



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112236155 B

(45) 授权公告日 2024.10.18

(21) 申请号 201880093363.0

GDMCC 60087 2016.10.13

(22) 申请日 2018.05.31

(73) 专利权人 深圳华大生命科学研究院

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112236155 A

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼

(43) 申请公布日 2021.01.15

(72) 发明人 邹远强 薛文斌 肖亮 李晓平  
余靖宏 刘传

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.11.12

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CN2018/089317 2018.05.31

专利代理师 李小焦 罗瑶

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/227417 ZH 2019.12.05

(51) Int.Cl.

C12N 1/00 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

GDMCC 60092 2016.10.13

GDMCC 60091 2016.10.13

GDMCC 60090 2016.10.13

CGMCC 10984 2015.06.16

GDMCC 60089 2016.10.13

GDMCC 60093 2016.10.13

(56) 对比文件

CN 104187710 A, 2014.12.10

CN 104413334 A, 2015.03.18

审查员 李红卫

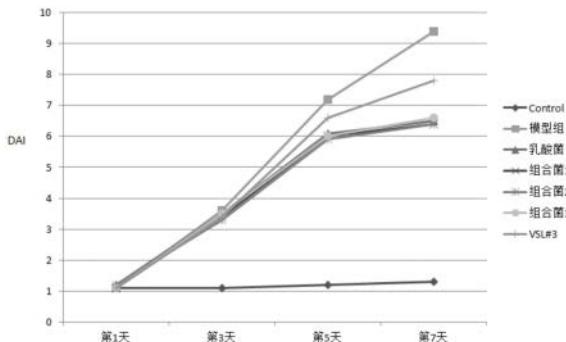
权利要求书2页 说明书26页 附图1页

## (54) 发明名称

一种组合物及其应用

## (57) 摘要

一种组合物及其应用。该组合物,包括加氏乳杆菌和/或其代谢产物,以及嗜酸乳杆菌和/或其代谢产物。该组合物,通过加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用,能够对炎症,尤其是溃疡性肠炎,及其相关疾病有良好的治疗和预防效果,为炎症及其相关疾病的治疗和预防提供了一种安全、有效、毒副作用小,且不易产生抗性的组合物。



1. 一种用于治疗 and 预防溃疡性结肠炎的组合物,其特征在在于:所述组合物为加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌;或所述组合物为加氏乳杆菌和其代谢产物以及嗜酸乳杆菌和其代谢产物;所述加氏乳杆菌为保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1,所述嗜酸乳杆菌为保藏号GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1。

2. 一种用于治疗 and 预防溃疡性结肠炎的组合物,其特征在在于:所述组合物为加氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌以及深圳柯林斯菌;或所述组合物为加氏乳杆菌和其代谢产物、嗜酸乳杆菌和其代谢产物以及深圳柯林斯菌和其代谢产物;所述加氏乳杆菌为保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1,所述嗜酸乳杆菌为保藏号GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1,深圳柯林斯菌为保藏号GDMCC 60090的深圳柯林斯菌TF06-26。

3. 一种用于治疗 and 预防溃疡性结肠炎的组合物,其特征在在于:所述组合物为加氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌以及罗斯氏菌;或所述组合物为加氏乳杆菌和其代谢产物、嗜酸乳杆菌和其代谢产物以及罗斯氏菌和其代谢产物;所述加氏乳杆菌为保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1,所述嗜酸乳杆菌为保藏号GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1,所述罗斯氏菌为保藏号DSM 16841的罗斯氏菌。

4. 一种用于治疗 and 预防溃疡性结肠炎的组合物,其特征在在于:所述组合物为加氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌以及丁酸杆菌;或所述组合物为加氏乳杆菌和其代谢产物、嗜酸乳杆菌和其代谢产物以及丁酸杆菌和其代谢产物;所述加氏乳杆菌为保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1,所述嗜酸乳杆菌为保藏号GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1,所述丁酸杆菌为保藏号CGMCC 10984的丁酸杆菌TF01-11。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的组合物,其特征在在于:所述组合物还含有益生元。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在在于,所述益生元选自低聚果糖、低聚半乳糖、低聚木糖、低聚乳果糖、大豆低聚糖、菊粉和寡聚糖中的至少一种。

7. 根据权利要求1-4任一项所述的组合物,其特征在在于:所述组合物还含有有助于保持组合物中各菌株的至少一种的活力的物质。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在在于:所述有助于保持组合物中各菌株的至少一种的活力的物质,选自半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸或其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素C和维生素E中的至少一种。

9. 根据权利要求1-4任一项所述的组合物,其特征在在于:所述组合物还包括药学上可接受的载体或辅料。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在在于:所述药学上可接受的载体或辅料,选自葡萄糖、乳糖、蔗糖、淀粉、甘露醇、糊精、脂肪酸甘油酯、聚乙二醇、羟乙基淀粉、乙二醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、氨基酸、明胶、白蛋白、水和生理食盐水中的至少一种。

11. 根据权利要求1-10任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防溃疡性结肠炎的药品中的应用。

12. 根据权利要求1-10任一项所述的组合物在制备用于控制哺乳动物因溃疡性结肠炎导致的体重下降的药品中的应用。

13. 根据权利要求1-10任一项所述的组合物在制备用于降低哺乳动物的溃疡性结肠炎的疾病活动指数的药品中的应用。

14. 根据权利要求1-10任一项所述的组合物在制备用于改善哺乳动物溃疡性结肠炎的药品中的应用。

15. 一种药品,其特征在于:所述药品中含有权利要求1-10任一项所述的组合物。

16. 根据权利要求15所述的药品,其特征在于:所述药品为片剂、颗粒剂、散剂、肠溶剂、溶液剂或悬浮剂。

17. 根据权利要求16所述的药品,其特征在于:所述药品为肠溶剂,所述肠溶剂为胶囊或肠溶片。

18. 根据权利要求17所述的药品,其特征在于,所述药品为肠溶片。

19. 根据权利要求18所述的药品,其特征在于:所述肠溶片的肠溶包衣厚度为5-100 $\mu\text{m}$ 。

20. 根据权利要求19所述的药品,其特征在于,所述厚度为20-80 $\mu\text{m}$ 。

## 一种组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及微生物制剂领域,特别是涉及一种微生物或微生物相关的组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 炎症性肠道疾病(inflammatory bowel disease,IBD)是一种病因不明的慢性炎症性肠道疾病,该疾病易反复,严重影响患者的生活质量。现代医学认为,引发炎症性肠道疾病(IBD)的因素有遗传、饮食、感染、自身免疫、心理因素以及环境等。炎症性肠道疾病包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD),均属于炎症相关疾病。

[0003] 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是炎症性肠道疾病(inflammatory bowel disease,IBD)一种重要的疾病类型,其发病原因不明,主要病变部位是在结肠粘膜的粘膜下层,属于一种慢性的肠道疾病。基于目前的研究,主要认为引发溃疡性结肠炎的病因有宿主遗传易感性、肠道菌群以及肠粘膜的免疫反应,临床病理表现为持续腹痛、腹泻和黏液血便,且病情反复,近年来我国UC的患病人数呈明显上升趋势。

[0004] 目前,临床上针对UC并的用药主要有水杨酸类药物、肾上腺糖皮质激素类药物和免疫抑制剂。这三类药物均可以一定程度上对UC进行缓解,但是也都存在不足。

[0005] 水杨酸类药物可以比较好的抑制前列腺素合成,清除氧自由基从而达到缓解炎症反应的目的,但也只能短期缓解,无法实现根治,临床上治疗UC常见的水杨酸类西药主要是柳氮磺胺吡啶(SASP),主要针对轻度、中度以及慢性UC患者。并且,水杨酸类药物还具有很多副作用,例如引发消化道反应、头痛、网织红细胞增多、精子减少,以及过敏反应引起的皮疹、肝毒性、白细胞减少、贫血等,这类药物同时也具有抗菌作用,容易引起菌群紊乱以及耐药性增强。

