(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105188723 A
(43)申请公布日 2015.12.23

(21)申请号 201480020011.4

(22)申请日 2014.04.03

(30)优先权数据
1350414-7 2013.04.03 SE
1351571-3 2013.12.20 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2014/050399 2014.04.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/163568 EN 2014.10.09

(71)申请人 普罗比公司
地址 瑞典隆德

(72)发明人 A·伯格伦 N·拉斯森 G·昂宁
I·阿伦·拉佐 K·肖格恩
C·奥尔松

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
代理人 王芝艳 吴小瑛

(51)Int.Cl.
A61K 35/74(2015.01)
A61P 19/10(2006.01)
C12N 1/20(2006.01)
C12R 1/225(2006.01)
C12R 1/25(2006.01)

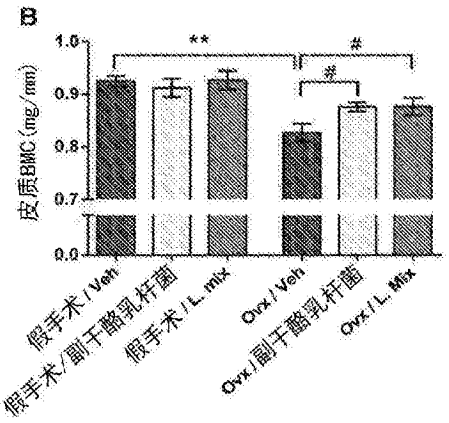
权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

益生菌菌株用于治疗或预防骨质疏松

(57)摘要

本发明涉及选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株，或者选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株与选自植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株的组合，用于治疗或预防骨质疏松或者用于提高哺乳动物（优选人）中Ca^{2+}离子的吸收。



CN 105188723 A

1.选自副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)的至少一种益生菌菌株,或者选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株与选自植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)的至少一种益生菌菌株的组合,在哺乳动物中,优选人中用于治疗或预防骨质疏松或者用于提高Ca^{2+}离子的吸收。

2.权利要求1的至少一种益生菌菌株的用途,通过防止皮质骨质流失、骨矿物质含量流失和骨吸收用于治疗或预防骨质疏松。

3.权利要求1的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株选自副干酪乳杆菌8700:2—DSM 13434,和副干酪乳杆菌02:A—DSM 13432。

4.权利要求1-3任一项的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株选自植物乳杆菌299—DSM 6595,植物乳杆菌299v—DSM 9843,植物乳杆菌HEAL 9—DSM 15312,植物乳杆菌HEAL 19—DSM 15313,和植物乳杆菌HEAL 99—DSM 15316。

5.权利要求1-4任一项的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述至少一种益生菌菌株存在于额外包含至少一种载体的组合物中。

6.权利要求5任一项的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述组合物包含含量为80-320mg,优选120-240mg的Ca^{2+}。

7.权利要求5-6任一项的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述组合物选自由以下组成的组:食品、饮食补充剂、医疗食物、功能食物或营养产品。

8.权利要求1-7任一项的至少一种益生菌菌株的用途,其中所述菌株的存在量是从大约$1x10^{6}$至大约$1x10^{14}$CFU、优选从$1x10^{8}$至$1x10^{12}$并且更优选从$1x10^{9}$至$1x10^{11}$。

9.权利要求1-8任一项的至少一种益生菌菌株的用途,用于治疗或预防与更年期有关的骨质疏松。

益生菌菌株用于治疗或预防骨质疏松

发明领域

[0001] 本发明涉及选自副干酪乳杆菌 (Lactobacillus paracasei) 的至少一种益生菌菌株，或者选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株与选自植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum) 的至少一种益生菌菌株的组合，在哺乳动物（优选人）中用于治疗或预防骨质疏松或者用于提高 Ca^{2+} 离子的吸收。

背景技术

[0002] 骨质疏松症是其中骨变脆并且更容易骨折的疾病。当测量骨中钙和矿物质的量时，通常骨密度流失。骨质疏松是最常见的骨的疾病类型。超过 50 岁的女性中有大约一半在其生命过程中会患有髋关节、腕关节或椎骨（脊柱骨）的骨折。骨是活组织。现有的骨不断被新骨代替。当身体不能形成足够的新骨、当太多现有的骨被身体吸收或上述两种情况皆存在时，发生骨质疏松。钙是骨形成所需的重要矿物质之一。如果不能获得足够的钙和维生素 D，或者身体没有从饮食中吸收足够的钙，骨将变脆并且更容易骨折。雌激素在绝经期女性中的下降和睾酮在男性中的下降是骨质流失的主要原因。

[0003] 由骨质疏松引起的骨折是一个重要的健康问题并给卫生保健系统带来巨大的经济负担。在西方世界中任何骨质疏松骨折的终生风险高（大约对于女性为 50％，对于男性为 20％），并且骨折与发病率和死亡率显著相关。皮质骨构成身体里大约 80％的骨，并且几项研究已经表明皮质骨是骨强度和因此的骨折易感性的主要决定因素。在 65 岁之后的骨质流失主要是由于皮质骨而非松质骨的流失 (Lancet, 2010, May 15；375(9727):1729-36)。

[0004] 骨骼是由形成骨的成骨细胞 (OB) 和吸收骨的破骨细胞 (OCL) 重建的。巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 提高 OCL 前体细胞的增殖和存活以及上调 OCL 中的核因子 kB 的受体激活物 (RANK) 的表达。这使得 RANK 配体 (RANKL) 结合并开始信号传导级联反应，导致 OCL 形成。RANKL 的作用可以被骨保护素 (OPG) 所抑制，骨保护素是 RANKL 的诱饵受体。

[0005] 已经明确建立了炎症和骨质流失之间的关联，并且在自身免疫疾病中，破骨细胞骨吸收是由活化的 T- 细胞产生的炎症细胞因子所驱动。此外，若干研究证实，由高敏 C 反应蛋白 (hsCRP) 血清水平的适当提升所表示的低度全身炎症与低 BMD、提高的骨吸收和增加的骨折风险有关。绝经后发生的雌激素不足导致破骨细胞的形成增加和存活延长。提出这是由于包括雌激素的免疫抑制作用丧失在内的多种因素引起的，导致促进破骨细胞生成的细胞因子的产生增加，以及雌激素对 OCL 的直接作用。与这些数据一致，炎症细胞因子 TNFα 和 IL-1 的阻断导致早期绝经后女性中骨吸收标记物的降低。

[0006] 在近些年中，已经广泛研究了肠道菌群 (gut microbiota，GM) 对健康和疾病二者的重要性。GM 由数万亿的细菌组成，其总共含有的基因是人类基因组的 150 倍。尽管是一个独特的群体，但其在出生时即被获取并且已经明显与人类基因组共同进化，并且被认为是以多种方式与其宿主沟通和影响宿主的多细胞机体。GM 的组成受到多种环境因素的调节，如饮食和抗生素治疗。由肠道细菌产生的分子可同时是有益的和有毒的，并且已知影响

肠道的内分泌细胞、肠神经系统、肠道渗透性和免疫系统。据推测，被扰乱的微生物组成参与多种肠道内和外的炎症病况，包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、多发性硬化症、糖尿病、食物过敏、湿疹和哮喘以及肥胖和代谢综合征。

[0007] 益生菌细菌被定义为活的微生物，当以合适的量被施用时其赋予宿主健康益处，并且被认为改变了肠道菌群的组成。所提出的内在机制是多方面的，包括增加的矿物质的溶解性和吸收、增强的屏障功能和免疫系统的调节。

[0008] 在 Gilman et al,The effect of Probiotic Bacteria on Transepithelial Calcium Transport and Calcium uptake in Human Intestinal-like Caco-2cells,Curr. Issues Intestinal Microbial.7:1-6 中，测试了一株唾液乳杆菌 (Lactobacillus salivarius,UCC 118) 和一株婴儿双岐杆菌 (Bifidobacterium infantis,UCC35624) 在培养的人小肠样 Caco-2 细胞中的钙摄取和跨上皮钙转运。所述菌株对完全分化的 16 天龄的 Caco-2 细胞中的跨上皮钙转运没有作用。暴露于唾液乳杆菌的细胞中，24h 后进入 Caco-2 单层细胞的钙摄取显著更高。

