



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106072658 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610417206.3

(22)申请日 2010.08.24

(30)优先权数据

09168590.9 2009.08.25 EP

(62)分案原申请数据

201080048017.4 2010.08.24

(71)申请人 雀巢产品技术援助有限公司

地址 瑞士沃韦

(72)发明人 P·麦克林 G·伯根则里德刚达

S·M·柯林斯 P·贝尔希克

E·韦尔杜 德 贝尔希克

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡晨曦 黄革生

(51)Int.Cl.

A23L 33/135(2016.01)

A23K 10/18(2016.01)

A61K 35/745(2015.01)

A61K 38/01(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

A61P 1/14(2006.01)

A61P 1/10(2006.01)

A61P 1/12(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61K 35/744(2015.01)

A61K 31/702(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

长双歧杆菌和功能性胃肠病症

(57)摘要

本发明涉及长双歧杆菌和功能性胃肠病症。具体而言,本发明一般地涉及益生菌的领域,其涉及长双歧杆菌,例如长双歧杆菌ATCC BAA-999,及其在可摄入的组合物中的应用。本发明所述的组合物可以用于治疗或预防功能性胃肠病症。

1. 长双歧杆菌ATCC BAA-999在制备用于治疗 and/或预防功能性胃肠病症的组合物中的用途。
2. 根据权利要求1的用途,其中功能性胃肠病症选自肠易激综合征;功能性消化不良;功能性便秘,功能性腹泻;功能性腹痛;功能性气胀,上腹部疼痛综合征,餐后不适综合征,或其组合。
3. 根据权利要求1或2的用途,其中功能性胃肠病症是与焦虑相关的。
4. 根据权利要求1或2的用途,其中组合物选自食品组合物、宠物食品组合物、膳食补充剂、营养制品和/或医药组合物。
5. 根据权利要求1或2的用途,其中组合物另外包含至少1种其他类型的食品级细菌。
6. 根据权利要求5的用途,其中所述食品级细菌选自乳酸菌、丙酸杆菌或其混合物。
7. 根据权利要求5的用途,其中所述食品级细菌选自双歧杆菌或其与丙酸杆菌的混合物。
8. 根据权利要求1或2的用途,其中组合物进一步含有至少1种益生元。
9. 根据权利要求8的用途,其中益生元选自寡糖。
10. 根据权利要求9的用途,其中所述组合物还含有果糖、半乳糖、甘露糖、大豆和/或菊粉、膳食纤维、或其混合物。
11. 根据权利要求1或2的用途,其中至少5%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是活的。
12. 根据权利要求11的用途,其中至少10%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是活的。
13. 根据权利要求11的用途,其中至少15%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是活的。
14. 根据权利要求1或2的用途,其中至少80%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是非复制的。
15. 根据权利要求14的用途,其中至少90%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是非复制的。
16. 根据权利要求14的用途,其中至少95%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是非复制的。
17. 根据权利要求1或2的用途,其中组合物每日剂量包含 10^4 - 10^{10} 个细胞的长双歧杆菌ATCC BAA-999。
18. 根据权利要求1或2的用途,其中组合物包含相对于每g组合物干重为 10^2 - 10^8 个细胞的长双歧杆菌ATCC BAA-999。
19. 根据权利要求1或2的用途,其进一步含有蛋白质源,所述的蛋白质源包含水解的乳清蛋白。
20. 根据权利要求1或2的用途,其中所述组合物为粉末形式,其具有小于0.2的水活度。
21. 根据权利要求20的用途,其中所述水活度在0.19-0.05的范围。
22. 根据权利要求20的用途,其中所述水活度小于0.15。

长双歧杆菌和功能性胃肠病症

[0001] 本申请为2010年8月24日提交的发明名称为“长双歧杆菌和功能性胃肠病症”的PCT申请PCT/EP2010/062320的分案申请,所述PCT申请进入中国国家阶段日期为2012年4月24日,申请号为201080048017.4。

技术领域

[0002] 本发明一般地涉及益生菌的领域。具体而言,其涉及长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)NCC3001(ATCC BAA-999)(下文将其称之为长双歧杆菌ATCC BAA-999)及其在可摄入的组合物中的应用。本发明中所述的组合物可以用于治疗或预防功能性胃肠(GI)病症。

背景技术

[0003] 功能性胃肠病症(FGIDs)是包括肠易激综合征(IBS)和功能性消化不良在内的一组疾病,它们是具有高发病率的慢性病,其特征在于腹部不适或疼痛、胃气胀和在IBS的情况中的改变的大便习惯(腹泻和/或便秘)。

[0004] 在普通人群中FGIDs的发病率相对高,范围在15%-30%,造成可观的经济负担。已经认为在8个最工业化的国家中每年仅IBS单独的直接成本目前在大约410亿美元,同时具有相当多的其它间接成本(例如工作缺勤等)。目前对FGIDs的治疗表明至多有边际效应,这在历史上与对该疾病的发病机理知之甚少有关。

