



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 114745970 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 21

(21) 申请号 202080081506.3

(22) 申请日 2020.10.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114745970 A

(43) 申请公布日 2022.07.12

(30) 优先权数据
1915144.8 2019.10.18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.24

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/052621 2020.10.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/074649 EN 2021.04.22

(73) 专利权人 马蒂吉姆英国企业有限公司
地址 英国萨里

(72) 发明人 B·史密斯 M·巴特勒

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A61K 35/744 (2006.01)
A61K 35/747 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2017106025 A1, 2017.04.20
US 2023053778 A1, 2023.02.23
W0 2023012109 A2, 2023.02.09

审查员 武法池
权利要求书2页 说明书35页 附图36页

(54) 发明名称
促进肠道微生物群产生SCFA的方法

(57) 摘要
本发明涉及通过施用液体水基益生菌组合
物促进肠道微生物群产生SCFA的方法。这些方法
在促进肠道健康方面特别有效。本发明还涉及促
进肠道屏障完整性的方法、促进致耐受性肠道表
型的方法和治疗帕金森病的方法。

1. 包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂在制备用于治疗或预防受试者的帕金森病的方法中的组合物中的用途,其中所述乳酸菌群包括鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 细菌中的每一种,所述方法包括向所述受试者施用所述液体非乳益生菌制剂。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用在所述受试者中改善以下一项或多项:运动症状、非运动症状、全身炎症标志物。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用改善所述受试者的非运动症状。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用改善所述受试者的胃肠道非运动症状。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用改善肠道屏障完整性。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用改善肠道屏障修复。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用促进所述受试者的致耐受性肠道表型。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述益生菌制剂的施用通过降低运动症状的严重性或减缓运动症状的进展或通过减缓或预防运动症状的发作来治疗或预防所述受试者的帕金森病。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者处于胃肠道生态失调的状态。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述受试者与健康对照相比在其肠道微生物群中表现出升高的厚壁菌门 (*Firmicutes*) 水平和/或降低的拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 水平。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述方法促进肠上皮细胞产生一种或多种抗炎分子。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述一种或多种抗炎分子选自IL-6和IL-10。

13. 根据权利要求1所述的用途,其中所述方法减少肠上皮细胞产生一种或多种促炎分子。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述一种或多种促炎分子选自CXCL-10、TNF α 、IL-8和MCP-1。

15. 根据权利要求1所述的用途,其中所述方法促进一种或多种SCFA的产生。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述一种或多种SCFA选自乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述一种或多种SCFA为丁酸盐。

18. 根据权利要求1所述的用途,其中所述方法减少所述受试者的肠道微生物群产生一种或多种支链脂肪酸 (BCFA) 和/或铵。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述一种或多种BCFA选自异丁酸盐、异戊酸盐和2-甲基丁酸盐。

20. 根据权利要求1所述的用途,其中将所述益生菌制剂至少每周一次施用于所述受试者。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中将所述益生菌制剂每天一次施用于所述受试者。

22. 根据权利要求1所述的用途, 其中将所述益生菌制剂施用于所述受试者持续至少1个月、至少2个月或至少3个月的时间段。

促进肠道微生物群产生SCFA的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过施用液体水基益生菌组合物促进肠道微生物群产生SCFA的方法。这些方法在促进肠道健康方面特别有效。本发明还涉及促进肠道屏障完整性的方法、促进致耐受性肠道表型的方法和治疗帕金森病的方法。

背景技术

[0002] 短链脂肪酸 (SCFA) 在人体肠道微环境中发挥着多种重要作用,包括作为宿主上皮细胞和粘膜细胞的食物来源以及调节局部pH条件。此外,SCFA作为微生物群细菌的食物来源,其中SCFA的产生、代谢和交叉喂养之间的复杂相互关系有助于肠道微生物群的整体组成和健康,从而有助于肠道本身。

[0003] SCFA的产生通常来自结肠中的碳水化合物代谢。产量最高的SCFA是乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐。乙酸盐可用作宿主的能量来源和体内脂质合成的潜在底物。丙酸盐减少肝脏中的胆固醇和脂肪酸合成,这被认为对代谢稳态有益。乙酸盐和丙酸盐也可以用作其他肠道细菌的能量来源,通常被代谢产生丁酸盐。

[0004] 另外据报道,乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐对饮食引起的肥胖具有保护作用。据报道,这是由于(响应于丁酸盐或丙酸盐)产生肠道激素之后的食欲不振所致或由于对中枢神经系统的作用(在乙酸盐的情况下)所致。

[0005] 诸如此类的健康益处的可能性导致消费者对含有益生菌物种的产品及其改善健康的潜力的兴趣增加。然而,人类消化道的挑战性环境意味着旨在用于口服给药的益生菌补充剂通常无法将细菌以可存活的状态递送到小肠。因此,任何有所改善的健康的感觉通常都会降低为安慰剂效应。此外,益生菌物种影响已建立的肠道微生物群的能力尚未得到证实。相反,任何在通过消化道时能够存活的益生菌仅在肠道的腔室中存在很短的时间,而不是在肠道粘膜隔室中定殖并影响已建立的肠道微生物群。这一假设可以解释为什么许多益生菌未能证明对肠道健康的长期影响。

[0006] 帕金森病是一种以运动系统综合征和一系列非运动症状为特征的退行性神经系统疾病。世界上许多国家的人口平均年龄都在增加,这使得帕金森病等退行性疾病变得更加普遍。目前对该病的治疗效果有限,并且药物治疗与显著的副作用有关。因此,需要治疗帕金森病的替代方法。

[0007] 本发明通过提供一种促进肠道微生物群产生SCFA从而促进肠道健康的方法以及提供一种治疗或预防帕金森病的方法来解决这些问题和其他问题。

发明内容

[0008] 肠道微生物群在影响一个人的整体健康方面的重要性正变得越来越明显。在健康个体中,肠道微生物群的变化与压力、焦虑和抑郁时期有关,并可能导致体重增加以及对饮食和药物的可变反应。这些变化可能是肠道微生物群的组成、其代谢活动的变化,或两者兼而有之。

[0009] 例如,与健康肠道相比,一个人的肠道微生物群可能表现出肠道细菌的类型和/或相对数量异常,这种状态也称为“生态失调”。SCFA产生的异常变化也可能表明肠道不健康,这本身可能是由于肠道微生物群组成的变化所致。

[0010] SCFA被认为有助于人类健康,例如通过降低肠腔内的pH值来抑制病原菌的生长,和提高上皮细胞抵御病原性大肠杆菌感染的能力。此外,丁酸盐是宿主结肠细胞的主要能量来源并诱导这些细胞分化,这被认为与降低结肠癌风险有关。据报道,丁酸盐和丙酸盐通过抑制组蛋白去乙酰化来诱导T调节细胞的分化。

[0011] 在表现出生态失调的受试者中,即使他们可能没有任何特定的疾病状况,肠道微生物群也可能严重失衡,以至于人的健康受到影响。生态失调会导致不适和感染风险增加。生态失调还与在其他方面健康的个体的焦虑、压力或抑郁风险有关,并与结肠癌等胃肠道癌症的风险增加有关。

[0012] 除了影响在其他方面健康的个体的安康外,肠道健康受损通常还与某些疾病状况有关,即使它不是本身疾病症状的一部分。例如,据报道,患有肥胖症、糖尿病和慢性疲劳综合征的受试者存在肠道微生物群异常。

[0013] 因此,促进健康的肠道微生物群可以对一个人的整体安康和健康做出重要贡献,无论是当这个人在其他方面健康时,还是在这个人患有疾病或病理状况时。

[0014] 如本文所证明的,施用包含益生菌种群的液体水基益生菌组合物能够影响已建立的肠道微生物种群以增加SCFA的产生水平,并且还被证明可以改变构成肠道微生物群的细菌类群的比例。

[0015] 根据本发明施用的制剂的益生菌被证明可以在肠粘膜和管腔环境中定殖和增殖,其中它们与已建立的细菌种群的相互作用导致整个微生物群重新平衡。肠道微生物群产生的SCFA增加表明了这种重新平衡。肠道微生物群组成在门和科分类水平上的变化进一步证明了这一点。这种对整个肠道微生物群平衡的改变表明施用益生菌后肠道健康得到改善。

[0016] 因为益生菌的施用导致已建立的微生物群在管腔中特别是在粘膜中的重新平衡,所以本发明方法的益处将是持续的和得以保持的。这与使用许多益生菌时所见的效果形成对比,其中无法影响整个肠道微生物群意味着任何影响都仅限于对腔室的短暂影响,因为这种效果只会在益生菌通过消化道的过程中发生。

[0017] 因此,在第一方面,提供了一种促进受试者胃肠道健康的方法,包括施用包含乳酸菌群的液体非乳基益生菌组合物,其中益生菌组合物的施用促进受试者的肠道微生物群产生一种或多种SCFA,从而促进肠道健康。

[0018] 在第二方面,提供了一种促进受试者的肠道微生物群产生一种或多种短链脂肪酸(SCFA)的方法,包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳基益生菌组合物。

[0019] 在另一方面,提供了一种促进受试者的肠道微生物群中一种或多种细菌门的生长的方法,该细菌门选自放线菌门(*Actinobacteria*) (例如双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*))、厚壁菌门(*Firmicutes*) (例如韦荣氏菌科(*Veillonellaceae*))、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、链球菌科(*Streptococcaceae*)、真杆菌科(*Eubacteriaceae*)、瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)、丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*))、变形菌门(*Proteobacteria*) (例如肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)),该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。

[0020] 在某些优选的实施方案中,生长是在肠粘膜隔室中。在某些优选的实施方案中,生长是在肠腔隔室中。在某些优选的实施方案中,生长是在管腔隔室和粘膜隔室中。

[0021] 在一个优选的实施方案中,该方法促进一种或多种SCFA的产生。

[0022] 在另一方面,提供了一种抑制受试者的肠道微生物群中一种或多种细菌门的生长的方法,该细菌门选自放线菌门(例如红螯菌科(Coriobacteriaceae)、埃格特菌科(Eggerthellaceae))、拟杆菌门(Bacteroidetes)(例如拟杆菌科(Bacteroidaceae)、理研菌科(Rikenellaceae)、毛螺菌科、瘤胃球菌科)、厚壁菌门(例如氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)、肠球菌科(Enterococcaceae)、梭菌科(Clostridaceae)、消化链球菌科(Peptostreptococcaceae))、变形菌门(例如肠杆菌科)、互养菌门(Synergistetes)(例如互养菌科(Synergistaceae))和疣微菌门(Verrucomicrobio)(例如阿克曼菌科(Akkermansiaceae)),该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。

[0023] 在某些优选的实施方案中,在肠粘膜隔室中的生长受到抑制。在某些优选的实施方案中,在肠腔室中的生长受到抑制。在某些优选的实施方案中,在管腔和粘膜隔室中的生长均受到抑制。

[0024] 在一个优选的实施方案中,该方法促进一种或多种SCFA的产生。

[0025] 在本发明所有方面的某些优选实施方案中,这些方法促进一种或多种选自丁酸盐、丙酸盐和乙酸盐的SCFA的产生。在某些优选实施方案中,该方法促进丁酸盐的产生。

[0026] 在施用根据本发明的益生菌制剂后产生的SCFA可以被认为是“后生元”化合物,或简称为“后生元”。后生元是在施用益生菌后由微生物群产生的与健康相关的化合物。通过促进肠道微生物群产生与健康相关的SCFA,根据本发明的益生菌制剂的施用可以被认为具有“后生元”效应。

[0027] 因此,在某些实施方案中,本发明的方法促进后生元化合物例如SCFA的产生。

[0028] 在另一方面,提供了一种促进受试者的肠道屏障完整性的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂,其中益生菌制剂的施用促进所述肠道屏障完整性。在某些此类实施方案中,该方法防止或减少肠道屏障完整性的丧失。在某些实施方案中,该方法促进肠道屏障修复。

[0029] 在另一方面,提供了一种用于促进受试者的致耐受性肠道表型的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂,其中益生菌制剂的施用促进所述致耐受性肠道表型。在某些实施方案中,该方法促进肠上皮细胞产生抗炎分子。在某些实施方案中,该方法减少肠上皮细胞产生促炎分子。

[0030] 在本发明方法的某些优选实施方案中,该方法是非治疗方法。

[0031] 在本发明方法的某些优选实施方案中,受试者是健康个体。

[0032] 在本发明方法的某些优选实施方案中,受试者处于胃肠生态失调状态。

[0033] 在某些优选实施方案中,受试者患有疾病或病症。在某些优选实施方案中,受试者患有选自帕金森病、肝硬化、炎症性肠综合征(IBD)、艰难梭菌感染、MRSA感染、大肠杆菌感染、肥胖、糖尿病和慢性疲劳综合征的疾病或病症。在某些优选实施方案中,受试者患有帕金森病。在某些实施方案中,受试者患有肝硬化。

[0034] 帕金森病是一种以运动系统综合征和一系列非运动症状为特征的退行性神经系统疾病。随着一些国家的人口老龄化,帕金森病等退行性疾病变得越来越普遍。目前的治疗

效果有限,并且药物治疗与显著的副作用有关。因此,需要治疗帕金森病的替代方法。

[0035] 如本文所报道,接受根据本发明的益生菌制剂的帕金森病患者表现出运动和非运动症状的改善。实施例提供的数据进一步表明,益生菌制剂能够通过减少肠道屏障完整性的丧失和PD患者表现出的炎症性肠道表型来促进帕金森病中的健康肠道表型。总之,这些数据表明益生菌制剂的施用将为帕金森病患者提供有效的治疗。

[0036] 因此,在另一方面,提供了一种治疗或预防受试者的帕金森病的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。在某些实施方案中,益生菌制剂的施用在受试者中改善以下一项或多项:运动症状、非运动症状、全身炎症标志物。在某些实施方案中,益生菌制剂的施用改善受试者的非运动症状,例如改善受试者的胃肠道非运动症状。在某些实施方案中,益生菌制剂的施用减缓或预防帕金森病症状例如运动症状的发作。

[0037] 在某些优选实施方案中,受试者处于胃肠生态失调状态。在某些优选实施方案中,与健康对照相比,受试者在其肠道微生物群中表现出升高的厚壁菌门水平。在某些优选实施方案中,与健康对照相比,受试者在其肠道微生物群中表现出降低的拟杆菌门水平。

[0038] 在所有方面的某些优选实施方案中,乳酸菌群包括鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 细菌中的至少一种。在某些实施方案中,乳酸菌群包括鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌和屎肠球菌细菌中的至少两种或至少三种。

[0039] 在某些实施方案中,乳酸菌群包括鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌细菌。

[0040] 在某些优选实施方案中,乳酸菌群包括鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌和屎肠球菌细菌中的每一种。

附图说明

[0041] 图1:添加至胃液时 (St0)、在胃液中历时45分钟后 (St45) 和在小肠液中历时180分钟后 (SI180),用流式细胞术测定的Symprove细菌的总细菌计数 (左) 和总活细胞计数 (右)。

[0042] 图2:对于供体对照样品 (C) 和每天给药Symprove持续1周 (T1)、2周 (T2) 和3周 (T3) 后的样品来说,三个供体的近端和远端结肠的管腔和粘膜隔室中Symprove细菌的平均log (拷贝数/毫升) $\pm$ sd (管腔; $n=3$) 或平均log (拷贝数/克) $\pm$ sd (粘膜; $n=3$)。嗜酸乳杆菌 (左上)、植物乳杆菌 (右上)、鼠李糖乳杆菌 (左下) 和屎肠球菌 (右下)。

[0043] 图3:对于供体对照样品 (C) 和每天给药Symprove持续1周 (T1)、2周 (T2) 和3周 (T3) 后的样品来说,三个供体的近端和远端结肠的腔室中的平均SCFA和乳酸盐浓度 $\pm$ sd ($n=3$)。乳酸盐 (左上)、乙酸盐 (右上)、丙酸盐 (左下) 和丁酸盐 (右下)。与对照相比具有统计学意义的结果用* ($P<0.05$) 表示。

[0044] 图4:对于供体对照样品和每天给药Symprove持续3周后的样品来说,三个供体的近端和远端结肠中的平均总计BCFA (上部) 和铵 (下部) 浓度 $\pm$ sd ($n=3$)。

[0045] 图5:在三名人类供体 ($n=1$) 的对照 (C) 和处理 (T) 时期结束时,近端 (PC) 和远端 (DC) 结肠的管腔 (A) 和粘膜 (B) 隔室中优势菌门的丰度 (%)。

[0046] 图6:三名人类供体 (对于每个供体, $n=1$) 在对照 (C) 和Symprove处理 (TR) 时期结

束时,M-SHIME培养基的近端和远端结肠的管腔内属于该菌门的不同科的丰度(%)。

[0047] 图7:三名人类供体(对于每个供体,n=1)在对照(C)和Symprove处理(TR)时期结束时,M-SHIME培养基的近端和远端结肠的粘膜层内属于该菌门的不同科的丰度(%)。

[0048] 图8:SHIME样品(对照和给药Symprove后)对(A)抗炎细胞因子(NF- κ B、IL-6、IL-10和IL-1 β)和(B)炎性趋化因子(MCP-1、CXCL 10和IL-8)的分泌的影响。与对照相比具有统计学意义的结果用*(P<0.05)和**(P<0.01)表示。

[0049] 图9:(A)使用来自三名肝硬化患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的总SCFA产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(B)使用来自三名肝硬化患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的乙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(C)使用来自三名肝硬化患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的丙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(D)使用来自三名肝硬化患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的丁酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。

[0050] 图10:(A)使用来自三名帕金森病患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的总SCFA产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(B)使用来自三名帕金森病患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的乙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(C)使用来自三名帕金森病患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的丙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(D)使用来自三名帕金森病患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的丁酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。

[0051] 图11:(A)使用来自三名IBD患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的总SCFA产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(B)使用来自三名IBD患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的乙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。(C)使用来自三名IBD病患者的肠道微生物群,在与Symprove孵育48小时的不同时间间隔(0-6小时、6-24小时和24-48小时)内的丙酸盐产量($\pm$ STDEV)。对于每名供体,包括阴性对照(空白组)(n=3)。

[0052] 图12:肝硬化患者的OTU层面的治疗效果(显示了25个最丰富的OTU)。值表示处理组中OTU的相对丰度与相应空白组中OTU的相对丰度的差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的统计学显著差异已用粗体表示。T检验列显示三个供体的处理组和空白组中的相对丰度的统计学显著差异,表明p值<0.05。

[0053] 图13:肝硬化患者的菌科层面的治疗效果。值表示处理组和相应空白组之间细菌

科的相对丰度差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的相对丰度的统计学显著差异已用粗体表示。最后一列显示了三个供体的处理组和空白组之间给定菌科的相对丰度的统计学显著差异,表明 p 值 <0.05 。

[0054] 图14:帕金森病患者的OTU层面的治疗效果(显示了25个最丰富的OTU)。值表示处理组中OTU的相对丰度与相应空白组中OTU的相对丰度的差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的统计学显著差异已用粗体表示。T检验列显示三个供体的处理组和空白组中的相对丰度的统计学显著差异,表明 p 值 <0.05 。

[0055] 图15:帕金森病患者的菌科层面的治疗效果。值表示处理组和相应空白组之间细菌科的相对丰度差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的相对丰度的统计学显著差异已用粗体表示。最后一列显示了三个供体的处理组和空白组之间给定菌科的相对丰度的统计学显著差异,表明 p 值 <0.05 。

[0056] 图16:IBD患者的OTU层面的治疗效果(显示了25个最丰富的OTU)。值表示处理组中OTU的相对丰度与相应空白组中OTU的相对丰度的差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的统计学显著差异已用粗体表示。T检验列显示三个供体的处理组和空白组中的相对丰度的统计学显著差异,表明 p 值 <0.05 。

[0057] 图17:IBD患者的菌科层面的治疗效果。值表示处理组和相应空白组之间细菌科的相对丰度差异,每名供体取三个重复值的平均值。因此,正值表示处理孵育中的富集更强,并以绿色表示。对于给定的供体和菌科,处理组和空白组之间的相对丰度的统计学显著差异已用粗体表示。最后一列显示了三个供体的处理组和空白组之间给定菌科的相对丰度的统计学显著差异,表明 p 值 <0.05 。

[0058] 图18:结肠批次样品对Caco-2/THP1-Blue™共培养物的跨上皮电阻(TEER)的影响。在共培养物处理24小时后测量TEER,并将每个24小时值标准化为其相应的0小时值,并显示为初始值的百分比。灰色虚线表示100%(初始值)。红色虚线对应于实验对照CM(完全培养基)。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(***)= $p<0.001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体D-F)的平均值。

[0059] 图19:结肠批次样品对THP-1-Blue™细胞的NF- κ B活性的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量NF- κ B活性水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$; (***)= $p<0.001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体D-F)的平均值。

[0060] 图20:结肠批次样品对IL-6(A)和IL-10(B)分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$; (**)= $p<0.01$; (***)= $p<0.001$; (****)= $p<0.0001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体D-F)的平均值。

[0061] 图21:结肠批次样品对TNF- α (A)、CXCL10 (B)、IL-8 (C) 和MCP-1 (D) 分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$;(**)= $p<0.01$;(***)= $p<0.001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体D-F)的平均值。

[0062] 图22:结肠批次样品对Caco-2/THP1-Blue™共培养物的跨上皮电阻 (TEER) 的影响。在共培养物处理后24小时测量TEER,并将每个24小时值标准化为其相应的0小时值,并显示为初始值的百分比。上部虚线代表100% (初始值)。下部虚线对应于实验对照CM (完全培养基)。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(***)= $p<0.0001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体G-I)的平均值。

[0063] 图23:结肠批次样品对THP-1-Blue™细胞的NF- κ B活性的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量NF- κ B活性水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$;(**)= $p<0.01$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体G-I)的平均值。

[0064] 图24:结肠批次样品对IL-6 (A) 和IL-10 (B) 分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(**)= $p<0.01$;(***)= $p<0.001$;(***)= $p<0.0001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体G-I)的平均值。

[0065] 图25:结肠批次样品对CXCL10 (A)、IL-8 (B) 和MCP-1 (C) 分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$;(**)= $p<0.01$;(***)= $p<0.001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体G-I)的平均值。

[0066] 图26:结肠批次样品对Caco-2/THP1-Blue™共培养物的跨上皮电阻 (TEER) 的影响。在共培养物处理后24小时测量TEER,并将每个24小时值标准化为其相应的0小时值,并显示为初始值的百分比。上部虚线代表100% (初始值)。下部虚线对应于实验对照CM (完全培养基)。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。在处理样品和对照样品之间没有发现显著差异。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体A-C)的平均值。

[0067] 图27:结肠批次样品对THP-1-Blue™细胞的NF- κ B活性的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量NF- κ B活性水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$;(**)= $p<0.01$;(***)= $p<0.001$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体A-C)的平均值。

[0068] 图28:结肠批次样品对IL-6 (A) 和IL-10 (B) 分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(**)= $p<0.01$;(***)= $p<0.001$;(***)= $p<0.0001$ 。数据分别

代表每个供体,并作为所有供体(供体A-C)的平均值。

[0069] 图29:结肠批次样品对TNF- α (A)、CXCL10 (B)、IL-8 (C)和MCP-1 (D)分泌的影响。在用结肠批样品对顶端预处理24小时后,在Caco-2/THP-1-Blue™共培养物的基底外侧进行LPS处理6小时后测量细胞因子水平。虚线对应于实验对照LPS+。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$;(**)= $p<0.01$ 。数据分别代表每个供体,并作为所有供体(供体A-C)的平均值。

[0070] 图30:在处理开始(0小时)和24小时孵育(24小时)后用供体D的对照(A)和Symprove处理样品(B)处理的T84细胞的伤口面积的图像。

[0071] 图31:用结肠肝硬化批次样品处理24小时后的伤口面积。在T84细胞处理后24小时测量伤口面积,并将每个24小时值标准化为其相应的0小时值,并显示为初始值的百分比。虚线对应于实验对照CM。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(*)= $p<0.05$ 。

[0072] 图32:在处理开始(0小时)和24小时孵育(24小时)后用供体G的对照(A)和Symprove处理样品(B)处理的T84细胞的伤口面积的图像。

[0073] 图33:用结肠帕金森病批次样品处理24小时后的伤口面积。在T84细胞处理后24小时测量伤口面积,并将每个24小时值标准化为其相应的0小时值,并显示为初始值的百分比。虚线对应于实验对照CM。数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。(*)表示处理样品和对照样品之间的统计学显著差异。(***)= $p<0.001$ 。

具体实施方式

[0074] “益生菌(Probiotic)”——如本文所用,术语“益生菌”应根据粮农组织/世卫组织联合报告和益生菌使用指南进行解释,其中益生菌被定义为“活的微生物,当以足够的量施用,可为宿主带来健康益处”。术语“益生菌(probiotic bacteria)”是指任何满足“益生菌(probiotic)”定义的细菌菌株。

[0075] “乳酸菌(LAB)”——如本文所用,术语“乳酸菌(LAB)”是指一组革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、非运动的厌氧菌,它们将碳水化合物发酵成乳酸。该组包括乳杆菌属(Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、片球菌属(Pediococcus)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)和肠球菌属(Enterococcus)。示例性益生乳酸菌包括但不限于乳酸杆菌属和肠球菌属中的那些。

[0076] “生态失调”——如本文所用,“生态失调”是指与健康肠道的值相比,当个体在肠道中表现出异常类型和/或异常相对数量的细菌时的状态。具有生态失调的个体可以是健康的——也就是说,个体没有与生态失调相关的疾病、病状或病理。或者,具有生态失调的个体可能患有疾病、病状或病理,例如被认为引起生态失调或由生态失调引起的疾病病状或病理。

[0077] “促进胃肠道健康”——如本文所用,“促进胃肠道健康”是指改善胃肠道微生物健康,表现为SCFA产量增加。可以促进健康个体的胃肠道健康,例如导致患结肠癌的风险降低,也可以促进患有疾病、病状或病理的个体的胃肠道健康。促进胃肠道健康对于表现出生态失调的个体尤为重要。

[0078] “复合碳水化合物”——如本文所用,术语“复合碳水化合物”包括寡糖和多糖。“寡

糖”是含有3至10个糖单元的糖聚合物；而术语“多糖”包括较长的聚合结构，例如由重复的糖(或二糖)单元形成的那些。

[0079] “简单糖”——如本文所用，术语“简单糖”是指单糖和二糖，除非另有说明。

[0080] “还原糖”——如本文所用，术语“还原糖”是指具有醛基或能够通过异构化在溶液中形成醛基的糖。还原糖的存在可以通过使用葡萄糖作为参考标准的Nelson-Somogyi方法来确定(Somogyi, M. (1952) *Journal of Biological Chemistry.*, 第195卷, 第19页; 转载于碳水化合物化学的许多标准教科书中)。尽管某些复合碳水化合物(例如淀粉)可能含有还原末端，因此满足“还原糖”的定义，但使用Nelson-Somogyi方法确定给定样品(例如本文所述的益生菌制剂样品)中“还原糖”的含量可作为样品中简单糖的量的近似值，因为与复合碳水化合物相比，简单糖每单位质量含有更大比例的还原末端。

[0081] “总碳水化合物含量”——如本文所用，术语“总碳水化合物”或“总碳水化合物含量”是指存在于给定产品(例如本文所述的益生菌制剂)中的复合碳水化合物和简单糖的总量。总碳水化合物含量可以使用苯酚-硫酸测定法并使用葡萄糖作为参考标准测量(Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) *Analytical Chemistry*, 第28卷, 第350页)。

[0082] 在本文提到液基产品(例如益生菌制剂中)的总碳水化合物含量与还原糖含量的比率时，这将通过计算产品的总碳水化合物含量(如通过本文所述的苯酚-硫酸法测量的(结果以mg/ml表示))与产品的还原糖含量(如通过本文所述的Nelson-Somogyi方法测量的(结果以mg/ml表示))的比率来确定。