[0009] WO99/02170 记载了乳杆菌在制备用于促进或增加从饮食中吸收如钙、锌、铁和镁的矿物质的非发酵肠道组合物中的用途。该文中所进行的支持所要求保护的吸收的实验是使用小肠 Caco-2 细胞系（致癌细胞系）的钙转运的体外模型。

[0010] KR101279852 公开了用于预防或治疗骨质疏松的组合物，其除了特定乳酸菌菌株如保藏号 KCTC11870BP 的嗜热链球菌 (Streptococcus thermophilus)、保藏号 KCTC 11868BP 的鼠李糖乳杆菌 (Lactobacillus rhamnosus) 和保藏号 KCTC11866BP 的副干酪乳杆菌之外，还含有钙和镁。

[0011] 在本领域仍然需要发现针对人的骨质疏松的有效预防和治疗方法。

[0012] 发明概述

[0013] 在一个方面，本发明涉及选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株，或者选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株与选自植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株的组合，在哺乳动物（优选人）中治疗或预防骨质疏松或者用于提高 Ca^{2+} 离子的吸收。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 公开了实验 1 和 2 所公开的用不同细菌菌株所测试的 Ca^{2+} 转运。

[0016] 图 2 公开了实验 1 和 2 中描述的 2h 后细胞中剩下的细胞内的 Ca^{2+}。

[0017] 图 3 公开了实验 3 的实验设计和体重。实验设计概要 (A)。在去卵巢 (ovx) 或假手术 (sham surgery) 之前两周开始的 6 周期间，用媒介 (veh)、单个乳杆菌 (L) 菌株（副干酪乳杆菌）或三种菌株的混合物 (L.mix) 处理八周龄的小鼠。以 10^9 的菌落形成单位 (cfu)/ml 在饮用水中给予乳杆菌菌株，而对照小鼠接受带有媒介的自来水。收集组织用于后续分析时，小鼠在研究结束时为 14 周龄。与在益生菌处理之后没有区别的假手术组小鼠相比，Ovx 带来预期的体重增加 (B)。结果表示为平均值 ±SEM(n = 9-10)，**p ≤ 0.01。Student's t 检验 ovx vs 假手术。

[0018] 图 4 公开了益生菌保护小鼠免受 ovx 诱导的皮质骨质流失。在 ovx 或假手术之前两周开始的 6 周期间，用媒介 (veh)、单个乳杆菌 (L) 菌株（副干酪乳杆菌）或三种菌株的混合物 (L.mix) 处理八周龄的小鼠，以研究益生菌处理对于 ovx 诱导的骨质流失的预防作用。在实验结束时，以高分辨率 μCT 和外周定量计算机断层扫描 (pQCT) 分析切下的股骨。

来自用 veh 和 L.mix 处理的假手术和 ovx 组的一个皮质剖面的代表性 μCT 图 (A)。在股骨的中间骨干区域通过 pQCT 测量皮质骨矿物质含量 (BMC)(B) 和皮质面积 (C)。数值表示为平均值 ±SEM(n = 9-10)。**p ≤ 0.01，*p ≤ 0.05。Student's t 检验 ovx vs 假手术。#p ≤ 0.05，ANOVA，然后是 ovx 副干酪乳杆菌和 L.mix vs.ovx veh 组内 Dunnett 事后检验 (Dunnett's post hoc test)。

[0019] 图 5 公开了益生菌降低皮质骨中炎症细胞因子的表达和 RANKL/OPG 比。已知促进骨吸收的基因表达的 QRT-PCR 分析；(A) 肿瘤坏死因子 α (TNFα)，(B) 白介素 -1β (IL-1β)，(C) 白介素 -6(IL-6)，(D) 核因子 κB 的配体受体活化剂 (RANKL) 和骨保护素 (OPG) 的比，以及 (E)OPG、(F)RANKL 和已知促进骨形成的基因的单独的图；(G) Osterix，(H)1 型胶原 a1(Coll a1) 和 (I) 骨钙素，其来自在 ovx 或假手术之前两周开始的 6 周期间，用媒介 (veh) 或三种益生乳杆菌菌株的混合物 (L.mix) 处理的 14 周龄卵巢切除 (ovx) 的小鼠的皮质骨，以研究益生菌处理对于 ovx 诱导的骨质流失的预防作用。数值表示为平均值 ±SEM，n = 9-10。*P ≤ 0.05vs.veh 处理，Student's t 检验。

[0020] 图 6 公开了在经 veh 处理的小鼠中但没有在副干酪乳杆菌或 L.mix 处理的小鼠中，ovx 提高了钙的排泄分数 (fractional excretion)。在 ovx 或假手术之前两周开始的期间 6 周，已经用媒介 (veh)、单个乳杆菌 (L) 菌株（副干酪乳杆菌）或三种菌株的混合物 (L.mix) 处理 14 周龄的小鼠，测量来自上述小鼠的血清和尿中的钙和肌酸酐。用下式计算尿钙的排泄分数 FECa = (尿 Ca x 血清肌酸酐)/(血清 Ca x 尿肌酸酐)。在每组中值表示为平均值 ±SEM，每组中 n = 5-10。*p ≤ 0.05。Student's t 检验 ovx vs 假手术。#p ≤ 0.05，ANOVA，然后是 ovx 副干酪乳杆菌和 L.mix vs.ovx veh 组内 Dunnett 的事后检验 (Dunnett's post hoc test)。

[0021] 发明详述

[0022] 在一个实施方案中，本发明涉及选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株，或者选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株与选自植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株的组合，用于哺乳动物（优选人）中治疗或预防骨质疏松或者提高 Ca^{2+} 离子的吸收。

[0023] 在本发明的一个实施方案中，本发明涉及至少一种益生菌菌株，用于通过防止皮质骨质流失、通过防止骨矿物质含量流失和通过防止骨吸收用在骨质疏松的治疗或预防中。

[0024] 皮质骨构成身体里大约 80％的骨，并且几项研究已经表明皮质骨是骨强度和因此的骨折易感性的主要决定因素。在本发明的实验中已经表明，副干酪乳杆菌的种的益生菌菌株单独或与植物乳杆菌的种的菌株组合防止了皮质骨质流失。在本发明的实验中还表明，益生菌处理改变骨的免疫状态，造成骨吸收减弱。此外，本发明的实验中还显示与媒介组相比，益生菌组中骨矿物质含量没有降低（图 4a-c)。与媒介组相比，在两个益生菌组中皮质骨中的骨矿物质含量均更高 (p<0.05，图 4b)。

[0025] 本发明涉及选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株，或者至少一种副干酪乳杆菌与选自植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株的组合，在哺乳动物（优选人）中用于治疗或预防骨质疏松，用于防止骨矿物质含量流失，用于防止骨质流失。

[0026] 本发明涉及选自副干酪乳杆菌的至少一种益生菌菌株，或者至少一种副干酪乳杆菌与选自植物乳杆菌的至少一种益生菌菌株的组合，在哺乳动物（优选人）中用于防止骨

矿物质含量流失，用于防止骨质流失。

[0027] 在本发明的一个实施方案中，至少两种或更多种植物乳杆菌菌株与至少一种副干酪乳杆菌菌株一起组合使用。在另一个实施方案中，至少两种或更多种（例如三种或更多种）副干酪乳杆菌菌株与至少一种植物乳杆菌菌株一起组合使用。