[0005] IBS的精确的病理生理学仍有待解释。

[0006] 最近的研究已经描述了IBS患者中的粘膜炎症和肠道微生物群落的变化以及与肠道感染有关的疾病。

[0007] 某些益生菌表现出抗细菌、抗病毒和抗炎的性质和它们能够恢复肠道微生物平衡的事实表明其可以成为针对IBS的合适的治疗剂。

[0008] 迄今为止,已经公开了若干关于不同益生菌在IBS个体上的作用的研究。这些研究表明益生菌的应用可以与IBS症状的改善联系起来,并且在IBS中并非全部益生菌都具有相等的效力。

[0009] 最近进行的若干荟萃分析的结论是对其他的益生菌的效力的论述没有充分的数据(Lynne V McFarland等人,World J Gastroenterol 2008May 7;14(17):2650-2661; Nourieh Hoveyda等人,BMC Gastroenterology 2009,9:15)。

[0010] 因此,本发明的目的是改进现有技术并且特别是提供能够用于治疗或预防功能性胃肠病症的组合物,所述的组合物包含有效的、容易获得的、低价的和能够安全给药且没有不希望的副作用的可选择的菌株。

[0011] 本发明人已经解决了这种需要。他们惊讶地发现其能够通过独立权利要求的主题来实现该目的。从属权利要求进一步发展本发明的构思。

发明内容

[0012] 已经发现治疗和/或预防功能性胃肠病症的效力取决于所用的细菌的属、种和菌株。

[0013] 因此,本发明的1个实施方案是用于治疗 and/或预防功能性胃肠病症的组合物,所述的组合物包含长双歧杆菌ATCC BAA-999和/或其发酵的生长培养基。

[0014] 本发明也涉及长双歧杆菌ATCC BAA-999在制备治疗和/或预防功能性胃肠病症的组合物中的应用。

[0015] 长双歧杆菌ATCC BAA-999是长双歧杆菌种的1种菌株,发现其特别有效地实现本发明的目的。

[0016] 有利的是,长双歧杆菌ATCC BAA-999可商购得到,其已被检验并且发现其例如可用于加入到食品中。

[0017] 长双歧杆菌ATCC BAA-999(BL999)可以从专业供应商购买得到,例如从日本的Morinaga Milk Industry Co.Ltd.,以BB536为商标。

[0018] 长双歧杆菌ATCC BAA-999(BL999)可以根据任意合适的方法进行培养。例如,可以将其加入到冷冻干燥或喷雾干燥形式的产品中。

[0019] 术语“长双歧杆菌ATCC BAA-999(BL999)”是指包括该细菌、该细菌的片段和/或该细菌发酵的生长培养基。

[0020] 组合物可以是任意的组合物,但优选是经口、胃肠内或直肠给药的组合物。

[0021] 例如,组合物可以是可食用的组合物。

[0022] “可食用的”是指经批准用于人或动物食用的材料。

[0023] 通常,组合物可以选自食品组合物、宠物食品组合物、膳食补充剂、营养制品、营养配方食品、饮料和/或医药组合物。

[0024] 如果本发明的组合物是食品组合物,其优势在于该组合物不但能够在药房、药店中销售,也能够正规的超级市场中销售,在该处任何人可以容易地得到组合物。

[0025] 食品组合物的通常讨人喜欢的味道进一步有助于产品的可接受性。特别是幼儿或宠物可能更加容易地食用具有通常喜欢的味道的组合物。

[0026] 适用于本发明的食品的实例是酸乳、乳、调味乳、冰淇淋、即食甜品、用例如乳或水重构的粉末、巧克力奶饮料、麦芽饮料、速食食品、用于人的方便菜肴或饮料、或者用于宠物或家畜的代表全部膳食或部分膳食的食品组合物。

[0027] 因此,在1个实施方案中,本发明的组合物是用于人、宠物或家畜的食品。

[0028] 组合物可以用于动物,所述的动物选自狗、猫、猪、牛、马、山羊、绵羊或家禽。

[0029] 在优选的实施方案中,组合物是用于成年物种、特别是成年人的食品。

[0030] 本发明的组合物可以进一步含有保护性水胶体(例如树胶、蛋白质、改性淀粉)、粘合剂、成膜剂、成胶囊剂/材料、壁/壳材料、基质化合物、包衣、乳化剂、表面活性剂、增溶剂(油、脂肪、蜡、卵磷脂等)、吸附剂、载体、填充剂、辅助化合物(co-compounds)、分散剂、润湿剂、加工助剂(溶剂)、助流剂、掩味剂、增重剂、成胶剂、胶凝剂、抗氧化剂和抗微生物剂。组合物也可以含有常规的药物添加剂和辅助剂、赋形剂和稀释剂,非限制性地包括水、任意来源的明胶、植物胶、木质素磺酸盐、滑石粉、糖、淀粉、阿拉伯胶、植物油、聚亚烷基二醇,矫味剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲剂、润滑剂、着色剂、润湿剂、填充剂等。在全部情况中,根据其对接受者的适用性选择所述的进一步的组分。