[0083] “非乳”——如本文所用，根据本领域接受的定义，术语“非乳”是指不包含并且不是基于哺乳动物的乳汁的产品。因此，非乳制品不包含也不基于奶、黄油、奶酪(包括植物奶酪)、酸奶、奶油、奶粉、乳清、乳糖、乳蛋白(包括酪蛋白和酪蛋白酸盐)、无水乳脂或开菲尔。

[0084] “受试者”——如本文所用，“受试者”是指被施用益生菌制剂的哺乳动物，优选人。

[0085] 以下实施方案是根据本发明每个方面的实施方案，并且任何实施方案都可以与任何其他实施方案组合，除非另有明确说明。

[0086] 为了使益生菌有效发挥作用并达到最佳状态，它们需要在上胃肠道(GI)的条件下存活而不触发消化。如果消化被触发，胃酸会削弱或破坏益生菌。对于配制为酸奶型饮料的益生菌来说，这是一个特殊的问题，众所周知，它们会引发胃酸、胃蛋白酶和其他消化化合物的产生。

[0087] 相反，如本文所证明的，根据本发明的方法施用液体非乳益生菌制剂导致制剂中的细菌在胃肠道条件下存活并在肠道(包括小肠和结肠)的粘膜和管腔隔室中建立。

[0088] 一旦在肠道的粘膜和管腔隔室中建立，益生菌就能够在组成和脂肪酸产生方面改变已建立的肠道微生物群，从而促进产生有益的SCFA，改善肠道健康。

[0089] 不希望受理论束缚，假设因为益生菌能够在腔室中，尤其是在粘膜中建立，所以益生菌作用能够持续和维持。这与对于许多益生菌所见的作用形成对比，其中无法影响整个肠道微生物群，特别是粘膜微生物群，这意味着任何作用都仅限于对腔室的短暂作用。这是因为这些替代益生菌的任何作用只会在益生菌通过消化道的过程中发生。

[0090] 因此，通过施用根据本发明的益生菌制剂来促进健康的肠道微生物群可以对一个人的整体安康和健康做出重要贡献，无论是当这个人在其他方面健康时，还是当这个人患

有疾病、病症或病理状况时。

[0091] 因此,在第一方面,提供了一种促进受试者的胃肠道健康的方法,包括施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂,其中益生菌制剂的施用促进受试者的肠道微生物群产生一种或多种SCFA,从而促进胃肠道健康。

[0092] SCFA被认为通过多种机制有助于人类肠道健康,例如通过降低肠腔内的pH值来抑制病原菌的生长,和提高上皮细胞抵御病原性大肠杆菌感染的能力。此外,丁酸盐是宿主结肠细胞的主要能量来源并诱导这些细胞分化,这被认为与降低结肠癌风险有关。据报道,丁酸盐和丙酸盐通过抑制组蛋白去乙酰化来诱导T调节细胞的分化,从而改善肠道屏障的维持。

[0093] 另外据报道,乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐对饮食引起的肥胖具有保护作用。据报道,这是由于(响应于丁酸盐或丙酸盐)产生肠道激素之后的食欲不振所致或由于对中枢神经系统的作用(在乙酸盐的情况下)所致。

[0094] 因此,在第二方面,提供了一种刺激受试者的肠道微生物群产生一种或多种短链脂肪酸(SCFA)的方法,包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。

[0095] 在某些优选实施方案中,刺激一种或多种SCFA的产生可用于治疗诸如艰难梭菌感染、MRSA感染、大肠杆菌感染、肥胖、糖尿病和慢性疲劳综合征的病状或降低患结肠癌的可能性。

[0096] 构成任何一名个体的肠道微生物群的不同细菌的相互作用是复杂的,并且可能高度依赖于微生物群中存在的其他细菌及其比例等因素。然而,细菌门的明显变化与肠道健康不良或肠道完整性差有关,例如炎症条件下厚壁菌门的水平降低。

[0097] 因此,调节形成受试者的肠道微生物群的细菌类群的生长和比例可能代表了促进肠道健康的另一种方法。如本文所证明的,根据本发明的益生菌制剂的施用导致肠道微生物群中细菌类群的调节,从而促进一些细菌类群的相对生长并抑制其他细菌类群。值得注意的是,肠道微生物群组成的变化不仅仅是由于制剂中益生菌数量的增加。相反,益生菌会在肠道内定殖,然后导致其他微生物群细菌的相对数量和平衡的变化。

[0098] 因此,在另一方面,提供了一种促进受试者的肠道微生物群中一种或多种细菌门的生长的方法,该细菌门选自放线菌门(例如双歧杆菌科)、厚壁菌门(例如韦荣氏菌科、毛螺菌科、链球菌科、真杆菌科、瘤胃球菌科、丹毒丝菌科、梭菌科)、变形菌门(例如肠杆菌科),该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。优选地,该方法促进所述细菌门中两个或更多个,优选3个或更多个的生长。

[0099] 在另一方面,提供了一种抑制受试者的肠道微生物群中一种或多种细菌门的生长的方法,该细菌门选自放线菌门(例如红蝾菌科、埃格特菌科)、拟杆菌门(例如拟杆菌科、理研菌科、毛螺菌科、瘤胃球菌科)、厚壁菌门(例如氨基酸球菌科、肠球菌科、梭菌科、消化链球菌科)、变形菌门(例如肠杆菌科)、互养菌门(例如互养菌科)和疣微菌门(例如阿克曼菌科),该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。优选地,该方法抑制所述细菌门中两个或更多个,优选3个或更多个的生长。

[0100] 在本发明所有方面的某些优选实施方案中,该方法是非治疗方法。

[0101] 在某些优选实施方案中,受试者是健康个体。

[0102] 在某些优选实施方案中,受试者处于胃肠生态失调状态。

[0103] 在某些优选实施方案中,受试者患有疾病或病症。在某些此类实施方案中,患有疾病或病症的受试者处于与所述疾病或病症相关的胃肠道生态失调状态。

[0104] 在某些优选实施方案中,受试者患有选自帕金森病、肝硬化、炎症性肠综合征 (IBD)、艰难梭菌感染、MRSA感染、大肠杆菌感染、沙门氏菌感染、诺如病毒感染、贾第虫病、乳糜泻、慢性肾病、HIV/AIDS、囊性纤维化、I型糖尿病、肥胖、肠易激综合征 (IBS) 和慢性疲劳综合征的疾病或病症。在某些优选实施方案中,受试者患有帕金森病。在某些优选实施方案中,受试者患有肝硬化。在某些实施方案中,患者患有IBD。

[0105] 在本发明所有方面的某些优选实施方案中,该方法促进一种或多种选自双歧杆菌科、微杆菌科、韦荣氏菌科、毛螺菌科、链球菌科、真杆菌科、瘤胃球菌科、丹毒丝菌科、梭菌科、肠杆菌科的细菌的生长。

[0106] 在本发明所有方面的某些优选实施方案中,该方法抑制一种或多种选自红蜡菌科、埃格特菌科、拟杆菌科、理研菌科、毛螺菌科、瘤胃球菌科、氨基酸球菌科、肠球菌科、梭菌科、消化链球菌科、肠杆菌科、互养菌科和阿克曼菌科的细菌的生长。在一个特别优选的实施方案中,该方法抑制拟杆菌科细菌的生长。

[0107] 优选地,对细菌生长的影响是在肠粘膜隔室中。

[0108] 优选地,对细菌生长的影响是在肠腔室中。

[0109] 优选地,对细菌生长的影响是在近端结肠中。

[0110] 优选地,对细菌生长的影响是在远端结肠中。

[0111] 在一个优选的实施方案中,该方法促进一种或多种SCFA的产生。

[0112] 短链脂肪酸产生

[0113] 在本发明方法的所有方面的优选实施方案中,这些方法促进一种或多种SCFA的产生,其中SCFA选自乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐(在本文中分别与乙酸、丙酸和丁酸互换使用)。

[0114] 如本文其他地方所述,这些SCFA的产生与健康的胃肠道相关,并与一系列健康和安康益处相关。因此,SCFA产量的增加可能表明胃肠道 (GI) 健康有所改善。

[0115] SCFA产量的增加也可能表明肠道微生物群组成的变化。例如,乙酸盐可以由许多不同的肠道微生物产生,包括放线菌门,如双歧杆菌属。同样,丙酸盐可以由多种肠道微生物产生,包括厚壁菌门,如韦荣氏菌科。丁酸盐主要由厚壁菌门细菌如梭菌科产生。

[0116] SCFA的产生会导致交叉喂养,其中一些微生物群细菌产生的SCFA如乙酸盐和丙酸盐作为其他细菌的食物来源,这些细菌将乙酸盐和丙酸盐转化为丁酸盐。然后丁酸盐本身可以被肠道上皮细胞用作食物来源。

[0117] 当由肠道微生物群产生时,丁酸盐尤其被认为可以带来健康益处。因此,在某些优选实施方案中,该方法促进肠道微生物群产生丁酸盐。

[0118] 相反,支链脂肪酸 (BCFA) (例如异丁酸盐、异戊酸盐和异己酸盐) 以及铵物质是由蛋白水解细菌活动产生的,并且被认为对健康有害。有利地,根据本发明的方法可以降低由受试者的肠道微生物群产生的BCFA和铵物质的水平。

[0119] 因此,在某些优选实施方案中,本发明的方法减少受试者的肠道微生物群产生一种或多种BCFA。在某些实施方案中,一种或多种BCFA选自异丁酸盐、异戊酸盐和异己酸盐。在某些实施方案中,本发明的方法减少异丁酸盐的产生。在某些实施方案中,本发明的方法减少异戊酸盐的产生。在某些实施方案中,本发明的方法减少异己酸盐的产生。在某些实施

方案中,本发明的方法减少2-甲基丁酸盐的产生。

[0120] 在某些优选实施方案中,本发明的方法减少受试者的肠道微生物群产生一种或多种铵物质。

[0121] 促进肠道屏障完整性

[0122] 肠上皮屏障由细胞间紧密连接形成,这是一种复杂的蛋白质-蛋白质网络,机械连接相邻细胞并密封细胞间隙。健康的肠上皮屏障调节肠道的通透性,控制分子从管腔空间进入更深的粘膜层,如固有层和肠道毛细血管。因此,肠道屏障完整性对胃肠道健康和整体安康很重要。

[0123] 肠道屏障完整性的破坏会导致肠道通透性增加和肠道腔内容物进入肠道固有层的运动失调,这可能导致胃肠道局部和全身的不良免疫反应。因此,保持肠道屏障完整性或修复任何屏障完整性损失以维持整体和胃肠道健康非常重要。

[0124] 如以下实施例所示,施用本文提供的益生菌制剂可促进肠道屏障功能和完整性。这既可以通过维持健康的肠道屏障功能的能力来证明,也可以通过在损伤或受伤后修复肠道屏障的能力来证明。

[0125] 因此,在另一方面,提供了一种促进受试者的肠道屏障完整性的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂,其中益生菌制剂的施用促进所述肠道屏障完整性。

[0126] 在某些实施方案中,该方法保持健康的肠道屏障完整性。即,该方法防止或减少受试者的肠道屏障功能的丧失。

[0127] 在某些此类实施方案中,受试者可以是健康受试者。

[0128] 或者,在某些此类实施方案中,例如由于接受抗生素疗法、化学疗法或放射疗法,受试者可能处于肠道屏障完整性丧失的增加了的风险中。在某些实施方案中,受试者可能处于丧失肠道屏障完整性的风险中,例如因为受试者具有与肠道屏障功能丧失相关的病症。

[0129] 在某些实施方案中,受试者可能处于丧失肠道屏障功能的风险中,因为受试者已被诊断患有选自以下的疾病:沙门氏菌感染、诺如病毒感染、贾第虫病、乳糜泻、慢性肾病、HIV/AIDS、囊性纤维化、肝硬化、帕金森病和I型糖尿病。

[0130] 如本文所示,所提供的方法在帕金森病或肝硬化患者的肠道屏障模型中特别有效。因此,在某些实施方案中,受试者可能处于丧失肠道屏障功能的风险中,因为受试者已被诊断患有帕金森病。在某些实施方案中,受试者可能处于丧失肠道屏障功能的风险中,因为受试者已被诊断患有肝硬化。

[0131] 在某些实施方案中,该方法促进肠道屏障修复。当受试者已经经历表明屏障功能障碍的症状,例如局部肠道炎症和/或全身炎症反应时,促进肠道屏障修复是重要的。已知许多病症会损害肠道屏障功能,包括:沙门氏菌感染、诺如病毒感染、贾第虫病、乳糜泻、慢性肾病、HIV/AIDS、囊性纤维化和I型糖尿病。

[0132] 因此,在某些实施方案中,该方法促进患有一种或多种选自以下的疾病的受试者的肠道屏障修复:沙门氏菌感染、诺如病毒感染、贾第虫病、乳糜泻、慢性肾病、HIV/AIDS、囊性纤维化、肝硬化、肠易激疾病(IBS)、帕金森病和I型糖尿病。

[0133] 在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有帕金森病的受试者的肠道屏障修复。在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有肝硬化的受试者的肠道屏障修复。

[0134] 在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有炎性肠病(溃疡性结肠炎或克罗恩病)的受试者的肠道屏障修复。

[0135] 在某些实施方案中,该方法是治疗患有漏肠综合征的受试者的方法。

[0136] 应当理解,与促进肠道屏障完整性的方法有关的上述实施方案同样且独立地适用于本文提供的其他方法方面。例如,本文提供的促进胃肠道健康的方法可以促进肠道中SCFA的产生并且还促进肠道屏障功能。类似地,促进肠道屏障完整性的方法可以促进SCFA(例如丁酸盐)的产生并且还(或由此)减少肠道屏障功能的丧失。类似地,本文提供的治疗帕金森病的方法可以促进肠道屏障功能和/或肠道屏障修复。

[0137] 促进致耐受性肠道表型

[0138] 所附实施例中提供的数据表明,本文提供的益生菌制剂能够影响各种免疫分子(例如细胞因子、趋化因子和配体)的表达。数据显示,益生菌制剂的施用能够促进肠上皮细胞中的“致耐受性”或抗炎表型(下文简称为“致耐受性肠道表型”)。这种致耐受性肠道表型的特征在于响应免疫攻击(例如LPS攻击)一种或多种致耐受性或抗炎分子(例如IL-6和IL-10)的产生增加,和/或一种或多种促炎分子(例如TNF α 、IL-8和MCP-1)的产生减少。

[0139] 因此,提供了一种用于促进受试者的致耐受性肠道表型的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂,其中益生菌制剂的施用促进所述致耐受性肠道表型。

[0140] 在某些优选实施方案中,该方法促进肠上皮细胞产生一种或多种抗炎分子,例如抗炎细胞因子和抗炎趋化因子。在某些实施方案中,该方法促进IL-6的产生。在某些实施方案中,该方法促进IL-10的产生。

[0141] 在某些优选实施方案中,该方法减少肠上皮细胞产生一种或多种促炎分子,例如促炎细胞因子和促炎趋化因子。在某些实施方案中,该方法减少MCP-1的产生。在某些实施方案中,该方法减少CXCL10的产生。在某些实施方案中,该方法减少IL-8的产生。在某些实施方案中,该方法减少TNF α 的产生。

[0142] 在这些实施方案中,该方法改变肠上皮细胞对促炎或抗炎分子的分泌。在某些实施方案中,肠上皮细胞对促炎或抗炎分子的分泌的变化可在肠腔中检测到,例如通过灌洗。在某些实施方案中,肠上皮细胞对促炎或抗炎分子的分泌的变化在血液样品中是可检测的。

[0143] 在某些实施方案中,具有致耐受性肠道表型的受试者的相对免疫分子产量可以例如与根据本文提供的方法施用益生菌制剂之前受试者的肠道上皮细胞表现出的免疫分子产生相比较。或者,相对产量可与未施用根据本文提供的方法益生菌制剂的对照受试者进行比较。或者,相对免疫分子产量可以与预定的对照值,例如对照种群的中值产生水平比较。

[0144] 将再次理解,与促进致耐受性肠道表型的方法有关的上述实施方案同样且独立地适用于本文提供的其他方法方面。例如,本文提供的促进胃肠道健康的方法也可以促进肠上皮细胞产生一种或多种抗炎分子。

[0145] 不希望受理论束缚,假设由所提供的方法诱导的致耐受性肠道表型受到同样由施用益生菌制剂诱导的增加的肠道屏障完整性的促进。特别是,通过降低肠道通透性,更少的大分子和微生物可以到达粘膜免疫细胞,例如固有层中。大分子和微生物转移到固有层被

认为会引发促炎反应。因此,通过促进肠道屏障完整性,假设本文提供的方法减少到达粘膜免疫细胞的促炎触发物,从而促进更具致耐受性或抗炎性的肠道表型。

[0146] 在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有帕金森病的受试者的致耐受性肠道表型。在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有肝硬化的受试者的致耐受性肠道表型。在某些实施方案中,该方法促进已被诊断患有炎性肠病(溃疡性结肠炎或克罗恩病)的受试者的致耐受性肠道表型。

[0147] 在某些此类实施方案中,该方法是治疗患有漏肠综合征的受试者的方法。

[0148] 在某些替代实施方案中,受试者是健康受试者。

[0149] 应当理解,除非本质上不相容,否则与促进致耐受性肠道表型的方法有关的上述实施方案同样且独立地适用于本文提供的其他方法方面。例如,本文提供的促进胃肠道健康的方法可以促进肠道中SCFA的产生并且还促进致耐受性肠道表型。类似地,促进致耐受性肠道表型的方法可以促进SCFA(例如丁酸盐)的产生,并且还(或由此)促进致耐受性肠道表型。类似地,本文提供的治疗帕金森病的方法可以促进致耐受性肠道表型。

[0150] 帕金森病

[0151] 如所附实施例中所报道,接受本文所述的益生菌制剂的帕金森病患者报告其疾病症状有所改善。此外,当在帕金森病患者肠道的详细体外模型中进行评估时,施用如本文所述的益生菌制剂导致SCFA产量增加、肠道屏障完整性增加、肠道屏障修复改善和向抗炎/致耐受性肠道表型转变。

[0152] 不希望受理论束缚,本文提供的数据提供了关于施用益生菌制剂治疗帕金森病的机制的假设。帕金森病与肠道屏障功能受损以及肠道炎症增加有关。这种异常的肠道环境会导致 α -突触核蛋白的错误折叠, α -突触核蛋白是在帕金森病中异常沉积的蛋白质。据推测,错误折叠的 α -突触核蛋白可以通过迷走神经运输到大脑(已知的肠-脑轴),从而导致或加剧帕金森病症状。

[0153] 如实施例中所证明的,益生菌制剂的施用导致改善的肠道屏障完整性、抗炎/致耐受性环境和增加的SCFA产生。这些作用将使肠道环境正常化,从而减轻促进 α -突触核蛋白错误折叠的条件,并降低肠道的通透性,从而降低错误折叠的蛋白质被转运到大脑的风险。因此,根据本发明的益生菌制剂的施用提供了减轻帕金森病的中枢神经系统症状以及治疗胃肠道非运动症状的作用。

[0154] 因此,在另一方面,提供了一种治疗或预防受试者的帕金森病的方法,该方法包括向受试者施用包含乳酸菌群的液体非乳益生菌制剂。

[0155] 在某些优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善以下一项或多项、优选两项或更多项、优选所有各项来治疗受试者的帕金森病:运动症状、非运动症状、外周血炎症标志物和肠道炎症标志物。在某些优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善运动症状来治疗受试者的帕金森病。在某些优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善非运动症状来治疗受试者的帕金森病。

[0156] 在某些优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善外周血炎症标志物和/或肠道炎症标志物来治疗受试者的帕金森病。在某些实施方案中,该方法减少MCP-1的产生。在某些实施方案中,该方法减少CXCL10的产生。在某些实施方案中,该方法减少IL-8的产生。在某些实施方案中,该方法减少TNFa的产生。

[0157] 在某些实施方案中,益生菌制剂的施用减缓或预防帕金森病症状例如运动症状的发作。

[0158] 用于评估帕金森病症状,例如运动、非运动和认知症状的严重程度的技术是本领域技术人员熟悉的并且在实施例3中提供。例如,运动症状可以使用运动障碍协会统一帕金森病评定量表(MDS-UPDRS)第III和IV部分进行评估,认知症状可以通过蒙特利尔认知评估(MoCA)标准进行评估。用于评估症状严重程度的其他技术详述于实施例3。

[0159] 在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善一种或多种非运动症状来治疗受试者的帕金森病。可能由患有帕金森病的受试者表现出并且可以根据本发明的方法得到改善的非运动症状包括:心血管异常(例如低血压)、抑郁、焦虑、性功能异常、感觉障碍、胃肠道症状(例如便秘)和睡眠障碍。

[0160] 可以使用非运动症状量表(NMSS)评估帕金森病患者的非运动症状(NMS)的整体评估,如随附实施例中所述。在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善受试者的NMSS来治疗受试者的帕金森病。

[0161] 在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善受试者的胃肠道非运动症状来治疗受试者的帕金森病。在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过改善便秘症状,例如通过增加每天的排便次数和/或通过减少受试者需要服用的泻药的数量来治疗受试者的帕金森病。

[0162] 在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过降低严重程度或减缓运动症状的进展(即减慢严重程度增加的速度)来治疗或预防受试者的帕金森病。在优选的实施方案中,益生菌制剂的施用通过减缓或预防运动症状的发作来治疗或预防受试者的帕金森病。

[0163] 在这些方法的某些优选实施方案中,受试者处于胃肠生态失调状态。在某些优选实施方案中,与健康对照相比,受试者在其肠道微生物群中表现出升高的厚壁菌门水平。在某些优选实施方案中,与健康对照相比,受试者在其肠道微生物群中表现出降低的拟杆菌门水平。

[0164] 在某些实施方案中,该方法进一步包括测量从受试者获得的肠道微生物群样品中厚壁菌门和/或拟杆菌门的水平的步骤,其中如果受试者与健康对照相比,其厚壁菌门水平升高,和/或如果受试者与健康对照相比,其肠道微生物群中的拟杆菌门水平降低,则向受试者施用益生菌制剂。

[0165] 在优选的实施方案中,该方法包括每天至少一次向受试者施用益生菌。

[0166] 在优选的实施方案中,该方法包括向受试者施用益生菌至少1周,优选至少2周,优选至少3周,优选至少4周。在优选的实施方案中,该方法包括向受试者施用益生菌至少1个月,优选至少2个月。在优选的实施方案中,该方法包括向受试者施用益生菌至少3个月。

[0167] 应当理解,除了本质上不相容的情况外,本文提供的本发明的其他方法的方面和实施方案同样且独立地适用于根据本发明治疗帕金森病的方法。

[0168] 例如,治疗帕金森病的方法可以促进肠道中SCFA的产生,也可以促进肠道屏障功能和/或致耐受性肠道表型。

[0169] 因此,在治疗帕金森病的方法的某些实施方案中,益生菌制剂的施用改善肠道屏障完整性。

[0170] 在治疗帕金森病的方法的某些实施方案中,益生菌制剂的施用改善肠道屏障修

复。

[0171] 在治疗帕金森病的方法的某些实施方案中,益生菌制剂的施用促进受试者的致耐受性肠道表型。

[0172] 益生菌制剂的组成

[0173] 根据本发明使用的益生菌制剂是非乳制品的液体产品(非冷冻干燥)。优选地,益生菌制剂是水基的。

[0174] 益生菌制剂含有乳酸菌群。乳酸菌是活的和具有代谢活性的益生菌,因此在制剂被吞下后立即“活着”并准备好发挥作用。

[0175] 在某些实施方案中,益生菌属于乳杆菌或肠球菌属。在某些优选的实施方案中,乳酸菌群包含屎肠球菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌中的一种或多种。

[0176] 提及鼠李糖乳杆菌意在包括最初归类为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)但现在重新归类为鼠李糖乳杆菌的任何细菌菌株。

[0177] 在某些优选的实施方案中,乳酸菌群包括屎肠球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌中的至少两种或至少三种。在某些优选的实施方案中,乳酸菌群包括植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌。

[0178] 在某些优选的实施方案中,乳酸菌群包括屎肠球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌中的每一种。

[0179] 产品Symprove™(含有屎肠球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌)在本文所述的研究中被证明在促进SCFA产生和肠道健康方面特别有效。Symprove™中的鼠李糖乳杆菌菌株最初被定性为干酪乳杆菌,但现在已被重新归类为密切相关的鼠李糖乳杆菌。

[0180] 在某些实施方案中,益生菌制剂中代谢活性细菌的总种群可以在每毫升 1.0×10^6 至 1.0×10^{10} 个活细胞,优选每毫升 1.0×10^6 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内,优选在每毫升 1.0×10^7 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内。存在于益生菌制剂中的每个单独的代谢活性细菌菌株可以在每毫升 1.0×10^5 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内,更优选地在每毫升 1.0×10^7 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内独立地存在。

[0181] 在益生菌制剂包含植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的组合或屎肠球菌、植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的组合的情况下,优选地是这些菌株中的至少一种并且优选地每一种在每毫升 1.0×10^6 至 1.0×10^{10} 个活细胞的范围内,优选地在每毫升 1.0×10^7 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内存在。

[0182] 在某些实施方案中,嗜酸乳杆菌种群(如果包括的话)可以低于每毫升 1.0×10^5 个活细胞,优选在每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^5 个活细胞的范围内,任选地为每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^4 个活细胞。

[0183] 在一个示例性实施方案中,该制剂可以包含屎肠球菌、植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的组合,其中这些细菌菌株中的每一种的细菌计数在每毫升 1.0×10^5 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内,更优选在每毫升 1.0×10^7 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内。嗜酸乳杆菌种群(如果包括的话)可以低于每毫升 1.0×10^5 个活细胞,优选在每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^5 个活细胞的范围内,任选地为每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^4 个活细胞。

[0184] 在某些优选的实施方案中,根据本发明的方法施用的益生菌制剂的液体基质通常包含多糖、寡糖、二糖和单糖的混合物。

[0185] 在某些实施方案中,益生菌制剂的特征在于制剂的总碳水化合物含量与还原糖含量的比率,反映了存在的多糖、寡糖、二糖和单糖的复杂混合物。在某些实施方案中,制剂的总碳水化合物含量与还原糖含量的比率在8:1至2:1的范围内,更通常在5:1至2.5:1的范围内,或在4:1至3:1的范围内。

[0186] 在益生菌制剂的进一步示例性实施方案中,制剂的总碳水化合物(多糖、寡糖、二糖和单糖)含量可以在20mg/ml至40mg/ml的范围内,或在20mg/ml至30mg/ml的范围内,并且总还原糖含量可以在5mg/ml至20mg/ml的范围内,或在5mg/ml至10mg/ml的范围内。

[0187] 益生菌制剂优选还包含蛋白质和肽组分。存在于益生菌制剂中的蛋白质和肽的总量通常在0.01mg/ml至2mg/ml,优选0.05mg/ml至2mg/ml的范围内。优选地,高分子量肽(分子量大于5000道尔顿)的总量在10 μ g/ml至300 μ g/ml,优选50 μ g/ml至200 μ g/ml的范围内。在一个具体实施方案中,蛋白质和肽的浓度可以是约1mg/ml至约2mg/ml,高分子量肽的浓度可以是约250 μ g/ml。

[0188] WO 2006/035218中提供了测量这些营养组分的浓度的方法,该专利通过引用并入本文。

[0189] 益生菌制剂还可以包含其他组分,例如纤维素、淀粉、 β -葡聚糖、戊聚糖、多酚、核糖核酸、脂质、磷酸盐、类黄酮、氨基酸、维生素(B₁、B₂、C和E)、硅酸盐和微量元素。

[0190] 益生菌制剂可包含含有期望益生菌菌株的发芽大麦提取物。

[0191] 益生菌制剂的一个示例性实施方案包含发芽大麦的提取物和屎肠球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌的组合,其中这些细菌菌株中的每一种的细菌计数在每毫升 1.0×10^5 至 1.0×10^{10} 个活细胞的范围内,更优选地在每毫升 1.0×10^7 至 1.0×10^9 个活细胞的范围内,并且进一步包含浓度低于每毫升 1.0×10^5 个活细胞,优选地在每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^5 个活细胞的范围内,任选地为每毫升 1.0×10^2 至 1.0×10^4 个活细胞的嗜酸乳杆菌。