[0028] 在本发明的一个实施方案中，益生菌菌株是活的、灭活的或者死的。在本发明的一个实施方案中，所述菌株存在于额外包含至少一种载体（carrier）的组合物中。所述载体可以是通常用于例如饮食补充剂中的任意载体。所述载体可以是任何基于谷物的载体，如能够用于功能食物中或其他任何类型的食物中的燕麦载体或大麦载体。所述载体可以是水或任何其他水性溶剂，其中在摄取前所述益生菌菌株是混合于其中的。

[0029] 在本发明的一个实施方案中，所述组合物以下面的形式补充有额外的Ca^{2+}：例如盐，如碳酸钙、氯化钙、柠檬酸的钙盐、葡萄糖酸钙、甘油磷酸钙、乳酸钙、氧化钙、硫酸钙。Ca^{2+}的建议每日摄取量（RDI）为800mg。在所述组合物中的Ca^{2+}的量可以在RDI的10-40％的范围内，优选在RDI的15-30％的范围内。因此，Ca^{2+}的量（例如以在组合物中盐的形式）可以在80-320mg、优选120-240mg的范围内。加入到组合物中的Ca^{2+}的量可以被调整至上述范围内的任意量，使得所述组合物仍然是稳定的并提供其有益作用。

[0030] 所述组合物可以是干燥的、非发酵的组合物或发酵过的组合物。在干燥的、非发酵的组合物的情况下，在所述组合物被个体摄取之后发生发酵，即在胃肠道中。此外，所述菌株可以作为冷冻干燥的菌株存在于组合物中。

[0031] 副干酪乳杆菌的益生菌菌株可以选自副干酪乳杆菌8700:2(DSM 13434)和副干酪乳杆菌02:A(DSM 13432)，植物乳杆菌的益生菌菌株可以选自植物乳杆菌299(DSM 6595)、植物乳杆菌299v(DSM 9843)、植物乳杆菌HEAL9(DSM 15312)、植物乳杆菌HEAL 19(DSM 15313)和植物乳杆菌HEAL 99(DSM 15316)。

[0032] 副干酪乳杆菌8700:2(DSM 13434)和副干酪乳杆菌02:A(DSM 13432)二者均于2000年4月10日保藏于德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganimsen und Zellkulturen GmbH)。

[0033] 植物乳杆菌HEAL 9(DSM 15312)、植物乳杆菌HEAL 19(DSM 15313)和植物乳杆菌HEAL 99(DSM 15316)于2002年11月28日保藏于德国微生物菌种保藏中心。

[0034] 植物乳杆菌299v(DSM 9843)于1995年3月21日和植物乳杆菌299(DSM 6595)于1991年7月5日保藏于德国微生物菌种保藏中心。

[0035] 在本发明的一个实施方案中，包括所述至少一种菌株的组合物可以选自食品、饮食补充剂、医疗食物、功能食物或营养产品。

[0036] 在所述组合物是食品的情况下，其可以选自包括以下的组：饮料、酸奶、果汁、冰激凌、面包、饼干、谷类食品、健康条(health bar)和涂抹料(spreads)。

[0037] 当上述任何菌株被用于如饮食补充剂的组合物中时，待添加的载体是本领域技术人员已知的。在饮食补充剂中正常使用的其他任何成分是本领域技术人员已知的，并且也可以与所述菌株一起常规添加。

[0038] 在本发明的一个实施方案中，上述益生菌菌株以从大约$1x10^{6}$至大约$1x10^{14}$、优选从$1x10^{8}$至$1x10^{12}$并且更优选从$1x10^{9}$至$1x10^{11}$CFU的量存在。所述菌株还可以上述量在水或其他任何水性媒介中单独用于，其中所述菌株在摄取前被加入或混合。

[0039] 本发明适用于哺乳动物，优选任何人，如老人、绝经后妇女和绝经前妇女，在所述人群中骨质流失、骨矿物质含量流失和提高的骨质流失或骨吸收是个问题或可能变成问题。

[0040] 健康的人为了保持健康并防止由骨质疏松而生病，也可以自然地从本发明获益。

[0041] 实验

[0042] 实验 1

[0043] 材料与方法

[0044] “转运溶液”；总体积 6ml

[0045] 转运溶液含有具有钙和镁、Hepes(2％)、谷氨酰胺 (4mM)、D-Glc(3.5g/l) 和 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(1.47g/l) 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS)。对该溶液的分析得出 $[Ca^{2+}]$ 为 10.65mM。

[0046] “基础溶液”

[0047] 与转运溶液类似，但没有添加外部钙。对该溶液的分析得出 $[Ca^{2+}]$ 为 1.22mM。

[0048] 实验 1：

[0049] 1. 仅转运溶液的对照

[0050] 2. 冻干植物乳杆菌 299v，0.788mg，对应于转运溶液中的 $4.02x10^8$个细菌 /6ml

[0051] 3. 植物乳杆菌 299v。转运溶液中的 $4.02x10^8$个细菌 /6ml

[0052] 4. 植物乳杆菌 299。转运溶液中的 $4.95x10^8$个细菌 /6ml

[0053] 5. 植物乳杆菌 HEAL 19，转运溶液中的 $4.95x10^8$个细菌 /6ml

[0054] 6.AMJ 1277。转运溶液中的 $4.95x10^8$个细菌 /6ml。AMJ 1277 是植物乳杆菌 299v 的突变形式。

[0055] 实验 2：

[0056] 1.CNCM I-2332，嗜酸乳杆菌 (Lactobacillus acidophilus)(La10)；转运溶液中的 $+4.95x10^8$个细菌 /6ml

[0057] 2. 植物乳杆菌 299v，转运溶液中的 $4.02x10^8$个细菌 /6ml

[0058] 3. 仅转运溶液的对照

[0059] 除了菌株 La10 外，所有菌株在 30ml 的 MRS 中有氧培养 (30℃，210rpm)。La10 在 37℃培养并在密封前用无菌过滤的氮气覆盖。接种的细胞数是 $3x10^8$个 / 瓶。细菌预培养过夜并且在接种时处于指数生长期。在 OD_{600}＝ 0.1-0.5 收获细胞并且针对每个菌株收集对应于 $4.02x10^8$个细胞的体积。将这些样品在 5000rpm 离心 3min，倒掉上清并将细胞重悬于 NaCl(0.9％) 中。将细胞再次离心并轻轻倒出上清。然后，现洗涤的沉淀悬于转运溶液中。

[0060] 在测试之前用 PBS 洗涤 Caco-2 细胞 (2 次)。向转运溶液加入 $^{45}CaCl_2$(74kBq/ml)。然后向生长于插入物的 Caco-2 细胞顶部加入 0.5ml 体积的混合物。然后每孔获得 6.7×10^7 个细菌 /ml。只将仅含有 HBSS 中的内源性 $[Ca^{2+}]$(1.22mM) 的基础溶液 (1.5ml) 加入基础室 (basal chamber)。允许悬液和对照对 Caco-2 细胞起作用 2h。然后，根据 WO99/02170 中所述的方法，吸干它们并且用冰冷的洗涤缓冲液洗涤细胞 3 次。此后，将 Caco-2 细胞在 0.5ml 的 NaOH(0.5M) 中裂解。收集基础室中的溶液用于在闪烁体 (Tri-carb2800TR, Perkin Elmer) 的帮助下测量转运。分析裂解物的 ^{45}Ca 和蛋白质含量。所有测量的 Ca^{2+} 转运 / 摄

取的数值针对各细胞中的蛋白质含量进行归一化。在测试溶液孵育之前和之后检查所有孔的跨上皮细胞电阻(TEER)。在试验之前和之后没有能够看到TEER的差异。测量TEER以确保上皮没有漏。试验后电阻的差异可能导致怀疑细胞间的连接可能已经被所使用的溶液破坏了。

[0061] 结果

[0062] 为了能够比较实验1和2的结果,来自所研究的菌株的转运和摄取数据已经针对没有细菌的对照溶液进行了归一化。因此,所有结果表示为对照的百分比(与WO99/02170中所做的类似)。还应当注意的是,实验1和2是分别在细胞培养的第16天和第21天完成的。在一般情况下,可以观察到所得到的结果的标准偏差是比较大的。这可能是由于细菌和Ca^{2+}的某种形式的聚集,导致Ca^{2+}可用性的变化。这没有在冷冻干燥的细菌中观察到,在冷冻干燥的细菌中与其余样品相比标准偏差比较小。