[0006] 肾上腺糖皮质激素类药物是重症或者爆发性UC患者的首选用药,典型的药物比如倍他米松;但是,肾上腺糖皮质激素类药物会导致机体代谢紊乱,水潴留等副作用,仅可作为应急用药,不能长期服用。

[0007] 免疫抑制剂,例如环孢素,可以通过抑制T细胞IL-2的产生,影响免疫反应的进展,从而对UC进行抑制;但是,免疫抑制剂治疗对药物依赖性较大,治疗周期长,容易引起肾毒性及二次感染,只能作为一种辅助治疗的手段。

[0008] 因此,目前来说尚没有安全有效的炎症相关疾病尤其是溃疡性结肠炎的治疗药物。

### 发明内容

[0009] 本申请的目的是提供一种组合物及其应用。

[0010] 本申请采用了以下技术方案:

[0011] 本申请的一方面公开了一种组合物,该组合物包括加氏乳杆菌和/或其代谢产物,以及嗜酸乳杆菌和/或其代谢产物。

[0012] 需要说明的是,本申请的关键在于,研究发现加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合

使用能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病,尤其是能够有效预防和治疗溃疡性肠炎;研究显示,其预防或治疗预防作用主要由两方面组成,一方面,是加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌对体内肠道微生态进行改善,形成由有益菌构成的生态保护屏障,从而起到炎症或炎症相关疾病的预防和治疗效果;另一方面,是加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌的代谢产物作为益生材料,起到炎症或炎症相关疾病的预防和治疗作用。因此,本申请的组合物,其重要的用途就是用于预防或治疗炎症或炎症相关疾病,尤其是用于预防或治疗溃疡性肠炎或其相关疾病。

[0013] 还需要说明的是,本申请的一种实现方式中,由加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌的组合物,通过两个菌对体内肠道微生态进行改善,形成由有益菌构成的生态保护屏障,起到溃疡性肠炎预防和治疗效果。可以理解,这种微生态的改善,不仅对溃疡性肠炎有预防和治疗效果,对于其它与微生态相关疾病,例如普通肠炎或胃炎等,同样具有效果;因此,本申请的组合物可以用于预防或治疗炎症或炎症相关疾病。

[0014] 优选的,加氏乳杆菌为保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1,所述嗜酸乳杆菌为保藏号GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1。

[0015] 需要说明的是,本申请的关键在于研究发现加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病,而加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1,这两个菌株是本申请研究过程中发现的联合使用效果较好的两个菌株,因此分别对两个菌株进行了保藏。可以理解,一方面,不排除在本申请的发明思路下,还可以采用其它菌株的加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌,达到甚至超过本申请两个菌株的效果;另一方面,在对炎症或炎症相关疾病预防或治疗效果要求较低的情况下,也可以采用其它菌株的加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌。

[0016] 优选的,本申请的组合物还包括深圳柯林斯菌和/或其代谢产物。

[0017] 优选的,深圳柯林斯菌为保藏号GDMCC 60090的深圳柯林斯菌TF06-26。

[0018] 优选的,本申请的组合物还包括罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*) 和/或其代谢产物。

[0019] 优选的,罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*) 为保藏号DSM 16841的罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*)。

[0020] 优选的,本申请的组合物还包括丁酸杆菌和/或其代谢产物。

[0021] 优选的,丁酸杆菌为保藏号CGMCC 10984的丁酸杆菌TF01-11。

[0022] 优选的,本申请的组合物还包括假小链状双歧杆菌和/或其代谢产物。

[0023] 优选的,假小链状双歧杆菌为保藏号GDMCC 60089的假小链状双歧杆菌TM12-14。

[0024] 优选的,本申请的组合物还包括单形巨单胞菌和/或其代谢产物,以及人粪厌氧棒形菌和/或其代谢产物。

[0025] 优选的,单形巨单胞菌为保藏号GDMCC 60093的单形巨单胞菌AF24-28AC,人粪厌氧棒形菌为保藏号GDMCC 60087的人粪厌氧棒形菌AM25-6。

[0026] 需要说明的是,本申请研究证实加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病,在不影响加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌联合使用效果的情况下,还可以加入深圳柯林斯菌、罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*)、丁酸杆菌或假小链状双歧杆菌,或者还可以在加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌的基础上加入单形巨单胞菌和人粪厌氧棒形菌。以上组合方案都能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病。

[0027] 优选的,本申请的组合物还含有其它益生菌和/或益生元。

[0028] 需要说明的是,本申请的组合物,其关键在于加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病,可以理解,在不影响加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合作用效果的情况下,还可以添加其它益生菌或者益生元,使得本申请的组合物具备更多的功能,或者对其原本的功效进行加强,这些益生菌或益生元可以采用现有研究报道过的益生菌或益生元,在此不做具体限定。

[0029] 优选的,本申请的一种实现方式中,本申请组合物的益生元选自低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)和寡聚糖中的至少一种。

[0030] 优选的,本申请的组合物还含有有助于保持组合物中各菌株的至少一种的活力的物质。

[0031] 可以理解,为了保持组合物中组合物中各菌株的活力,保障其功效,还可以在组合物中添加各种维持菌株活力的物质,这些活力物质可以是现有研究报道过的活力物质,在此不做具体限定。

[0032] 优选的,本申请的一种实现方式中,有助于保持菌株活力的物质,选自半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸或其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素C和维生素E中的至少一种。

[0033] 优选的,本申请的组合物还包括药学上或食品上可接受的载体或辅料。

[0034] 需要说明的是,本申请的组合物具有预防和治疗炎症及炎症相关疾病的效果,本申请的一种实现方式中,主要通过食用本申请的组合物,达到预防和治疗效果。因此,组合物中还可以包括药学上或食品上可接受的载体或辅料,以方便使用。

[0035] 优选的,药学上或食品上可接受的载体或辅料,选自葡萄糖、乳糖、蔗糖、淀粉、甘露醇、糊精、脂肪酸甘油酯、聚乙二醇、羟乙基淀粉、乙二醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、氨基酸、明胶、白蛋白、水和生理食盐水中的至少一种。

[0036] 本申请的另一面公开了本申请的组合物在制备用于治疗或预防炎症或炎症相关疾病的食物、保健品、食品添加剂或药品中的应用。

[0037] 可以理解,本申请的组合物具有预防和治疗炎症及炎症相关疾病的效果,为了方便使用,可以将本申请的组合物制成各种食物、保健品、食品添加剂或药品。

[0038] 优选的,本申请的组合物尤其可以用于制备治疗或预防溃疡性肠炎或其相关疾病的食物、保健品、食品添加剂或药品。

[0039] 本申请的再一面公开了本申请的组合物在制备用于控制哺乳动物体重下降的食物、保健品、食品添加剂或药品中的应用。

[0040] 其中,哺乳动物体重下降,尤其指哺乳动物因炎症导致的体重下降。

[0041] 优选的,炎症为溃疡性肠炎,即控制哺乳动物因溃疡性肠炎导致的体重下降。

[0042] 本申请的再一面公开了本申请的组合物在制备用于降低哺乳动物的疾病活动指数的食物、保健品、食品添加剂或药品中的应用。

[0043] 本申请的再一面公开了本申请的组合物在制备用于改善哺乳动物肠道病变的食物、保健品、食品添加剂或药品中的应用。

[0044] 需要说明的是,本申请的组合物能够预防和治疗炎症及炎症相关疾病,其关键就

体现在能够对炎症及炎症相关疾病引起的体重下降进行控制、降低炎症及炎症相关疾病引起的疾病活动指数,并改善哺乳动物肠道病变;因此,本申请的组合物也可以单独的用于制备控制哺乳动物体重下降、降低哺乳动物疾病活动指数或改善哺乳动物肠道病变的食品、保健品、食品添加剂或药品。