[0031] 组合物可以是营养上完全的配方食品。

[0032] 根据本发明的组合物可以包含蛋白质源。

[0033] 可以使用任意合适的膳食蛋白质,例如动物蛋白(例如乳蛋白、肉蛋白和卵蛋白);植物蛋白(例如大豆蛋白、小麦蛋白、大米蛋白和豌豆蛋白);游离氨基酸的混合物;或其混合物。特别优选乳蛋白(例如酪蛋白和乳清蛋白)和大豆蛋白。

[0034] 蛋白质可以是完整的或者水解的或者完整的和水解的蛋白质的混合物。可能需要供应部分水解的蛋白质(水解程度在2和20%之间),例如用于有发生牛奶过敏症风险的人个体和/或动物。

[0035] 而且,预水解的蛋白质源通常更容易被受损伤的胃肠道消化和吸收。

[0036] 如果需要水解的蛋白质,水解过程可以根据需要和本领域已知的技术进行。可能需要供应部分水解的蛋白质(水解程度在2和20%之间)。

[0037] 例如,通过在1个或多个步骤中酶促水解乳清蛋白成分可以制备乳清蛋白水解产物。如果作为起始原料使用的乳清蛋白成分基本上没有乳糖,那么发现在水解过程中蛋白质经历更少的赖氨酸阻断。这能使赖氨酸阻断的程度从总赖氨酸重量的约15%减少到约10%重量的赖氨酸;例如约7%重量的赖氨酸,这极大地改善了蛋白质源的营养质量。

[0038] 组合物也可以含有碳水化合物源和脂肪源。

[0039] 如果组合物包括脂肪源,脂肪源优选地提供组合物能量的5%-40%;例如20%-30%的能量。使用芥花油(canola oil)、玉米油和高油酸葵花籽油的混合物可以得到合适的脂肪谱。

[0040] 可以将碳水化合物源加入到组合物中。

[0041] 碳水化合物源优选地提供组合物的40%-80%的能量。可以使用任意合适的碳水化合物,例如蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、玉米糖浆固形物、麦芽糖糊精及其混合物。如果需要也可以加入膳食纤维。未经酶消化的膳食纤维通过小肠并且发挥天然的填充剂和轻泻药的作用。膳食纤维可以是可溶的或不可溶的,并且通常优选这两种类型的混合物。合适的膳食纤维源包括大豆、豌豆、燕麦、果胶、瓜尔胶、部分水解的瓜尔胶、阿拉伯胶、低聚果糖、酸性寡糖、半乳寡聚糖、唾液酸基乳糖和来源于动物乳的寡糖。优选的纤维混合物是菊粉与较短链的低聚果糖的混合物。优选地,如果存在纤维,纤维含量为2-40g/1所消耗的组合物,更优选为4-10g/1。

[0042] 组合物也可以含有矿物质和微量营养素,例如根据政府部门(例如USRDA)推荐的微量元素和维生素。例如,组合物每日剂量可以含有1种或多种以下范围的以下微量营养素:300-500mg钙,50-100mg镁,150-250mg磷,5-20mg铁,1-7mg锌,0.1-0.3mg铜,50-200μg碘,5-15μg硒,1000-3000μgβ-胡萝卜素,10-80mg维生素C,1-2mg维生素B1,0.5-1.5mg维生素B6,0.5-2mg维生素B2,5-18mg烟酸,0.5-2.0μg维生素B12,100-800μg叶酸,30-70μg生物素,1-5μg维生素D,3-10μg维生素E。

[0043] 如果需要,可以将1种或多种食品级乳化剂加入到组合物中;例如二乙酰酒石酸单和二甘油酯、卵磷脂和单和二甘油酯。类似地可以包括合适的盐和稳定剂。

[0044] 组合物可以是口服和/或肠内给药的;例如以用乳或水重构的粉末的形式。

[0045] 根据本发明的1个优选的实施方案,组合物包含至少另外1种其他的食品级的微生物。

[0046] “食品级”微生物是能安全地用于食物中的微生物。

[0047] 食品级微生物优选是食品级细菌或食品级酵母。食品级细菌可以选自乳酸菌、双歧杆菌、丙酸杆菌或其混合物。能够使用食品级酵母,例如酿酒酵母和/或鲍氏酵母菌。

[0048] 食品级细菌可以是益生菌。

[0049] “益生菌”是指对宿主的健康或幸福有益的微生物细胞制剂或微生物细胞成分。(Salminen S,Ouwehand A.Benno Y.等人,“益生菌:它们应当如何定义(Probiotics:how should they be defined)”Trends Food Sci.Technol.1999:10 107-10)。

[0050] 益生菌优选地选自乳酸菌、双歧杆菌、丙酸杆菌或其混合物。益生菌可以是具有被证实的益生菌特性的任意的乳酸菌或双歧杆菌。例如它们也能够促进双歧性(bifidogenic)肠道微生物丛的发育。