[0063] Ca^{2+}的转运

[0064] 实验1的结果显示,当菌株AMJ 1277存在时,Ca^{2+}转运显著改善(134.7±18.9%,P = 0.002),参见图1。其他菌株(冷冻干燥的和活的Lp299v、Lp299、Lp HEAL 19)在Ca^{2+}的转运方面均没有显著差异,参见表1。在La10和Lp299v进行测试的实验2中,当比较具有Lp299v的样品与没有细菌的对照时,没有检测到Ca^{2+}转运的显著差异(p = 0.2)。对于La10,观察到在存在相同细菌时Ca^{2+}转运的轻微下降(79.5±19.3%)并且该变化是显著的(p = 0.049)。

[0065] Ca^{2+}的摄取

[0066] 这里呈现的摄取数据显示在2小时后细胞中存在的Ca^{2+}的量。对于实际的摄取数据的估计,细胞内的Ca^{2+}的量应当被加入到外侧(lateral)隔室中所检测到的Ca^{2+}的量中。这些数据的总和描述了已经通过顶部膜转运的Ca^{2+}的总量。这些实验的结果整体显示,与无细菌的对照溶液相比,在细菌的存在下细胞内[Ca^{2+}]的降低,参见图2。但是,只有冻干的和活的Lp299v的差异是显著的(p = 0.04和p = 0.02)。注意,相比于所转运的Ca^{2+}量,中间的细胞内Ca^{2+}水平只有百分之几。由于这个原因,所证明的Ca^{2+}的摄取的作用并没有产生与对转运的作用相同的影响。这可以对冻干的和活的Lp 299v观察到,其具有较高的细胞内[Ca^{2+}]但并未证实在转运方面的改善。

[0067] 结论

[0068] 在菌株AMJ1277(突变的植物乳杆菌299v)存在下,与对照和剩余菌株相比均观察到提高的钙的转运和甚至钙的总摄取。因此,在所观察的菌株之间存在变化。

[0069] 实验3

[0070] 卵巢切除小鼠模型和益生菌处理

[0071] 卵巢切除(ovx)导致与改变的免疫状态有关的骨质流失。该实验的目的是确定益生菌处理是否保护小鼠免受ovx诱导的骨质流失。在ovx之前两周开始的6周期间,用在饮用水中给予的单个乳杆菌(L)菌株、副干酪乳杆菌DSM13434(L.para)或副干酪乳杆菌DSM13434、植物乳杆菌DSM 15312和DSM 15313三种菌株的混合物(L.mix)处理小鼠。

[0072] 六周龄C57BL/6N雌性小鼠购自Charles River(德国)。将小鼠在控制温度(22℃)和光照(12小时光照,12小时黑暗)下圈养在标准的动物设施中,并自由获得新鲜水和无大豆食物颗粒R70(Lactamin AB,Stockholm,Sweden)。用于骨质疏松的卵巢切除

(ovx)模型包括于用于治疗绝经后骨质疏松的试剂的临床前和临床评估的FDA指南中。益生菌处理开始于ovx前两周,以研究益生菌处理对ovx诱导的骨质流失的预防作用。在6周期间,用单个乳杆菌(L)菌株、副干酪乳杆菌DSM13434(L.para)或称为L.mix的副干酪乳杆菌DSM13434、植物乳杆菌DSM 15312和DSM 15313三种菌株的混合物处理小鼠。益生菌菌株基于它们的抗炎性质选择。以10^9的菌落形成单位(cfu)/ml在饮用水中给予乳杆菌菌株,而对照小鼠接受带有媒介的自来水。每天下午换水瓶。定期检查在水瓶中乳杆菌菌株的存活情况,并且24h后浓度下降一个对数单位至大约10^8cfu/ml。每只小鼠饮用平均4.5ml水/天。益生菌处理两周后,在异氟醚(Forene;Abbot Scandinavia,Solna,Sweden)吸入麻醉下,小鼠或进行假手术或ovx。手术后四周,在Ketalar/Domitor vet麻醉下腋静脉收集血液,并且将小鼠随后通过颈脱位杀死。立即取出用于RNA制备的组织并在液氮中速冻用于后续分析。切下骨并在4%多聚甲醛中进行固定。所有动物实验均由哥德堡大学动物研究的当地伦理委员会批准进行。

[0073] 外周定量计算机断层扫描(pQCT)

[0074] 用在70μm,as的分辨率操作的pQCT XCT RESEARCH M(version 4.5B,Norland,Fort Atkinson,Wl,USA)进行计算机断层扫描。在股骨的中间骨干区域离体分析皮质骨参数。

[0075] 高分辨率μCT

[0076] 通过使用1172模型μCT(Bruker micro-CT,Aartselaar,Belgium)在远端股骨进行高分辨率μCT分析。用0.5毫米的铝过滤器,以50kV的X射线管电压和201μA电流对股骨进行成像。扫描角旋转为180°,角度增量0.70°。各向同性的体素尺寸(voxel size)为4.48μm。采用NRecon(1.6.9版)进行扫描后重建。在股骨中,选择接近远端生长板的松质骨,用于在感兴趣的符合体积内(皮质骨除外)进行分析,所述分析开始于从生长板538.5μm的距离,并在近端方向延伸134.5μm的进一步的纵向距离。在股骨骨干区域进行皮质骨测量,在从生长板3.59mm的距离开始并在近端方向延伸134.5μm的进一步的纵向距离。对于BMD分析,用陶瓷标准样品校准设备。

[0077] RNA分离和实时PCR

[0078] 使用TriZol试剂(Inbitrogen,Lidingo,Sweden)从皮质骨(去除末端并用PBS在冷冻前冲洗出骨髓的股骨)和骨髓制备总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(#4368814,Applied Biosystems,Stockholm,Sweden)将RNA逆转录成cDNA。使用ABI Prism 7000序列检测系统(PE Applied Biosystems)进行RT-PCR分析。我们使用了来自Applied Biosystems(Sweden)的预先设计的RT-PCR测定用于分析IL-6(Mm00446190_m1)、IL-1β(Mm00434228_m1)、TNFα(Mm00443258_m1)、RANKL(Mm00441908_m1)、OPG(Mm00435452_m1)、Runx2(Mm00501580_m1)、Col1α1(Mm00801666_g1)、骨钙素(Mm01741771_g1)和TGFβ1(Mm03024053_m1)的mRNA水平。使用“标准曲线法”(用户电子公告2;PE Applied Biosystems)计算每个基因的mRNA丰度并针对18S(4308329)核糖体RNA的表达进行调整。

[0079] 血液分析

[0080] 根据制造商的说明书对以下进行分析:血清和尿钙(QuantiChrom™钙测定试剂盒(DICA-500),Bioassays systems,Hayward,CA,USA)、血清和尿肌酸酐(小鼠肌酸酐试剂盒,

Crystal Chem,Downers Grove,IL,USA)。作为骨吸收的标记物,使用 RatLaps ELISA 试剂盒 (Nordic BioScience Diagnostics,Herlev,Denmark) 评估了 I 型胶原蛋白片段的血清水平。用小鼠骨钙素放免测定试剂盒 (Immutopics,San Clemente,CA) 测定了作为骨形成的标记物的骨钙素的血清水平。