[0045] 本申请的再一面公开了采用本申请的组合物进行炎症或炎症相关疾病的治疗或预防的方法。

[0046] 本申请的再一面公开了采用本申请的组合物控制哺乳动物体重下降的方法。

[0047] 本申请的再一面公开了采用本申请的组合物降低哺乳动物的疾病活动指数的方法。

[0048] 本申请的再一面公开了采用本申请的组合物改善哺乳动物肠道病变的方法。

[0049] 需要说明的是,以上各种方法中,主要是通过食用本申请的组合物,以起到治疗或预防炎症或炎症相关疾病、控制哺乳动物体重下降、降低哺乳动物疾病活动指数或改善哺乳动物肠道病变的效果。

[0050] 本申请的再一面公开了一种食品,该食品中含有本申请的组合物。

[0051] 优选的,食品为乳酸饮品或豆乳饮品。本申请的食品,是广义上的以任何形态存在的可食用物品,并不仅限于乳酸饮品或豆乳饮品,例如还可以是发酵食品,也可以是动物饲料等。

[0052] 需要说明的是,本申请的食品由于含有本申请的组合物,因此同样具有治疗或预防炎症或炎症相关疾病、控制哺乳动物体重下降、降低哺乳动物疾病活动指数和改善哺乳动物肠道病变的效果。可以理解,本申请的食品,其关键在于其中含有本申请的组合物,至于食品的具体形态,如固体、液体等,可以根据不同的食品产品或使用需求而定,在此不做具体限定。本申请的一种实现方式中,主要是将本申请的组合物制成常见的乳酸饮品或豆乳饮品,以方便饮用;当然,也可以制成例如奶片、奶酪条等固体食品,在此不做具体限定。

[0053] 还需要说明的是,本申请的食品中加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌的活性菌量或者摄取量不做具体限定,实际应用中,可以根据实际状况灵活选择。以加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1为例,本申请的研究显示,每天摄入加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1的浓度都是 $10^9$  cfu/mL的组合物0.2mL,对溃疡性肠炎有良好的治疗效果,该活性菌剂量可以作为食品、保健品、食品添加剂或药品的参考用量或参考摄取量。

[0054] 本申请的再一面公开了一种保健品,该保健品中含有本申请的组合物。

[0055] 需要说明的是,本申请的保健品由于含有本申请的组合物,因此同样具有治疗或预防炎症或炎症相关疾病、控制哺乳动物体重下降、降低哺乳动物疾病活动指数和改善哺乳动物肠道病变的效果。

[0056] 本申请的再一面公开了一种食品添加剂,该食品添加剂中含有本申请的组合物。

[0057] 需要说明的是,本申请的组合物可以与通常的食品材料配合食用。例如,谷类及薯类,谷类包括米、面、杂粮,薯类包括马铃薯、红薯等;动物性食物,包括肉、禽、鱼、奶、蛋等;豆类及其制品,包括大豆及其它干豆类;蔬菜水果类,包括鲜豆、根茎、叶菜、茄果等;纯热能食物,包括动植物油、淀粉、食用糖和酒类等;因此,本申请的组合物可以单独的作为食品添加剂或者调制剂加入各种食材中直接食用,起到炎症及其相关疾病的治疗或预防效果。

[0058] 本申请的再一面公开了一种药品,该药品中含有本申请的组合物。

[0059] 优选的,药品为片剂、颗粒剂、散剂、肠溶剂、溶液剂或悬浮剂。

[0060] 需要说明的是,本申请的药品由于含有本申请的组合物,因此具有炎症及其相关疾病的治疗或预防效果;本申请的药品,可以是单独的本申请的组合物,也可以与其它炎症药物配合使用,只要相互之间不影响活性即可。可以理解,本申请的药品,只要不影响组合物中各菌株的活性,药品可以采用现有的各种剂型。而本申请的药品中,进一步的还可以包括药品或剂型中常用的辅料,例如稳定剂、湿润剂、乳化剂、粘合剂、等渗剂等。

[0061] 本申请的药品可以以口服液、片剂、针剂、口崩片、冻干粉制剂或肠溶剂型的任何一种形式给药。优选肠溶剂型,如胶囊或肠溶片,以便于药品的活性成分即微生物能顺利通过胃而不被胃酸所破坏。更优选的,本申请的药品可制成肠溶片供口服使用。

[0062] 本申请的肠溶剂型是指在胃液中不崩解,而在肠液中能够崩解和吸收的一种药品剂型,肠溶剂型包括胶囊和肠溶片。其中,胶囊由粉末状的药品封装在的常规药物允许使用的胶囊壳中形成;肠溶片则是在普通的片剂药品外面包裹一层肠溶包衣而成。本申请的“肠溶包衣”简称“肠衣”,包括所有常规药物允许使用的包衣,这些包衣不被胃酸降解,但在小肠中能充分分解并快速释放出本申请的药品。例如,本申请的肠衣能在合成胃酸如pH=1的HCl溶液中在36-38℃维持2小时以上,并优选在合成肠液如pH=7.0的缓冲液中在1.0小时内分解。

[0063] 优选的,本申请的肠溶片中,其肠衣厚度为5-100 $\mu\text{m}$ ,理想的厚度为20-80 $\mu\text{m}$ 。肠衣成分选自己公开知晓的常规材料。

[0064] 本申请的药品中组合物的各菌株的活性菌含量,或者药剂量不受特别限制,实际应用中,可以根据给药对象的健康状况灵活选择。但是,本申请的研究显示,每天摄入加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1的浓度都是 $10^9$ cfu/mL的组合物0.2mL,对溃疡性肠炎有良好的治疗效果,此用量可以作为药品中活性菌含量或者给药剂量参考。

[0065] 本申请的有益效果在于:

[0066] 本申请的组合物,通过加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用,能够对炎症,尤其是溃疡性肠炎,及其相关疾病有良好的治疗和预防效果,为炎症及其相关疾病的治疗和预防提供了一种新的安全、有效、毒副作用小,且不易产生抗性的组合物。

## 附图说明

[0067] 图1是本申请实施例中Control组、模型组、VSL#3组、益生菌组合物治疗组、组合菌1、组合菌2、组合菌3、组合菌4、组合菌5治疗组小鼠的体重的变化曲线;

[0068] 图2是本申请实施例中Control组、模型组、VSL#3组、益生菌组合物治疗组、组合菌1、组合菌2、组合菌3、组合菌4、组合菌5治疗组小鼠的DAI指数的变化曲线。

[0069] 本申请的加氏乳杆菌TF08-1于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60092。

[0070] 嗜酸乳杆菌AM13-1于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60091。

[0071] 深圳柯林斯菌TF06-26于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保

藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60090。

[0072] 罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*) DSM 16841于购自德国微生物菌种保藏中心。

[0073] 丁酸杆菌TF01-11于2015年06月16日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏单位的地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏号为CGMCC 10984。

[0074] 假小链状双歧杆菌TM12-14于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60089。

[0075] 单形巨单胞菌AF24-28AC于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60093。

[0076] 人粪厌氧棒形菌AM25-6于2016年10月13日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏单位的地址为中国广东省广州市先烈中路100号省微生物所实验楼五楼,保藏号为GDMCC 60087。

### 具体实施方式

[0077] 随着肠道微生态的深入研究,发现溃疡性结肠炎的发病与肠道微生物的组成密切相关,肠道细菌的失衡与肠粘膜炎症反应有着密切的关系,其中有害菌的过度增殖可以引发炎症反应,进而诱发溃疡性结肠炎的发病。健康的人体肠道中存在着大量的有益菌,这些有益菌构成肠道的第一层生物屏障。

[0078] 基于以上研究和认识,本申请研发并提出了一种新的组合物,该组合物包括加氏乳杆菌和/或其代谢产物,以及嗜酸乳杆菌和/或其代谢产物。本申请的组合物不仅具有溃疡性结肠炎治疗和预防功能,而且,对于其它与微生态相关疾病,例如普通肠炎或胃炎等,同样具有效果;因此,本申请的组合物能够用于预防或治疗炎症或炎症相关疾病。