[0051] 合适的益生菌可以选自双歧杆菌属、乳酸杆菌属、链球菌属和酵母菌属或其混合物,特别是选自长双歧杆菌、乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、植物乳杆菌、唾液乳杆菌、屎肠球菌、鲍氏酵母菌和罗伊乳杆菌或其混合物,优选地选自约氏乳杆菌(NCC533;CNCM I-1225)、长双歧杆菌(NCC490;CNCM I-2170)、长双歧杆菌(NCC2705;CNCM I-2618)、乳双歧杆菌(2818;CNCM I-3446)、副干酪乳杆菌(NCC2461;CNCM I-2116)、鼠李糖乳杆菌GG(ATCC 53103)、鼠李糖乳杆菌(NCC4007;CGMCC 1.3724)、屎肠球菌SF 68(NCIMB10415),及其混合物。

[0052] 在本发明的优选的实施方案中,组合物进一步含有至少1种益生元。“益生元”是指用于促进肠内的益生菌生长的食物物质。

[0053] 因此,益生元能够促进肠内的某些食品级细菌、特别是益生菌的生长,并且因此能够增强长双歧杆菌ATCC BAA-999的作用。而且,某些益生元对例如消化具有积极作用。

[0054] 优选地,益生元可以选自寡糖并且任选地含有果糖、半乳糖、甘露糖、大豆和/或菊粉;膳食纤维;或其混合物。

[0055] 长双歧杆菌ATCC BAA-999可以以活细菌和灭活的非复制的细菌物种使用。

[0056] “非复制的”是指通过经典平板培养法不能检测到存活的细胞和/或菌落形成单位。这些经典平板培养法在微生物学书籍中总结概括:James Monroe Jay,Martin J.Loessner,David A.Golden.2005.现代食品微生物学(Modern food microbiology),第7版,Springer Science,New York,N.Y.790p。通常,没有存活的细胞能够显示如下:在用不同浓度的细菌制剂(“非复制的”样本)接种和在合适的条件(有氧和/或无氧气氛至少24小时)下孵育之后,在琼脂平板上没有可见的菌落或者在液体生长培养基中没有浑浊。

[0057] 优选至少部分的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是存活的并且优选地活着到达肠道。这样其能够持续在肠道中并且通过繁殖可以增大其效果。其也可以通过与共生的细菌和/或宿主相互作用来发挥作用。

[0058] 例如,对于特殊的无菌食品或药物,可能优选长双歧杆菌ATCC BAA-999以非复制的形式存在于组合物中。因此,在本发明的1个实施方案中,至少部分的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是非复制的。

[0059] 在治疗应用中,以足以至少部分地治疗或阻止疾病的症状及其并发症的量给予组合物。将足以实现这一目的的量定义为“治疗有效剂量”。用于该目的的有效量将取决于许

多本领域的技术人员已知的因素,例如疾病的严重性和患者的体重和总体状况。

[0060] 在预防应用中,本发明的组合物以足以至少部分地降低发生疾病的风险的量给予易患或有风险罹患特定疾病的患者。将该量定义为“预防有效剂量”。而且,精确的量取决于许多患者特异性的因素,例如患者的健康状况和体重。

[0061] 通常,长双歧杆菌ATCC BAA-999将以治疗有效剂量和/或预防有效剂量给药。

[0062] 如果长双歧杆菌ATCC BAA-999以可存活的形式存在,鉴于这些细菌能够寄居肠道并且繁殖,因此在理论上其以任意浓度都是有效的。

[0063] 对于本发明的组合物,通常优选组合物的每日剂量包含 10^4 - 10^{12} cfu(菌落形成单位)的长双歧杆菌ATCC BAA-999。长双歧杆菌ATCC BAA-999的特别合适的每日剂量为 10^4 - 10^{11} cfu,更优选为 10^4 - 10^{10} cfu。

[0064] 本发明的组合物也可以包含相对于每克组合物干重为 10^2 - 10^{10} cfu、优选 10^2 - 10^9 的菌落形成单位,更优选 10^2 - 10^8 cfu的长双歧杆菌ATCC BAA-999。

[0065] 在灭活的和/或非复制的长双歧杆菌ATCC BAA-999的情况中,通常优选本发明的组合物包含相对于每克组合物干重为 10^2 - 10^{10} 的长双歧杆菌ATCC BAA-999的非复制的细胞。长双歧杆菌ATCC BAA-999的特别合适的剂量是相对于每克组合物干重为 10^3 - 10^8 的非复制的细胞,更优选 10^5 - 10^8 的非复制的细胞。

[0066] 显然,非复制的微生物不形成菌落,因此,术语细胞理解为非复制的微生物的量,其由复制的细菌细胞的指定的量得到。这包括灭活的、非存活的或死亡、或者以片段(例如DNA或细胞壁材料)呈现的微生物。

[0067] 可以以水活度小于0.2、例如在0.19-0.05的范围内、优选小于0.15的粉末形式提供本发明的组合物。

[0068] 组合物可以是贮存稳定的粉末。低水活度提供贮存稳定性并且确保益生菌微生物(例如长双歧杆菌ATCC BAA-999)甚至在长时间存储之后仍将保持存活。水活度或 a_w 是系统中水的能量状态的量度。将其定义为在相同温度下水的蒸气压除以纯水的蒸气压;因此,纯蒸馏水具有恰好是1的水活度。