[0081] 流式细胞术

[0082] 使用注射器将 5ml PBS 冲洗一根股骨的骨腔收获骨髓细胞。515g 离心 5min 后,细胞沉淀重悬于 Tris 缓冲的 0.83％ NH_4Cl 溶液 (pH 7.29)5min 以裂解红细胞,然后在 PBS 中进行洗涤。在使用前骨髓细胞重悬于 RPMI 培养基 (PAA Laboratories,Pasching,Austria)。使用自动细胞计数仪 (Sysmex,Hamburg,Germany) 计算骨髓中白细胞的总数。对于流式细胞术分析,细胞用以下抗体进行染色 :别藻蓝蛋白 (APC) 标记的抗 CD4 的抗体用于检测 T 辅助细胞和异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗 CD8 细胞毒 T 细胞的抗体 (Beckton-Dickinson) 或甲藻叶绿素蛋白 (PerCP) 标记的抗 Gr-1/Ly-6G 的抗体 (BioLegend) 来消除粒细胞以及 FITC 标记的抗 CD11b 的抗体用于检测 OCL 前体细胞 (Beckton-Dickinson)。然后细胞在 FACSCalibur(BD Pharmingen,Franklin Lakes,NJ USA) 上进行荧光激活的细胞分选分析 (FACS) 并使用 FlowJo 软件进行分析。结果表示成细胞频率 (％)。

[0083] 统计学分析

[0084] 所有统计学结果表示为平均值 ±SEM。使用非配对 t 检验计算组间差异。使用单向方差分析 (ANOVA) 接着用于校正多重比较的 Dunnett 检验计算多组之间的比较。双尾的 $p \leqq 0.05$ 被认为是显著的。

[0085] 结果一益生菌处理保护小鼠免受 ovx 诱导的皮质骨流失和增加的骨吸收

[0086] 为了确定益生菌处理对 ovx 诱导的骨质流失的预防作用,在 ovx 或假手术之前两周开始的 6 周期间,用媒介 (veh)、单个乳杆菌 (L) 菌株 (副干酪乳杆菌) 或三种菌株的混合物 (L.mix) 处理八周龄的小鼠 (图 3A)。子宫重量可以用作雌激素状态的指标,并且 ovx 导致与所有处理均类似的子宫重量的预期的下降 (表 2)。此外,在所有的处理组中,ovx 增加了体重、脂肪质量和胸腺重量 (图 3B,表 2)。

[0087] 在媒介处理的小鼠中,ovx 降低了皮质骨矿物质含量和股骨的中间骨干区域的皮质剖骨面积 ($p<0.01$,图 4a-c)。重要的是,在 L.para 或 L.mix 处理的小鼠中,ovx 没有降低皮质骨矿物质含量或皮质剖骨面积 (图 4a-c)。与 veh 处理的 ovx 小鼠相比,在副干酪乳杆菌和 L.mix 处理的 ovx 小鼠中皮质骨矿物质含量均更高 ($p<0.05$,图 4b)。为了确定益生菌对皮质骨的预防作用是否由受影响的骨吸收引起,分析了 C- 末端端肽的血清水平 (RatLaps)。在 veh 处理的小鼠中 (+45±11％,相对于假手术小鼠 $p<0.05$) 但不在副干酪乳杆菌处理 (20±9％,不显著) 或 L.mix 处理的小鼠中 (23±9％,不显著),ovx 提高了 RatLaps 的水平。如血清骨钙素所示,益生菌处理没有显著影响骨形成 (数据未显示)。在所有处理组中 ovx 显著降低了在股骨远端干骺端区域中的松质骨参数 (BV/TV 和松质骨 BMD) ($p<0.05$,表 1)。这些发现证实益生菌处理保护小鼠免受 ovx 诱导的皮质骨流失和增加的骨吸收。

[0088] 益生菌降低了炎症细胞因子的表达和皮质骨中的 RANKL/OPG 比

[0089] 为了研究益生菌处理对 ovx 诱导的皮质骨流失的作用机制,我们测量了皮质骨中

骨相关mRNA的转录（图5）。与ovx小鼠中媒介处理相比，益生菌处理显著降低了TNFα（由促进破骨细胞形成的骨髓细胞产生的炎症细胞因子）和IL-1β（TNFα 对骨作用的下游调节基因）的mRNA水平（TNFα -46%，$p<0.05$；IL-1β -61%，$p<0.05$，图5a和5b）。尽管在益生菌处理组中具有表达降低的趋势（-20%，$p = 0.12$，图5c），IL-6的表达在处理组之间没有不同。

[0090] RANKL/骨保护素（OPG）的比是破骨细胞形成和因此的骨吸收的主要决定因素。重要的是，益生菌处理降低了RANKL/OPG的比（-45%，与veh相比 $p<0.05$，图5d）并且这是由于OPG表达增加所造成的（OPG；+28%，$p<0.05$ 和 RANKL；+1%，不显著，图5e、f）。相比之下，三种成骨细胞相关基因Osterix、Col1α1和骨钙素的mRNA水平没有被益生菌处理所影响（图5g-h）。

[0091] 骨髓的免疫状态

[0092] 由益生菌细菌产生的一些抗炎作用被认为是经由调节性T(Treg)细胞的诱导所介导的。骨髓的FACS分析显示，T_{reg}($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) 细胞的频率在veh处理的小鼠中被ovx降低，但在益生菌处理的小鼠中没有被ovx降低（表2）。T_{reg}细胞的诱导和维持依赖于TGFβ，与ovx媒介处理的小鼠相比，ovx益生菌处理的小鼠骨髓中TGFβ1的表达升高（+77±19%，$p<0.01$）。

[0093] 还检查了益生菌处理是否调节骨髓中破骨细胞前体细胞（preOCL）的频率。在任何处理组中，骨髓中preOCLs($CD11b^+Gr1^+$）的频率没有受到ovx的影响（表2）。

[0094] 矿物质代谢

[0095] 在veh处理的小鼠中，ovx提高了钙的尿排泄分数（FECa =（尿Ca x 血浆肌酸酐）/（血浆Ca x 尿肌酸酐））(+86%，$p<0.05$，图6）。ovx诱导的FECa的提高被益生菌处理完全阻止，这表明了增强的钙排泄（图6）。在veh但不在益生菌处理的小鼠中，ovx后Ca血浆水平有提高的倾向（+13%，$p = 0.05$，表3）。在任何处理组中，尿Ca/肌酸酐的比均没有受到ovx的影响（表3）。

[0096] 表1

[0097]

菌株	转运					细胞内Ca（2h）				
	(pmol /mg prot)		对照的%			(pmol /mg prot)		对照的%		
	平均	sdev (±)	平均	sdev (±)	'pc	平均	sdev (±)	平均	sdev (±)	'pc
没有细菌的对照	0.14822	0.02254	100	x	1	0.010295	0.0029458	100	x	1
冻干的 Lp 299v	0.161773	0.0217772	88.903807	5.771965	0.346026	0.008155	0.0018638	79.60091	15.90266	0.048854
Lp 299v (1)	0.161124	0.0439384	108.70837	29.68811	0.489595	0.00777	0.001767	75.47339	17.15157	0.023464
Lp 299	0.156745	0.0517202	107.77589	34.6461	0.579358	0.008286	0.0011452	80.58207	14.06352	0.083082
Lp 菌株 19	0.161981	0.0291023	108.866	19.66359	0.497942	0.008736	0.001961	84.85697	18.45752	0.151586
AMJ1277	0.199657	0.0279951	134.70931	18.91582	0.002	0.008744	0.000942	84.8374	9.141623	0.035014
Lp 19	0.182937	0.0443204	79.537982	19.28973	0.048	0.010901	0.003187	97.43651	19.51249	0.828775
Lp 299v (2)	0.210131	0.0288741	91.361137	12.59742	0.2	0.014491	0.002639	88.756696	16.12947	0.309532
没有细菌的对照	0.2296676	0.0113053	100	x	1	0.016319	0.0033254	100	x	1

[0098] *如果 $p<0.05$，则变化被看做是显著的

[0099] 表2

[0100]