[0079] 本申请的一种实现方式中,由保藏号GDMCC 60092的加氏乳杆菌TF08-1和保藏号为GDMCC 60091的嗜酸乳杆菌AM13-1组成的组合物,对溃疡性结肠炎的治疗效果优于美国Alfasigma公司生产的VSL<sup>#</sup>3复合益生菌剂,能够用于制备治疗或预防炎症及其相关疾病的食品、保健品、食品添加剂或药品。

[0080] 下面通过具体实施例对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

[0081] 实施例一

[0082] 本例以分子量36000-50000的硫酸葡聚糖钠(缩写DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型为研究对象,研究加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) TF08-1和嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) AM13-1组合物对溃疡性结肠炎的治疗效果。并分别在加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) TF08-1和嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) AM13-1组合物中添加不同的益生菌,与之联合使用,这些添加的益生菌包括:深圳柯林斯菌 (*Collinsella shenzhenensis*) TF06-26、罗斯氏菌 (*Roseburia inulinivorans*) DSM

16841、丁酸杆菌 (*Butyribacter intestini*) TF01-11、假小链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) TM12-14、单形巨单胞菌 (*Megamonas funiformis*) AF24-28AC和人粪厌氧棒形菌 (*Anaerofustis stercorihominis*) AM25-6。具体如下:

[0083] 一、材料和方法

[0084] 1. 菌株培养和鉴定

[0085] 1.1 加氏乳杆菌TF08-1

[0086] 本例的加氏乳杆菌TF08-1采用PYG培养基进行分离,分离条件为37°C厌氧条件。TF08-1在PYG培养基培养2天的菌落为白色、低凸起、近圆形、边缘波状,菌落直径约1-2mm,菌体的显微形态为杆状,革兰氏阳性、不产芽孢和鞭毛。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60092。

[0087] 加氏乳杆菌TF08-1的具体分离鉴定步骤如下:

[0088] 1.1.1 样品收集

[0089] 分离的样品来自于位16岁健康女性志愿者的粪便样品,志愿者居住于广东省深圳市。并详细记录该志愿者的饮食情况和身体情况。

[0090] 1.1.2 菌株的分离培养

[0091] 提前制备好分离培养基,培养基选用购自环凯微生物科技公司的PYG培养基,具体成分为:蛋白胨5g,胰化酪蛋白5g,酵母粉10g,牛肉膏5g,葡萄糖5g,  $K_2HPO_4$  2g, Tween 80 1mL, Cysteine-HCl  $\cdot H_2O$  0.5g, 硫化钠0.25g, 血红素5mg, 维生素 $K_1$  1 $\mu$ L, 无机盐溶液40mL, 刃天青1mg, 蒸馏水950mL, pH6.8~7.0, 115°C灭菌25min。固体培养基加入1.5%的琼脂,在厌氧操作箱中倾倒。每1L无机盐溶液含有 $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$  0.25g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  0.5g,  $K_2HPO_4$  1g,  $KH_2PO_4$  1g,  $NaHCO_3$  10g,  $NaCl$  2g。

[0092] 收集的新鲜粪便样品转移至厌氧箱,取0.2g粪便悬浮于1mL无菌磷酸盐缓冲液(缩写PBS)中,充分混匀,然后进行梯度稀释,取100 $\mu$ L稀释液进行平板涂布,37°C厌氧培养3-4天,厌氧的气体组分为 $N_2:CO_2:H_2=90:5:5$ 。待平板长出菌落选取单个菌落进行划线分纯,获得纯培养菌株,然后进行鉴定和功能验证。

[0093] 1.1.3 菌株的16S rDNA鉴定

[0094] 分离得到的菌株进行16S rDNA鉴定,以确定菌株的物种分类信息。将获得的分离菌株在液体PYG培养基中培养24h,取1mL菌液进行10000r/min离心5min,收集菌体,提取菌株的基因组DNA,以基因组DNA作为模板进行16S rDNA的扩增,使用16S rDNA的通用引物。

[0095] 16S rDNA的PCR扩增体系为:10 $\times$ PCR缓冲液3 $\mu$ L、dNTP 2.5 $\mu$ L、上游引物27F 0.5 $\mu$ L、下游引物1492R 0.5 $\mu$ L、Taq酶0.3 $\mu$ L、模板1 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 18.2 $\mu$ L。

[0096] 16S rDNA的扩增条件为:95°C预变性4min,然后进入30个循环:95°C变性30s、57°C退火40s、72°C延伸1min 30s。

[0097] 对16S rDNA的PCR产物进行纯化,3730测序,获得菌株的16S rDNA序列,然后进行NCBI的数据库的比对。

[0098] 本试验的16S rDNA通用引物的上下游引物分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示序列。分离获得的菌株TF08-1的16S rDNA序列结果为SEQ ID NO.3所示序列。NCBI blast比对结果显示,本例分离的TF08-1菌株与*Lactobacillus gasseri*同源性最高,相似度为99.9%,因此,判断TF08-1为加氏乳杆菌,命名为加氏乳杆菌TF08-1,并对其进行保藏。

[0099] SEQ ID NO.1:5' -AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

[0100] SEQ ID NO.2:5' -TAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

[0101] 1.2嗜酸乳杆菌AM13-1

[0102] 嗜酸乳杆菌AM13-1采用PYG培养基进行分离,分离条件为37°C厌氧条件。AM13-1在PYG培养基培养2天的菌落为白色,凸起,较粘稠,不透明,圆形,边缘整齐,直径约2-3mm,菌体的显微形态为杆状,革兰氏阳性、不产芽孢和鞭毛。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60091。

[0103] 嗜酸乳杆菌AM13-1的具体分离鉴定步骤如下:

[0104] 1.2.1分离培养

[0105] 分离的样品来自于深圳市一位健康男性的粪便样品,嗜酸乳杆菌AM13-1的分离过程如下:

[0106] (1) 将样品转移至厌氧箱中,取约0.2g样品悬浮于1mL无菌PBS中,充分混匀,然后进行梯度稀释;

[0107] (2) 取100 $\mu$ L稀释液于PYG培养基平板上,然后进行涂布,涂布均匀后放置在37°C厌氧环境中进行培养,厌氧的气体组成为:氮气:氢气:二氧化碳=90:5:5;PYG培养基与“1.1.2菌株的分离培养”相同;

[0108] (3) 培养4天,待平板上长出菌落之后,挑选单菌落进行划线分纯,37°C厌氧培养;

[0109] (4) 对分纯的单菌进行甘油保藏和真空冷冻干燥保藏。

[0110] 1.2.2 AM13-1的16S rDNA鉴定

[0111] 提取基因组DNA,以DNA作为模板进行16S rDNA扩增,采用16S rDNA的通用引物进行PCR扩增,扩增的PCR产物进行纯化,3730测序,获得AM13-1的16S rDNA全长序列,将AF13-1的16S rDNA序列在NCBI的数据库比对。

[0112] 本试验的16S rDNA通用引物、PCR扩增体系和条件都与“1.1.3菌株的16S rDNA鉴定”相同。分离获得的菌株AM13-1的16S rDNA序列结果为SEQ ID NO.4所示序列。NCBI blast比对结果显示,本例分离的AM13-1菌株与*Lactobacillus acidophilus*同源性最高,相似度为100%,因此,判断AM13-1为嗜酸乳杆菌,命名为嗜酸乳杆菌AM13-1,并对其进行保藏。

[0113] 1.3深圳柯林斯菌TF06-26

[0114] 本例的深圳柯林斯菌TF06-26采用PYG培养基进行培养,培养条件为37°C厌氧条件。在厌氧的PYG培养基上深圳柯林斯菌TF06-26培养2天的菌落为白色,凸起,菌落较粘稠,菌落直径约1-2mm。菌体细胞在显微镜下呈短杆状,革兰氏阴性,没有芽孢和鞭毛。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60090。

[0115] 深圳柯林斯菌TF06-26的具体分离鉴定步骤如下:

[0116] 1.3.1样品采集

[0117] 本试验的深圳柯林斯菌TF06-26分离自深圳市的一位健康青少年女性志愿者的粪便样品。

[0118] 1.3.2准备培养基和磷酸盐缓冲液PBS

[0119] 本试验所采用菌株分离的培养基是购自环凯微生物科技公司的厌氧的PYG培养基,具体成分是1L培养基中包含:蛋白胨5g,胰化酪蛋白5g,酵母粉10g,牛肉膏5g,葡萄糖

5g,  $K_2HPO_4$  2g, Tween 80 1mL, Cysteine-HCl  $\cdot$   $H_2O$  0.5g, 血红素5mg, 维生素 $K_1$  1 $\mu$ L, 无机盐溶液40mL, 刃天青1mg, 蒸馏水950mL, 调节pH至6.8~7.0。灭菌条件为115 $^{\circ}$ C高压灭菌25min。固体培养基需在厌氧操作箱中倾倒平板。其中, 每升1L无机盐溶液含有 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.25g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $K_2HPO_4$  1g,  $KH_2PO_4$  1g,  $NaHCO_3$  10g,  $NaCl$  2g。

[0120] PBS的准备: 称取 $NaCl$  8g,  $KCl$  0.2g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  3.63g,  $KH_2PO_4$  0.24g, 半胱氨酸盐酸盐0.5g, 溶于900mL双蒸水中, 用盐酸和 $NaOH$ 调pH值至7.4, 加水定容至1L, 通入 $N_2$ 除氧30s, 厌氧瓶密封, 然后115 $^{\circ}$ C高压灭菌25min, 备用。

#### [0121] 1.3.3 菌株分离

[0122] 收集的新鲜粪便样品立即转移至厌氧箱, 厌氧箱的气体组成为: 氮气: 氢气: 二氧化碳=90:5:5, v/v, 取约0.2g粪便于PBS中进行悬浮, 充分混匀, 进行10倍为单位的梯度稀释, 然后涂平板, 37 $^{\circ}$ C厌氧条件下培养2天, 选择单菌落进行划线纯化, 获得纯培养菌株, 并进行-80 $^{\circ}$ C甘油冷冻保藏和真空冷冻干燥保藏。

#### [0123] 1.3.4 16S rDNA鉴定

[0124] 对分离得到的纯培养菌株进行16S rDNA测序, 获得每株菌的分类信息。菌株在液体的PYG培养基中培养24小时, 达到菌浓约 $10^8$ cfu/ml, 对菌液进行基因组提取, 以提取的基因组DNA作为模板进行16S rDNA PCR扩增, 对获得的16S rDNA扩增产物进行电泳检测、纯化、3730测序, 获得菌株的16S rDNA序列, 然后进行EZBio Cloud数据库的比对, 对分离菌株进行鉴定。

[0125] 本试验16S rDNA PCR扩增的引物、PCR扩增体系和条件都与“1.1.3菌株的16S rDNA鉴定”相同。

[0126] 测序结果显示, 本例分离的TF06-26菌株的16S rDNA序列为SEQ ID NO.5所示序列。EZBio Cloud数据库比对结果显示, 本例分离的TF06-26菌株与购自日本微生物菌种保藏中心的Collinsella aerofaciens JCM 10188同源性最高。

#### [0127] 1.3.5 TF06-26的生理生化特征

[0128] TF06-26为过氧化氢酶阴性, 氧化酶阴性, 不具运动性, 生长温度范围是25-45 $^{\circ}$ C, 生长pH值范围是5.0-8.0,  $NaCl$ 耐受浓度为2%, 胆盐耐受浓度是0.3%。TF06-26和近缘参考菌购自日本微生物菌种保藏中心的Collinsella aerofaciens JCM 10188的底物利用情况, API 20A和API 50CHL, 详见表1, 表1中“+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应, “w”表示弱阳性反应。

[0129] 表1 TF06-26和JCM 10188的底物利用情况

[0130]

底物	TF0 6-26	JCM 10188	底物	TF06 -26	JCM 10188
API 20A					
吲哚产生	-	-	明胶水解	-	-
脲素(脲酶)	-	-	七叶灵	-	-
葡萄糖	+	+	甘油	-	-
甘露醇	-	-	纤维二糖	-	-
乳糖	+	w	甘露糖	+	+
蔗糖	-	+	松叁糖	-	-

[0131]

麦芽糖	+	+	棉籽糖	-	-
柳醇	w	-	山梨醇	-	-
木糖	-	-	鼠李糖	-	-
阿拉伯糖	-	-	海藻糖	-	-
API 50CHL					
甘油	-	-	柳醇	+	-
赤藓醇	-	-	纤维二糖	w	-
D-阿拉伯糖	-	-	麦芽糖	+	-
L-阿拉伯糖	-	-	乳糖	+	w
核糖	-	-	蜜二糖	+	w
D-木糖	-	-	蔗糖	-	-
L-木糖	-	-	海藻糖	-	w
阿东醇	-	-	菊糖	-	-
$\beta$ -甲基-D-木糖甙	-	-	松叁糖	-	-
半乳糖	+	w	棉子糖	-	-
葡萄糖	+	+	淀粉	-	-
果糖	+	w	肝糖	-	-
甘露糖	+	w	木糖醇	-	-
山梨糖	-	-	龙胆二糖	-	-
鼠李糖	-	-	D-松二糖	-	-
卫茅醇	-	-	D-来苏糖	-	-
肌醇	-	-	D-塔格糖	-	-
甘露醇	-	-	D-岩糖	+	+
山梨醇	-	-	L-岩糖	-	-
$\alpha$ -甲基-D-甘露糖甙	-	-	D-阿拉伯糖醇	-	-
$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖甙	-	-	L-阿拉伯糖醇	-	-
N-乙酰-葡糖胺	+	+	葡萄糖酸盐	-	-
苦杏仁甙	-	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-	w
熊果甙	w	-	5-酮基-葡萄糖酸盐	-	-

[0132] 表1中TF06-26与JCM 10188的碳源利用情况比较显示,TF06-26同JCM 10188在乳糖、蔗糖、柳醇、半乳糖、果糖、甘露糖、熊果甙、纤维二糖、麦芽糖、蜜二糖、海藻糖以及2-酮基-葡萄糖酸盐的利用有着明显不同,由此可见TF06-26跟JCM 10188不是同一个物种。

[0133] 1.3.6新物种TF06-26同亲缘菌株JCM 10188的基因组杂交试验

[0134] 参考TF06-26的16S rDNA比对结果,亲缘关系最近的菌为*Collinsella aerofaciens* JCM 10188,16S rDNA相似度为99.9%,从16S rDNA序列来看,无法将TF06-26和JCM 10188进行种水平的区分,因此需要进行DNA杂交进一步的确认。

[0135] DNA杂交结果显示,TF06-26同JCM 10188的同源性为51%。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》,两株菌的DNA杂交值高于70%,可以判定这两株菌属于同一个物种,TF06-26和JCM 10188的DNA杂交值低于70%,所以TF06-26是一株不同于已知菌的新菌种。按照国际细菌分类委员会(IBSP)细菌命名规则,将这株新菌命名为*Collinsella shenzhenensis* sp.nov,TF06-26作为这个种的模式菌株。即本例的深圳柯林斯菌TF06-26,并对其进行保藏

[0136] 1.4罗斯氏菌DSM 16841

[0137] 本例的罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)DSM 16841,培养基采用PYG厌氧培养基,37°C厌氧培养。在PYG培养基培养2天的菌落为浅黄色,直径约1mm。菌体的显微形态为短杆状,革兰氏阳性、不产芽孢和鞭毛。菌株购自德国微生物菌种保藏中心(DSMZ),保藏编号为DSM 16841。

