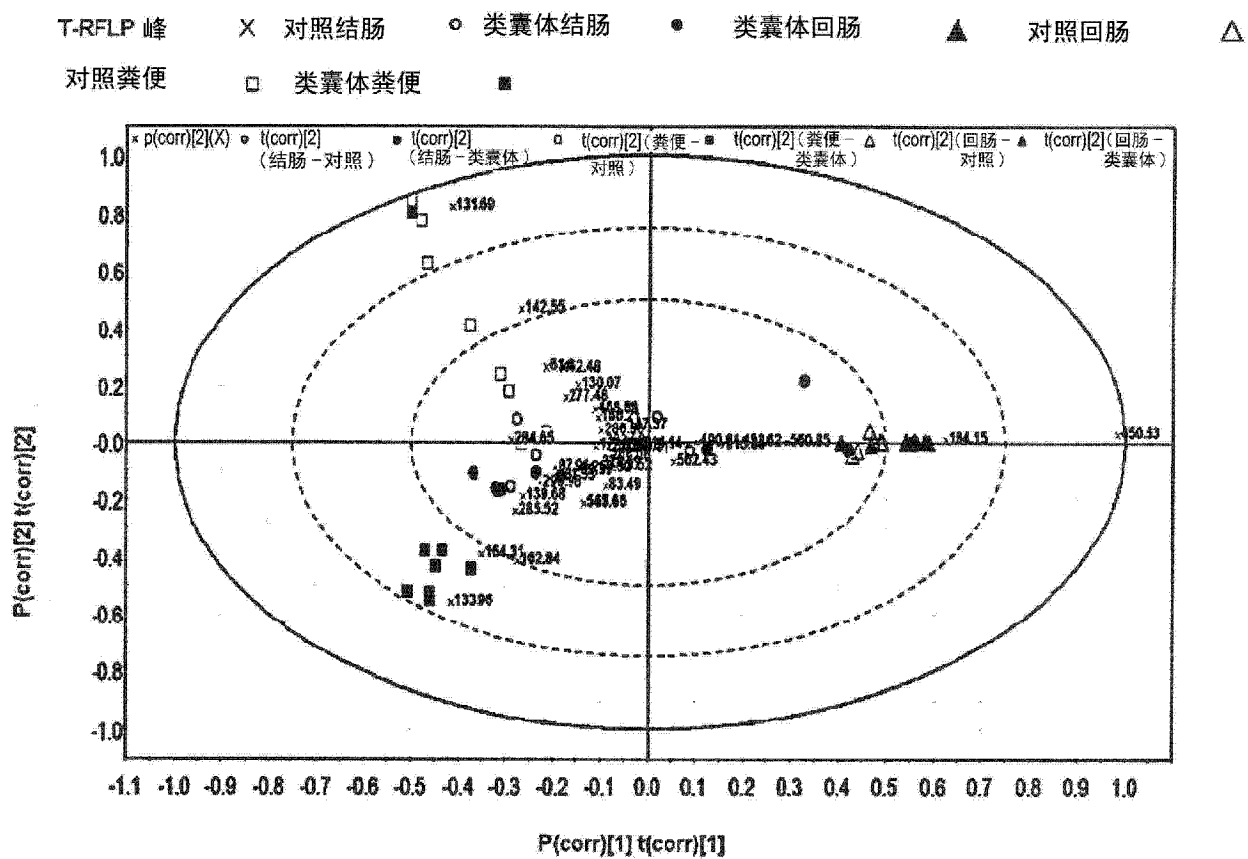


图 5

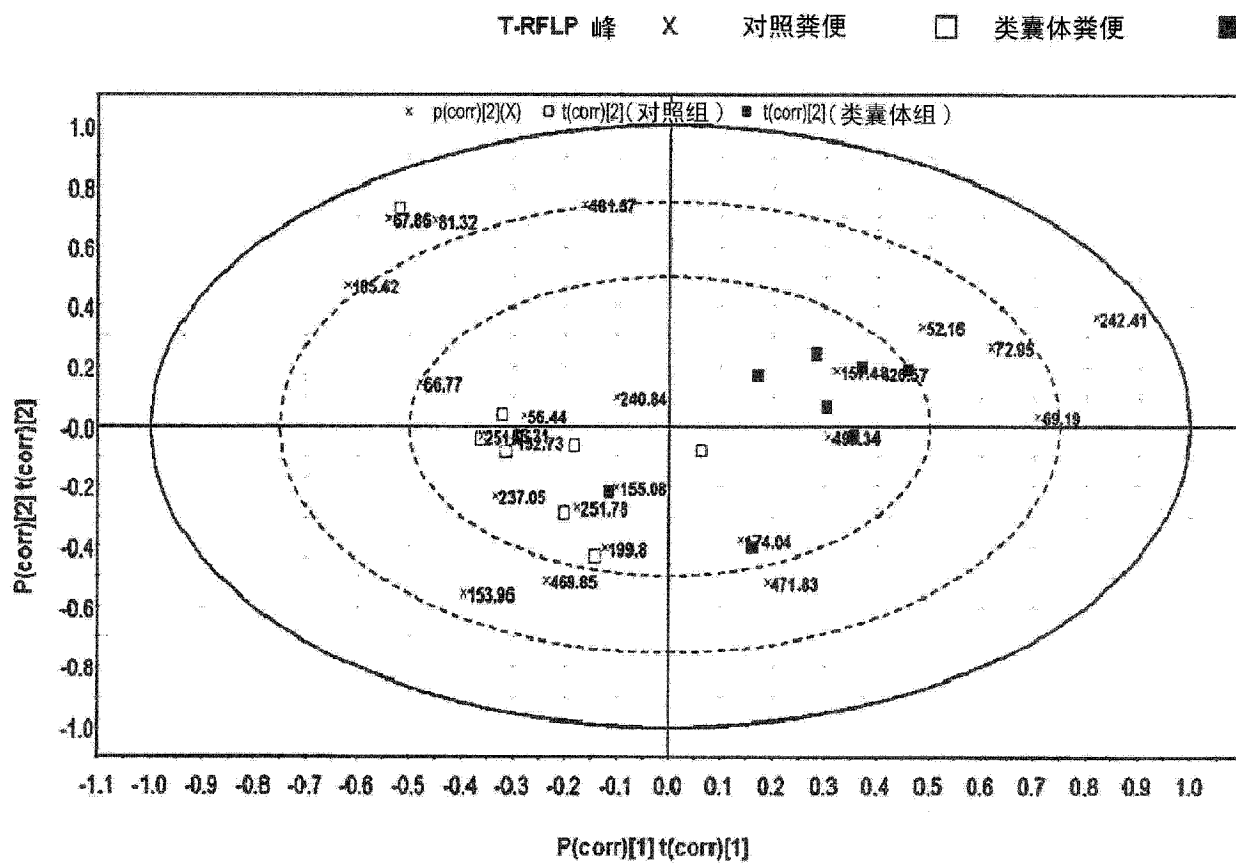


图 6