	假手术			Ovx		
	Veh	副干酪乳杆菌	L.Mix	Veh	副干酪乳杆菌	L.Mix
雌激素响应的器官重量						
子宫重量（mg）	49.0±4.8	65.9±12.3	65.2±10.4	8.85±0.7**	11.0±1.2**	6.9±0.1**
生殖腺脂肪（mg）	397±41	296±46	326±46	397±58*	630±128**	577±58**
胸腺重量（mg）	55.5±1.2	51.6±5.1	47.7±1.6	51.0±1.3**	60.0±5.1**	73.7±8.1**#
松质骨						
BV/TV(%)	16.3±0.7	16.8±0.8	17.4±0.8	13.5±0.7**	14.4±0.6*	13.8±0.5**
BMD(mg/cm³)	222±9	231±12	244±6	203±9*	208±7**	206±7**
骨髓中的免疫细胞						
T_{reg}(CD4+Foxp3+CD25+)(%)	0.317±0.023	0.189±0.017	0.196±0.017	0.075±0.004*	0.085±0.008	0.070±0.014
preOCLs (CD11b+Gr1-)(%)	7.7±1.0	6.7±1.3	8.9±1.1	6.3±0.9	7.1±1.3	8.5±1.3

[0101] 表 1. 八周龄小鼠骨髓中雌激素响应的器官重量、松质骨和免疫细胞。在股骨远端干骺端区域通过高分辨率 μCT 分析松质骨参数；松质骨体积为组织体积的百分比 (BV/TV)；松质骨矿物质密度 (BMD)。股骨骨髓细胞用识别 CD4、Foxp3、CD25、CD11b 和 Gr1 的抗体进行染色。数值代表 Treg(CD4+Foxp3+CD25+) 或 preOCLs(CD11b+Gr1-) 在总骨髓群体中的百分比。在每组中结果表示为平均值 ±SEM，n = 6-10。**p<0.01，*p<0.05，Student's t 检验 ovx vs. 假手术，#p<0.05，组内 ANOVA-Dunnets 检验。

[0102] 表 3

[0103]

	假手术			Ovx		
	Veh	副干酪乳杆菌	L.Mix	Veh	副干酪乳杆菌	L.Mix
血清Ca (mg/dl)	9.1±0.4	9.2±0.4	8.5±0.3	10.3±0.4(*)	9.3±0.4	8.7±0.3#
尿 Ca/肌酸酐之比	6.7±0.7	6.3±0.4	5.4±0.6	8.5±1.3	5.9±0.5	5.6±0.7

[0104] 表 2. 测量 14 周龄小鼠血清和尿中矿物质代谢钙和肌酸酐。在每组中结果表示为平均值 ±SEM，n = 5-10。**p<0.01，*p<0.05，(*)p = 0.05。Student's t 检验 ovx vs. 假手术，#p<0.05，组内 ANOVA-Dunnets 检验。

[0105] 总之，本发明的数据显示，饮用水中的益生菌降低了 ovx 诱导的皮质骨流失，这表明益生菌在治疗绝经后骨质疏松中的治疗潜能。此外，结果支持了肠道菌群调节骨质量的作用。

[0106] 副干酪乳杆菌和 L.mix 处理均保护小鼠免受 ovx 诱导的皮质骨流失和增加的骨吸收。与媒介 (veh) 处理的 ovx 小鼠相比，在副干酪乳杆菌和 L.mix 处理的 ovx 小鼠中皮质骨矿物质含量均更高。在 veh 处理而不是副干酪乳杆菌或 L.mix 处理的小鼠中，ovx 提高了钙的尿排泄分数和吸收标记物 RatLaps。因此，益生菌抑制了 ovx 诱导的尿钙的排泄。益生菌处理降低了 ovx 小鼠的皮质骨中两种炎症细胞因子 TNFα 和 IL-1β 的表达并提高了 OPG 的表达。此外，ovx 降低了 veh 处理但不是益生菌处理小鼠的骨髓中的调节性 T 细胞 (CD4+CD25+Foxp3+) 的频率。因此，益生菌抑制了骨髓中调节性 T 细胞的频率的 ovx 诱导的降低。此外，益生菌提高了骨髓中 TGFb1 的表达，并且益生菌抑制了吸收标记物 Rat Lap 的

ovx 诱导的提高。总之，用副干酪乳杆菌或 L.mix 处理预防了 ovx 诱导的皮质骨流失。本发明的这些发现表明，如通过炎症细胞因子的降低的表达和 OPG 的提高的表达所证明的，这些益生菌处理改变了骨中免疫状态，导致 ovx 小鼠中骨吸收减弱。

[0107] 实验 4

[0108] 在该实验中，将测试如上所述的相同的益生菌是否会在早已切除卵巢并因而早已流失骨质的雌性小鼠中影响如上的同样的参数（即皮质骨量、骨矿物质含量、骨吸收）。切除卵巢的雌性小鼠是公认的女性绝经后骨质流失的模型。实验的时间线将如下所示。

[0109] 切除卵巢的小鼠＝>4 周＝>益生菌处理 6 周＝>结束

[0110] 将在饮用水中给予益生菌并且将首先在卵巢切除后 4 周开始。剂量将为 10^9cfu/ml/天，并且将在 9-10 周龄进行卵巢切除。结束实验后的分析将是骨的 (CT) 以测量密度和厚度以及血清分析和骨标记物。

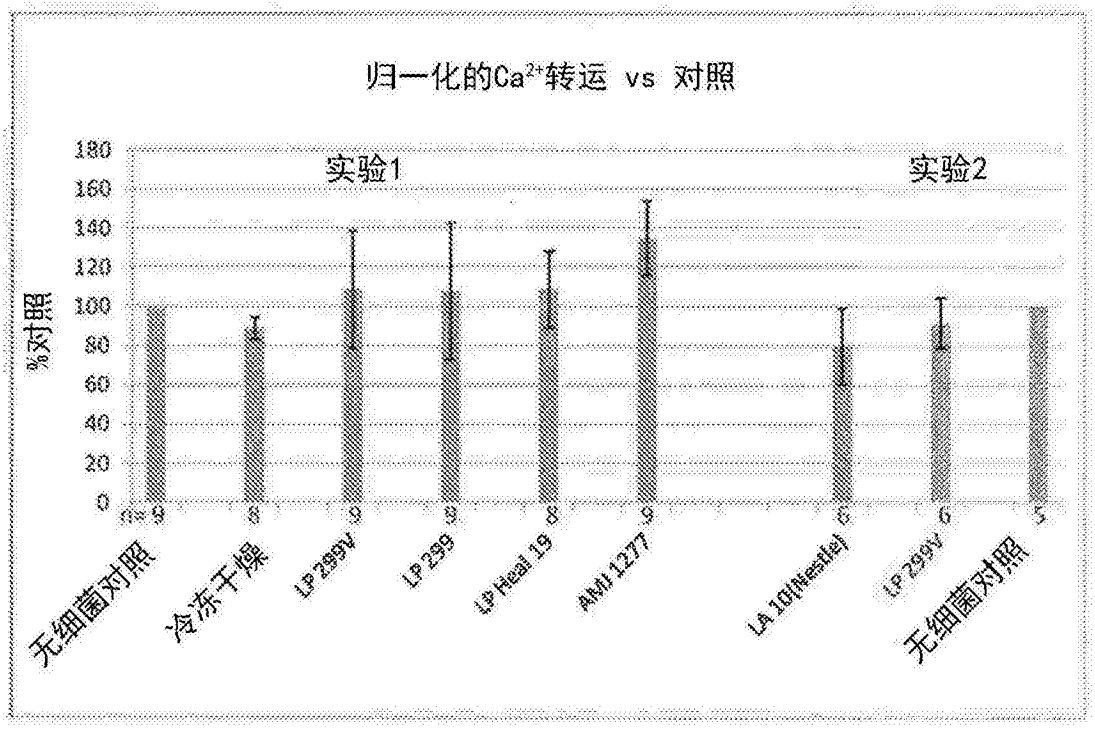

归一化的Ca2+转运 vs 对照
实验1
实验2
%对照
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
n= 9 8 9 9 8 9 6 6 5
无细菌对照
冷冻干燥
LP 299V
LP 299
LP Heal 19
AMI 1277
LA 10(Nestle)
LP 299V
无细菌对照