[0192] 可以向益生菌制剂添加额外的组分,例如调味剂和/或着色剂,以改善适口性。

[0193] 通过添加合适的缓冲剂或缓冲剂的组合可以方便地控制制剂的pH值。优选的缓冲剂包括例如柠檬酸三钠或磷酸盐缓冲剂。本文所述的基于液体的制剂的pH值在长期储存期间通常保持在3.8至4.5的范围内,特别是保持在约pH 4.0。益生菌制剂可在4 $^{\circ}$ C至环境温度(约25 $^{\circ}$ C)的任何温度下储存。本文所述的SymproveTM产品已显示在约4 $^{\circ}$ C下储存至少6个月和在25 $^{\circ}$ C下储存至少4个月时保持稳定(就细菌计数而言)。

[0194] 该制剂可以另外包含抗真菌剂,例如灭菌的山梨酸钾,和/或抗氧化剂,例如维生素C。

[0195] 在一个优选实施方案中,生长基质可以包含颗粒物质,例如直径不超过1mm的颗粒。

[0196] 益生菌制剂的最优选实施方案是称为SymproveTM的产品,其含有屎肠球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌的活的代谢活性细胞,该产品可根据本文提供的实施例制备。SymproveTM中的鼠李糖乳杆菌菌株最初被定性为干酪乳杆菌,但现在已被重新归类为密切相关的鼠李糖乳杆菌。

[0197] 施用

[0198] 在某些优选的实施方案中,该制剂是口服施用的。

[0199] 在某些优选的实施方案中,该制剂每周至少施用一次。在某些优选的实施方案中,

该制剂每天至少施用一次,优选每天施用一次。

[0200] 在某些优选的实施方案中,该制剂以在0.5mg/kg患者至5mg/kg患者的范围内的剂量施用。在一个优选的实施方案中,该制剂以1mg/kg患者的剂量施用。

[0201] 在某些优选的实施方案中,该制剂施用至少1周,优选至少2周,优选至少3周,优选至少4周。在某些优选的实施方案中,该制剂被施用至少1个月。在某些优选的实施方案中,该制剂被施用至少5周、至少6周、至少7周、至少8周、至少9周、至少10周、至少11周或至少12周。

[0202] 在某些优选的实施方案中,该制剂以1mg/kg患者的剂量每天至少施用一次,持续至少3周,优选至少1个月。

[0203] 益生菌制剂制造

[0204] 根据本发明的方法使用的益生菌制剂可以通过在液体生长基质(例如发芽大麦的提取物)中培养一种或多种益生菌菌株来制备。生长基质本身可以使用W0 2006/035218中描述的制造方法从种子或麦粒发芽样品大麦开始制备,该专利的内容通过引用并入本文。

[0205] 一种不需要主动生长步骤的产生益生菌制剂的替代方法仅包括用益生菌的发酵剂培养物接种生长基质(例如,如W02006/035218中所述制备的发芽大麦的提取物)。该方法的发酵剂培养物包括例如冷冻干燥的细菌或液体培养物。生长基质可以接种多于一种细菌物种。优选地,发酵剂培养物中活细胞的浓度超过每毫升 10^6 个活细胞。该方法也在W02006/035218中描述。

[0206] 产生益生菌制剂的另一种替代方法是收集满足本文和W02006/035218中描述的益生菌制剂的营养需求的营养底物,并用益生菌接种所述底物。

[0207] 参考以下非限制性实验实施例将进一步理解本发明:

[0208] 实施例

[0209] 实施例1

[0210] Symprove中的益生菌影响三种健康人类肠道微生物群的能力是使用体外肠道模型(人体肠道微生物生态系统模拟器,配备粘膜隔室(M-SHIME®));在三周内给药Symprove后,针对细菌多样性、SCFA产生和炎症标志物的作用进行了量化。Symprove的制造及其营养组成进一步提供于W0 2006/035218中,其通过引用并入本文。

[0211] 2. 材料和方法

[0212] 2.1. M-SHIME®测试

[0213] Symprove™从Symprove Ltd获得并按原样使用。使用M-SHIME®系统进行实验。简而言之,该系统包括四个反应器容器(V)。前两个反应器采用填充和抽取原理,模拟食物摄取和消化的初始阶段。蠕动泵分别向胃(V1)和小肠(V2)中添加食物(140mL,每天3次)和胰液/胆汁(60mL,每天3次),并在规定的时间间隔后清空每个反应器。其余2个反应器模拟近端(V3)和远端(V4)结肠的条件。结肠容器不断搅拌,保持固定体积(PC=500mL;DC=800mL),并且其pH值是恒定的(PC=5.6-5.9;DC=6.6-6.9)。选择每个容器中培养基的保留时间以模拟人类体内条件。结肠反应器接种了来自健康人类供体(食用西式饮食)的粪便微生物群,并允许微生物群落在2周内稳定下来。然后将微生物群再维持2周的对照期。在此期间,记录了基线微生物群落组成和活动。在这项研究中使用了三个供体来解决个体间的可

变性。然后开始为期三周的治疗阶段;Symprove被添加到V1中,并在被喂入结肠微生物群之前通过V2进行。一组V1-V2容器用于最大限度地减少食物材料的可变性,这意味着到达近端结肠容器的食物对于所有供体都是相同的。所有结肠容器都添加了粘蛋白覆盖的微型生态系统,不仅可以维持腔内微生物群,还可以维持结肠区域的特定粘膜微生物群。

[0214] 2.2.通过流式细胞术定量存活和非存活细菌

[0215] 在V1和V2中以不同时间间隔从不同阶段收集样品,以研究益生菌物种的上胃肠道存活率。最初在磷酸盐缓冲盐水中制备10倍稀释系列。通过用SYTO 24和碘化丙啶对适当的稀释液进行染色来评估存活和非存活的细菌种群。使用高流速在BDFacs verse上分析样品。通过在SYTO通道上应用200的阈值水平,将细菌细胞与培养基碎片和信号噪声分离。设置适当的父门和子门来确定所有种群。结果报告为三个独立生物学重复的平均对数(计数)±标准差。

[0216] 2.3.测量SCFA/BCFA、乳酸盐和铵

[0217] 监测SCFA水平,包括乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐和支链SCFA(异丁酸盐、异戊酸盐和异己酸盐)。根据制造商的说明,使用市售的酶测定试剂盒(R-Biopharm,Darmstadt,Germany)进行乳酸盐定量。通过最初进行蒸汽蒸馏来量化铵分析。随后,用HCl以滴定法测定馏出物中的铵。

[0218] 2.4.微生物群落分析

[0219] 在参考期和治疗期中,每周从每个结肠容器收集一次用于微生物群落分析的样品。从源自1mL管腔样品或0.1g粘膜样品的沉淀细胞开始分离DNA。使用物种特异性引物和探针,通过qPCR方案确定益生菌物种的数量。虽然引物是物种特异性的而不是菌株特异性的,但微生物群是在给药Symprove之前的4周内建立的,因此在治疗期中细菌物种数量的任何增加都是益生菌治疗的结果,意味着不需要菌株特异性引物。qPCR在QuantStudio 5实时PCR系统(Applied Biosystems,Foster City,CA USA)上进行。一式三份分析每个样品。结果报告为三个技术重复品的管腔样品的平均log(拷贝数/毫升)和粘膜样品的平均log(拷贝数/克)±sd。

[0220] 通过16S靶向测序分析建立了每个结肠隔室的微生物群图谱。根据制造商的说明(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA),使用Taq DNA聚合酶和Fermentas PCR试剂盒进行质量控制PCR。将获得的PCR产物在2%琼脂糖凝胶上在100V下沿DNA提取物运行30分钟。将10μl原始基因组DNA提取物送到LGC基因组学有限公司(LGC genomics GmbH,德国)进行文库制备和在Illumina Miseq平台上使用v3化学和上述引物进行测序。

[0221] 2.5.Caco-2/THP1-blue™共培养模型

[0222] 使用Caco-2细胞(HTB-37;美国典型培养物保藏中心)进行共培养实验,这些细胞以 1×10^5 个细胞/插入物的密度接种在24孔半渗透插入物(0.4μm孔径)中。将Caco-2单层培养14天,期间每周更换3次培养基,直到获得具有超过 $300 \Omega \text{cm}^2$ 的跨上皮电阻(TEER)(用Millicell ERS-2上皮伏欧计,Millipore测量)的功能性单层。细胞维持在含有葡萄糖(25mM)和谷氨酰胺(4mM)并补充有HEPES(10mM)和热灭活胎牛血清(HI-FBS,20%v/v)的杜氏改良伊格培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)中。

[0223] THP1-Blue™细胞(InvivoGen)以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种在24孔板中,并用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)处理48小时,并维持在罗斯威尔公园纪念研究所

(RPMI) 1640培养基中,该培养基含有葡萄糖(11mM)和谷氨酰胺(2mM)并补充有HEPES(10mM)、丙酮酸钠(1mM)和HI-FBS(10%v/v)。

[0224] 在建立共培养之前,测量了Caco-2单层的TEER(从所有读数中减去空插入物的TEER)。然后将携带Caco-2的插入物放置在PMA分化的THP1-blue™细胞的顶部。顶端隔室(包含Caco-2细胞)充满无菌过滤(0.22μm)的结肠SHIME培养基(在Caco-2完全培养基中以1:5v/v稀释)。细胞用丁酸钠(Sigma-Aldrich)进行顶端处理以作为阳性对照。基底外侧隔室(包含THP1-blue™细胞)充满Caco-2完全培养基。将细胞处理24小时,然后测量TEER。然后弃去基底外侧上清液,并在基底外侧用含有超纯脂多糖(LPS,大肠杆菌K12,InvivoGen)的Caco-2完全培养基刺激细胞。还在基底外侧用LPS与氢化可的松(HC,Sigma-Aldrich)的组合和作为对照的无LPS培养基刺激细胞。在LPS刺激(6小时)后,收集基底外侧上清液用于通过Luminex®multiplex(Affymetrix-eBioscience)进行细胞因子测量(人IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、CXCL10和MCP-1)并用于NF-κB活性测量。所有测量一式三份进行,并且细胞在37℃的空气/CO2(95:5v/v)潮湿气氛中孵育。

[0225] 3. 结果

[0226] 粪便样品取自三个健康的成年供体,并用于建立三个离散的肠道模型,每个模型都有一个具有代表性的人类微生物群。经过两周的稳定期和另外两周的对照期,在此期间供体微生物群建立并充满活力,在三周内每天将Symprove给药到M-SHIME®肠道模拟器中。这将细菌暴露在胃酸条件下45分钟(体内MRI成像显示,纯水(240mL)在人体中的半排空时间为13±1分钟),然后它们转移到小肠液中保持180分钟。图1中的数据显示暴露于这些阶段后的总细胞计数和活细胞计数;在这次攻击中,99.3%的细菌仍然存活。这表明Symprove的水性制剂保护细菌免受胃部pH值低和小肠中存在的高浓度胆汁盐的影响,这与早期体外耐酸测试的结果一致。在暴露于胃液和小肠液的这个时期之后,细菌被转移到来自三个健康成年供体的已建立的微生物群中。

[0227] 图2显示益生菌物种是如何定殖在近端和远端结肠的管腔和粘膜隔室中的。在对照样品中未检测到嗜酸乳杆菌,表明它并非天然存在于人类微生物群中,并且仅在两周后在近端结肠中以可检测的水平出现。在给药期中,它没有定殖于远端结肠的管腔或近端和远端结肠的粘膜隔室。这可能反映了这样一个事实,即在Symprove的产生过程中,添加了嗜酸乳杆菌作为促进剂以帮助鼠李糖乳杆菌的生长,并且在最终产品中它的存在量不超过10⁴个拷贝/毫升。在对照样品中也未检测到鼠李糖乳杆菌,但在给药Symprove后鼠李糖乳杆菌立即在腔室中定殖,1周后在近端结肠中达到约10⁶个拷贝/毫升并在远端结肠中达到约10⁷个拷贝/毫升。在整个给药期的剩余时间内,在这些浓度下仍可检测到鼠李糖乳杆菌。它还立即定殖在近端结肠的粘膜隔室中,达到10⁴个拷贝/克,但从未在远端结肠的粘膜隔室中检测到。在对照期中,在近端结肠的管腔中偶尔检测到植物乳杆菌,但它立即定殖在近端(10⁸个拷贝/毫升管腔和10⁵个拷贝/克粘膜)和远端(10⁷个拷贝/毫升管腔和10⁵个拷贝/克粘膜)结肠的管腔和粘膜隔室中。在对照期中,屎肠球菌大量存在于所有隔室中,但在给药Symprove后其数量增加,在管腔内达到约10⁸个拷贝/毫升并在粘膜隔室中达到约10⁶个拷贝/克。

[0228] 图3报告了给药Symprove之前和期间近端和远端结肠中的乳酸盐和SCFA浓度。给药Symprove之后乳酸盐浓度升高,并随着持续给药而增加。乳酸盐是乳酸杆菌和双歧杆菌

发酵碳水化合物的主要副产物,但也被产生丙酸盐的物种(如韦荣氏菌属(*Veillonella*)和巨球菌属(*Megasphaera*))以及产生丁酸盐的物种(如粪厌氧棒杆菌(*A.caccae*)和霍式真杆菌(*E.hallii*))消耗。因此,测得的乳酸盐浓度是生产和消耗之间的净差。

[0229] SCFA数据显示乙酸盐含量最多(在近端和远端结肠中为50.9%),其次是丁酸盐和丙酸盐。这与体内数据相关,显示乙酸盐占人类粪便中检测到的总SCFA的一半以上,这是因为包括拟杆菌和产乙酸细菌的许多细菌群将其作为糖酵解发酵的副产物产生。乙酸盐本身就是许多产生丁酸盐的物种(例如普氏栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)和罗氏菌属(*Roseburia* spp.))的底物,并且是一种必需的辅助底物,它需要被消耗才能完成从乳酸盐或碳水化合物合成丁酸盐。因此,与乳酸盐一样,乙酸盐的浓度是生产和消耗之间的净差。丙酸盐水平在供体微生物群中是可变的,并且在给药Symprove期间没有显著改变。

[0230] 相对于对照,近端和远端结肠中的丁酸盐浓度显著增加。与乙酸盐和乳酸盐不同,丁酸盐是发酵的最终产物,因此在体外肠道模型中不被消耗,但体内丁酸盐是结肠细胞的主要能量来源(其利用高达90%的丁酸盐并且高丁酸盐浓度通常与改善健康有关(Tan等人,2014,Ríos-Covían等人,2016))。

[0231] 一旦碳水化合物耗尽,结肠微生物群将从糖酵解发酵转变为蛋白质的蛋白水解发酵,从而产生铵、支链脂肪酸(BCFA,通常是异丁酸盐、2-甲基丁酸盐和异戊酸盐)和各种胺、酚/吲哚和硫化物;这些化合物通常会损害结肠健康,因此它们的存在是不受欢迎的。图4显示,与对照相比,给药Symprove实际上降低了BCFA和铵水平。

[0232] 图5显示了在对照期和给药期中三个供体在六个主要菌门方面的肠道微生物群的多样性(菌门内操作分类单位(OTU)的菌科细节在图6和图7中给出)。一般来说,Symprove的给药会增加供体1和2的放线菌的近端和远端管腔水平以及远端粘膜水平,但以拟杆菌为代价。特别是,供体1和2中的假链状双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)增加,而供体3中的青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)增加,主要以长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)为代价。对于供体2和3,两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)的粘膜数量也显著增加。双歧杆菌属于放线菌门,因此该门的增加可以解释较高的乙酸盐浓度,但也可以解释较高的丁酸盐浓度,由乙酸盐驱动的和上述产生丁酸盐的细菌的交叉喂养相互作用介导,而拟杆菌科的减少可以解释低丙酸盐浓度。供体1和2的近端结肠以及所有三个供体的远端结肠中的厚壁菌门的管腔水平均有所增加。在OTU水平,主要变化归因于OTU 33(植物乳杆菌)和OTU 125(鼠李糖乳杆菌),反映了Symprove中益生菌的成功定殖。

[0233] 所有三个供体中的瘤胃球菌科数量均增加,其中供体2(以及所有供体的粘膜隔室)中的OTU 64(普氏栖粪杆菌)数量增加,供体1和3中的OTU 29(*Subdoligranulum* spp.)数量增加。有趣的是,毛螺菌科,一个强烈产生丁酸盐的科,在所有供体的粘膜隔室中都受到抑制。所有供体的韦荣氏菌科数量都有所增加,特别是供体2(OTU 1,巨球菌属)。许多产生丁酸盐的细菌属于厚壁菌门,因此该门比例的增加也与上面讨论的丁酸盐水平升高有关。在给药Symprove后富集的其他产乳酸盐菌科包括供体1和3的管腔和粘膜近端结肠和管腔远端结肠中的肠球菌科,反映了所有供体的所有隔室中的屎肠球菌和链球菌科的广泛定殖;这些增加体现在放线菌门和厚壁菌门的普遍增加中。互养菌门定殖于供体2和3的远端结肠,并且在给药Symprove后它们的数量增加。

[0234] Caco-2-THP1-BlueTM共培养体外模型用于评估SHIME样品的炎症反应(对照和Symprove给药后)。在Symprove给药后,在细胞培养模型中未观察到跨上皮电阻(TEER)的降低,这表明在实验过程中维持了上皮的完整性。图8显示了抗炎细胞因子(NK- κ B、IL-6、IL-10和IL-1 β)和炎症趋化因子(MCP-1、CXCL10和IL-8)的水平。Symprove给药不会改变NF- κ B或IL-1 β 的水平,但会增加IL-6和IL-10的水平并降低MCP-1、CXCL 10和IL-8的水平。

[0235] 4. 讨论

[0236] 此处报告的数据表明,Symprove中的益生菌物种能够在模拟人类条件下经受住口服递送挑战。暴露于胃酸45分钟和暴露于小肠液3小时并未显著降低活细菌数量(99.3%的存活率)。这种稳定性的主要因素可能是细菌悬浮在水性麦芽汁中,而不是在冷冻干燥的压片/小袋或水包油乳液(如酸奶)中;在体内,水的消耗不会引发胃酸的产生(胃酸的主要分泌是通过使蛋白质变性并通过将其转化为胃蛋白酶来激活胃蛋白酶原来促进蛋白质的消化)。事实上,摄入大量水会稀释胃液,提高局部pH值。在没有脂肪的情况下,胃会迅速将水排入小肠(人类的半排空时间为13 $\pm$ 1分钟),其中局部pH值再次升高(小肠pH值沿其长度从约5.6逐渐增加到7.4。乳酸杆菌已被证明具有明显的耐酸性;例如,嗜酸乳杆菌菌株在pH 3.5时仍可存活,而鼠李糖乳杆菌菌株可在pH 3时可保持存活数小时。当脂肪是摄入食物的组成部分时,水会以相同的速度排空,但脂肪会保留更长的时间。当葡萄糖含量高于6%w/v时,胃排空会进一步延迟。

[0237] 在通过上胃肠道后,三种益生菌(植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和屎肠球菌)能够在近端和远端结肠的管腔和粘膜隔室中建立、定殖和增殖,而嗜酸乳杆菌则能够在近端管腔中增殖。重要的是,数据显示三种益生菌物种都能够定殖于粘膜层。这表明Symprove的体内消耗会导致益生菌物种在肠道中定殖,而不是管腔数量暂时上升,这有助于解释临床研究中看到的积极、长期的影响。尽管存在已建立且充满活力的微生物群,但仍发生了增殖,这表明益生菌物种在营养方面没有被共生细菌超越。

[0238] 一旦建立,益生菌就会产生积极的影响;主要影响是通过增加乳酸盐浓度引起的。这种底物的交叉喂养相互作用促进了共生肠道细菌,尤其是厚壁菌门的细菌的生长,导致SCFA水平增加,尤其是丁酸盐。

[0239] 所有供体的微生物群组成都发生了变化,尽管具体变化各不相同,反映了人类肠道菌群的复杂性和多样性。肠道微生物群的广泛变化与肠道疾病有关;例如,在IBS中通常可以看到降低的厚壁菌门和放线菌门水平,而在IBD中通常可以看到降低的厚壁菌门水平和增加的变形菌门水平。

[0240] 除了由Symprove中的乳酸杆菌属产生外,双歧杆菌的数量也有所增加,并且已知这些是产生乳酸盐的。一种可能性是,用于生产和悬浮Symprove中的益生菌的麦芽汁本身就是双歧杆菌的营养来源,因为它含有发芽的大麦提取物。未经处理的大麦已显示在生长猪和喂食低脂饮食的大鼠中增加双歧杆菌属和乳酸杆菌属,并增加丁酸盐浓度,而在模拟GIT条件下,来自大麦的低聚木糖已显示增加乳酸杆菌属。双歧杆菌数量的增加本身将对整体健康产生有益影响;例如,食用两歧双歧杆菌4周可调节健康成年人的微生物群,从而减少普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)和普雷沃菌属(Prevotella)的数量,增加瘤胃球菌科和理研菌科的数量并提高丁酸盐浓度。

[0241] 虽然乙酸盐水平在整个对照期和给药期中保持相对恒定,但产乙酸盐细菌(双歧

杆菌、拟杆菌和产乙酸菌)的比例增加暗示了乙酸盐浓度的升高,但由于测量的乙酸盐浓度始终反映生产和消耗之间的净差,因此总体水平没有明显提高。

[0242] 相反,丁酸盐的浓度明显更高,因为这是发酵的终点;在体内,大部分丁酸盐被利用,但由于这些不存在于体外肠道模型中,因此丁酸盐会在管腔培养基中积累。

[0243] 由于生态失调与产生丁酸盐的物种减少有关,因此预计此处看到的丁酸盐增加会带来积极的临床效果。鉴于丁酸盐对人体健康的诸多积极影响,人们已经进行了许多尝试来配制丁酸盐补充剂;不幸的是,丁酸盐有一种强烈的难闻气味,大部分被上胃肠道吸收,并且丁酸钠包衣丸剂配方在调节大鼠肠道功能方面被证明是不成功的。此处提供的数据表明,适当配制的益生菌补充剂可能是一种更好的方法,它可以刺激现有的微生物群产生丁酸盐,而不是将其作为膳食补充剂提供。

[0244] 益生菌对调节炎症反应的作用也可能有助于其临床有效性。在这里,体外细胞培养模型显示,在给药Symprove后暴露于SHIME培养基时,上皮屏障的完整性没有退化,炎症标志物也有所减少。抗炎细胞因子NK- κ B和IL-1 β 的水平没有变化,而IL-6升高并且IL-10显著升高。同时,炎症趋化因子MCP-1、CXCL 10和IL-8的水平发生降低。

[0245] 5. 总结

[0246] 数据表明,当益生菌悬浮液以能够解决人类口服递送的挑战的方式配制时,可以将存活的益生菌物种递送到肠道。一旦到达那里,细菌就可以在管腔和粘膜隔室中浸润、定殖和增殖。重要的是要记住,本文描述的细胞培养模型意味着微生物群作为一个整体的变化正在调节免疫反应。这是一个关键的区别;世界卫生组织的定义要求益生菌“给宿主带来健康益处”,但经常被错误地解释为必须证明益生菌物种本身必须通过某种代谢机制在体内产生积极影响。这里提供的数据清楚地表明,事实上益生菌物种在现有微生物群中的整合和定殖,以及可利用的营养物(乳酸盐)的产生,刺激了大部分有益菌门的生长,这意味着是细菌科的再平衡给宿主带来了健康益处。即使微生物群是从三个健康供体获得的,这种再平衡效应也可以在这里看到;如上所述,由于许多肠道疾病与生态失调有关,因此再平衡机制似乎是临床症状改善的主要原因,而不是单个益生菌物种的任何影响。另外值得注意的是,数据显示对肠道健康没有负面影响。

[0247] 先前的研究表明,乳酸杆菌属和双歧杆菌属可以对艰难梭菌发挥抗病原作用。因此,在更激进的措施例如粪便微生物群移植之前,递送这些益生菌物种可能会为复发性肠道感染患者提供另一种治疗选择。

[0248] 实施例2

[0249] 进行了进一步的实验以研究Symprove对患有严重肝硬化或早发性帕金森病(PD)的患者的肠道微生物群的影响。还对患有炎症性肠病(IBD)的患者的肠道微生物群进行了实验,已知IBD可以通过Symprove治疗。

[0250] 肝硬化和PD的病理学通常与患者的肠道细菌群无关。然而,如下面的数据所示,PD和肝硬化患者都表现出肠道生态失调。此外,在两种病况之间观察到不同的生态失调变化。因此,所提供的数据证明了Symprove在各种生态失调状态和疾病状况下促进生态失调肠道微生物群重新平衡到更健康状态的能力。

[0251] 2. 材料和方法

[0252] 使用从患有PD、肝硬化或IBD的患者(每种疾病3个供体,平行运行)获得的粪便样

品的细菌接种物进行使用实施例1中描述的 **M-SHIME[®]** 系统的短期测定。这涉及在 Symprove 中存在或不存在益生菌的情况下,在单个容器中发酵粪便样品。简而言之,在 pH 6.5 下缓冲的无糖营养培养基 (56mL) 在发酵开始时与 7mL Symprove 共同施用,该无糖营养培养基含有结肠中存在的基础营养物质 (5.9g/L K_2HPO_4 、18.3g/L KH_2PO_4 、2.3g/L $NaHCO_3$ 、2.3g/L 酵母提取物、2.3g/L 蛋白胨、0.6g/L 半胱氨酸和 2.3mL/L Tween80)。通过将基础营养培养基添加到蒸馏水 (7mL, 而不是 Symprove) 中进行相应的一系列空白实验。空白数据与 Symprove 数据的比较可以确定益生菌制剂的效果。从每个供体在厌氧磷酸盐缓冲液 (K_2HPO_4 8.8g/L; KH_2PO_4 6.8g/L; 巯基乙酸钠 0.1g/L; 连二亚硫酸钠 0.015g/L) 中制备 7.5% (w/v) 的粪便悬浮液并接种 (7mL) 到反应器中,使总体积达到 70mL。最后,所有结肠容器都添加了五个粘蛋白覆盖的微型生态系统,不仅可以维持腔内微生物群,还可以维持结肠区域的特定粘膜微生物群。每次孵育一式三份进行,得到 18 次独立孵育。在摇动 (90rpm) 和厌氧条件下,在 37°C 下孵育 48 小时。孵育在具有足够大的体积 (70mL) 的完全独立的封闭反应器中进行,从而不仅可以进行稳健的微生物发酵,还可以随着时间的推移收集多个样品。每次孵育一式三份进行以解释生物学变异,得到 54 次独立孵育 (9 个供体,每个供体都有空白组和处理组,一式三份)。

[0253] 在短期结肠孵育开始时,将测试成分以对应于产品的双倍剂量的浓度添加到含有结肠中存在的基础营养素 (例如宿主衍生的聚糖,如粘蛋白) 的无糖营养培养基中。对于每个供体,还包括一个仅包含无糖营养培养基 (不含纤维) 的空白组,从而可以评估细菌群落背景活动。

[0254] 除了测量 SCFA、BCFA 和铵的产生外,还通过 16S rRNA 分析评估了微生物群组成的变化。使用基于 Illumina PCR 的测序方法,其中微生物序列被扩增直到达到饱和水平。因此,结果以不同的系统发育水平 (微生物门、科、属和 OTU 水平) 表示,并表示为与每个样品中序列总量的比例值,从而提供半定量结果。所应用的方法涉及跨越 16S rDNA 的 2 个高变区 (V3-V4) 的引物,使用双端测序方法,由此 2×250 bp 的测序产生 424bp 的扩增子。