[0069] 此外或可选的,可以以包囊剂的形式提供益生菌微生物长双歧杆菌ATCC BAA-999。

[0070] 已经发现细菌的包囊剂具有治疗和技术优势。包囊增加细菌的存活,并且因此增加到达肠道的活细菌的数量。而且,逐渐释放细菌使得延长细菌对个体健康的作用。细菌可以是微囊密封的,例如如FR2443247(Societe des Produits Nestle)所述的,将其引入本文作为参考。简要地说,细菌可以经冷冻干燥或喷雾干燥并且将其加入凝胶中。

[0071] 本申请发明人特别惊讶地发现能够成功地使用本发明的组合物来显著增加海马区BDNF表达。

[0072] BDNF(脑源性神经营养因子)来自多肽生长因子的独特家族的生长因子。BDNF和其他的神经营养因子(例如NGF(神经生长因子)、NT-3(神经营养因子-3)和NT-4(神经营养因子-4))对于神经系统的健康和良好状态是必不可少的。

[0073] 该作用可能解释所发现的对功能性肠病症的作用。

[0074] 术语“功能性胃肠病症”是指一类肠紊乱,其特征不在于没有能够解释症状的结构或生化病因的慢性腹部不适。

[0075] 功能性胃肠病症是本领域的技术人员所熟知的,并且其例如被记载并定义为具有归因于中或下胃肠道的症状的功能性胃肠病症,例如Longstreth等人在肠病学(GASTROENTEROLOGY)2006;130:1480-1491中所述。

[0076] 功能性胃肠病症可以选自肠易激综合征;功能性消化不良;功能性便秘,功能性腹泻;功能性腹痛;功能性气胀,上腹部疼痛综合征,餐后不适综合征(Postprandial Distress Syndrome),或其组合。

[0077] 例如,可以由本发明的主题治疗或预防的功能性胃肠病症包含与焦虑相关的功能性胃肠病症。

[0078] 焦虑是心理和生理状态,其导致通常与不安、恐惧或担忧相关的不愉快的感觉。例如焦虑是正常的应激反应。其可以帮助人在工作中或在学校处理困难的情况,但是当过度时导致焦虑障碍,与焦虑相关的功能性胃肠病症是其中的一类。

[0079] 不希望受当前理论的限制,发明人认为本发明的组合物起效所遵循的潜在的机理与双向的微生物-肠-大脑轴的调节有关,该轴可能显著地与心理因素相关。

[0080] 本领域的技术人员清楚,在不脱离所公开的本发明的范围的情况下,本说明书中所述的任意特征能够进行自由组合。特别地,用于描述本发明的组合物的全部特征可适用于本发明的用途,并且反之亦然。

[0081] 本发明的其他特征和优点来自于以下的实施例和附图。

附图说明

[0082] 图1表示暗盒/亮盒试验的结果:受到鼠鞭虫(*Trichuris muris*, Tm)感染的小鼠在亮盒中所花的总时间、重新进入亮盒的潜伏期和步下的潜伏期。Tm-培养基和Tm-长双歧杆菌是指分别用新鲜培养基(阴性对照)和长双歧杆菌ATCC BAA-999处理的Tm感染的小鼠;显示了用鼠李糖乳杆菌(*L. rh*)菌株处理的Tm组用于比较。

[0083] 图2表示受到鼠鞭虫(Tm)感染的小鼠的大脑海马区区域中原位杂交的结果。Tm-长双歧杆菌是用长双歧杆菌ATCC BAA-999处理的Tm感染的小鼠;显示了用鼠李糖乳杆菌菌株处理的Tm小鼠组用于比较。

[0084] 通过自动射线照相术和图像分析(右上图)进行35S信号的定量。

[0085] 图3表示通过在受到鼠鞭虫(Tm)感染的小鼠中的髓过氧化物酶活性分析(左图)和单核细胞浸润(右图)测量的结肠炎症所获得的结果。Tm-培养基和Tm-长双歧杆菌是用新鲜培养基(阴性对照)和长双歧杆菌ATCC BAA-999处理的Tm感染的小鼠;显示了用鼠李糖乳杆菌菌株处理的小鼠Tm组用于比较。

具体实施方式

[0086] 实施例:

[0087] 材料和方法

[0088] 细菌培养条件:

[0089] 益生菌(长双歧杆菌ATCC BAA-999和鼠李糖乳杆菌NCC4007进行对比)在缺氧条件下在Man-Rogosa-Sharpe(MRS, BioMerieux)培养基(双歧杆菌的含有0.5%半胱氨酸)中生长。在37℃、24h之后,通过在600nm测量光密度估计细菌的数量($10D_{600} = 10^8$ 细菌/mL)。细

菌细胞通过在4℃以5000X g离心15分钟沉淀,并且进一步以 10^{10} /mL的浓度重新混悬在所用培养基中。1mL的等分试样保持冷冻直至使用。

[0090] 动物:

[0091] 购买鼠龄在6-8周的雄性BALB/c或AKR小鼠(Harlan,加拿大)并在麦克玛斯特大学中心动物房(McMaster University Central Animal Facility)饲养在常规的无特定病原体的单元中。全部实验都经麦克玛斯特大学动物关怀委员会(McMaster University Animal Care Committee)批准实施。

[0092] 设计:

[0093] 慢性鼠鞭虫感染:

[0094] 用鼠鞭虫(300枚卵/小鼠)($n=26$)或用安慰剂($n=9$)管饲雄性AKR小鼠。然后从第30天用鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌或新鲜的MRS管饲被感染的小鼠10天。未被感染的小鼠从第30天至第40天每天用新鲜的MRS管饲。在给予益生菌或安慰剂的最后,小鼠经历暗盒/亮盒和步下试验。然后处死小鼠,获得组织样本。将结肠样本固定在福尔马林中用于组织学分析或者快速冷冻用于MPO测定。将大脑快速冷冻在液氮中并且贮藏用于原位杂交。

[0095] 行为测试:

[0096] 暗盒/亮盒:

[0097] 使用如文献中所述的暗盒/亮盒分别评价小鼠中的焦虑行为。简言之,将每一只小鼠置于照亮的亮盒(30x30cm)的中央,亮盒通过开口(10x3cm)连接到较小的暗盒(30x15cm)。通过数码摄像机记录在亮盒中的每一只小鼠的运动行为10分钟,并且将其储存在计算机中用于离线分析。由设盲的观测者评价若干参数,包括亮盒中所花费的总时间、重新进入亮盒的潜伏期(在第一次进入后在暗盒中所花费的时间)和跨界的数量(从暗盒到亮盒穿过的次数)。

[0098] 步下试验:

[0099] 使用如文献中所述的步下试验评价焦虑行为。简言之,将每一只小鼠置于位于黑色地板中部的升高的平台(直径7.5cm,高3cm)的中央。通过秒表测量从底座步下的潜伏期;试验的最大持续时间是5分钟。

[0100] 组织学:

[0101] 将结肠样本固定在10%福尔马林中,然后用苏木精-曙红染色。在光学显微镜下检查载玻片,从而为急性和慢性炎症性浸润分级。

[0102] 髓过氧化物酶活性分析:

[0103] 为了评价急性肠炎,在如前所述的冷冻的组织上进行髓过氧化物酶活性(MPO)分析。MPO活性表示为单位/mg组织,其中将1个单位的MPO定义为在室温在1分钟内能够将 $1\mu\text{mol}$ 过氧化氢转化为水的酶的量。

[0104] 在CNS中的原位杂交:

[0105] 通过在如前所述的冷冻的大脑切片上使用 ^{35}S -标记的RNA探针进行原位杂交,评价在海马区中的BDNF和在下丘脑(室旁核)中的CRH的水平(Whitfield等人,1990;Foster等人,2002)。简言之,移除大脑并且通过在 -60°C 浸入2-甲基丁烷中进行快速冷冻并且在 -70°C 贮存。将低温恒温切片 $12\text{-}\mu\text{m}$ 厚的冠状部分融裱在明胶涂覆的载玻片上,干燥和在 -35°C 贮存。组织切片用4%甲醛进行固定,用在0.1M三乙醇胺-HCl、pH 8.0中的0.25%醋酸酐进

行乙酰化,脱水和用氯仿去脂。使用Riboprobe System(Promega Biotech,Burlington,ON)分别用 α -35S-UTP(比活性 $>1000\text{Ci}/\text{mmol}$;Perkin-Elmer,Boston,MA)和T3和T7聚合酶从线性化质粒转录反义BDNF核糖核苷酸探针(来自加利福尼亚欧文大学的Dr.J.Lauterborn和Dr.C.Gall的赠送)和反义CRH核糖核苷酸探针(来自辛辛那提大学的Dr.James Herman的赠送)。将放射标记的探针稀释在杂交缓冲液(0.6M NaCl , $10\text{mM Tris pH } 8.0$, $1\text{mM EDTA pH } 8.0$, 10% 右旋糖酐硫酸酯, 0.01% 剪切的鲑鱼精子DNA, 0.05% 总酵母RNA,XI型, 0.01% 酵母tRNA, 1X Denhardt 氏溶液)中,并且将其应用于大脑切片(大约 $500,000\text{CPM}/\text{切片}$)。载玻片在湿润的箱中在 55°C 孵化过夜。为了减少探针的非特异性结合,载玻片在室温在 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 核糖核酸酶溶液中洗涤30分钟,然后分别在 50°C 在 2XSSC 中、在 55°C 和 60°C 在 0.2XSSC 中各洗涤1小时。载玻片进行脱水和风干用于自动射线照相术。将载玻片和 ^{14}C 塑料标准品置于靠近胶片(BioMax MR;Eastman Kodak,Rochester,NY)的x射线盒中5天并显像(Kodak医学X射线处理器)。大脑切片和标准品的自动射线照相的胶片图像用具有60mm Nikon镜头的固态照像机使用QCapture软件(Qicam;Quorum Technologies Inc.,Guelph,ON)和具有图像软件的基于苹果电脑的图像分析系统(<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>)进行数字化。通过在显示器上描绘结构测量透过胶片的透光率。对于BDNF mRNA,使用用于标准品的Rodbard曲线将透光率转化为放射性水平。对于CRH mRNA,使用密度分割特征测量透光率和mRNA信号的面积。然后计算的DPM与面积相乘从而产生积分密度。直接从捕获的图像进行图解。