图 1

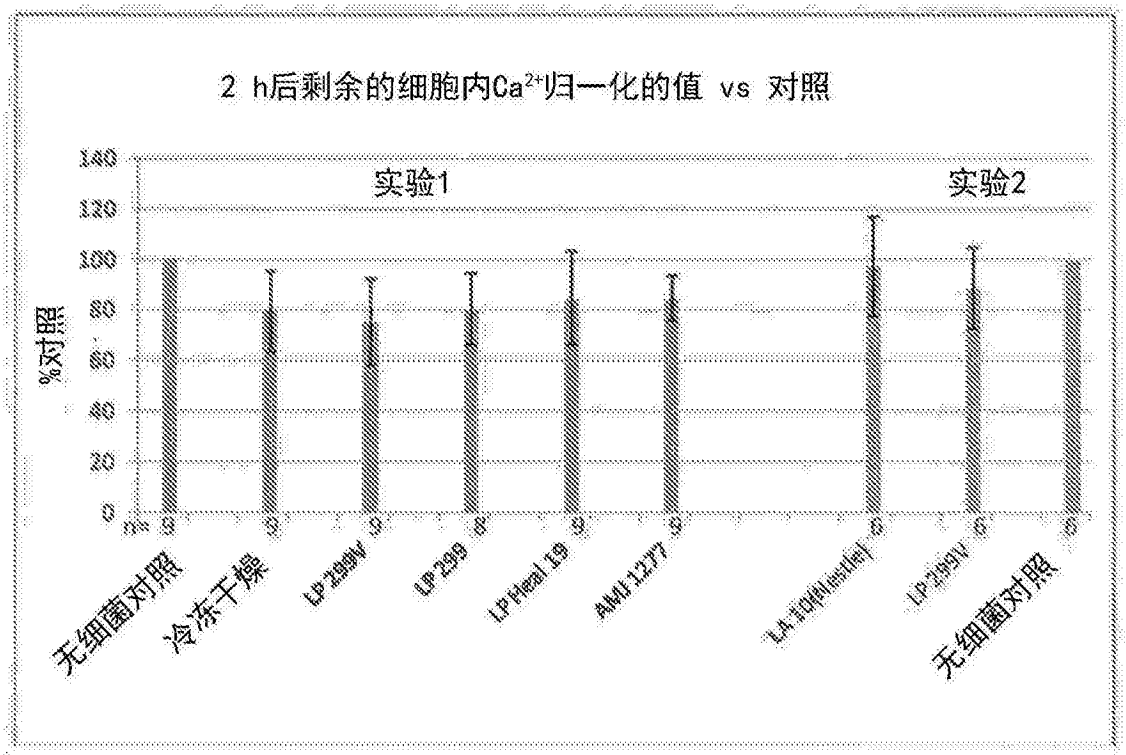

2 h后剩余的细胞内Ca2+归一化的值 vs 对照
实验1
实验2
%对照
140
120
100
80
60
40
20
0
n= 9 9 9 8 9 9 6 6 6
无细菌对照
冷冻干燥
LP 299V
LP 299
LP Heal 19
AMI 1277
LA 10(Nestle)
LP 299V
无细菌对照

图 2

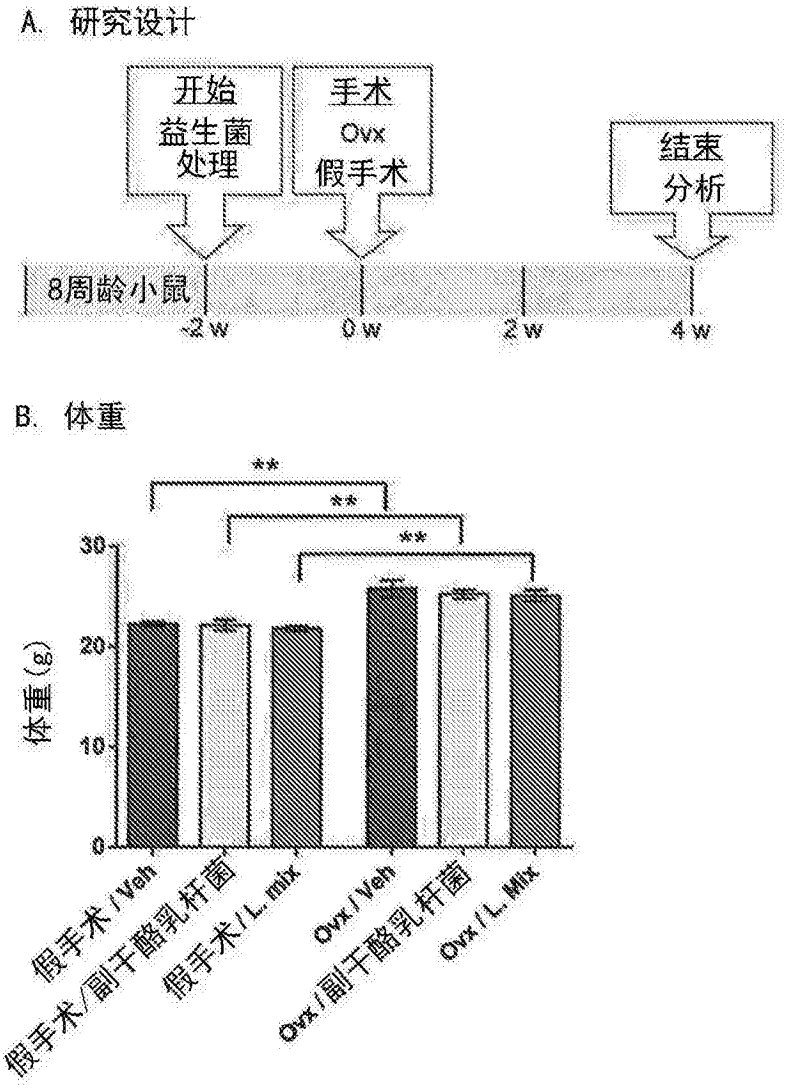

A. 研究设计
开始
益生菌
处理
手术
Ovx
假手术
结束
分析
8周龄小鼠
-2 w
0 w
2 w
4 w
B. 体重
**
**
**
体重(g)
30
20
10
0
假手术/Veh
假手术/副干酪乳杆菌
假手术/L. mix
Ovx/Veh
Ovx/副干酪乳杆菌
Ovx/L. Mix