[0138] 1.5丁酸杆菌TF01-11

[0139] 本例的丁酸杆菌TF01-11采用PYG培养基进行培养,培养条件为37°C厌氧条件。在厌氧的PYG培养基上丁酸杆菌TF01-11培养48h之后菌落呈现灰白色,不透明,平滑,边缘不规则似假根状,菌落直径约2mm。通过革兰氏染色、显微观察,TF01-11为革兰氏阳性菌,长杆状,无芽孢,具有鞭毛,可运动,菌体直径约0.5-1.0mm,长度约2.0-8.0mm。菌株由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)提供和保藏,保藏编号为CGMCC 10984。

[0140] 1.6假小链状双歧杆菌TM12-14

[0141] 假小链状双歧杆菌TM12-14采用PYG培养基进行分离,分离条件为37°C厌氧条件。TM12-14在PYG培养基培养2天的菌落为白色、凸起、圆形、边缘整齐,菌落直径约1-2mm,菌体显微形态呈现分歧杆状,革兰氏染色为阳性,没有芽孢和鞭毛产生。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60089。

[0142] 假小链状双歧杆菌TM12-14的具体分离鉴定步骤如下:

[0143] 1.6.1样品收集

[0144] 分离样品来自于一位14岁健康的男性粪便,将粪便采集至无菌的样品管中,1h内带回实验室进行分选。

[0145] 1.6.2假小链状双歧杆菌的分离纯化

[0146] 收集的新鲜样品立刻转移至厌氧操作箱中,取0.2g样品于1mL无菌的PBS中,充分震荡混匀,然后进行梯度稀释涂布,培养基采用PYG培养基平板,于37°C厌氧培养,厌氧的气体组分为 $N_2:CO_2:H_2=90:5:5$ 。培养3天后,挑取单菌落进行划线分纯,获得每株单菌的纯培养。其中,PYG培养基与“1.1.2菌株的分离培养”相同。

[0147] 1.6.3菌种保藏

[0148] 对获得的纯培养菌株进行培养,至浓度约为 $10^9$ cfu/mL,取400 $\mu$ L菌液添加40%甘油400 $\mu$ L,使其甘油浓度达到20%,然后进行-80°C超低温保藏。

[0149] 1.6.4 16S rDNA鉴定

[0150] 将获得的分离菌株在液体PYG培养基中培养24h,取1mL菌液进行10000r/min离心5min,收集菌体,提取基因组DNA。以基因组DNA作为模板,使用16S rDNA通用引物进行PCR扩

增,PCR扩增引物、体系和条件与“1.1.3菌株的16S rDNA鉴定”相同。

[0151] 将获得的16S rDNA扩增产物进行电泳检测、纯化、3730测序,获得菌株的16S rDNA序列,然后进行NCBI的数据库的比对。

[0152] 测序结果显示,菌株TM12-14的16S rDNA长度为1400bp,序列如SEQ ID NO.6所示。NCBI blast比对结果显示,菌株TM12-14与Bifidobacterium pseudocatenulatum同源性最高,鉴定其为假小链状双歧杆菌Bifidobacterium pseudocatenulatum,命名为假小链状双歧杆菌TM12-14,并对其进行保藏。

[0153] 1.7单形巨单胞菌AF24-28AC

[0154] 本例的单形巨单胞菌AF24-28AC采用PYG培养基进行培养,培养条件为37°C厌氧条件。AF24-28AC在PYG培养基培养2天的菌落为浅黄色,边缘不规则波状,扁平,含水量低,直径约2-3mm。菌体的显微形态为杆状,革兰氏阴性、不产芽孢和鞭毛。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60093。

[0155] 单形巨单胞菌AF24-28AC的具体分离鉴定步骤如下:

[0156] 1.7.1菌株的分离培养

[0157] 分离样品来自于位健康的女性粪便,采用梯度稀释涂平板方法进行菌株分离,培养基采用购自环凯微生物科技公司的PYG培养基,进行厌氧培养,厌氧的气体组分为N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>=90:5:5,培养48h,挑取单菌落进行划线分纯,获得每株单菌的纯培养。

[0158] 1.7.2菌株的16S rDNA鉴定

[0159] 对分离菌株的基因组DNA进行提取,采用16S rDNA通用引物进行PCR扩增,对获得的16S rDNA扩增产物进行电泳检测、纯化、3730测序,获得菌株的16S rDNA序列,然后在EZBio Cloud数据库中进行比对,对分离菌株进行鉴定。

[0160] 16S rDNA的PCR扩增体系为:10×PCR缓冲液3μL、dNTPs 2.5μL、上游引物27F 0.5μL、下游引物1492R 0.5μL、Taq酶0.3μL、模板1μL、ddH<sub>2</sub>O 18.2μL。

[0161] 16S rDNA的扩增条件如下:

	94°C	4min	
	94°C	30s	} 20 循环
	65°C-57°C	40s	
	72°C	1min30s	
[0162]	94°C	30s	
	57°C	40s	
	72°C	1min30s	
	72°C	10min	
	4°C	∞	

[0163] 其中,65°C-57°C 40s是指每个循环后温度等比递减,即第1个循环时的退火温度为65°C,最终在第20个循环降低到57°C。

[0164] 本试验的16S rDNA通用引物的上游引物为27f,上游引物序列为SEQ ID NO.1所示序列,下游引物为1492r,下游引物序列为SEQ ID NO.2所示序列。

[0165] 分离获得的菌株AF24-28AC的16S rDNA序列结果为SEQ ID NO.7所示序列。EZBio

Cloud数据库比对结果显示,本例分离的AF24-28AC菌株与购自德国菌种保藏中心的Megamonas funiformis DSM 19343同源性最高,相似度为99.09%,因此,判断AF24-28AC为单形巨单胞菌,命名为单形巨单胞菌AF24-28AC,并对其进行保藏。

[0166] 1.8人粪厌氧棒形菌AM25-6

[0167] 本例的人粪厌氧棒形菌AM25-6采用PYG培养基进行培养,培养条件为37℃厌氧条件。AM25-6在PYG培养基培养2天的菌落为浅黄色,菌落较小,针尖状,直径约0.5mm。菌体的显微形态为短杆状,革兰氏阳性、不产芽孢和鞭毛。菌株保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC 60087。

[0168] 人粪厌氧棒形菌AM25-6的具体分离鉴定步骤如下:

[0169] 1.8.1菌株的分离培养

[0170] 分离样品来自于—位健康的男性粪便,将粪便采集至无菌的样品管中,1h内带回实验室进行分选。收集的新鲜样品立刻转移至厌氧操作箱中,取0.2g样品悬浮在1mL无菌的磷酸缓冲液(缩写PBS)中,充分震荡混匀。采用梯度稀释涂平板方法进行菌株分离,培养基采用购自环凯微生物科技公司的PYG培养基。涂布的平板置于37℃厌氧培养,厌氧的气体组分为 $N_2:CO_2:H_2=90:5:5$ 。培养3天后,挑取单菌落进行划线分纯,获得每株单菌的纯培养。对获得的纯培养菌株进行培养,至浓度约为 $10^9$ cfu/mL,取400 $\mu$ L菌液添加40%甘油400 $\mu$ L,使其甘油浓度达到20%,然后进行-80℃超低温保藏。

[0171] 1.8.2菌株16S rDNA鉴定

[0172] 对分离菌株的基因组DNA进行提取,采用16S rDNA通用引物进行PCR扩增,对获得的16S rDNA扩增产物进行电泳检测、纯化、3730测序,获得菌株的16S rDNA序列,然后进行EZBio Cloud数据库的比对,对分离菌株进行鉴定。

[0173] 本试验16S rDNA PCR扩增的引物、PCR扩增体系和条件都与“1.1.3菌株的16S rDNA鉴定”相同。

[0174] 测序结果显示,本例分离的AM25-6菌株的16S rDNA序列为SEQ ID NO.8所示序列。EZBio Cloud数据库比对结果显示,本例分离的AM25-6菌株与购自德国菌种保藏中心的Anaerofustis stercorihominis DSM 17244同源性最高,同源性99.86%,因此,判断AM25-6为人粪厌氧棒形菌,命名为人粪厌氧棒形菌AM25-6,并对其进行保藏。