[0106] 统计分析:

[0107] 数据以适当的平均值 $\pm$ 标准差或具有四分位数的范围的中值呈现。使用适当的双向ANOVA检验或非配对t检验分析数据。将 <0.05 的p值视为统计学上显著的。

[0108] 结果:

[0109] 慢性感染了寄生虫鼠鞭虫的小鼠在2个行为测试中表现出焦虑样行为的增加:1)在暗盒/亮盒试验中,被感染的动物表现出在亮盒中所花费的时间的减少和重新进入亮盒的潜伏期的增加;2)在步下试验中,感染增加了从底座上步下的潜伏期(图1)。用长双歧杆菌ATCC BAA-999处理、但不用鼠李糖乳杆菌NCC4007处理导致焦虑样行为降低至正常状态。对行为的影响与仅用长双歧杆菌使海马区中的鼠鞭虫介导的BDNF水平降低的正常化相关(图2)。与之相反,用长双歧杆菌以及用鼠李糖乳杆菌处理导致以前由鼠鞭虫感染引起的髓过氧化物酶活性和单核浸润的降低(图3),这表明行为的正常化是不依赖于细菌的抗炎作用。

[0110] 实施方案:

[0111] 1.组合物,其包含用于治疗 and/或预防功能性胃肠病症的长双歧杆菌ATCC BAA-999。

[0112] 2.根据实施方案1的组合物,其中功能性胃肠病症选自肠易激综合征;功能性消化不良;功能性便秘,功能性腹泻;功能性腹痛;功能性气胀,上腹部疼痛综合征,餐后不适综合征,或其组合。

[0113] 3.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中功能性胃肠病症是与焦虑相关的。

[0114] 4.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中组合物选自食品组合物、宠物食品组合物、膳食补充剂、营养制品、营养配方食品、饮料和/或医药组合物。

[0115] 5.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中组合物另外包含至少1种其他类型

的食品级细菌,其中食品级细菌优选地选自乳酸菌、双歧杆菌、丙酸杆菌或其混合物。

[0116] 6.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中组合物进一步含有至少1种益生元。

[0117] 7.根据实施方案7的组合物,其中益生元选自寡糖并且任选地含有果糖、半乳糖、甘露糖、大豆和/或菊粉;膳食纤维;或其混合物。

[0118] 8.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中至少5%、优选至少10%、更优选至少15%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是活的。

[0119] 9.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中至少80%、优选至少90%、更优选至少95%的长双歧杆菌ATCC BAA-999在组合物中是非复制的。

[0120] 10.根据之前的实施方案任一项的组合物,其中组合物每日剂量包含 10^4 - 10^{10} 个细胞的长双歧杆菌ATCC BAA-999。

[0121] 11.根据实施方案1-10任一项的组合物,其中组合物包含相对于每g组合物干重为 10^2 - 10^8 个细胞的长双歧杆菌ATCC BAA-999。