图 3

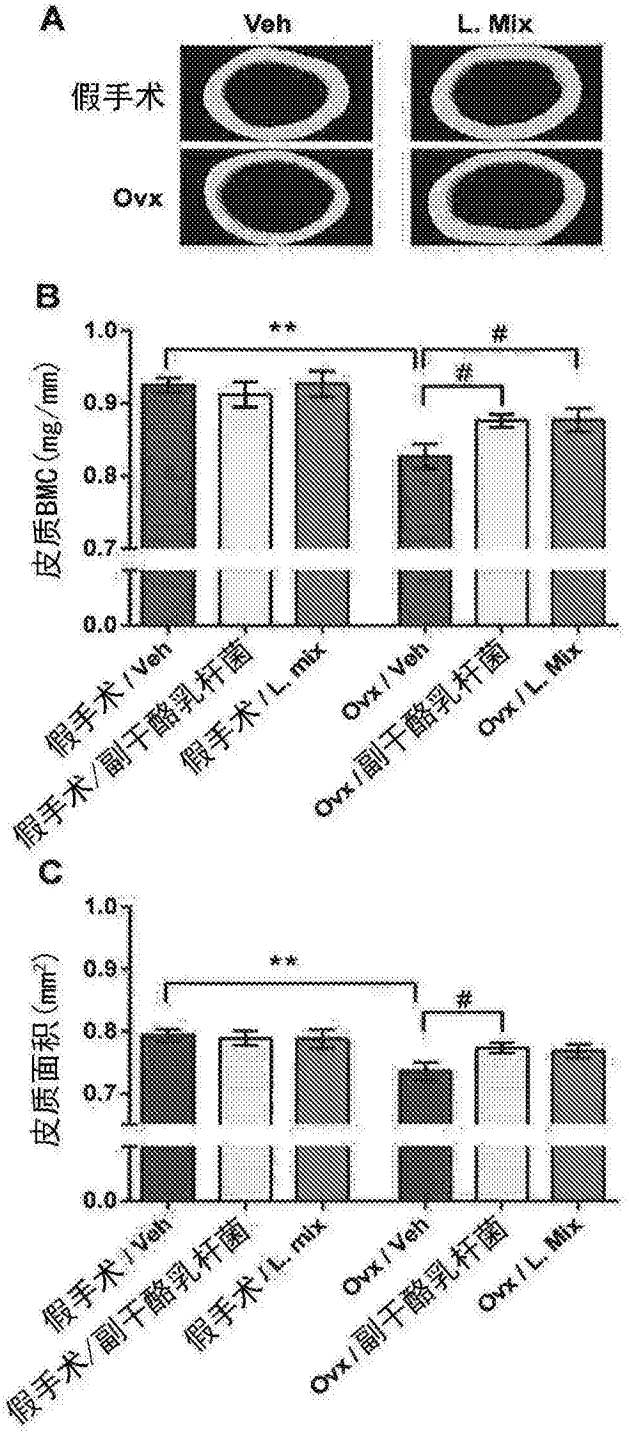

A
Veh
L. Mix
假手术
Ovx
B
皮质BMC (mg/mm)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.0
**
#
#
假手术 / Veh
假手术/副干酪乳杆菌
假手术 / L. mix
Ovx / Veh
Ovx / 副干酪乳杆菌
Ovx / L. Mix
C
皮质面积 (mm²)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.0
**
#
假手术 / Veh
假手术/副干酪乳杆菌
假手术 / L. mix
Ovx / Veh
Ovx / 副干酪乳杆菌
Ovx / L. Mix

图 4

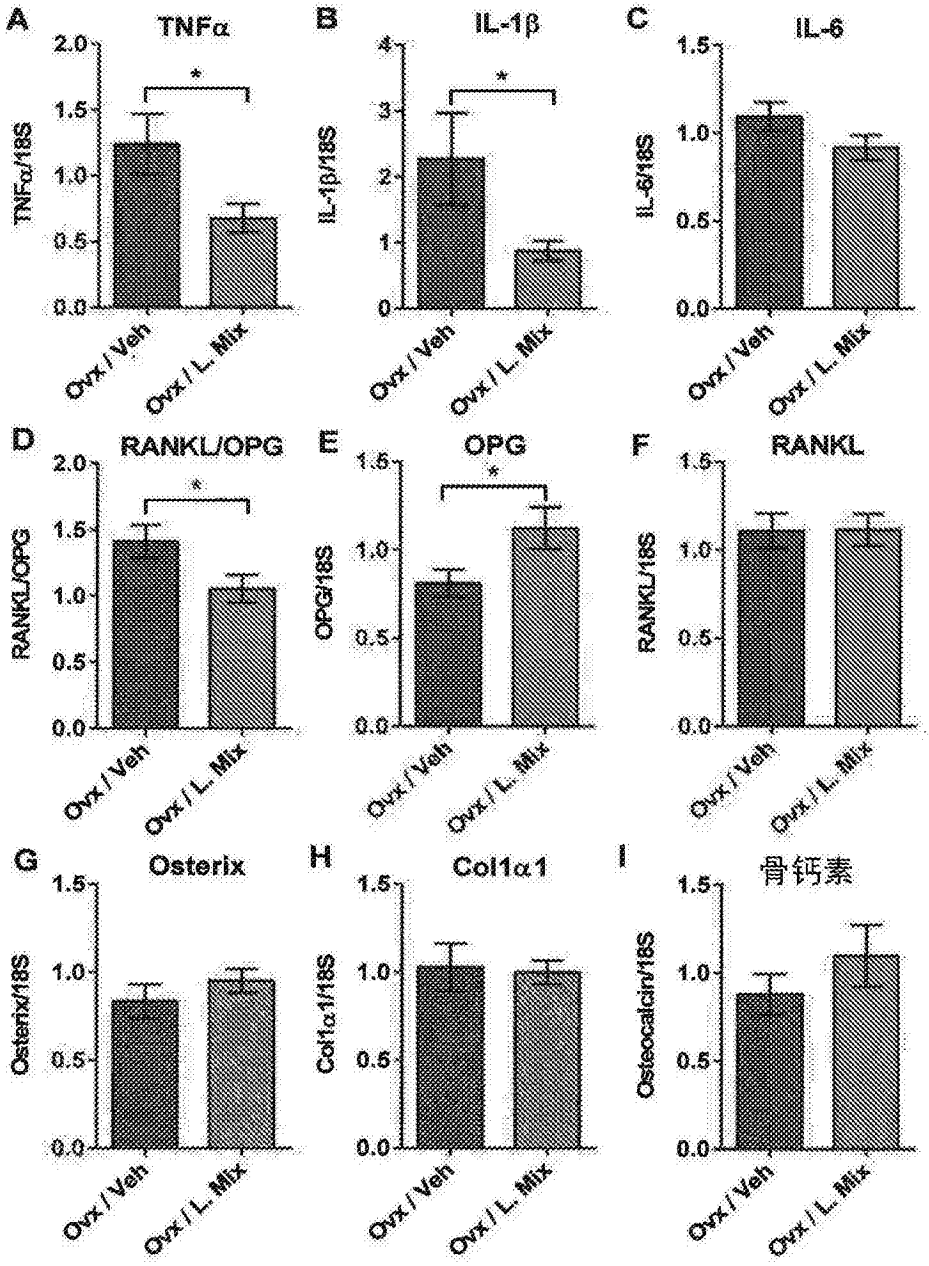

A
TNFα
TNFα/18S
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
B
IL-1β
IL-1β/18S
4
3
2
1
0
*
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
C
IL-6
IL-6/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
D
RANKL/OPG
RANKL/OPG
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
E
OPG
OPG/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
F
RANKL
RANKL/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
G
Osterix
Osterix/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
H
Col1α1
Col1α1/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix
I
骨钙素
Osteocalcin/18S
1.5
1.0
0.5
0.0
Ovx / Veh
Ovx / L. Mix

图 5

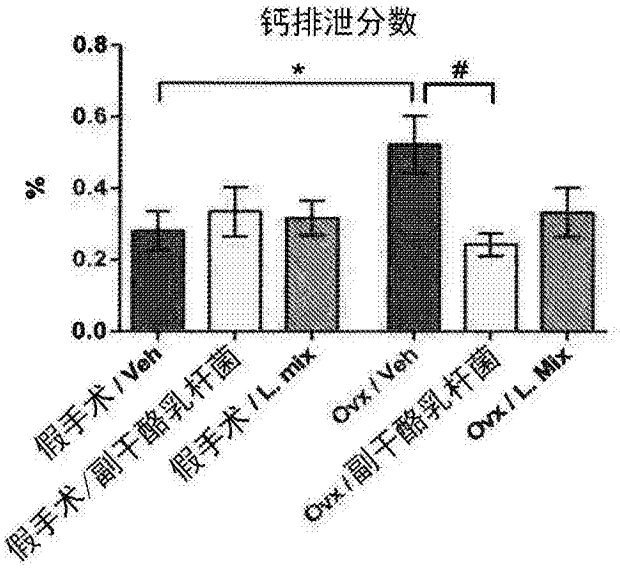

钙排泄分数
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
%
*
#
假手术 / Veh
假手术/副干酪乳杆菌
假手术 / L. mix
Ovx / Veh
Ovx /副干酪乳杆菌
Ovx / L. Mix

图 6