[0255] 此外,如上所述进行 Caco-2/THP1 共培养测定。简而言之,将 Caco-2 细胞 (HTB-37; 美国典型培养物保藏中心) 接种在 24 孔半渗透插入物中。Caco-2 单层培养 14 天,每周更换 3 次培养基,直到获得具有跨上皮电阻 (TEER) 的功能性细胞单层。将细胞维持在含有葡萄糖和 L-谷氨酰胺并补充有 HEPES 和 20% (v/v) 热灭活 (HI) 胎牛血清 (FBS) 的杜氏改良伊格培养基 (DMEM) 中。细胞在空气/CO₂ (95:5, v/v) 的湿润气氛中于 37°C 孵育。

[0256] THP1-Blue[™] (InvivoGen) 细胞维持在罗斯威尔公园纪念研究所 (RPMI) 1640 培养基中,该培养基含有葡萄糖和谷氨酰胺,并补充有 HEPES、丙酮酸钠和 10% (v/v) HI-FBS。THP1-Blue[™] 是用报告构建体稳定转染的 THP1 人单核细胞,该构建体表达受转录因子核因子 κ B (NF- κ B) 诱导的启动子控制下的分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 基因。在 TLR 激活后 (例如通过脂多糖 (LPS); 从革兰氏阴性菌中分离), NF- κ B 被激活并诱导 SEAP 的表达和分泌。然后可以使用 QUANTI-Blue 试剂 (InvivoGen) 在上清液中测量 SEAP 活性。THP1-Blue[™] 细胞接种在 24 孔板中,并用 PMA 处理, PMA 可诱导细胞分化为巨噬细胞样细胞,这些细胞能够粘附并为 TLR 信号传导做好准备。细胞在空气/CO₂ (95:5, v/v) 的湿润气氛中于 37°C 孵育。

[0257] 对于共培养,测量了 Caco-2 单层的 TEER (=0 小时时间点)。

[0258] 从所有读数中减去空插入物的 TEER,以说明插入物的剩余电阻。然后,如前所述,

将携带Caco-2的插入物置于PMA分化的THP1-Blue™细胞顶部进行进一步实验4,11。简而言之,顶端隔室(包含Caco-2细胞)充满无菌过滤(0.22μm)的结肠SHIME悬浮液。细胞也用丁酸钠(NaB)(Sigma-Aldrich)进行顶端处理以作为阳性对照。基底外侧隔室(包含THP1-Blue™细胞)充满Caco-2完全培养基。

[0259] 作为对照,细胞也在两个室中暴露于Caco-2完全培养基。将细胞处理24小时,然后测量TEER(=24小时时间点)。减去空插入物的TEER后,将所有24小时值归一化为其自己的0小时值(以说明不同插入物的初始TEER差异),并以初始值的百分比表示。然后,弃去基底外侧上清液并在基底外侧用含有超纯LPS(大肠杆菌K12,InvivoGen)的Caco-2完全培养基刺激细胞。还在基底外侧用LPS与氢化可的松(HC,Sigma-Aldrich)的组合和作为对照的无LPS(LPS-)培养基刺激细胞。根据制造商的说明,在LPS刺激后,收集基底外侧上清液用于细胞因子测量(IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α、CXCL10和MCP-1,通过Luminex® multiplex(Affymetrix-eBioscience))和NF-κB活性测量。所有处理均以生物学一式三份进行。细胞在空气/CO2(95:5,v/v)的湿润气氛中于37℃孵育。

[0260] 此外,还进行了划痕试验以评估Symprove促进肠上皮屏障修复的能力。使用T84细胞(Sigma-Aldrich)进行体外划痕愈合试验,将这些细胞接种在24孔板中并培养7天,每周更换3次培养基,直到形成完全融合的细胞单层。将细胞维持在杜氏改良伊格培养基/营养混合物F-12Ham中,其含有L-谷氨酰胺和HEPES,并补充有抗生素-抗真菌剂和5%HI-FBS。细胞在空气/CO2(95:5,v/v)的湿润气氛中于37℃孵育。

[0261] 培养7天后,在T84细胞单层中产生划痕,然后在无血清T84培养基中用1/10稀释的结肠批次悬浮液处理。使用Cytation 5细胞成像多模式读取器在初始时间点(0小时)和孵育24小时后捕获图像。

[0262] 比较图像以量化细胞的迁移率,并使用ImageJ®测量伤口面积。无血清培养基和5mM NaB(Sigma-Aldrich)分别用作阴性和阳性对照。所有处理均以生物学一式三份进行。细胞在空气/CO2(95:5,v/v)的湿润气氛中于37℃孵育。

[0263] 3. 结果

[0264] 3.1短链脂肪酸生产

[0265] 肝硬化

[0266] 就SCFA的生产而言,添加Symprove对三名肝硬化供体的肠道微生物群具有刺激作用(图9A)。SCFA生产主要发生在6-48小时的时间范围内。总体而言,对供体E和D观察到Symprove的最强刺激作用,分别产生比相应空白组高28.0mM和26.9mM的SCFA浓度。

[0267] Symprove的添加对三名肝硬化供体的乙酸盐生产具有刺激作用(图9B)。供体E的特点是在前6小时内已经大量生产乙酸盐,这明显受到Symprove的刺激。总体而言,乙酸盐的生产主要发生在6-24小时的时间范围内。Symprove处理与增加的乙酸盐浓度相关,这在供体D(处理组中浓度比空白组高16.9mM)和E(浓度高16.7mM)中最为明显。

[0268] Symprove的添加对三个肝硬化供体的孵育过程中的丙酸盐生产具有刺激作用(图9C)。丙酸盐生产发生在6-48小时的时间范围内,供体D在48小时后产生最高浓度。对供体D也观察到Symprove的最强刺激作用,产生的丙酸盐浓度比相应的空白组高8.8mM。

[0269] 在所有供体中添加Symprove刺激了丁酸盐的生产,特别是在供体E和F中(图9D)。

供体F在48小时后获得了最高的丁酸盐浓度,这可能是由于乙酸盐的转化,从而解释了较低的乙酸盐浓度(图9B)。Symprove的添加增加了丁酸盐的生产,供体F为7.5mM,供体E为3.9mM。

[0270] 帕金森病

[0271] 就SCFA的生产而言,添加Symprove对三名帕金森病供体的肠道微生物群具有刺激作用(图10A)。SCFA生产主要发生在6-48小时的时间范围内。总体而言,对供体H和I观察到Symprove的最强刺激作用,分别产生比相应空白组高27.8mM和28mM的SCFA浓度。

[0272] Symprove的添加对三个帕金森病供体的乙酸盐生产有刺激作用(图10B),主要是在6-48小时的时间范围内。这种刺激导致处理组中的乙酸盐浓度显著高于空白组。在供体I中观察到最强的刺激(在处理组中产生21.4mM的更高的乙酸盐浓度)。在所有三个供体中,在24-48小时的时间范围内产生了大量的乙酸盐,这表明底物在24小时后没有耗尽。

[0273] Symprove的添加对三个帕金森病供体中的两个(G和H)的孵育过程中的丙酸盐生产有刺激作用(图10C)。丙酸盐的生产发生在6-48小时的时间范围内,但刺激作用是在24-48小时的时间范围内发挥的。对于供体H,48小时后丙酸盐浓度最高,Symprove的刺激作用最强,产生的丙酸盐比相应的空白组多5.9mM。

[0274] Symprove刺激了三个供体中的丁酸盐生产(图10D)。刺激作用在24小时后已经很明显,并在24-48小时的时间范围内持续。在与供体G的处理孵育中获得了48小时后的最高丁酸盐浓度,与空白组相比,丁酸盐水平增加了9.1mM。Symprove的添加增加了丁酸盐的生产,供体H为7.5mM,供体I为5.9mM。

[0275] 乳酸盐浓度在6小时后大幅上升,然后在其余测试期间下降。乳酸盐是第一种浓度增加的化合物,因为Symprove中的乳酸菌会发酵碳水化合物;然而,乳酸盐实际上并没有在系统中积累,因为它被产生丙酸盐的物种(如韦荣氏菌属和韦荣氏菌属)以及产生丁酸盐的物种(如粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae*)和霍式真杆菌)消耗。

[0276] 此外,与三个测试PD供体中的对照孵育相比,Symprove降低了支链CFA浓度(异丁酸盐、异戊酸盐和2-甲基丁酸盐)。关于铵生产,发现与三个供体的对照孵育相比,Symprove降低了铵浓度。

[0277] 产生短链脂肪酸(SCFA)的细菌的数量减少是PD患者微生物群的一个普遍特征,因此从治疗PD患者的角度来看,在给药益生菌后看到的SCFA水平提高是一个令人鼓舞的迹象。

[0278] IBD

[0279] Symprove的添加对SCFA的生产具有刺激作用(图11A)。SCFA生产反映了测试成分的整体发酵。SCFA的生产在6-24小时的时间范围内开始,供体A在24小时后产生最高浓度,并在24-48小时的时间范围内继续产生。在孵育结束时,对供体A的处理获得了最高的SCFA浓度。对供体A也观察到Symprove的最强刺激作用,产生的SCFA浓度比相应的空白组高25.3mM。

[0280] Symprove的添加对三个IBD供体的孵育过程中的乙酸盐生产具有刺激作用(图11B)。孵育前6小时的产量相当低;它主要发生在6-24小时的时间范围内。供体A在24小时后获得最高浓度。该供体的乙酸盐生产在24-48小时的时间范围内进一步继续,在孵育结束时在三个供体中产生最高的乙酸盐浓度。对供体A也观察到Symprove的最强刺激作用,产生的

乙酸盐浓度比相应的空白组高13.3mM。

[0281] 在与供体C的处理孵育中,乙酸盐在24-48小时的时间范围内被消耗。乙酸盐的消耗表明群落成员之间的交叉喂养。

[0282] Symprove的添加对三个IBD供体的孵育过程中的丙酸盐生产具有刺激作用(图11C)。在孵育的前6小时内没有发生生产,但在6-48小时的时间范围内发生了生产。供体A在48小时后获得了最高浓度。对于供体A也观察到Symprove的最强刺激作用,产生的丙酸盐浓度比相应的空白组高9.7mM。

[0283] 在孵育的前6小时内不产生丁酸盐。考虑到丁酸盐的生产依赖于乙酸盐和/或乳酸盐的初级生产,它通常在孵育的后期生产。丁酸盐的生产在6-24小时内开始,48小时后处理组中产生的浓度高于空白组,因此表明Symprove对丁酸盐产生的刺激作用。供体B和C获得的丁酸盐浓度最高,分别产生比相应的空白组高10.9mM和12.6mM的丁酸盐。

[0284] 对于所有3种疾病情况,在孵育的前6小时内观察到乳酸盐产量大幅增加,随后从第6小时到第48小时乳酸盐浓度下降。这表明了以乳酸盐转化为丁酸盐和/或丙酸盐为特征的交叉喂养相互作用,观察到的这些SCFA的增加证实了这一点。

[0285] 3.2微生物群组成的变化

[0286] 在任何处理之前比较来自3个不同组的微生物群。16S数据显示:

[0287] 与帕金森病患者(平均7.7%)相比,肝硬化患者(平均35.0%)的放线菌相对丰度显著更高。这主要归因于双歧杆菌科的强代表性(平均为27.4%,而PD为2.5%)。

[0288] 与IBD患者(平均13.0%)相比,PD患者的拟杆菌门相对丰度(平均19.0%)显著更高。在科的层面上,这主要归因于绒毛杆菌科(Muribaculaceae),它仅存在于PD患者的肠道微生物群中。

[0289] 与其他两种疾病(IBD中69.0%和PD中70.3%)相比,肝硬化患者中厚壁菌门的相对丰度显著降低(42.5%)。在科的层面上,这主要归因于瘤胃球菌科(肝硬化患者中的平均丰度为9.5%,IBD患者为15.6%,帕金森病患者为24.2%)和毛螺菌科(肝硬化患者中的平均丰度为19.0%,IBD患者为40.3%,PD患者为32.8%)。

[0290] 与肝硬化患者(0.1%)相比,PD患者(0.4%)的疣微菌门相对丰度显著更高。在科的层面上,这些差异归因于阿克曼菌科(Akkermansiaceae)和紫红球菌科(Puniceicoccaceae)。

[0291] 肝硬化

[0292] Symprove产品中含有的两种益生菌物种OTU20(植物乳杆菌)和OTU21(鼠李糖乳杆菌)在供体D和E的管腔和粘膜环境中显著富集(图12),表明这些益生菌菌株能够在肝硬化患者的肠道微生物群存在的情况下很好地增殖。

[0293] 利用Symprove的处理始终导致三个测试供体的管腔和粘膜环境中的放线菌门富集。虽然富集主要是由于双歧杆菌科的刺激(图13),但负责的OTU在供体之间不同(表8)。发现在所有三个供体中,Symprove显著刺激了OTU5(长双歧杆菌)和OTU30(青春双歧杆菌)(图12)。

[0294] 该处理还极大地丰富了三个供体的管腔中的厚壁菌门种群。这种刺激作用在所有供体中均具有统计学意义,主要针对乳杆菌科和韦荣氏菌科(图13)。在粘膜环境中,毛螺菌科和乳杆菌科一直受到处理的刺激。OTU28(韦荣氏菌)在三个供体的管腔中持续富集;

OTU11和OTU12(均为梭菌XIVa)在三个供体的粘膜环境中持续富集(图12)。Symprove倾向于对粘膜环境中的变形菌门产生刺激作用,同时降低它们在管腔环境中的相对丰度。

[0295] 最后,无论供体如何,在用Symprove处理后,管腔和粘膜中的拟杆菌门的相对丰度都会降低。

[0296] 帕金森病

[0297] OTU20(植物乳杆菌)和OTU21(鼠李糖乳杆菌)都是Symprove产品的益生菌物种,在三个供体的管腔和粘膜环境中显著富集(图14)。除此之外,OTU22(屎肠球菌)(也是Symprove的一种益生菌)在供体I的管腔和粘膜环境中显著富集(图14),表明上述益生菌菌株能够在PD患者肠道微生物群存在的情况下很好地增殖。

[0298] 利用Symprove的处理始终导致三个测试供体的管腔和粘膜环境中的放线菌门富集。在所有情况下,效果都具有统计学意义。富集是由于双歧杆菌科的刺激(图15),更具体地说是OTU5的刺激,被确定为与长双歧杆菌密切相关(图14)。

[0299] 该处理强烈富集了三个供体的管腔中和供体G和H的粘膜环境中的厚壁菌门种群。在管腔中,刺激作用是针对三个供体中的真杆菌科、毛螺菌科、乳杆菌科、链球菌科和

[0300] 韦荣氏菌科(图15)。在粘膜环境中观察到丹毒丝菌科、毛螺菌科和韦荣氏菌科的最强富集,但观察到个体间差异(图15)。OTU11、OTU12(均为梭菌XIVa)、OTU7(小韦荣氏菌/殊异韦荣氏菌(*Veillonella parvula/dispar*))在三个供体的管腔和粘膜环境中显著富集(图14)。

[0301] 如上所述,一个细菌种群的相对丰度下降可能是由于另一个细菌种群的生长;在这种特定情况下,例如厚壁菌门、放线菌门和变形菌门。

[0302] IBD

[0303] Symprove产品中含有的两种益生菌物种OTU20(植物乳杆菌)和OTU21(鼠李糖乳杆菌)在三个供体的管腔和粘膜环境中显著富集(图16),表明这些益生菌菌株能够在IBD患者肠道微生物群存在的情况下很好地增殖。

[0304] Symprove处理持续增加了三个受试供体的腔内放线菌水平。在科的层面上,富集主要是由于双歧杆菌科(图17)。该细菌科的OTU在所有三个供体中都没有显著富集(图16),说明对特定细菌群刺激方面的治疗反应是供体依赖性的。例如,OTU5(长双歧杆菌)在供体C中显著富集,而在供体B中,OTU56(假长双歧杆菌(*B.pseudolongum*))负责观察到的刺激。

[0305] 此外,Symprove处理持续刺激了三个供体粘膜中的厚壁菌门种群。富集是针对毛螺菌科,在较小程度上用于乳杆菌科、链球菌科和韦荣氏菌科(图17)。在管腔中,只有乳酸杆菌科在三个供体中显著富集。罗氏菌属(*Roseburia*)物种(供体A/B的OTU13和供体C的OUT44)在三个供体的粘膜层中显著富集(图16)。

[0306] Symprove倾向于在三个供体的粘膜环境中对变形菌门具有温和的刺激作用,同时降低它们在管腔环境中的相对丰度。刺激作用主要是由于供体A和B中的肠杆菌科和供体B和C中的伯克霍尔德菌科(*Burkholderiaceae*)(图17)。管腔环境中的降低作用主要针对供体C中的伯克霍尔德菌科(OTU52,人屎副萨特氏菌(*Parasutterella excrementihominis*))和供体A和B中的肠杆菌科(OTU1,大肠杆菌)(图17)。

[0307] 3.3 Caco-2/THP1-blue™共培养

[0308] 肝硬化

[0309] Symprove处理后所有肝硬化供体的结肠样品与其对照相比显著增加了共培养物的TEER,而与实验对照CM相比,对照样品的TEER甚至略有下降(图18)。因此可以得出结论,肝硬化患者的Symprove结肠批次处理样品对肠上皮屏障功能和完整性具有显著的积极作用。

[0310] 在评估LPS刺激后的炎症反应时,与对照相比,Symprove处理后的肝硬化结肠样品促进了更多的抗炎/耐受性反应。

[0311] 与LPS+对照和与它们自己的对照相比,治疗结肠肝硬化批次样品增加了NF- κ B活性(图19)。当取所有供体的平均值时,发现这些差异是显著的。

[0312] 关于抗炎细胞因子IL-6和IL-10的分泌,来自所有供体的Symprove处理样品与其对照相比增加了IL-6和IL-10水平(图20)。

[0313] 总之,使用Symprove处理导致来自肝硬化供体的结肠样品增加了NF- κ B活性和伴随的抗炎细胞因子IL-6和IL-10的分泌,表明Symprove处理后的抗炎/致耐受性肠道表型。

[0314] 与对照相比,Symprove处理样品中的平均TNFa和CXCL10反应升高,尽管这没有统计学意义。

[0315] 关于IL-8和MCP-1的分泌,与LPS+对照相比,除了一个肝硬化批次样品外,所有样品的分泌均减少,所有Symprove处理样品与其各自的对照相比均减少了IL-8和MCP-1的分泌(图21)。

[0316] 总之,用Symprove处理导致来自肝硬化供体的结肠样品减少了IL-8和MCP-1的分泌,表明Symprove处理后的抗炎/致耐受性肠道表型。

[0317] 帕金森病

[0318] 来自帕金森病患者的对照批次样品的TEER与实验对照CM相比有所降低,而在用Symprove处理后,与它们的对照相比,在所有三个测试的供体中TEER显著增加(图22)。这表明Symprove对帕金森病供体的结肠批次样品中炎症诱导的肠上皮屏障通透性具有显著的保护作用。

[0319] 与LPS+样品和批次对照样品相比,所有帕金森病供体的Symprove处理样品都增加了NF- κ B活性,而对照样品将NF- κ B活性保持在LPS+对照水平(图23)。与批次对照相比,平均增加的NF- κ B活性具有统计学意义。

[0320] 与LPS+对照相比,所有经过Symprove处理的批次样品都增加了抗炎细胞因子IL-6和IL-10的分泌(图24)。此外,对于所有供体,发现增加的IL-6和IL-10分泌与其对照相比存在显著差异。

[0321] 因此,对于所有帕金森病供体,与未治疗的对照相比,经过Symprove处理的结肠批次样品增加了NF- κ B活性和抗炎细胞因子IL-6和IL-10的伴随分泌,表明这些经过治疗的样品中的抗炎/致耐受性肠道表型。

[0322] TNFa反应因供体而异,没有观察到显著的平均反应。对于所有供体,与他们的对照相比,使用Symprove的治疗显著增加了CXCL10水平,从而达到了与LPS+对照相同的水平(图25)。

[0323] 与LPS+对照相比,所有Symprove处理帕金森病批次样品均降低了IL-8水平(图25)。对于所有供体,与他们各自的对照相比,用Symprove处理后IL-8水平趋于降低。

[0324] 最后,与LPS+对照相比,所有帕金森病批次样品都降低了MCP-1水平(图25)。此外,

与对照相比,经过治疗的样品降低了MCP-1水平。发现这种效果与对照样品中的反应显著不同。

[0325] 因此,对于所有帕金森病供体,Symprove处理的结肠批次样品减少了趋化因子IL-8和MCP-1的分泌,而CXCL10的分泌增加。

[0326] IBD

[0327] 与实验对照CM相比,向细胞中添加对照结肠批次样品不影响TEER(图26)。相比之下,与对照相比,用Symprove处理的样品在所有三个IBD供体中都增加了TEER。因此,对于所有IBD供体,用Symprove处理的结肠批次样品对炎症诱导的肠上皮屏障通透性具有温和的保护作用。

[0328] 与LPS+对照相比,所有结肠批次处理样品都增加了NF- κ B活性,而对照样品不影响LPS诱导的NF- κ B活性(图27)。此外,与各自的对照相比,使用Symprove的治疗增加了所有供体的NF- κ B活性。

[0329] 关于抗炎细胞因子IL-6和IL-10的分泌,与LPS+对照相比,所有处理样品都增加了IL-6和IL-10的分泌,而对照样品则没有增加(图28)。此外,对于所有供体,与对照相比,在用Symprove处理后观察到IL-6和IL-10水平增加。

[0330] 总之,在所有三个IBD供体中,用Symprove处理增加了NF- κ B活性和抗炎细胞因子IL-6和IL-10的伴随分泌。

[0331] 与LPS+对照相比,所有对照IBD批次样品均增加了LPS诱导的促炎细胞因子TNF- α 的分泌,而与它们各自的对照样品和/或LPS+对照相比,所有处理样品均降低了TNF- α 水平(图29)。

[0332] 关于趋化因子CXCL10、IL-8和MCP-1的分泌,与LPS+对照相比,在用所有IBD批次样品处理后观察到LPS诱导的CXCL10水平降低(图29)。然而,当查看

[0333] 所有IBD供体的平均值时,在CXCL10分泌方面,对照组和处理组之间没有观察到显著差异。

[0334] 与LPS+和批次样品对照相比,所有Symprove处理样品都能够降低IL-8水平(图29)。此外,在Symprove处理后,IL-8分泌的减少在对照和治疗IBD批次样品之间存在显著差异。最后,与LPS+对照相比,所有IBD批次样品都降低了MCP-1水平(图29)。

[0335] 总之,与它们的对照IBD批次样品相比,用Symprove处理降低了促炎细胞因子TNF- α 和趋化因子IL-8和MCP-1的分泌。

[0336] 3.4伤口愈合测定

[0337] 肝硬化

[0338] 在用对照肝硬化样品处理24小时后,供体D和E的伤口面积大于CM对照,而供体F的表现与CM相似(图30和图31)。在使用Symprove处理样品进行刺激后,对于所有供体,与对照组相比,伤口面积显著减少。

[0339] 帕金森病

[0340] 与CM对照及其各自的批次对照样品相比,测试的两个帕金森病供体的Symprove处理样品减少了伤口面积,而对照样品的伤口面积与CM对照相似(图32和图33)。

[0341] IBD

[0342] 孵育24小时后,结肠批次对照样品的伤口面积与阴性CM对照相当。相比之下,所有

供体的结肠IBD批次Symprove处理样品的刺激与对照相比显著减少了伤口面积,其中对供体C观察到的影响最大。

[0343] 因此,对于所有疾病状况,使用Symprove处理可促进肠上皮屏障损伤模型中的伤口修复。

[0344] 4. 结论

[0345] 这些数据表明,尽管代表不同疾病的微生物群的生态失调状态不同,但Symprove在不同患者组之间产生了一致的治疗效果。

[0346] Symprove的施用导致乙酸盐产量增加、丙酸盐产量增加和丁酸盐产量增加。这种向SCFA生产的转变表明更健康的肠道似乎不是由Symprove中存在的益生菌的短暂通过驱动的。相反,益生菌被整合到肠道的管腔和粘膜隔室中,并且微生物群的相应再平衡解决了治疗前存在的生态失调问题,并促进了SCFA的生产,这表明肠道更健康。

[0347] 在肠道上皮的Caco-2/THP1-blueTM共培养模型中,显示Symprove的施用也能够改变肠道免疫细胞的免疫反应状态。特别是,用Symprove处理的提取物进行处理的细胞表现出更高的致耐受性或抗炎表型。表现出这种表型的细胞通过产生更多的抗炎细胞因子(如IL-6和IL-10)以及较低水平的促炎细胞因子(如IL-8)和趋化因子(如MCP-1)来响应LPS刺激。Symprove诱导的这种致耐受性或抗炎表型在来自健康供体以及患有肝硬化、帕金森病或IBD的供体的样品中很明显。

[0348] 在IBD患者中,当来自对照患者的结肠样品具有显著的促炎作用时,还证明Symprove减少了TNF α 的产生。这进一步证明了Symprove的抗炎作用,因为它明显抵消了未经治疗的IBD患者肠道中存在的一般促炎环境。对于肝硬化样本,没有观察到对TNF α 水平的显著影响,这可能是因为来自这些患者的对照样品不具有足以诱导高水平TNF α 产生的相同的一般促炎作用。

[0349] 实施例3

[0350] 实施例2表明帕金森病患者表现出胃肠道生态失调,因为他们的肠道微生物群与健康供体不同。据推测,胃肠道生态失调可能导致帕金森病的病理学。具体来说,被破坏的微生物群可能导致炎症和/或由炎症引起,炎症本身会导致肠道通透性增加(‘肠道渗漏’)。肠道通透性的增加可能导致错误折叠的 α -突触核蛋白的表达和聚集的增加,所述 α -突触核蛋白是帕金森病特有的蛋白质聚集体。然后, α -突触核蛋白可以通过迷走神经传输到大脑,迷走神经是肠-脑轴的导管。此外,继发于肠道微生物群改变的慢性肠道炎症也可能导致全身炎症和血脑屏障改变,从而导致大脑炎症,这是帕金森病的已知病理生理事件。

[0351] 实施例2表明,施用Symprove能够调节肠道细菌门的生长,并且还可以促进帕金森病患者肠道中SCFA的产生。此外,在使用Symprove处理后,帕金森病患者的胃肠道环境表现出改善的SCFA产生、改善的肠道完整性和减少的炎症环境。

[0352] 因此,不希望受理论束缚,假设Symprove可以治疗帕金森病,例如通过以下一项或多项或全部:促进肠道健康、刺激肠道SCFA产生、治疗肠道生态失调、促进肠道屏障完整性和/或促进致耐受性肠道表型。这样做有望限制聚集的错误折叠 α -突触核蛋白的形成,并限制任何此类聚集体向大脑的运输。

[0353] 因此,Symprove提供了一种治疗帕金森病的方法,其可以减缓神经或运动症状的发展。此外,众所周知,帕金森病患者的肠道活动受到干扰,例如便秘。因此,本文证明的

Symprove对肠道健康的有益作用也将能够缓解帕金森病的这些非运动症状。

[0354] 个别案例研究的报告表明,在一段时间内摄入Symprove后,帕金森病的运动和非运动方面有所改善。

[0355] 以下I期临床试验进一步证明了Symprove对帕金森病的治疗:

[0356] 主要假设

[0357] 该研究将在患有便秘的帕金森病患者 (PwP) 中检验以下假设。

[0358] PwP的口服Symprove摄入与安慰剂摄入相比将导致:

[0359] 1.改善运动和非运动状态,特别关注胃肠道症状;

[0360] 2.改善非运动症状 (NMS) 的总体负担;

[0361] 3.对一系列全身炎症标志物的全身抗炎有益作用;

[0362] 4.生活质量的提高。

[0363] 调查计划

[0364] 研究计划

[0365] 该研究是一项双盲、安慰剂对照研究。参与者将在进入两个处理组之一时被随机分配:

[0366] a) ‘常规治疗 (UT)+安慰剂’ 或

[0367] b) ‘UT+Symprove’

[0368] UT将由在研究持续期间 (3个月) 剂量稳定的药物组成。此外,参与者将保持饮食和身体活动稳定。

[0369] 研究参与者

[0370] N=60名帕金森病患者将被招募到研究中,每个处理组分配n=30。

[0371] 资格标准

[0372] a) 包括:

[0373] • 18岁及以上

[0374] • 根据运动障碍协会临床标准和英国PD脑库标准诊断出帕金森病 (PD)

[0375] • Hoehn Yarhr分期 $32 \geq 2$ 且 ≤ 4

[0376] • 根据罗马IV标准诊断出功能性便秘且每周排便少于3次。

[0377] b) 排除:

[0378] • 诊断出或怀疑帕金森病的原因

[0379] • 晚期治疗 (深部脑刺激、持续左旋多巴十二指肠输注和阿扑吗啡皮下输注)

[0380] • 任何炎症性肠病 (克罗恩病和溃疡性结肠炎) 或结肠疾病

[0381] • 以前有过胃肠道手术

[0382] • 泻药滥用史

[0383] • 持续的人工营养 (肠内或肠外)

[0384] • 经常使用益生菌 (不包括经常喝酸奶)

[0385] • 以前对益生菌的不耐受和/或不良反应

[0386] • 以前使用过Symprove

[0387] • 最近或当前在使用任何抗生素 (研究开始前4周内)

[0388] • 干扰液体的安全摄入的吞咽问题

- [0389] • 怀孕或哺乳
- [0390] • 重大全身性疾病(如心力衰竭、肾衰竭、肝硬化、癌症等)
- [0391] • 任何干扰提供知情同意书的情况
- [0392] • 参加另一项同时进行的研究性试验
- [0393] 盲随机化将是双盲的,并且是1:1的(计算机生成的块随机化将由不直接参与研究的工作人员进行)。
- [0394] 剂量
- [0395] 将施用每日剂量的Symprove口服溶液(70ml)以用于积极治疗条件和匹配的安慰剂,为期三个月。后者在外观和味道上是类似的液体,将由益生菌制造商提供。在之前的研究中发现这种剂量的Symprove是安全且耐受性良好的。
- [0396] 评估
- [0397] 评估将包括:
- [0398] 1. 人口统计学和临床特征
- [0399] 人口统计信息和临床特征将包括出生日期、性别、评估年龄、PD发病年龄、患病持续时间、Hoehn和Yahr分期(PD运动分期)、用药方案(包括泻药)、“开启”状态的时间(PD药物摄入后充分控制PD症状所必需的时间)、社会人口统计数据 and 排便习惯。
- [0400] 2. 每日大便日记
- [0401] 将要求符合条件的患者在治疗的最后2周内完成基线时的2周大便日记。
- [0402] 每日大便日记将包括记录排便频率并使用Bristol大便量表描述大便的稠度和其他相关症状。
- [0403] 3. 营养和身体活动评估
- [0404] 将在基线和治疗后评估时完成营养和身体活动形式表。
- [0405] 4. 验证问卷和量表
- [0406] a) 运动障碍协会统一帕金森病评定量表(MDS-UPDRS)第III和IV部分(ON)
- [0407] MDS-UPDRS有四个部分:第一部分(日常生活的非运动体验),有六个基于评估者的项目和七个用于自我评估的项目;第二部分(日常生活的运动体验),包括13个基于患者的项目;第三部分(运动考试),18个项目,33分,由于左、右和其他身体分布;第四部分(运动并发症),有六个项目。每个问题都有五个与普遍接受的临床术语相关的回答:0=正常;1=轻微,2=适度,3=中度,4=严重。每个部分的总分由对应项目分数的总和得到。
- [0408] b) 非运动症状量表(NMSS)
- [0409] NMSS由30个项目组成,分为9个领域:心血管(2个项目)、睡眠/疲劳(4个项目)、情绪/认知(6个项目)、知觉问题/幻觉(3个项目)、性功能(2个项目)和杂项(4项)。每个项目的分数是严重程度(从0到3)和频率分数(从1到4)的倍数。总分从0到360。
- [0410] c) 蒙特利尔认知评估(MoCA)
- [0411] MoCA是一种广泛使用的用于检测认知障碍的筛查评估。它由12个项目组成,最高分为30分,分数越高表示表现越好。
- [0412] d) 帕金森病严重程度指数的临床印象(CISI-PD)
- [0413] CISI-PD是由四个项目(运动体征、残疾、运动并发症和认知状态)组成的严重性指数,评分为0(完全没有)到6(非常严重或严重残疾)。总分是通过对项目分数求和来计算的。

[0414] e) 国王帕金森病疼痛量表 (KPPS)

[0415] KPPS是第一个也是唯一一个对PD中不同类型疼痛进行识别和分级的量表:肌肉骨骼疼痛、慢性疼痛、波动相关疼痛、夜间疼痛、口面部疼痛、水肿相关疼痛和神经根性疼痛。

[0416] f) 肠易激综合征严重程度评分 (IBSSS)

[0417] IBSSS是一种肠易激综合征评分系统,包括疼痛、膨胀、肠功能障碍和生活质量/整体安康。最高可达到的分数为500(每个项目分数的总和)。

[0418] g) 帕金森病睡眠量表2 (PDSS-2)

[0419] PDSS-2是原始15项PDSS的最新验证和更新版本。这是一份由15个关于各种睡眠和夜间障碍的项目组成的自评问卷,由患者使用从0(从不)到4(非常频繁)的五个类别之一进行评分。PDSS-2总分范围从0(无干扰)到60(最大夜间干扰)。

[0420] h) 帕金森病问卷-8 (PDQ-8)

[0421] PDQ-8是评估PD患者的健康相关生活质量的专用工具。它包括8个项目,每个项目从0到4评分。PDQ-8总结指数表示为每个项目得分总和在最大可能量表得分上的百分比。

[0422] i) 医院焦虑和抑郁量表 (HADS)

[0423] HADS是一种用于检测抑郁和焦虑状态的自我评估量表。它由两个分量表形成:焦虑和抑郁,每个分量表都有七个项目,从0(最不严重)到3(更严重)评分。根据每个项目分数的总和计算每个分量表的子分数。

[0424] j) 帕金森疲劳量表-16 (PFS-16)

[0425] PFS是一个16项患者评分量表,用于评估疲劳的身体方面及其对PD患者日常功能的影响。项目响应选项的范围是从一(‘非常不同意’)到五(‘非常同意’)。总分是基于每个项目得分的总和。

[0426] k) 患者对变化的整体印象 (PGIC)

[0427] PGIC是一种自我评分的7点评估工具,用于评估整体治疗经验。

[0428] 5. 帕金森的KinetiGraph (PKG) 客观记录

[0429] 将使用为期7天的帕金森的KinetiGraph (PKG) 监测进行客观记录。PKG是一种佩戴在患者受影响最严重一侧手腕上的可穿戴设备。PKG报告包括几个分数和度量,如下所示:

[0430]	得分	图表和汇总表
	运动迟缓得分 (BKS)	运动迟缓和运动障碍的每日汇总图和严重性百分比汇总
	运动障碍得分 (DKS)	脱下手腕汇总
	波动得分 (FDS)	静止不动汇总
	静止不动时间百分比 (PTI)	震颤汇总
	震颤时间百分比 (PTT)	按下按钮

[0431] 6. 智能腰带客观记录

[0432] 智能腰带是一种可穿戴传感器,旨在记录消化过程中的排便情况。该系统将在用餐期间以简单舒适的方式放置在参与者的腹部周围。

[0433] 7. 外周炎症标志物的实验室检查

[0434] 将在基线和治疗后评估时收集血样,以评估外周炎症标志物。

- [0435] 8.肠道微生物组分析
- [0436] 参与者将在家中收集粪便样品,并在基线时和治疗后将其送去进行分析。
- [0437] 评估将在基线和治疗结束时进行(3个月+/-1周)。
- [0438] 结果度量
- [0439] 所有结果将作为从基线到3个月治疗结束(Symprove/安慰剂)的变化来衡量。
- [0440] 主要结果
- [0441] 在以下方面的变化:
- [0442] -每周排便次数(BM)
- [0443] -NMSS总分。
- [0444] 次要结果
- [0445] 在以下方面的变化:
- [0446] -每周泻药次数
- [0447] -IBSSS
- [0448] -MDS-UPDRS第III和IV部分(ON)
- [0449] -‘开启’状态的时间
- [0450] -CISPD
- [0451] -PGIC
- [0452] -PDQ-8
- [0453] -PDSS 2
- [0454] -PFS-16
- [0455] -HADS
- [0456] -MoCA
- [0457] -KPPS
- [0458] -外周炎症标志物水平
- [0459] -可穿戴传感器记录分数(PKG,智能腰带分数)
- [0460] -肠道微生物组的变化
- [0461] 与治疗前相比,接受Symprove的患者将在一项或多项主要和/或次要结果方面表现出改善。

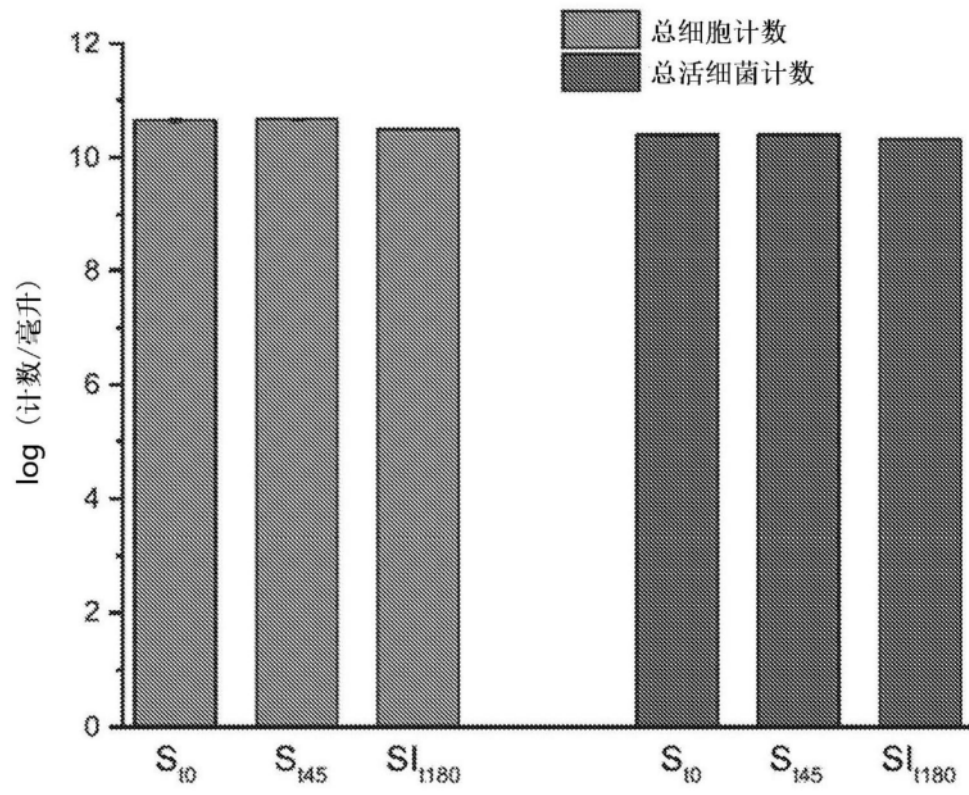


图1

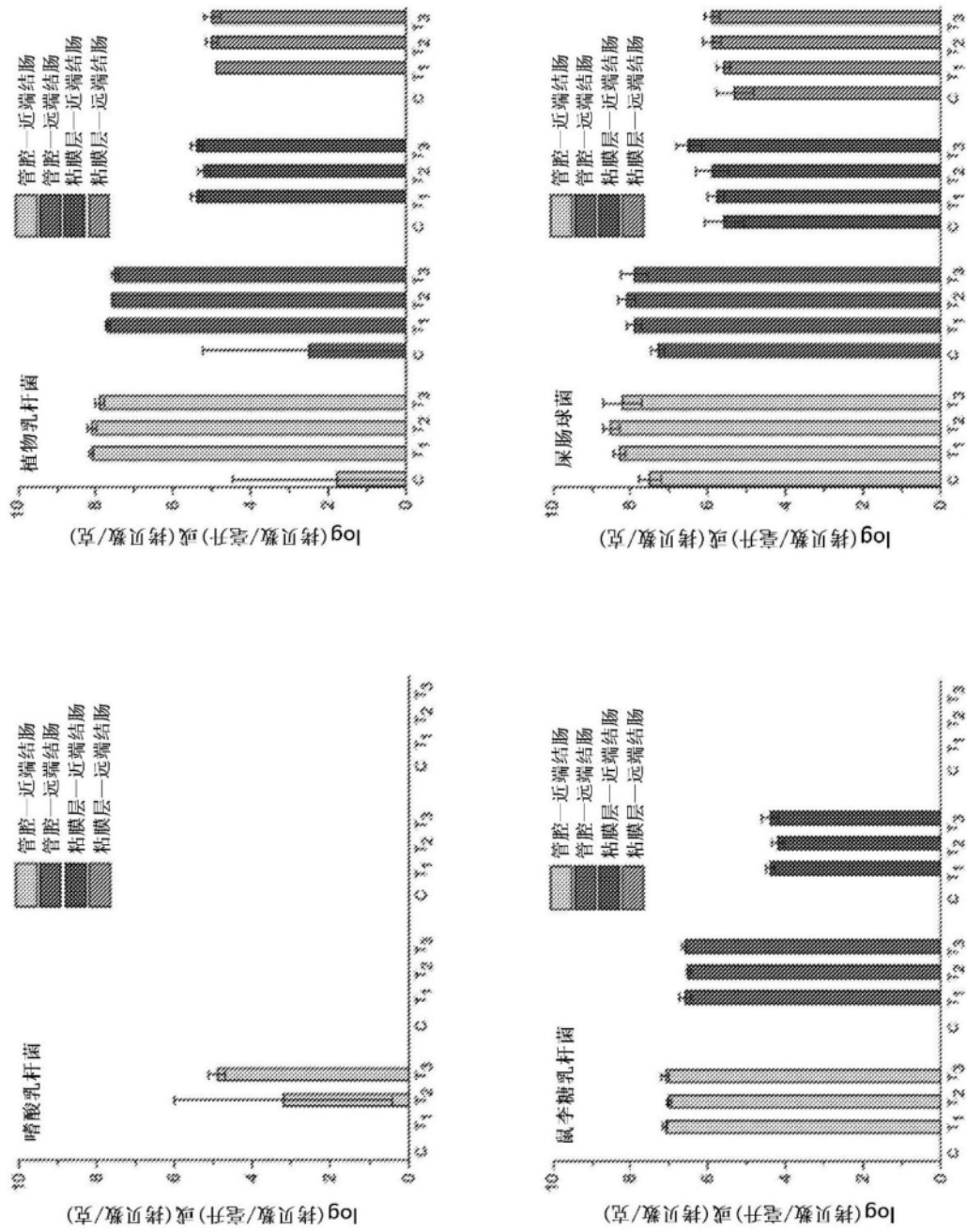


图2

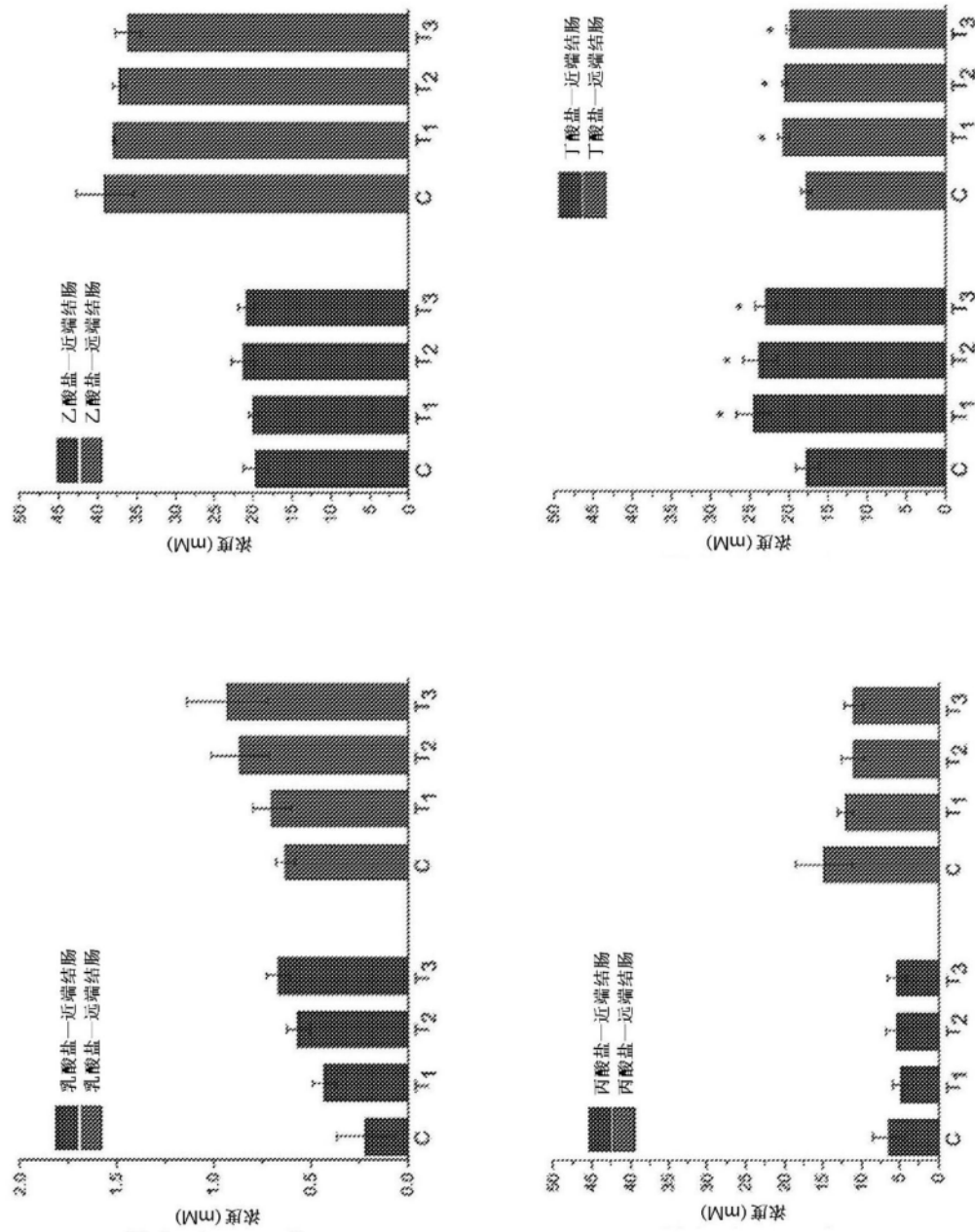


图3

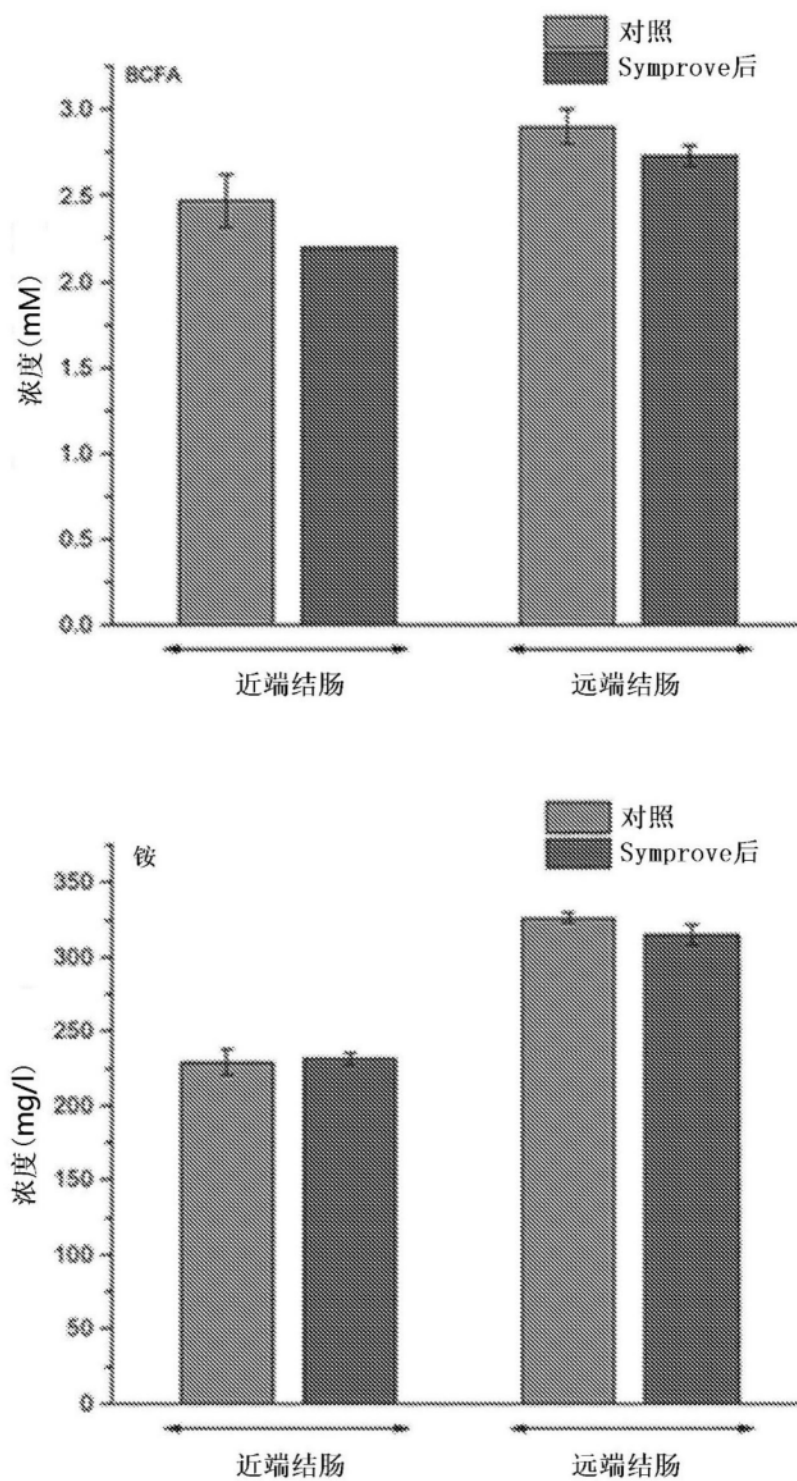


图4

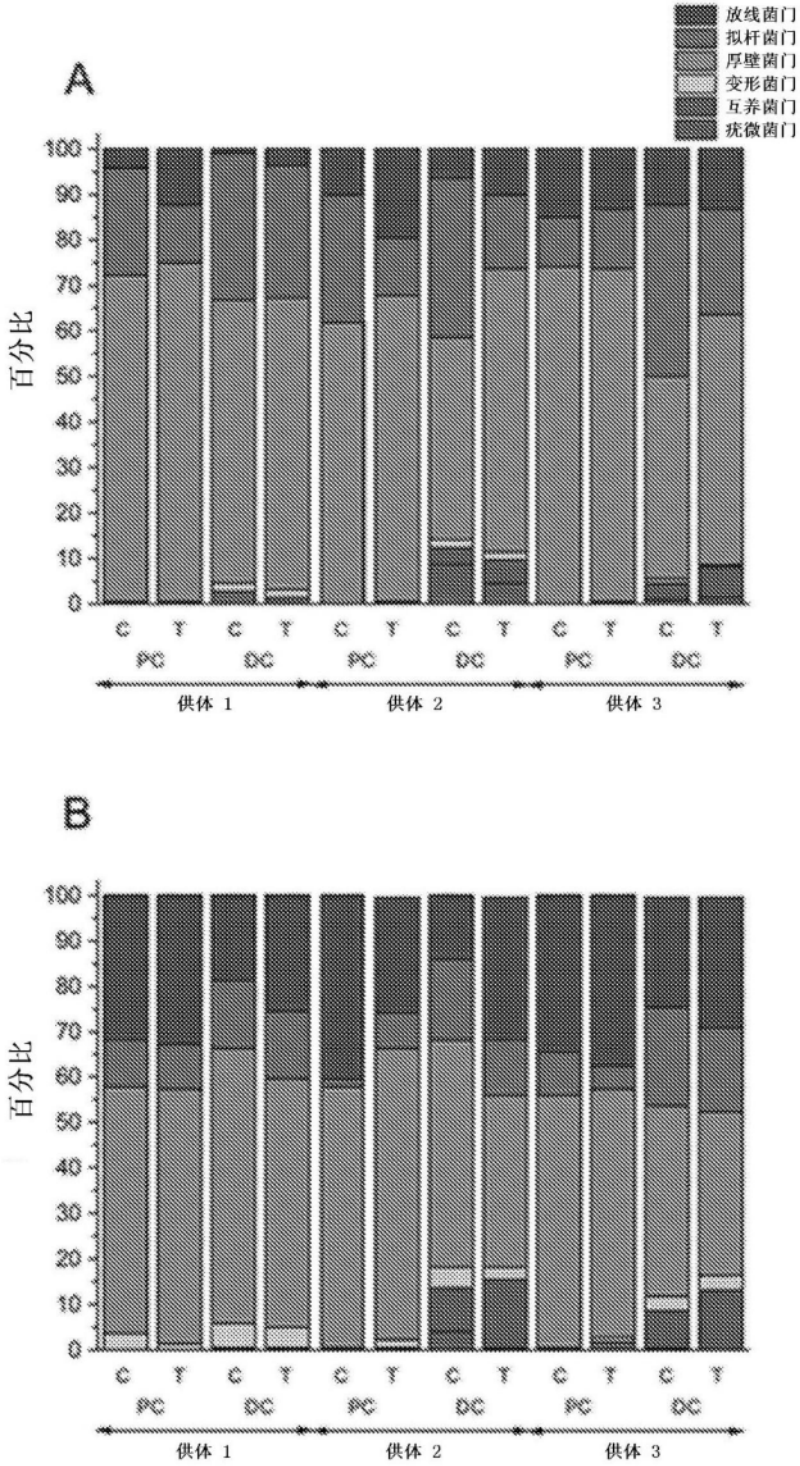


图5

门	科	肠腔室											
		供体 A				供体 B				供体 C			
		近端结肠		远端结肠		近端结肠		远端结肠		近端结肠		远端结肠	
		C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR
放线菌门	双歧杆菌科	3.0	10.3	0.6	2.7	8.9	19.0	5.6	9.2	14.3	12.2	11.6	12.3
	红螺菌科	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
	埃格特菌科	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	微杆菌科	0.8	1.5	0.2	0.9	0.8	0.2	0.5	0.4	0.6	0.4	0.5	0.5
拟杆菌门	拟杆菌科	23.2	12.5	31.0	28.0	28.3	12.5	32.2	14.9	11.0	12.8	31.6	20.4
	巴恩斯氏菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Marinifilaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	普雷茨氏菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5
	理研菌科	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	0.3	0.4
	坦纳菌科	0.6	0.5	0.9	0.9	0.0	0.5	2.2	1.5	0.0	0.6	5.7	1.9
	氨基醌球菌科	3.4	3.4	8.6	6.2	2.3	3.7	3.7	5.0	2.6	4.9	3.5	3.1
厚壁菌门	梭菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	肠球菌科	2.0	9.5	0.4	2.7	3.3	2.6	0.6	1.8	0.6	1.3	0.2	0.8
	丹毒丝菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
	毛螺菌科	8.2	11.4	21.5	24.8	9.6	6.0	15.0	16.3	3.8	4.8	18.7	13.0
	乳杆菌科	0.0	0.9	0.0	0.5	0.0	0.7	0.0	0.5	0.0	0.7	0.0	0.5
	类芽孢杆菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	瘤胃球菌科	0.0	0.1	1.0	2.0	0.0	0.3	0.4	1.2	0.0	0.1	0.3	2.7
	链球菌科	0.0	1.3	0.0	1.2	0.0	0.5	0.0	0.8	0.0	0.5	0.0	0.6
	韦荣氏菌科	58.3	48.1	30.9	26.5	46.5	53.3	24.8	36.2	67.0	61.0	21.8	34.1
	伯克霍尔德菌科	0.0	0.1	0.1	0.3	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1
变形菌门	脱硫弧菌科	0.2	0.2	0.8	0.4	0.0	0.0	0.4	0.5	0.0	0.0	0.5	0.2
	肠杆菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	假单胞菌科	0.0	0.0	0.3	0.4	0.0	0.0	0.4	0.5	0.0	0.0	0.2	0.3
	未培养	0.0	0.0	0.3	0.4	0.0	0.2	0.8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1
	黄单胞菌科	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
	互养菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	5.3	0.0	0.3	3.8	6.8
疣微菌门	阿克曼菌科	0.0	0.0	3.0	1.6	0.0	0.0	8.9	4.5	0.0	0.0	0.8	1.3