[0122] 12.根据之前的实施方案任一项的组合物,其进一步含有蛋白质源,所述的蛋白质源包含水解的乳清蛋白。

[0123] 13.粉末形式的根据之前的实施方案任一项的组合物,其具有小于0.2的水活度,例如在0.19-0.05的范围,优选小于0.15。

焦虑样行为

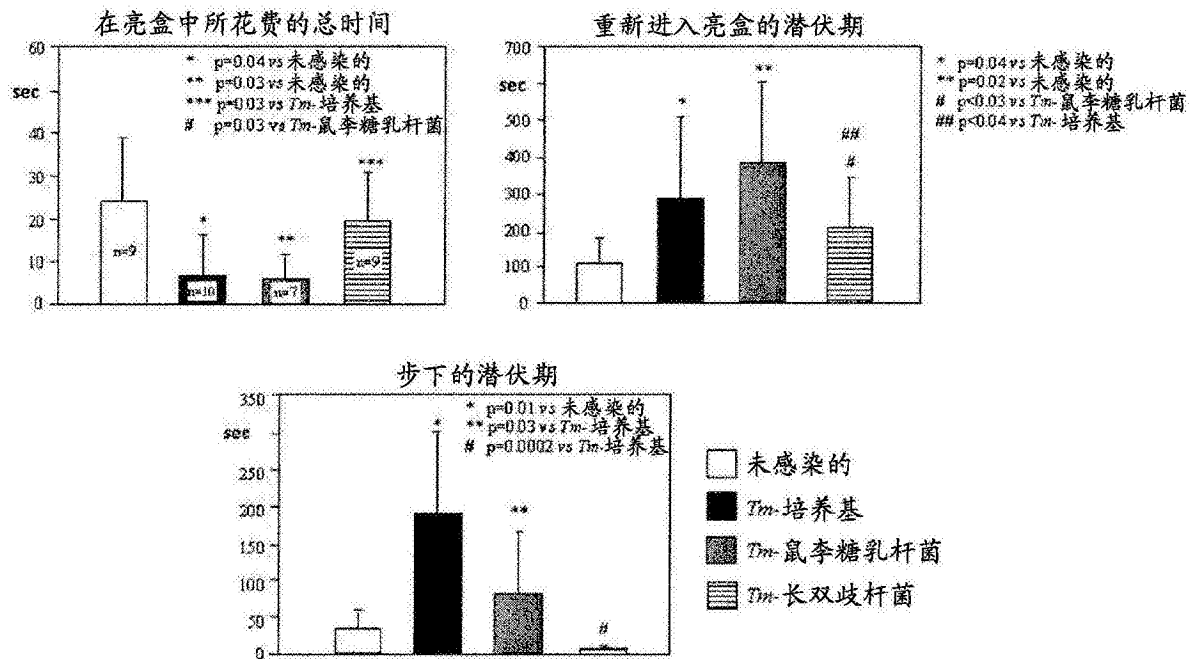


图1

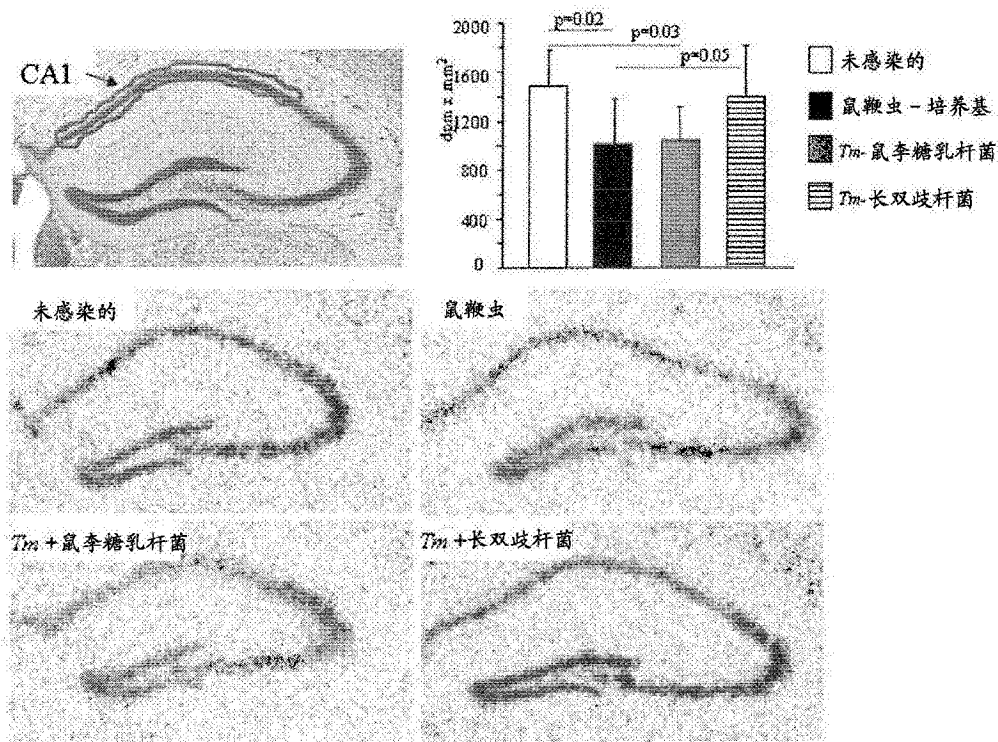


图2

结肠炎症

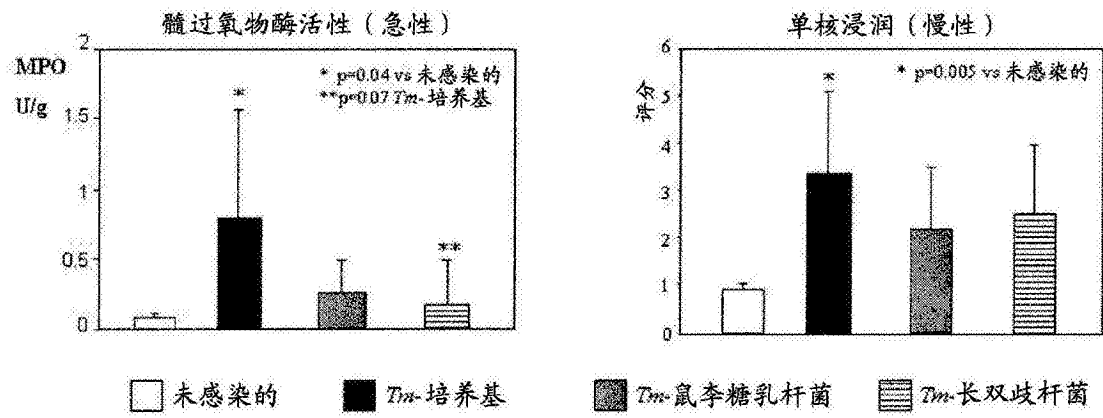


图3