[0175] 2.小鼠模型

[0176] 本例所选取的小鼠模型为:DSS(硫酸葡聚糖钠Dextran Sulfate,Na,分子量36000-50000)诱导的溃疡性肠炎小鼠模型。

[0177] 具体的,采用购自湖北医学实验动物中心的小鼠品系为C57b1/6小鼠84只,所有小鼠8周龄,体重 $20g \pm 2g$ ,在SPF级别的鼠房环境中饲养。96只小鼠随机分为8组,每组12只进行后续试验。

[0178] DSS造模:续给小鼠饮用0.15%的DSS七天,即获得溃疡性肠炎小鼠模型。

[0179] 3.试验方法

[0180] 84只小鼠随机分为8组,每组12只,8组分别为正常组(即control组)、模型组、益生菌组合物治疗组、组合菌1组、组合菌2组、组合菌3组、组合菌4组、组合菌5组和VSL#3治疗组,各组的具体处理方式如下:

[0181] 正常组:采用普通饲料进行饲喂,每只小鼠每天灌胃0.2mL的PBS缓冲液。

[0182] 模型组:采用相同的饲料饲喂,并进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的PBS缓冲液。

[0183] 益生菌组合物治疗组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的益生菌组合物菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的益生菌组合物菌液。

[0184] 组合菌1组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的组合菌1菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的组合菌1菌液。

[0185] 组合菌2组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的组合菌2菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的组合菌2菌液。

[0186] 组合菌3组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的组合菌3菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的组合菌3菌液。

[0187] 组合菌4组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的组合菌4菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的组合菌4菌液。

[0188] 组合菌5组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的组合菌5菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的组合菌5菌液。

[0189] VSL<sup>#</sup>3治疗组:采用相同的饲料饲喂,在进行DSS造模前3天,每天给每只小鼠灌胃0.2mL的VSL<sup>#</sup>3菌液,然后再进行DSS造模:将DSS添加到小鼠饮水中,DSS添加量为终浓度0.15%,饲喂七天,每只小鼠每天灌胃0.2mL的VSL<sup>#</sup>3菌液。

[0190] 其中,益生菌组合物菌液、组合菌1至组合菌5菌液采用如下方法配制:

[0191] 将加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1、深圳柯林斯菌TF06-26、罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)DSM 16841、丁酸杆菌TF01-11、假小链状双歧杆菌TM12-14、单形巨单胞菌AF24-28AC和人粪厌氧棒形菌AM25-6分别培养24h,离心分别收集菌体,用PBS对各菌体进行悬浮,分别调整菌浓度至 $10^9$ cfu/mL的菌悬液,用于配制各菌液。

[0192] 益生菌组合物菌液:加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1的菌悬液等体积混合,即获得益生菌组合物菌液;

[0193] 组合菌1菌液:加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和深圳柯林斯菌TF06-26的菌悬液等体积混合,即获得组合菌1菌液;

[0194] 组合菌2菌液:加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)DSM 16841的菌悬液等体积混合,即获得组合菌2菌液;

[0195] 组合菌3菌液:加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和丁酸杆菌TF01-11的菌悬液等体积混合,即获得组合菌3菌液;

[0196] 组合菌4菌液:加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和假小链状双歧杆菌TM12-14的菌悬液等体积混合,即获得组合菌3菌液;

[0197] 组合菌5菌液:加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1、单形巨单胞菌AF24-28AC和

人粪厌氧棒形菌AM25-6的菌悬液等体积混合,即获得组合菌5菌液。

[0198] VSL#3菌液采用如下方法配制:

[0199] VSL#3购自美国Alfasigma公司,是一种,包含干酪乳杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、德式乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌等8种有益菌的复合益生菌剂;同样,采用PBS对VSL#3进行悬浮,调节浓度至 $10^9$ cfu/mL,即获得VSL#3菌液。

[0200] DSS造模后每天记录小鼠体重、饮食和饮水情况,同时观察小鼠的粪便性状及粪便隐血情况,分别在第1天、第3天、第5天和第7天计算小鼠的疾病活动指数(缩写DAI),DAI评分标准详见表2。实验结束后处死小鼠,所有小鼠取血、脱颈、取结肠、拍照、称重、量取结肠长度。结肠组织保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱和多聚甲醛中。其中,正常组的记录时间与DSS造模相同。

[0201] 表2 DAI指数评分表

	体重下降 (%)	大便性状	大便隐血/弱眼血便	积分
[0202]	0	正常	正常	0
	1-5			1
[0203]	5-10	松散	隐血阳性	2
	10-15			3
	>15	稀便	肉眼血便	4

[0204] 表2中的“大便性状”,“正常”大便是指成形大便,“松散”大便是指不粘附于肛门的糊状、半成型大便,“稀便”是指可粘附于肛门的稀样水便。“大便隐血/弱眼血便”中,“正常”是指小鼠便血为阴性;“肉眼血便”是指肉眼可以直接观察到红色或褐色便血;“隐血阳性”是指不明显的肉眼血便,使用四甲基联苯胺进行检测为便血阳性。DAI指数等于体重、“大便性状”以及“大便隐血/弱眼血便”三个积分之和。

[0205] 二、结果及分析

[0206] 1. 体重变化

[0207] 统计小鼠分别在第1天、第3天、第5天和第7天的体重,各组小鼠的平均体重如表3和图1所示。

[0208] 表3各自小鼠平均体重

分组	第1天(g)	第3天(g)	第5天(g)	第7天(g)
Control	22.32±0.45	23.73±0.64	24.98±0.96	25.52±1.26
模型组	22.41±0.52	21.65±0.71*	20.02±1.26*	18.21±1.57**
益生菌	22.29±0.50	21.85±0.79	21.41±1.27 <sup>▲</sup>	21.40±1.46 <sup>▲</sup>
组合菌1	22.31±0.48	21.89±0.72	21.43±1.09 <sup>▲</sup>	21.51±1.50 <sup>▲</sup>
组合菌2	22.22±0.62	21.90±0.81	21.48±1.14 <sup>▲</sup>	21.48±1.61 <sup>▲</sup>
组合菌3	22.50±0.56	21.94±0.78	21.47±1.19 <sup>▲</sup>	21.54±1.59 <sup>▲</sup>
组合菌4	22.38±0.61	21.97±0.85	21.47±1.35	21.32±1.49 <sup>▲</sup>

组合菌5	22.09±0.47	21.59±0.81	21.42±1.37 <sup>▲</sup>	21.21±1.75 <sup>▲</sup>
VSL <sup>#</sup> 3	22.54±0.71	21.87±0.92	21.32±1.48	20.01±1.66 <sup>▲</sup>

[0210] 表3中,“Control”是指正常组,“益生菌”即益生菌组合物治疗组,组合菌1即组合菌1治疗组,组合菌2即组合菌2治疗组,组合菌3即组合菌3治疗组,组合菌4即组合菌4治疗组,组合菌5即组合菌5治疗组,“VSL<sup>#</sup>3”即VSL<sup>#</sup>3治疗组。“\*”是指模型组相对于正常组小鼠体重的差异显著水平 $P<0.05$ ,\*\*是指模型组相对于正常组小鼠体重的差异显著水平 $P<0.01$ ,”▲”是指“益生菌”、“组合菌1”、“组合菌2”、“组合菌3”、“组合菌4”、“组合菌5”和“VSL<sup>#</sup>3”组小鼠相对于模型组的差异显著水平 $P<0.05$ 。