图6

门	科	粘膜层						供体 B						供体 C					
		供体 A			远端结肠			近端结肠			远端结肠			近端结肠			远端结肠		
		C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR	C	TR
放线菌门	双歧杆菌科	31.0	31.1	17.2	21.8	36.1	23.3	12.4	30.1	33.8	35.6	22.1	1.1	1.7	26.4				
	红螺菌科	0.3	0.2	0.3	1.9	1.2	1.1	1.3	1.1	0.3	1.0	1.1	1.1	1.7					
	埃格特菌科	0.0	0.0	0.8	0.4	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.7	0.2						
	微杆菌科	0.6	1.3	0.4	1.2	3.1	1.4	0.2	0.5	0.4	1.1	0.2	0.4						
	拟杆菌科	8.4	8.1	11.7	10.8	2.0	6.1	11.7	8.6	9.6	4.3	18.5	13.2						
拟杆菌门	巴恩斯氏菌科	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2						
	Marinifilaceae	0.0	0.0	0.4	0.3	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.3	0.4						
	普雷沃氏菌科	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0						
	理研菌科	0.0	0.0	1.1	1.7	0.0	0.1	2.1	1.2	0.0	0.0	1.0	2.0						
	坦纳菌科	1.9	1.9	1.5	2.2	0.0	1.2	3.5	2.3	0.0	0.6	2.1	2.6						
厚壁菌门	氨基醯球菌科	8.6	6.4	10.4	11.8	6.6	7.4	8.8	5.0	6.0	3.9	9.6	5.5						
	梭菌科	0.1	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	0.5	1.3	0.0	0.0	0.7	1.2						
	肠球菌科	2.3	9.9	4.9	4.5	6.2	4.3	2.6	2.0	2.6	12.5	1.7	2.1						
	丹毒丝菌科	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.5	2.2	0.0	0.0	0.8	0.2						
	毛螺菌科	14.7	11.1	28.0	21.1	11.0	7.5	22.1	18.0	19.3	5.1	20.2	14.2						
变形菌门	乳杆菌科	0.0	0.2	0.0	0.6	0.0	0.2	0.0	0.4	0.0	0.2	0.0	0.5						
	类芽孢杆菌科	0.0	0.1	0.0	2.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
	瘤胃球菌科	0.1	0.2	5.1	3.4	0.0	1.0	2.7	2.7	0.0	1.5	3.9	3.7						
	链球菌科	0.0	0.2	0.0	1.1	0.0	0.2	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	0.3						
	韦荣氏菌科	28.5	27.6	10.4	8.6	33.5	43.2	12.0	5.1	27.2	31.3	4.1	8.1						
变形菌门	伯克霍尔德菌科	0.4	0.4	1.6	3.1	0.1	0.4	2.4	1.1	0.4	0.4	1.9	1.3						
	脱硫弧菌科	3.0	1.1	1.8	0.6	0.1	1.0	1.1	1.0	0.2	0.0	0.9	1.0						
	肠杆菌科	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2						
	假单胞菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
	未培养	0.0	0.0	1.8	0.5	0.0	0.3	1.1	0.5	0.0	0.0	0.4	0.4						
互养菌门	黄单胞菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1						
	互养菌科	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	9.4	15.2	0.0	2.0	8.1	13.3						
疣微菌门	阿克曼菌科	0.0	0.0	0.7	0.4	0.0	0.2	4.3	0.5	0.0	0.0	0.7	0.1						

图7

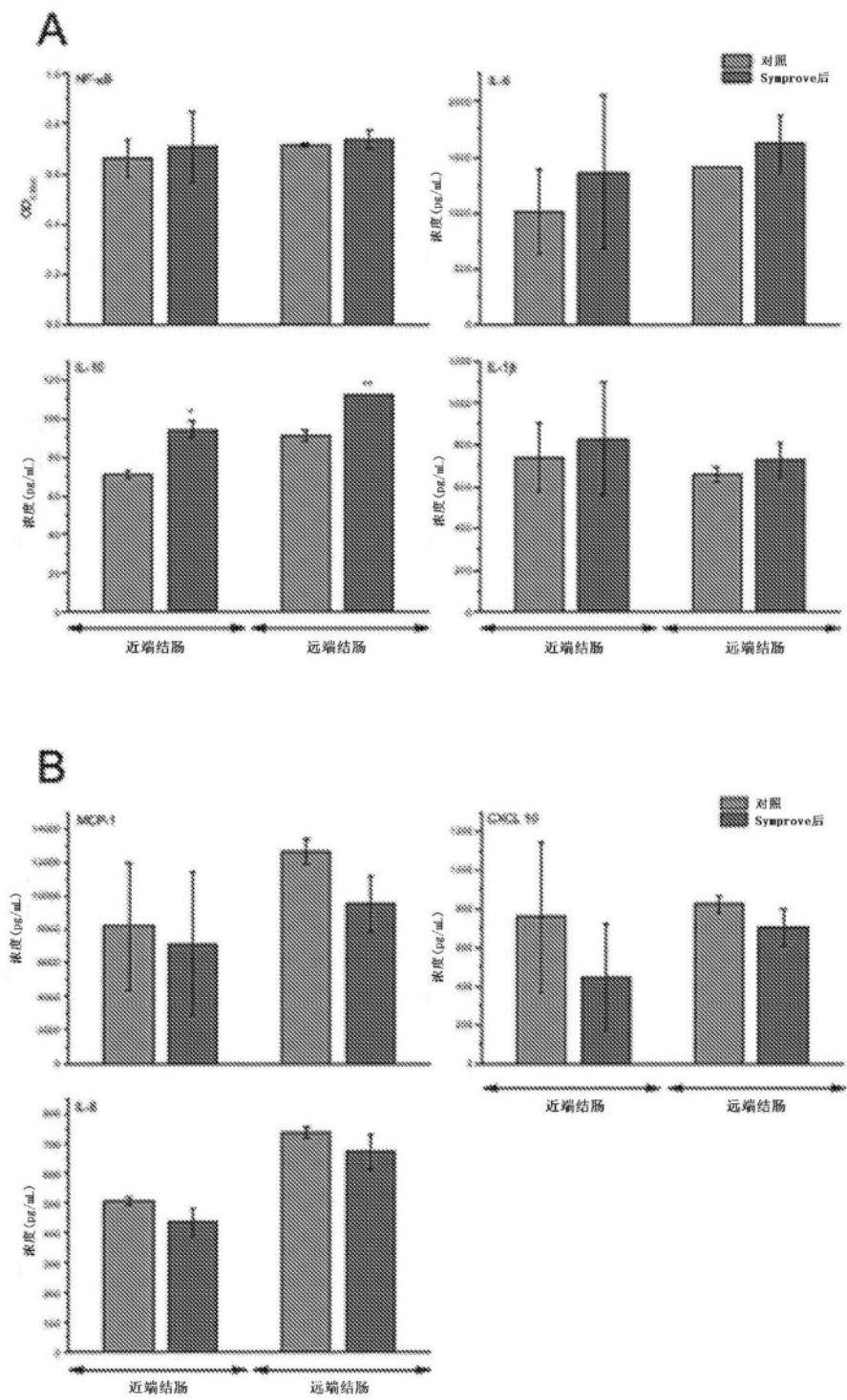


图8

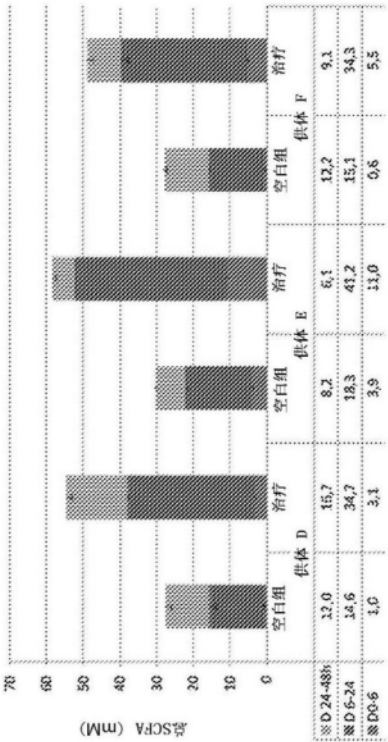


图9A

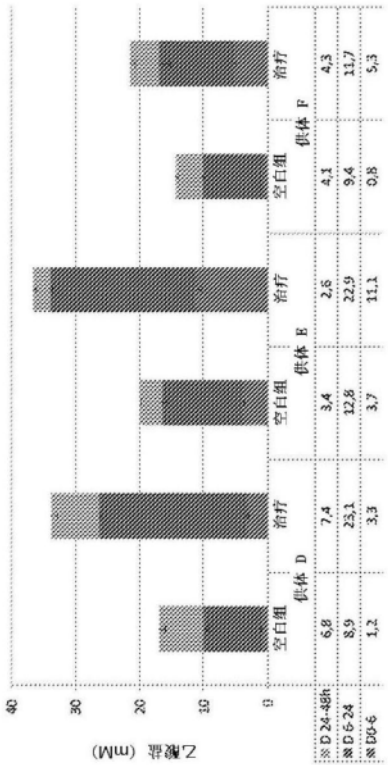


图9B

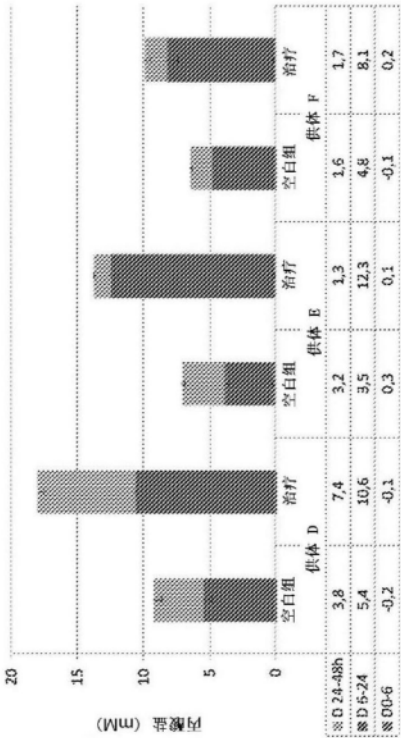


图9C

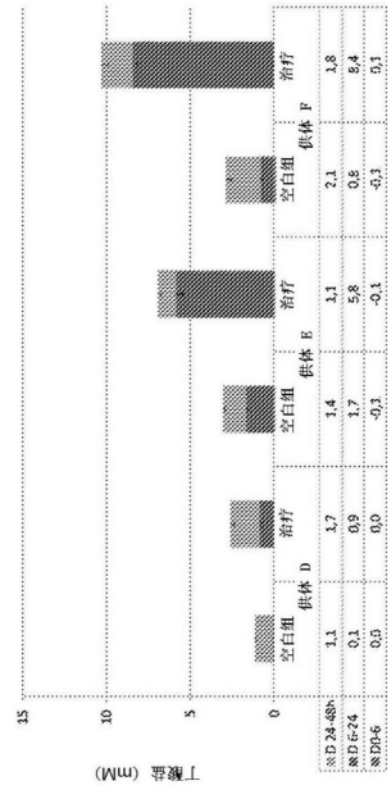


图9D

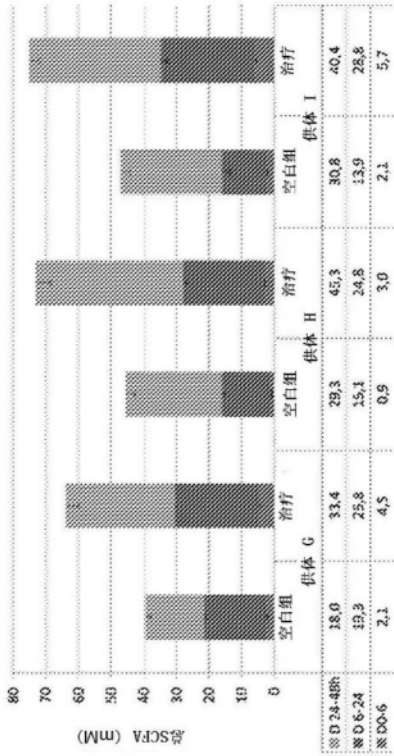


图10A

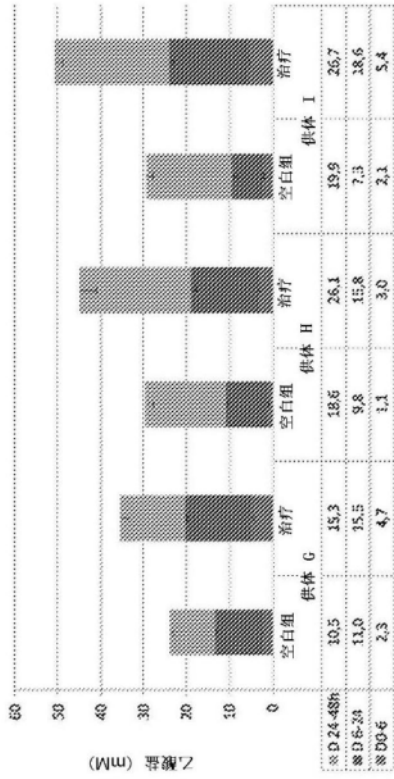


图10B

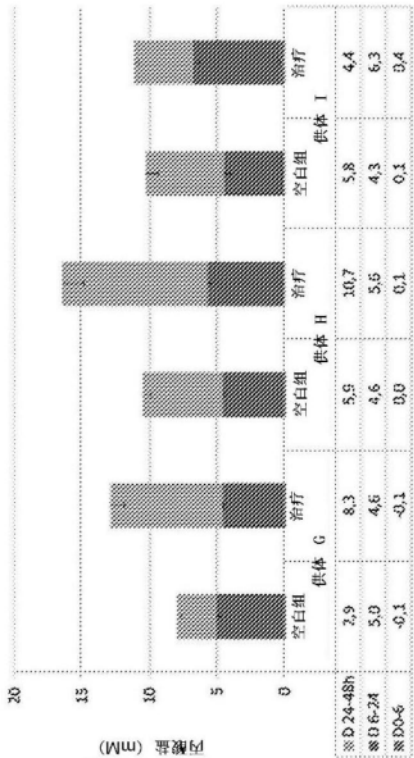


图10C

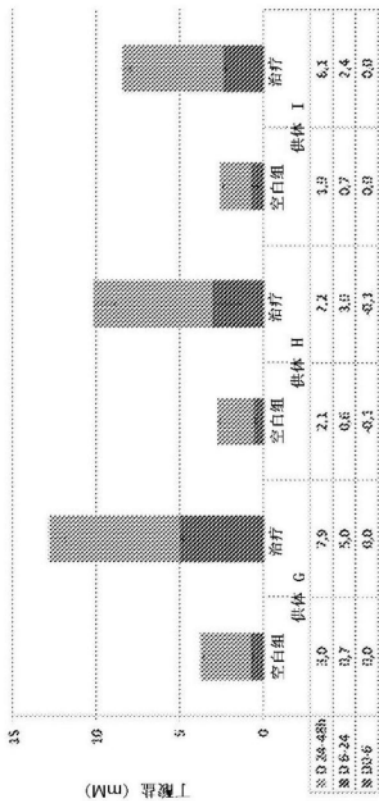


图10D

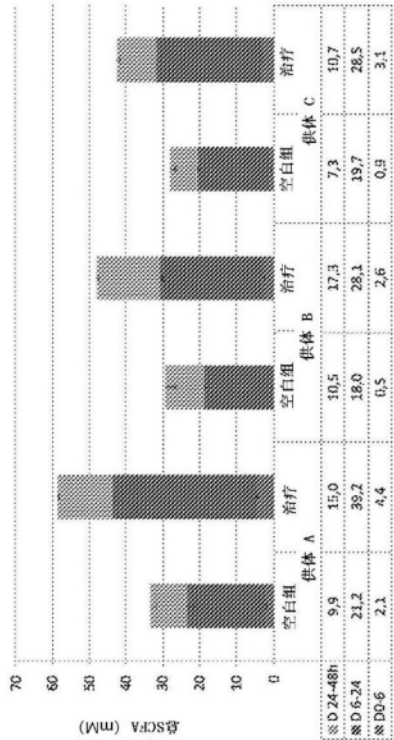


图11A

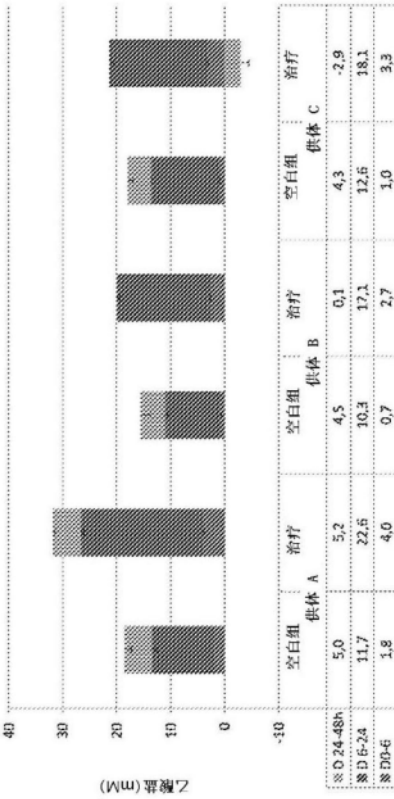


图11B

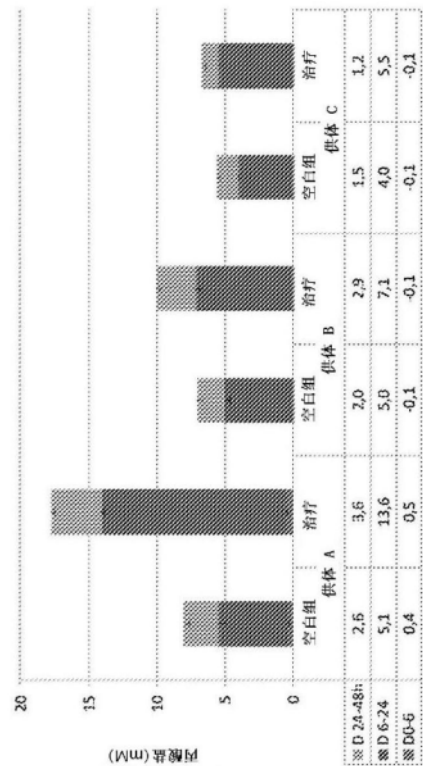


图11C

OTU	密切相关的属	密切相关的种	肝硬化					
			假胆			粘胆		
			供体 D	供体 E	供体 F	T 检验	供体 D	供体 E
1	埃希氏志贺氏菌属(100)	大肠杆菌	-0.5%	-12.5%	-10.9%	0.004	0.0%	3.3%
2	拟杆菌属(100)	脆弱拟杆菌	-0.1%	-9.9%	1.2%	0.155	-2.2%	-21.2%
3	拟杆菌属(100)	多形拟杆菌	-0.9%	0.0%	-6.3%	0.041	0.3%	0.0%
4	拟杆菌属(100)	多形拟杆菌	-1.5%	-2.5%	-3.3%	0.000	0.1%	0.0%
5	双歧杆菌属(100)	长双歧杆菌	0.4%	0.4%	1.1%	0.001	-0.4%	5.3%
6	阿克曼菌属(100)	嗜粘蛋白阿克曼菌	-6.2%	-1.0%	0.0%	0.045	-4.3%	0.0%
7	韦荣氏菌属(100)	小韦荣氏菌/殊异韦荣氏菌	18.0%	1.8%	-1.5%	0.082	12.9%	-0.4%
8	梭菌属(100)	第三梭菌	0.0%	-0.5%	-1.5%	0.033	0.2%	-16.9%
9	双歧杆菌属(100)	两歧双歧杆菌	0.0%	-0.2%	0.0%	0.134	0.0%	10.6%
10	拟杆菌属(100)	单形拟杆菌	1.1%	5.8%	-0.3%	0.061	-0.3%	0.3%
11	梭菌XIVa属(99)	不明	0.0%	0.0%	2.0%	0.088	3.1%	0.0%
12	梭菌XIVa属(100)	不明	-0.4%	-0.1%	-0.8%	0.026	2.7%	1.9%
15	双歧杆菌属(100)	假链状双歧杆菌	0.2%	3.7%	0.0%	0.056	0.0%	2.9%
16	柯林斯氏菌属(100)	产气柯林斯氏菌	0.0%	-0.1%	0.4%	0.138	0.1%	2.0%
17	乳球菌属(100)	格氏乳球菌	-5.8%	0.0%	0.0%	0.117	-3.4%	0.0%
18	梭菌XIVa属(100)	共生梭菌	-1.3%	-1.1%	-0.3%	0.021	-0.1%	0.0%
27	拟杆菌属(100)	多形拟杆菌	-4.1%	-0.9%	-0.1%	0.065	-2.4%	0.0%
28	韦荣氏菌属(100)	不明	0.0%	11.7%	2.6%	0.029	0.0%	0.4%
30	双歧杆菌属(100)	吉春双歧杆菌	1.0%	0.0%	4.3%	0.034	0.3%	0.0%
31	链球菌属(100)	巴氏链球菌/马氏链球菌/没食子酸链球菌	0.0%	0.0%	13.9%	0.087	0.1%	0.0%
33	副拟杆菌属(100)	粪副拟杆菌	0.0%	0.0%	-2.8%	0.104	-0.7%	0.0%
39	普雷沃菌属(100)	粪普雷沃菌	0.0%	0.0%	0.0%	0.110	0.0%	0.0%
40	霍尔德曼氏菌属(100)	双形霍尔德曼氏菌	0.0%	0.0%	2.8%	0.096	0.7%	0.0%
41	琥珀酸弧菌属(100)	溶糖精琥珀酸弧菌	0.0%	0.0%	0.0%	0.215	0.1%	0.0%
54	巨球菌属(100)	埃氏巨球菌	0.0%	0.1%	2.3%	0.147	0.0%	0.0%

图12

门	科	肝硬化							
		盲腔				粘膜			
		供体 D	供体 E	供体 F	T 检验	供体 D	供体 E	供体 F	T 检验
放线菌门	Atopobiaceae	0.0%	0.0%	0.1%	0.138	0.0%	0.0%	0.1%	0.100
	双歧杆菌科	2.8%	4.6%	5.4%	0.000	0.5%	23.2%	2.2%	0.052
	红螺菌科	0.0%	-0.1%	0.4%	0.129	0.1%	2.6%	0.1%	0.095
	埃格特菌科	0.0%	-0.3%	-0.1%	0.042	0.0%	0.0%	0.0%	0.647
	丙酸杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.744	0.0%	0.0%	0.0%	0.347
拟杆菌门	拟杆菌科	-6.9%	-7.3%	-10.6%	0.002	-8.7%	-20.6%	-13.0%	0.000
	拟杆菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.532	0.0%	0.0%	0.0%	0.030
	拟杆菌纲 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	Marinifilaceae	0.1%	-0.2%	0.0%	0.448	0.0%	0.0%	0.0%	0.727
	绒毛杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	普雷沃氏菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.106	0.0%	0.0%	1.0%	0.293
	理研菌科	0.1%	-0.4%	0.0%	0.221	-0.1%	0.1%	0.0%	0.874
	坦纳菌科	-0.2%	1.1%	-3.2%	0.311	-0.8%	0.4%	-8.5%	0.072
	氨基酸球菌科	-3.5%	0.0%	-4.4%	0.086	-3.9%	0.0%	-0.8%	0.050
厚壁菌门	芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.467	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	克里斯滕森菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.100	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	梭菌科 1	0.0%	-0.6%	-1.7%	0.023	0.2%	-14.8%	-26.7%	0.008
	梭菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.898	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	肠球菌科	-0.8%	-1.5%	-0.3%	0.001	-6.2%	0.1%	-0.3%	0.071
	丹毒丝菌科	0.1%	0.0%	3.3%	0.080	0.7%	0.2%	16.2%	0.073
	真杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.470	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	科 XI	0.0%	0.0%	0.0%	0.004	0.0%	0.0%	0.0%	0.069
	科 XIII	0.0%	0.0%	0.0%	0.064	0.0%	0.0%	0.0%	0.347
	毛螺菌科	-0.9%	1.2%	-0.9%	0.743	16.6%	4.0%	2.9%	0.010
	乳杆菌科	9.7%	6.2%	3.5%	0.000	1.5%	1.2%	1.1%	0.000
	类芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	消化链球菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.086	0.0%	0.0%	0.0%	0.678
	瘤胃球菌科	0.1%	-0.1%	0.1%	0.117	0.0%	0.5%	0.2%	0.071
	链球菌科	-5.7%	0.0%	14.9%	0.360	-4.4%	0.2%	6.9%	0.684
	韦荣氏菌科	19.3%	13.7%	4.1%	0.001	13.7%	0.2%	-1.9%	0.143
	梭杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.137	0.0%	0.0%	0.0%	0.065
	气单胞菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	-0.1%	0.082
	伯克霍尔德菌科	0.1%	0.0%	0.1%	0.074	0.0%	0.1%	0.0%	0.259
	脱硫弧菌科	-0.1%	0.0%	0.1%	0.990	0.0%	0.0%	0.0%	0.484
变形菌门	肠杆菌科	-8.0%	-15.3%	-11.1%	0.000	-4.8%	2.6%	-2.1%	0.345
	琥珀酸弧菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.210	0.1%	0.0%	23.1%	0.082
	互养菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.347	0.0%	0.0%	0.0%	NA
疣微菌门	阿克曼菌科	-6.3%	-1.0%	0.0%	0.044	-4.3%	0.0%	0.0%	0.173

图13

OTU	密切相关的属	密切相关的种	金黄色葡萄球菌						枯草芽孢杆菌					
			菌液			菌液			菌液			菌液		
			供体 G	供体 H	供体 I	T 检验	供体 G	供体 H	供体 I	T 检验	供体 G	供体 H	供体 I	T 检验
1	埃希氏-志贺氏菌属(100)	大肠杆菌	-0.6%	0.2%	-0.7%	0.734	0.3%	-3.1%	-10.7%	0.273	0.3%	-3.1%	-10.7%	0.273
2	拟杆菌属(100)	脆弱拟杆菌	0.0%	0.1%	-3.0%	0.094	0.0%	1.6%	-17.3%	0.125	0.0%	1.6%	-17.3%	0.125
3	拟杆菌属(100)	多形拟杆菌	-1.5%	8.5%	-9.6%	0.760	0.1%	12.7%	-0.7%	0.108	0.1%	12.7%	-0.7%	0.108
4	拟杆菌属(100)	多氏拟杆菌	0.0%	-7.6%	-1.9%	0.036	0.5%	-13.0%	-0.3%	0.036	0.5%	-13.0%	-0.3%	0.036
5	双歧杆菌属(100)	长双歧杆菌	2.3%	0.1%	1.0%	0.008	10.5%	2.8%	8.3%	0.001	10.5%	2.8%	8.3%	0.001
6	阿克曼菌属(100)	嗜粘蛋白阿克曼菌	-3.9%	-25.1%	-0.2%	0.049	-5.4%	-3.5%	0.0%	0.062	-5.4%	-3.5%	0.0%	0.062
7	韦荣氏菌属(100)	小韦荣氏菌/奇异韦荣氏菌	39.6%	9.3%	2.7%	0.003	0.7%	5.7%	0.3%	0.046	0.7%	5.7%	0.3%	0.046
8	梭菌属(100)	第三梭菌	-0.4%	0.0%	-1.5%	0.027	-4.7%	-3.3%	-12.2%	0.003	-4.7%	-3.3%	-12.2%	0.003
10	拟杆菌属(100)	单形拟杆菌	3.5%	0.0%	-0.3%	0.142	0.1%	-0.1%	-0.1%	0.537	0.1%	-0.1%	-0.1%	0.537
11	梭菌XIVa属(99)	不明	0.0%	2.9%	0.7%	0.026	0.7%	23.4%	3.4%	0.036	0.7%	23.4%	3.4%	0.036
12	梭菌XIVa属(100)	不明	0.1%	0.5%	1.4%	0.016	0.1%	0.8%	2.2%	0.017	0.1%	0.8%	2.2%	0.017
13	罗氏菌属(100)	不明	-0.1%	0.0%	0.0%	0.112	0.0%	0.0%	0.0%	0.186	0.0%	0.0%	0.0%	0.186
17	乳球菌属(100)	格氏乳球菌	3.8%	0.0%	0.0%	0.098	0.3%	0.0%	0.0%	0.116	0.3%	0.0%	0.0%	0.116
19	拟杆菌属(100)	粪拟杆菌	-2.6%	0.3%	-1.0%	0.034	-13.4%	1.1%	-0.7%	0.103	-13.4%	1.1%	-0.7%	0.103
20	乳杆菌属(100)	植物乳杆菌	6.8%	3.4%	3.1%	0.000	0.4%	0.7%	0.3%	0.000	0.4%	0.7%	0.3%	0.000
21	乳杆菌属(100)	鼠李糖乳杆菌	1.4%	4.3%	7.8%	0.001	0.1%	0.3%	0.3%	0.000	0.1%	0.3%	0.3%	0.000
22	肠球菌属(99)	屎肠球菌	-0.4%	-1.1%	3.0%	0.429	-0.1%	-3.6%	1.2%	0.341	-0.1%	-3.6%	1.2%	0.341
25	梭菌属 1(100)	丁酸梭菌	0.2%	0.0%	0.0%	0.091	3.0%	-22.2%	0.0%	0.159	3.0%	-22.2%	0.0%	0.159
26	考拉杆菌属(100)	屎考拉杆菌	0.0%	-1.2%	-3.0%	0.015	0.0%	-0.7%	-2.0%	0.034	0.0%	-0.7%	-2.0%	0.034
29	栖粪杆菌属(100)	普氏栖粪杆菌	0.0%	0.0%	0.0%	0.051	0.0%	0.0%	0.0%	0.085	0.0%	0.0%	0.0%	0.085
43	未分类的索单胞菌科(91)	不明	0.0%	0.0%	0.0%	0.125	0.0%	0.0%	0.0%	0.251	0.0%	0.0%	0.0%	0.251
46	柠檬酸杆菌属(77)	弗氏柠檬酸杆菌	-0.1%	-2.0%	-0.1%	0.057	-0.1%	-5.8%	0.0%	0.077	-0.1%	-5.8%	0.0%	0.077
48	罗姆布茨菌属(100)	不明	-0.1%	-0.1%	0.0%	0.006	0.0%	-0.2%	0.0%	0.171	0.0%	-0.2%	0.0%	0.171
49	副拟杆菌属(100)	戈氏副拟杆菌	-0.6%	0.4%	0.0%	0.809	-2.0%	-0.2%	0.0%	0.072	-2.0%	-0.2%	0.0%	0.072
53	乳球菌属(100)	乳酸乳球菌	0.0%	1.9%	0.0%	0.148	0.0%	0.0%	0.0%	0.757	0.0%	0.0%	0.0%	0.757

图14

门	科	肺炎球菌							
		管腔				粘膜			
		供体 G	供体 H	供体 I	T 检验	供体 G	供体 H	供体 I	T 检验
放线菌门	Atopobiaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.667	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	双歧杆菌科	4.7%	0.2%	3.4%	0.004	12.6%	2.9%	10.2%	0.002
	红赭菌科	0.1%	0.0%	0.0%	0.074	0.3%	0.6%	0.0%	0.073
	埃格特菌科	0.1%	0.0%	-0.1%	0.745	0.0%	0.0%	0.0%	0.850
	内酸杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.187	0.0%	0.0%	0.0%	0.295
拟杆菌门	拟杆菌科	-1.3%	1.5%	-17.2%	0.115	-13.8%	1.2%	-19.2%	0.012
	拟杆菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.852	0.1%	0.0%	0.0%	0.201
	拟杆菌纲 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.456	0.0%	0.0%	0.0%	0.920
	Marinifilaceae	0.0%	0.0%	-0.2%	0.083	0.0%	-0.2%	0.0%	0.061
	绒毛杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.121	0.0%	0.0%	0.0%	0.251
	普雷沃氏菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.099	0.0%	0.0%	0.0%	0.099
	理研菌科	0.4%	0.0%	0.0%	0.084	0.1%	0.0%	0.0%	0.221
	坦纳菌科	-1.4%	1.1%	-0.4%	0.650	-4.2%	0.4%	0.1%	0.227
	氨基酸球菌科	-0.1%	-1.2%	-3.0%	0.012	-0.1%	-0.7%	-2.1%	0.023
	芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	0.347
厚壁菌门	克里斯滕森菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.307	0.0%	0.0%	0.0%	0.078
	梭菌科 1	-6.9%	-0.4%	-1.9%	0.018	1.3%	-25.7%	-12.1%	0.019
	梭菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.2%	0.303	0.0%	0.0%	-0.3%	0.188
	肠球菌科	-22.7%	-2.1%	3.0%	0.105	-1.6%	-4.0%	1.2%	0.091
	丹毒丝菌科	0.8%	0.0%	0.0%	0.111	5.5%	0.4%	0.3%	0.062
	真杆菌科	0.0%	1.7%	2.5%	0.019	0.0%	0.2%	0.1%	0.016
	科 XI	0.3%	-0.2%	-0.1%	0.872	0.0%	-0.1%	0.0%	0.124
	科 XIII	0.0%	0.1%	0.0%	0.146	0.0%	0.0%	0.0%	0.164
	毛螺菌科	0.7%	4.3%	2.4%	0.007	5.5%	27.2%	10.0%	0.003
	乳杆菌科	7.9%	7.7%	10.9%	0.000	0.6%	0.9%	0.7%	0.000
	类芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	消化链球菌科	-0.6%	-0.1%	-1.1%	0.010	-0.6%	-0.1%	-0.3%	0.014
	瘤胃球菌科	0.1%	0.0%	0.1%	0.079	0.2%	0.1%	0.2%	0.002
	链球菌科	3.9%	4.2%	0.0%	0.008	0.9%	2.8%	0.1%	0.016
	韦荣氏菌科	20.1%	12.5%	3.4%	0.001	0.8%	7.1%	0.4%	0.050
	梭杆菌科	-1.1%	0.0%	0.0%	0.087	-0.2%	0.0%	0.0%	0.093
变形菌门	气单胞菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	伯克霍尔德菌科	0.0%	0.0%	-0.2%	0.098	0.0%	0.0%	-0.1%	0.135
	脱硫弧菌科	-0.1%	0.0%	0.0%	0.359	0.0%	0.0%	0.0%	0.444
	肠杆菌科	-0.6%	-3.5%	-1.0%	0.155	0.2%	-9.3%	10.9%	0.850
	琥珀酸弧菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	0.347
互养菌门	互养菌科	-0.6%	-0.8%	-0.8%	0.000	0.0%	-0.2%	0.0%	0.053
疣微菌门	阿克曼菌科	-3.9%	-25.2%	-0.2%	0.049	-5.4%	-3.6%	0.0%	0.062

图15

OTU	密切相关的属	密切相关的种	18D						粘膜					
			供体 A	供体 B	供体 C	T 检验	供体 A	供体 B	供体 C	T 检验	供体 A	供体 B	供体 C	T 检验
1	埃希氏-志贺氏菌属 (100)	大肠杆菌	-7.4%	-2.5%	-1.9%	0.003	3.4%	4.3%	-0.1%	0.039	3.4%	4.3%	-0.1%	0.039
2	拟杆菌属 (100)	脆弱拟杆菌	5.0%	7.8%	-0.5%	0.014	-10.1%	-1.1%	-2.1%	0.064	-10.1%	-1.1%	-2.1%	0.064
3	拟杆菌属 (100)	多形拟杆菌	-6.6%	3.5%	0.0%	0.513	-1.1%	-2.1%	0.0%	0.062	-1.1%	-2.1%	0.0%	0.062
4	拟杆菌属 (100)	多形拟杆菌	-1.6%	0.0%	-3.1%	0.161	0.1%	0.0%	-2.6%	0.098	0.1%	0.0%	-2.6%	0.098
5	双歧杆菌属 (100)	长双歧杆菌	0.0%	0.0%	14.1%	0.086	0.0%	0.0%	-3.7%	0.730	0.0%	0.0%	-3.7%	0.730
6	阿克曼菌属 (100)	嗜粘蛋白阿克曼菌	0.0%	-11.6%	0.0%	0.102	0.0%	-1.6%	0.0%	0.104	0.0%	-1.6%	0.0%	0.104
9	双歧杆菌属 (100)	两歧双歧杆菌	0.0%	0.0%	-1.6%	0.081	0.0%	0.0%	0.3%	0.972	0.0%	0.0%	0.3%	0.972
10	拟杆菌属 (100)	单形拟杆菌	-0.2%	-0.2%	2.0%	0.453	0.0%	0.0%	-0.3%	0.456	0.0%	0.0%	-0.3%	0.456
11	梭菌XIVa属 (99)	不明	-1.7%	-0.1%	-2.7%	0.013	0.7%	-3.7%	-1.0%	0.116	0.7%	-3.7%	-1.0%	0.116
12	梭菌XIVa属 (100)	不明	-2.5%	-0.4%	-2.6%	0.004	-4.9%	-4.3%	-0.1%	0.004	-4.9%	-4.3%	-0.1%	0.004
13	罗氏菌属 (100)	不明	0.1%	0.1%	-0.2%	0.587	6.9%	38.5%	0.0%	0.040	6.9%	38.5%	0.0%	0.040
16	柯林斯氏菌属 (100)	产气柯林斯氏菌	0.0%	-0.1%	0.0%	0.094	0.0%	-9.9%	0.0%	0.087	0.0%	-9.9%	0.0%	0.087
18	梭菌XIVa属 (100)	共生梭菌	-5.1%	-0.8%	-7.9%	0.005	-0.5%	-0.7%	-0.2%	0.012	-0.5%	-0.7%	-0.2%	0.012
20	乳杆菌属 (100)	植物乳杆菌	3.0%	7.4%	11.6%	0.001	0.4%	2.1%	6.1%	0.035	0.4%	2.1%	6.1%	0.035
21	乳杆菌属 (100)	鼠李糖乳杆菌	1.7%	5.5%	11.2%	0.003	0.1%	0.5%	0.9%	0.035	0.1%	0.5%	0.9%	0.035
24	瘤胃球菌属 (100)	不明	-1.8%	0.0%	0.0%	0.084	-13.2%	-1.0%	0.0%	0.061	-13.2%	-1.0%	0.0%	0.061
27	副拟杆菌属 (100)	狄氏副拟杆菌	-1.0%	0.0%	0.0%	0.387	0.1%	0.0%	0.0%	0.306	0.1%	0.0%	0.0%	0.306
28	韦荣氏菌属 (100)	不明	15.8%	0.1%	0.0%	0.082	1.2%	0.0%	0.0%	0.075	1.2%	0.0%	0.0%	0.075
32	布劳特氏菌属 (100)	不明	4.1%	0.0%	0.4%	0.062	10.8%	0.0%	0.5%	0.070	10.8%	0.0%	0.5%	0.070
42	毛螺菌属 (100)	不明	0.4%	0.0%	0.0%	0.058	0.7%	0.0%	1.5%	0.051	0.7%	0.0%	1.5%	0.051
44	罗氏菌属 (100)	嗜葡萄糖杆菌	0.0%	0.0%	0.0%	0.109	0.0%	0.0%	9.1%	0.217	0.0%	0.0%	9.1%	0.217
50	链球菌 (100)	唾液链球菌	-0.2%	0.0%	0.0%	0.239	0.1%	0.0%	0.0%	0.189	0.1%	0.0%	0.0%	0.189
51	梭菌XVII属 (100)	多歧梭菌	0.0%	0.1%	-7.8%	0.108	0.0%	-0.5%	-0.7%	0.013	0.0%	-0.5%	-0.7%	0.013
56	双歧杆菌属 (100)	假长双歧杆菌	0.0%	5.5%	0.0%	0.085	0.0%	1.0%	0.0%	0.178	0.0%	1.0%	0.0%	0.178
69	Fonticella (100)	不明	0.0%	0.0%	0.0%	0.347	-0.1%	-7.1%	-3.7%	0.076	-0.1%	-7.1%	-3.7%	0.076

图16

门	科	IBD							
		管腔				粘膜			
		供体 A	供体 B	供体 C	T 检验	供体 A	供体 B	供体 C	T 检验
放线菌门	Atopobiaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.347	0.0%	0.0%	0.0%	0.157
	双歧杆菌科	1.6%	5.6%	12.6%	0.005	0.2%	1.2%	-3.6%	0.509
	红螺菌科	-0.5%	-0.1%	0.0%	0.026	-0.4%	-9.9%	0.0%	0.076
	埃格特菌科	-0.3%	-0.5%	-1.0%	0.001	0.0%	0.0%	0.0%	0.053
	丙酸杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.347	0.0%	0.0%	0.0%	NA
拟杆菌门	拟杆菌科	-7.0%	12.0%	-4.5%	0.968	-11.7%	-3.7%	-9.9%	0.004
	拟杆菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.370	0.0%	0.0%	0.0%	0.506
	拟杆菌纲 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	Marinifilaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.003	0.0%	0.0%	0.0%	0.053
	绒毛杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	普雷沃氏菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.106	0.0%	0.0%	0.0%	0.380
	理研菌科	-0.2%	0.0%	-0.1%	0.016	0.0%	0.0%	0.0%	0.931
厚壁菌门	坦纳菌科	-1.2%	0.0%	0.0%	0.391	0.1%	0.0%	0.0%	0.365
	氨基酸球菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.188	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	-0.1%	0.109	0.0%	0.0%	-1.4%	0.085
	克里斯滕森菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.189	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	梭菌科 1	0.0%	0.0%	0.0%	0.650	-1.1%	-6.9%	-3.7%	0.050
	梭菌目 未分类	0.0%	0.0%	0.0%	0.114	0.0%	0.0%	0.0%	0.153
	肠球菌科	-0.1%	-21.0%	0.1%	0.081	0.0%	-0.1%	0.0%	0.870
	丹毒丝菌科	-0.4%	0.1%	-7.8%	0.091	-0.1%	-0.5%	-0.8%	0.004
	真杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	0.347	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	科 XI	0.0%	-0.3%	0.0%	0.119	0.0%	0.0%	0.0%	0.119
	科 XIII	0.0%	0.0%	0.0%	0.010	0.0%	0.0%	0.0%	0.341
	毛螺菌科	-5.9%	1.7%	-13.8%	0.055	7.6%	11.6%	11.4%	0.004
	乳杆菌科	8.7%	16.8%	22.9%	0.000	1.4%	4.7%	7.1%	0.012
	类芽孢杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	-0.2%	-0.1%	0.086
	消化链球菌科	-5.7%	0.0%	0.0%	0.084	-0.2%	0.1%	0.1%	0.837
	瘤胃球菌科	-1.6%	-0.2%	-0.6%	0.006	-0.2%	0.0%	0.0%	0.564
	链球菌科	6.1%	0.0%	-0.3%	0.100	1.0%	0.1%	0.4%	0.035
	韦荣氏菌科	17.5%	0.4%	0.1%	0.082	3.1%	1.1%	0.1%	0.007
梭杆菌门	梭杆菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
变形菌门	气单胞菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
	伯克霍尔德菌科	0.0%	-0.2%	-5.4%	0.073	0.0%	0.2%	0.3%	0.035
	脱硫弧菌科	-0.1%	0.0%	0.0%	0.101	0.0%	0.0%	0.0%	0.347
	肠杆菌科	-7.8%	-2.6%	-1.9%	0.003	1.3%	-4.3%	-0.1%	0.031
	琥珀酸弧菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
互养菌门	互养菌科	0.0%	0.0%	0.0%	NA	0.0%	0.0%	0.0%	NA
疣微菌门	阿克曼菌科	0.0%	-11.7%	0.0%	0.102	0.0%	-1.7%	0.0%	0.107

图17

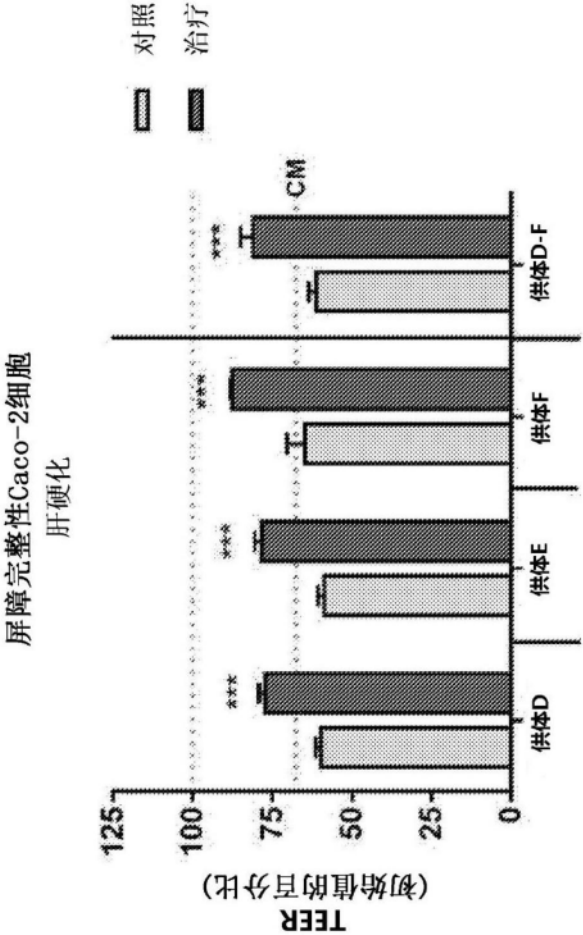


图18

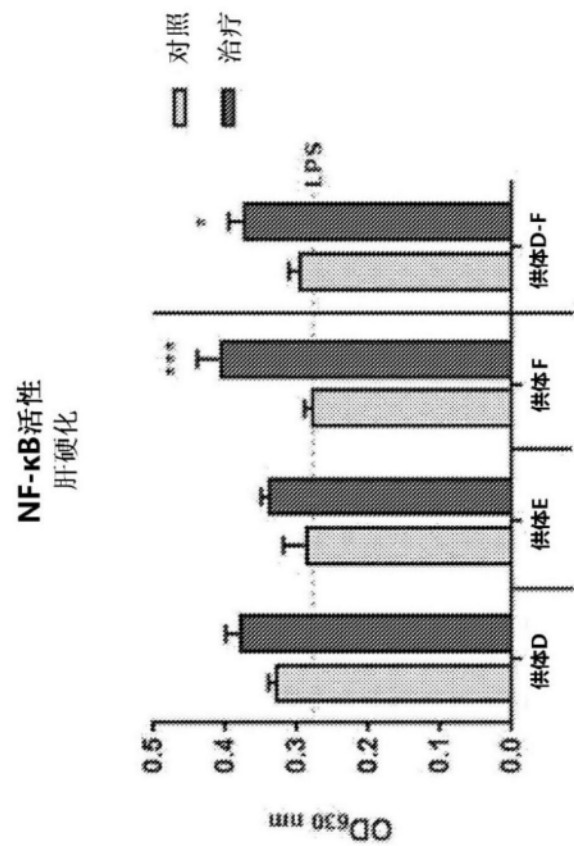


图19

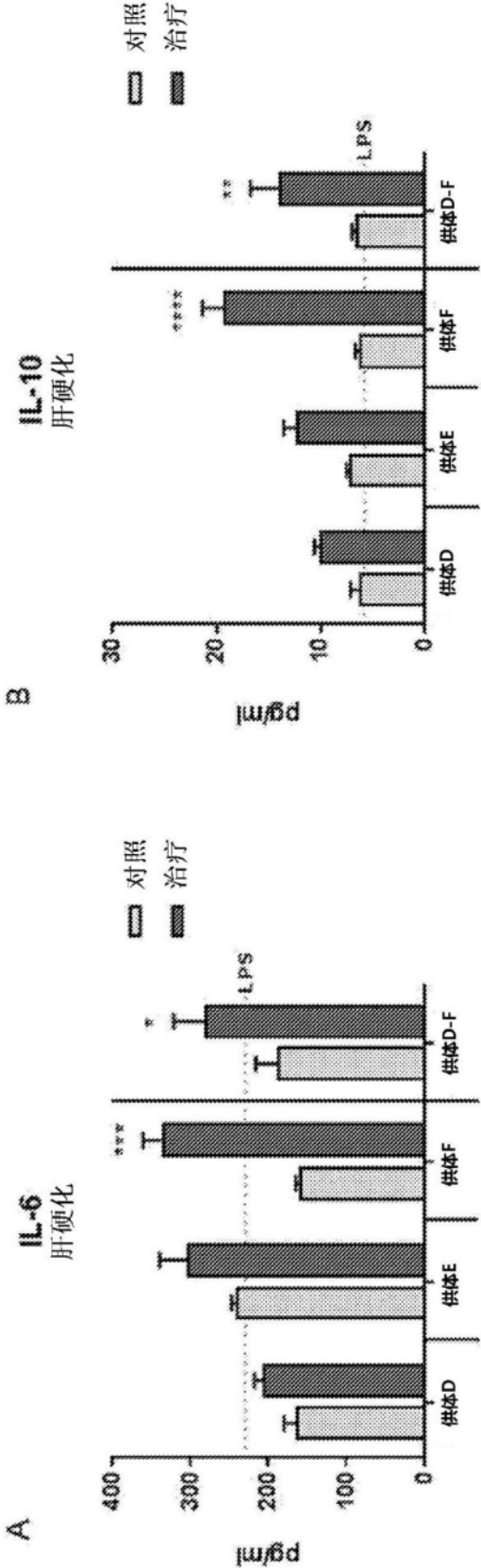


图20

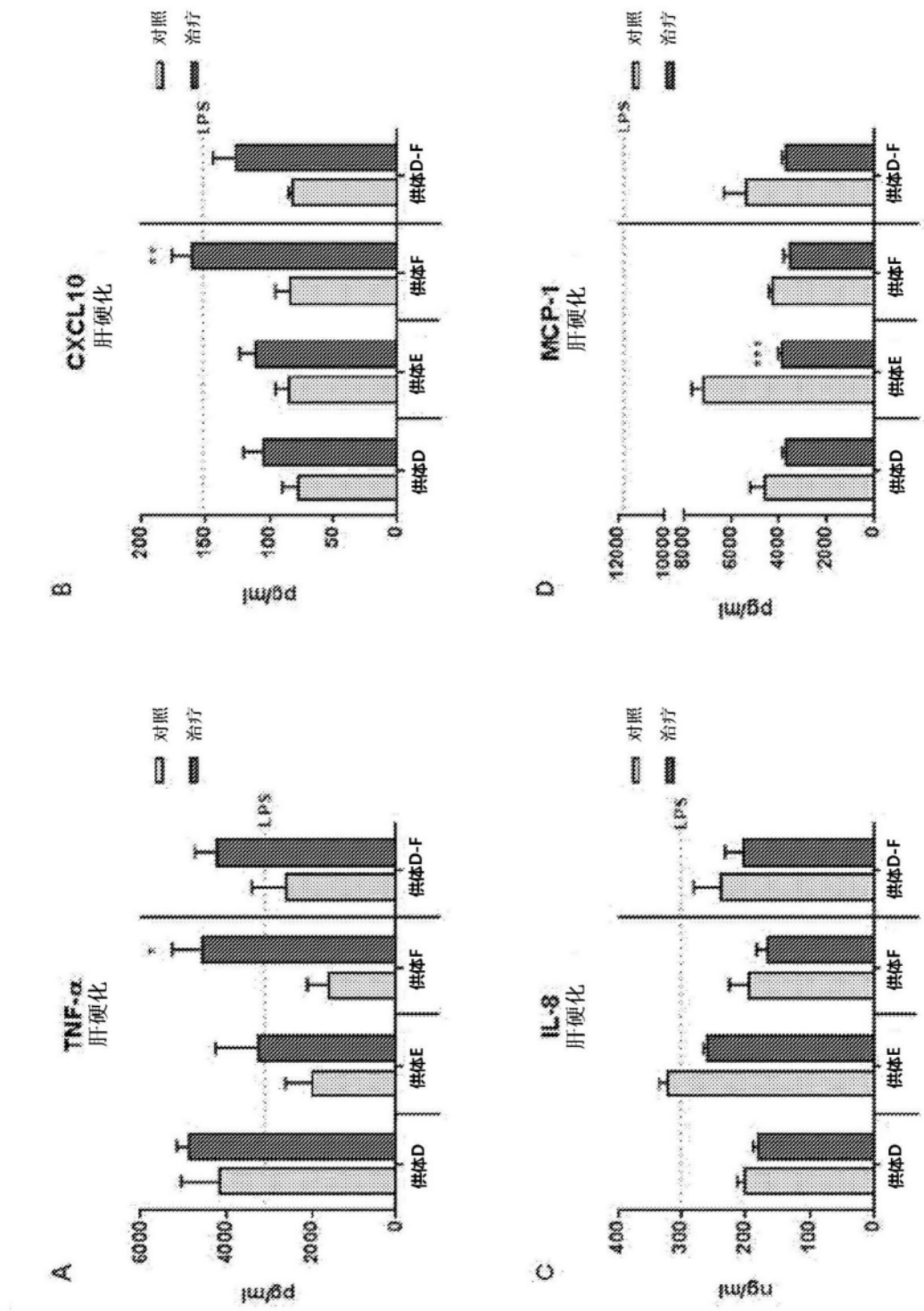


图21

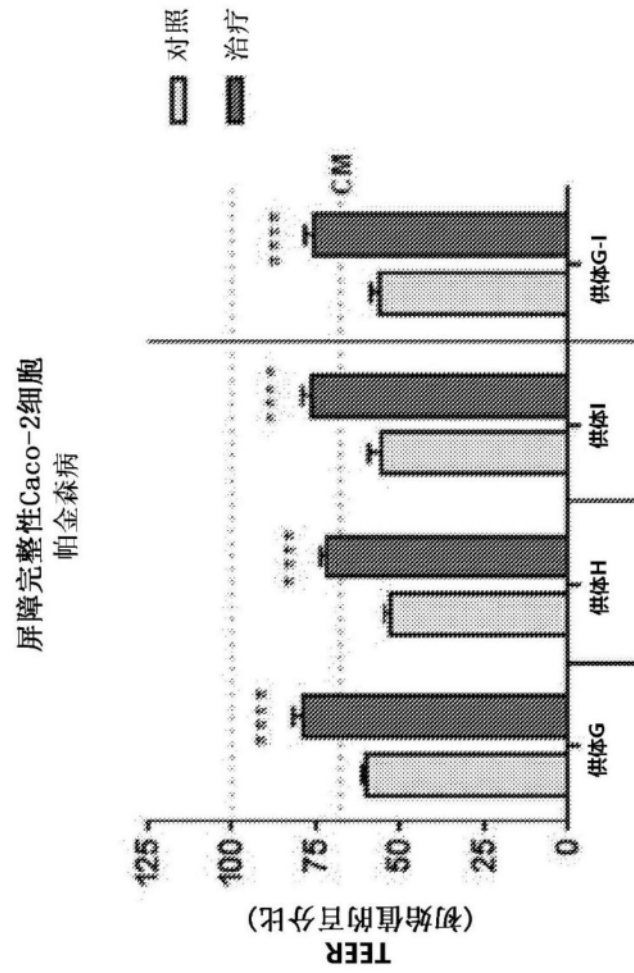


图22

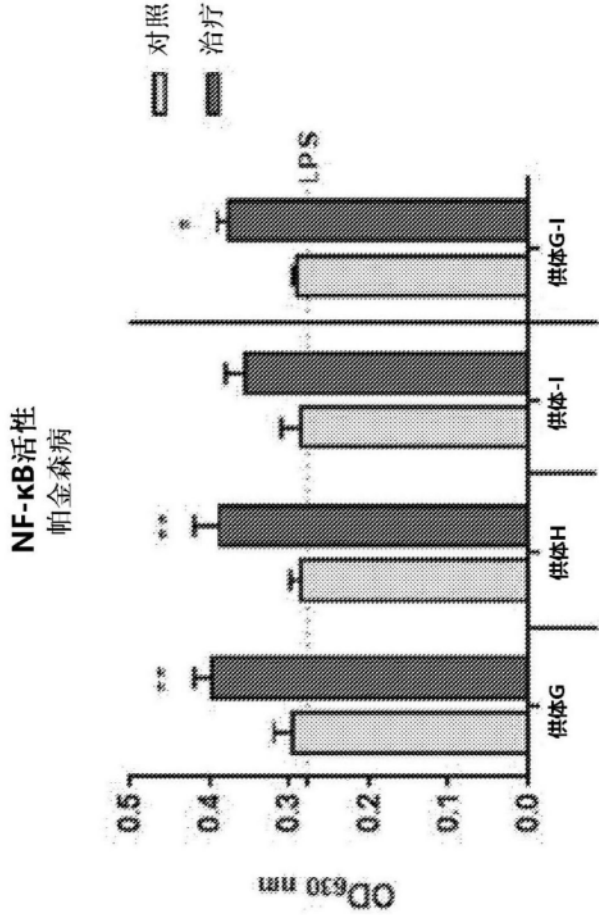


图23

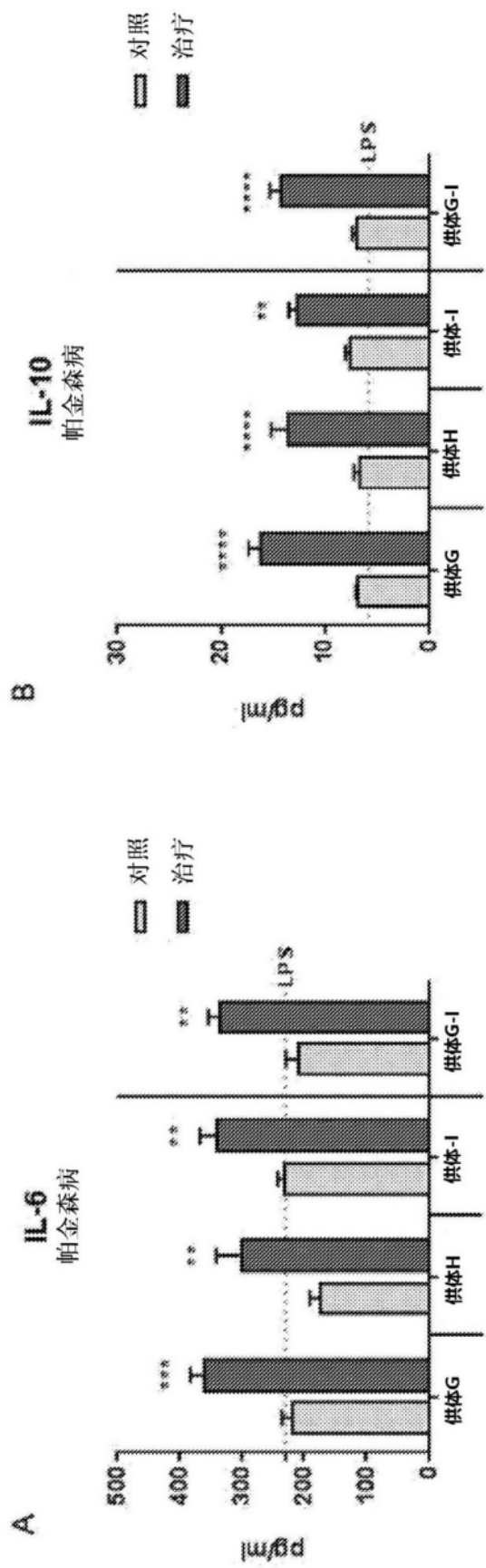


图24

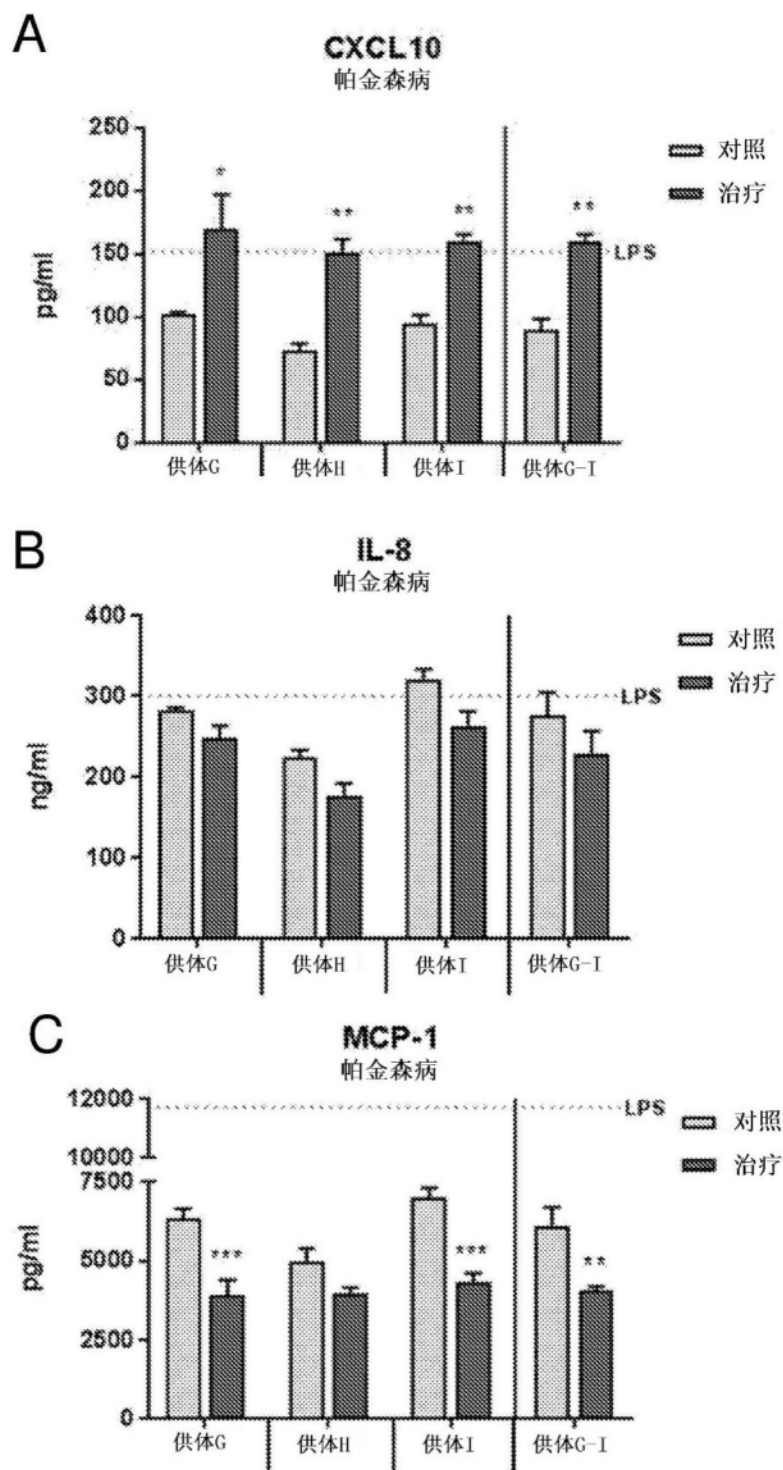


图25

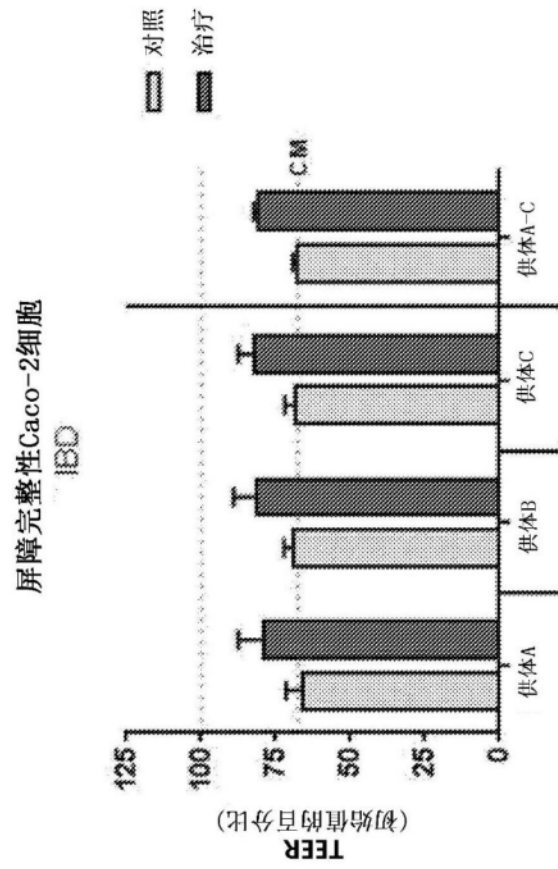


图26

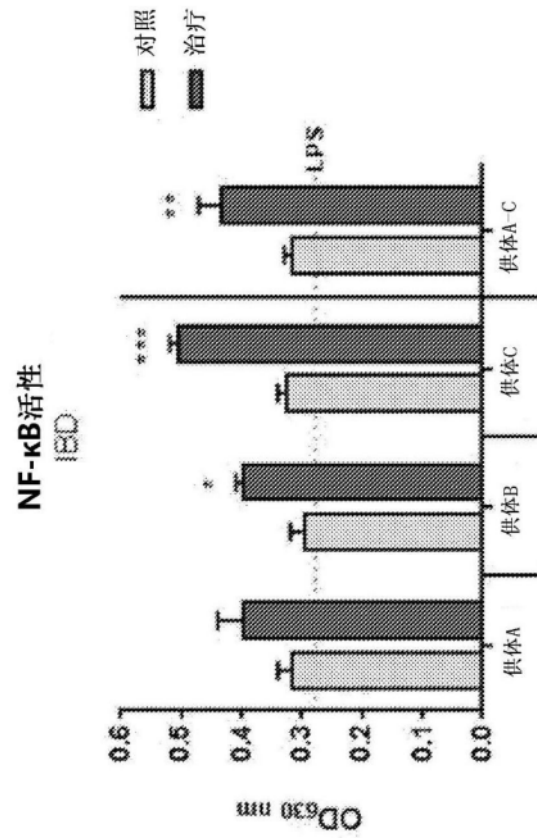


图27

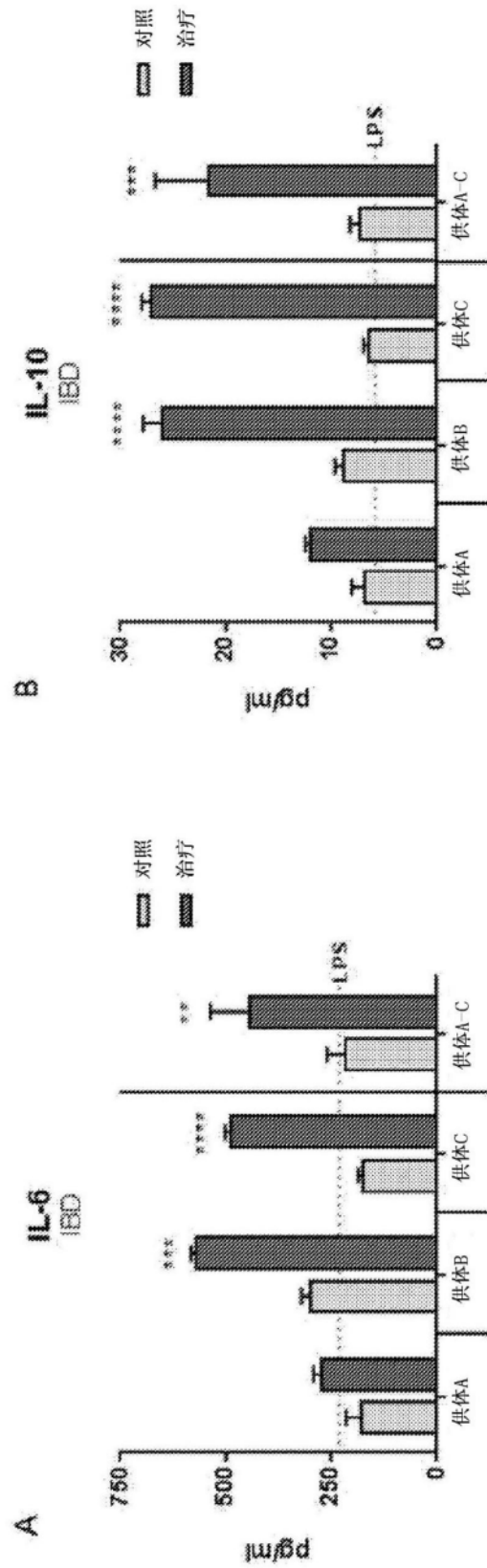


图28

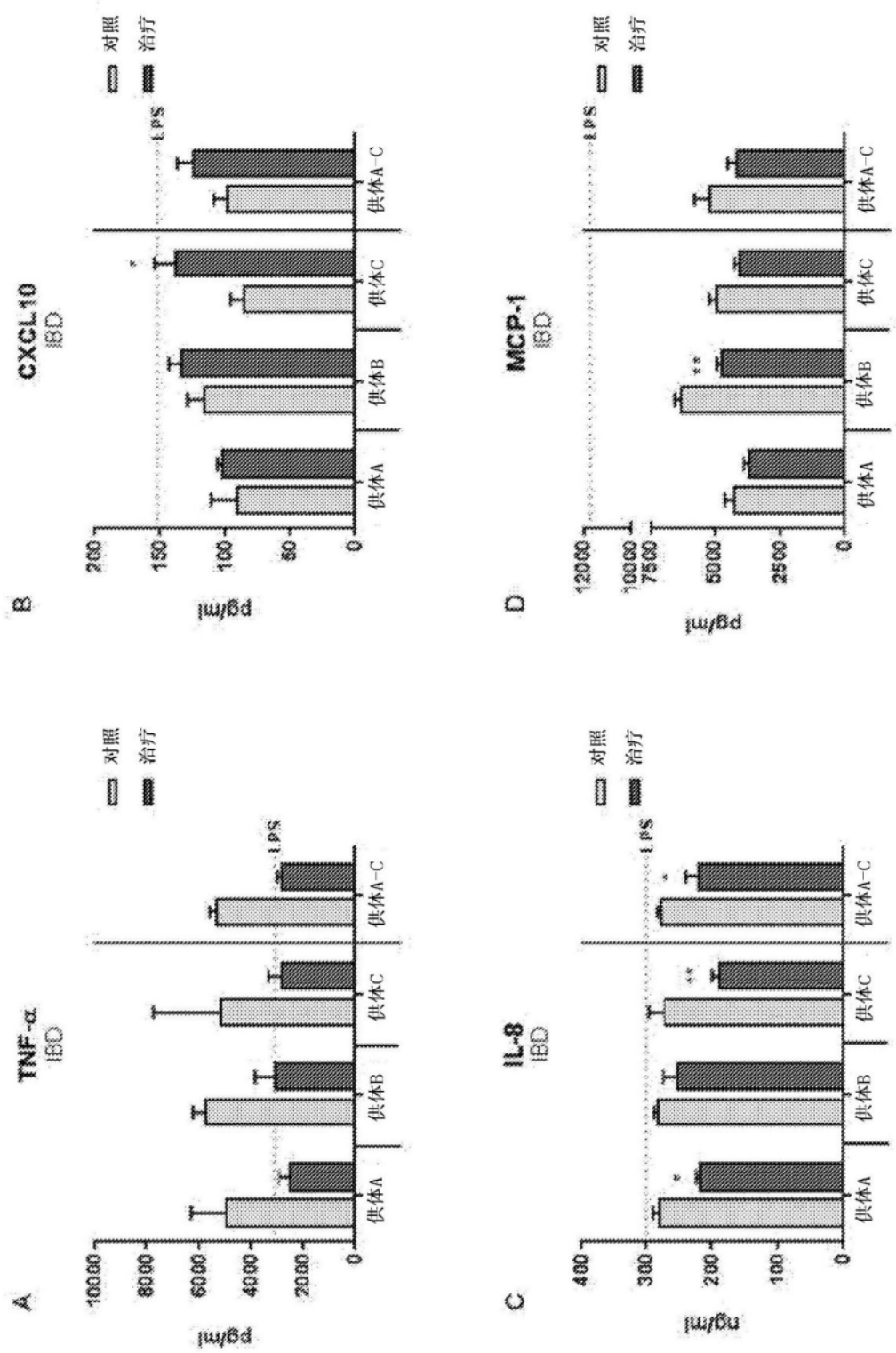


图29

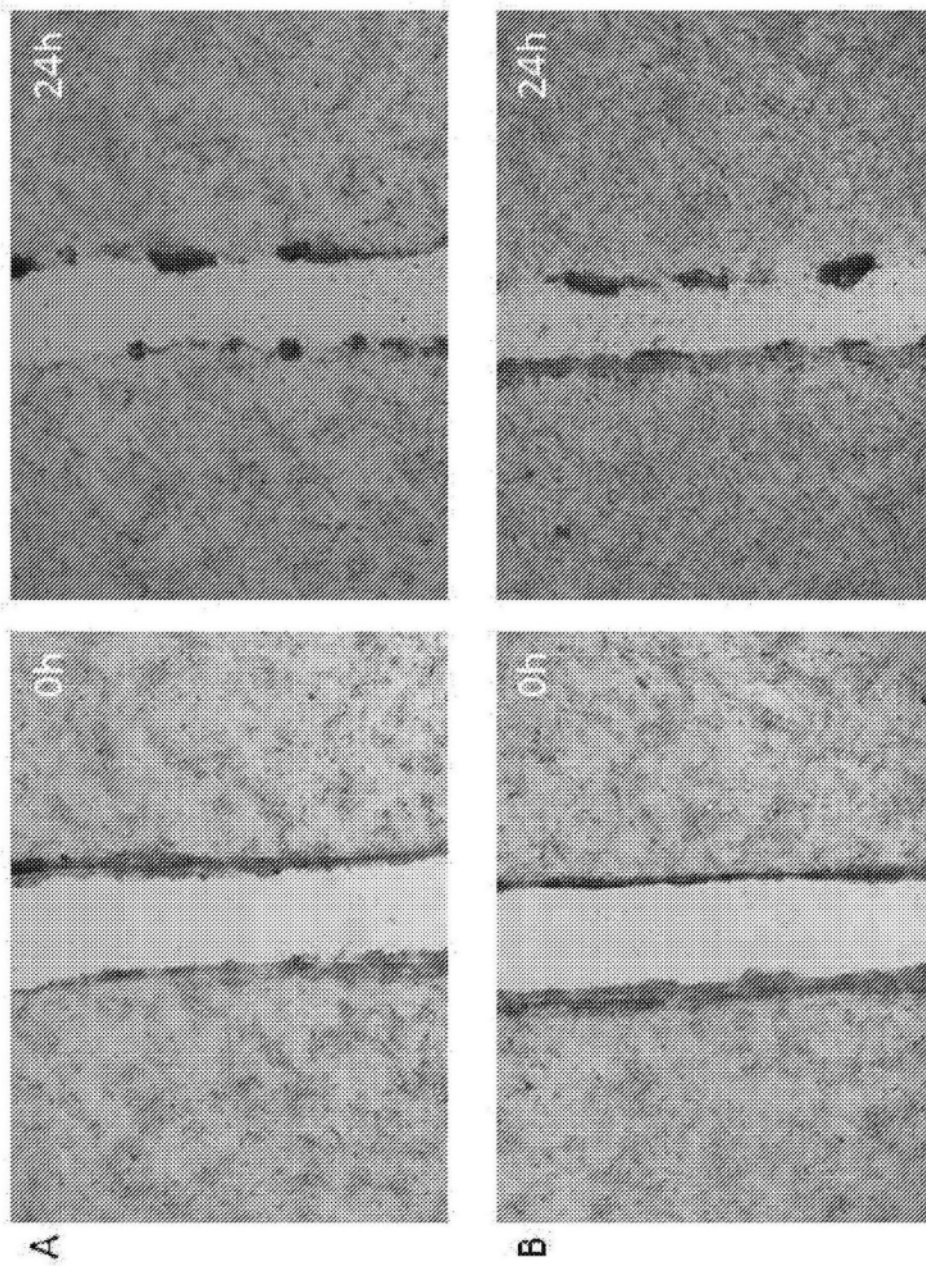


图30

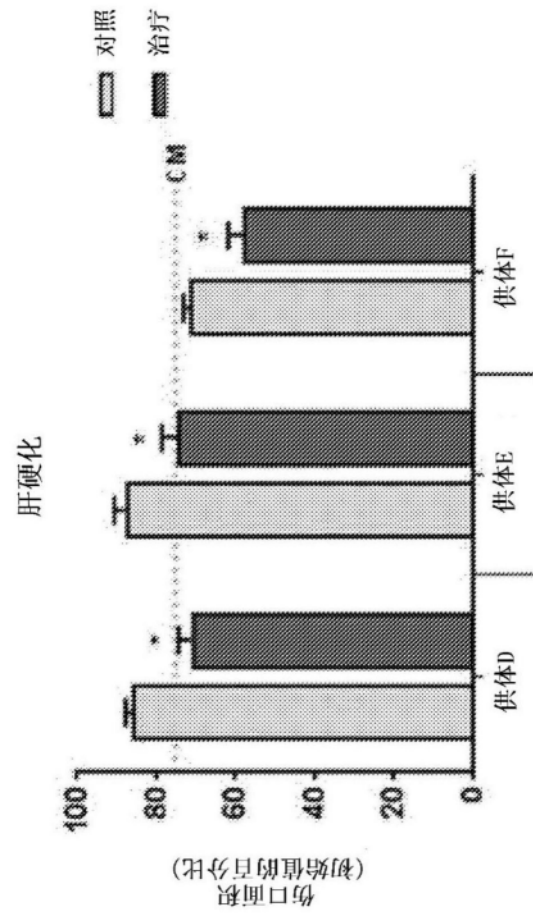


图31

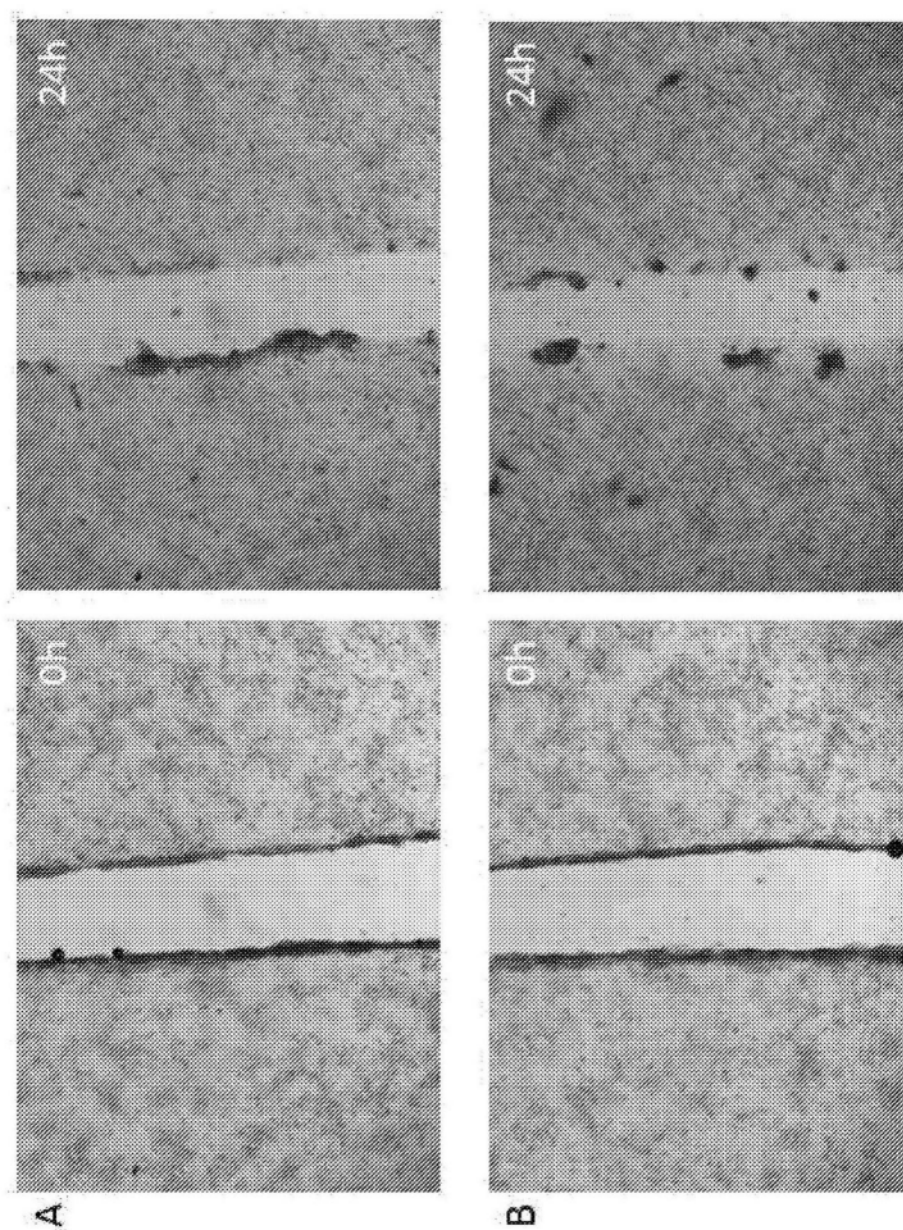


图32

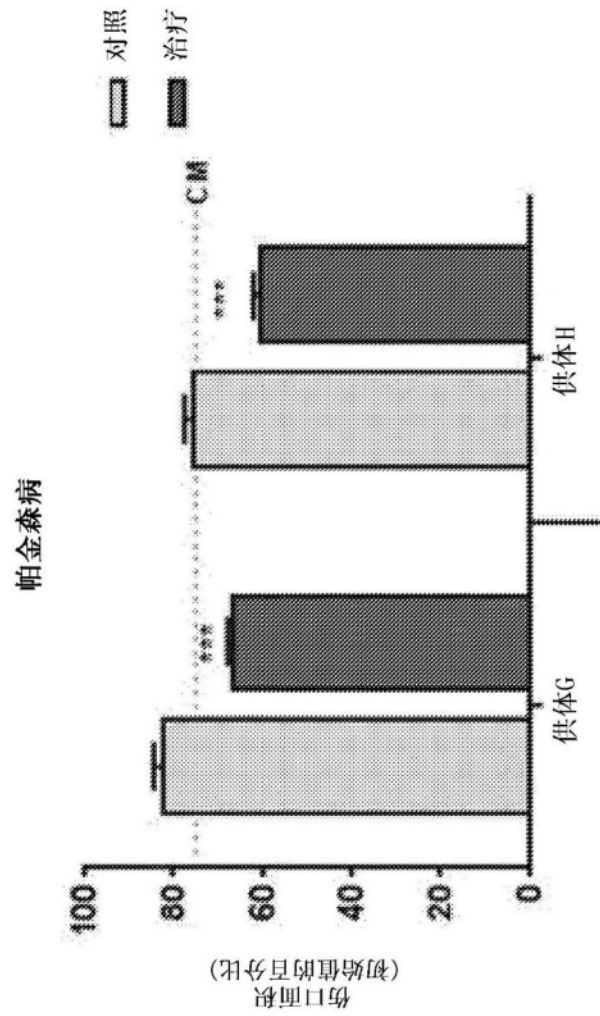


图33