[0211] 表3和图1的结果显示,Control组小鼠的体重呈缓慢升高的趋势,DSS诱导的8组小鼠的体重均持续下降,模型组与对照组相比,在第3天体重下降开始显著( $*P<0.05$ ),第7天,二者之间的差异显著程度更加明显( $**P<0.01$ )。而益生菌组、组合菌1,2,3,4,5和VSL<sup>#</sup>3的干预都可以减缓UC小鼠体重的下降,在第7天,这7组小鼠的体重下降的控制相对于模型组比较显著( $\blacktriangle P<0.05$ )。说明本例由加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组成的益生菌组,以及组合菌1,2,3,4,5和VSL<sup>#</sup>3都可以控制UC引起的体重下降情况。并且,在第7天本例的加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组成益生菌组合物组以及组合菌1,2,3,4,5的小鼠的体重都略高于VSL<sup>#</sup>3,说明加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组成益生菌组合物,以及在此基础上添加其他益生菌的组合菌在控制UC小鼠体重降低的效果上都略优于VSL<sup>#</sup>3。

## [0212] 2.DAI的变化

[0213] DSS诱导的溃疡性肠炎的小鼠由于体重下降、大便性状和便血情况的变化引起DAI指数的变化,小鼠DAI指数在第1天、第3天、第5天和第7天的统计值如表4和图2。表4中,各组小鼠的DAI取各组小鼠的平均值。

## [0214] 表4小鼠DAI值

分组	第1天	第3天	第5天	第7天
Control	1.1±0.5	1.1±0.7	1.2±0.8	1.3±0.8
模型组	1.1±0.5	3.6±1.1*	7.2±1.6**	9.4±2.0**
益生菌	1.2±0.4	3.5±1.1	6.1±1.5 <sup>▲</sup>	6.5±1.9 <sup>▲</sup>
组合菌1	1.1±0.4	3.4±1.2	6.0±1.5 <sup>▲</sup>	6.4±1.8 <sup>▲</sup>
组合菌2	1.2±0.4	3.3±1.3	5.9±1.4 <sup>▲</sup>	6.4±1.7 <sup>▲</sup>
组合菌3	1.1±0.5	3.5±1.2	6.0±1.6 <sup>▲</sup>	6.6±1.9 <sup>▲</sup>
组合菌4	1.2±0.4	3.4±1.2	6.0±1.5 <sup>▲</sup>	6.5±1.8 <sup>▲</sup>
组合菌5	1.1±0.4	3.4±1.2	6.0±1.7 <sup>▲</sup>	6.4±2.1 <sup>▲</sup>
VSL <sup>#</sup> 3	1.1±0.4	3.4±1.3	6.6±1.6	7.8±1.9 <sup>▲</sup>

[0216] 表4中,“Control”是指正常组,“益生菌”即益生菌组合物治疗组,组合菌1即组合菌1治疗组,组合菌2即组合菌2治疗组,组合菌3即组合菌3治疗组,组合菌4即组合菌4治疗组,组合菌5即组合菌5治疗组,“VSL<sup>#</sup>3”即VSL<sup>#</sup>3治疗组。“\*”是指模型组相对于正常组小鼠DAI指数的差异显著水平 $P<0.05$ ,\*\*是指模型组相对于正常组小鼠DAI指数的差异显著水平 $P<0.01$ ,”▲”是指“益生菌”、“组合菌1”、“组合菌2”、“组合菌3”、“组合菌4”、“组合菌5”和“VSL<sup>#</sup>3”组小鼠相对于模型组的差异显著水平 $P<0.05$ 。

[0217] 表4和图2数据显示,Control组小鼠的DAI基本持平,而随着DSS诱导,模型组、益生菌组和基于益生菌组基础上添加其他益生菌的组合菌1,2,3,4,5和VSL#3组小鼠的DAI逐渐升高,与对照组相比,第3天模型组小鼠DAI变得开始显著(\* $P < 0.05$ ),第7天模型组小鼠DAI达到最高水平(即相对于control组\*\* $P < 0.01$ )。加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组合益生菌组合、在益生菌组合基础上添加其他益生菌形成的组合菌1,2,3,4,5的干预可以控制DAI的升高,这几组小鼠在第5天和第7天的DAI值相对于模型组得到了显著的控制(▲ $P < 0.05$ ),并且,在第7天益生菌组合和组合菌1,2,3,4,5干预的小鼠的DAI略低于VSL#3,说明加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组成益生菌组合物,以及在此基础上添加其他益生菌的组合菌在控制UC小鼠DAI升高的效果都优于VSL#3。

[0218] 3. 结肠长度的变化

[0219] UC模型小鼠的结肠组织会发生改变,主要是因为溃疡和炎症的发生导致结肠组织缩短,治疗结束后,通过解剖测量的小鼠结肠长度如表5所示。

[0220] 表5小鼠结肠长度

分组	结肠长度 (cm)
Control	8.38±0.49
模型组	5.02±0.87**
VSL#3	6.10±0.67▲
益生菌	6.62±0.69▲
组合菌 1	6.64±0.58▲
组合菌 2	6.66±0.71▲
组合菌 3	6.65±0.79▲
组合菌 4	6.63±0.71▲
组合菌 5	6.63±0.62▲

[0223] 表5中,“Control”是指正常组,“益生菌”即益生菌组合物治疗组,组合菌1即组合菌1治疗组,组合菌2即组合菌2治疗组,组合菌3即组合菌3治疗组,组合菌4即组合菌4治疗组,组合菌5即组合菌5治疗组,“VSL#3”即VSL#3治疗组。“\*\*”是指模型组相对于正常组小鼠结肠长度差异显著水平 $P < 0.01$ ,“▲”是指“益生菌”、“组合菌1”、“组合菌2”、“组合菌3”、“组合菌4”、“组合菌5”和“VSL#3”组小鼠相对于模型组小鼠结肠长度差异显著水平 $P < 0.05$ 。

[0224] 表5的结果显示,在进行DSS诱导7天后的模型组小鼠的结肠组织缩短情况比较严重,与control组相比较非常显著(\*\* $P < 0.01$ )。而益生菌组合物、组合菌1,2,3,4,5和VSL#3的干预可以显著控制小鼠结肠的缩短,相对于模型组得到了显著的控制(\* $P < 0.05$ )。通过表中数据可以发现益生菌组合物和组合菌1,2,3,4,5干预的小鼠的结肠长度比VSL#3组小鼠结肠长度长,可以说明加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组成益生菌组合物,以及

在此基础上添加其他益生菌的组合菌在控制UC小鼠结肠缩短的能力强于VSL#3。

[0225] 表3至表5以及图1和图2的结果显示,本例的益生菌组合物,以及在此基础上的组合菌1,2,3,4,5对溃疡性肠炎具有治疗和预防作用,并且治疗效果都略优于现有的VSL#3产品。

[0226] 实施例二

[0227] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组合物制成常见的食品,具体如下:

[0228] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1按照表6的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0229] 表6含益生菌组合物的食品配方

[0230]

原料	质量百分比(%)
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.2
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.2
牛奶	90.0
白糖	9.0
维生素C	0.6

[0231] 按照表6的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90°C左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43°C,混入保护剂(即维生素C),并接种1-100×10<sup>6</sup>cfu/g的加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1和嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1两种混合益生菌的食品组合物。

[0232] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的益生菌组合物治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃益生菌组合物菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0233] 实施例三

[0234] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌1的组合物制成常见的食品,具体如下:

[0235] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和深圳柯林斯菌TF06-26按照表7的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0236] 表7含益生菌组合物的食品配方

[0237]

原料	质量百分比(%)
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.2
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.2
Collinsella shenzhenensis TF06-26	0.2
牛奶	90.0
白糖	8.8
维生素C	0.6

[0238] 按照表7的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90°C

左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43℃,混入保护剂(维生素C),并接种 $1-100 \times 10^6$ cfu/g的加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和深圳柯林斯菌*Collinsella shenzhenensis* TF06-26三种混合益生菌的食品组合物。

[0239] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的组合菌1治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃组合菌1菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0240] 实施例四

[0241] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌2的组合物制成常见的食品,具体如下:

[0242] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*) DSM 16841按照表8的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0243] 表8含益生菌组合物的食品配方

原料	质量百分比(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.2
<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841	0.2
牛奶	90.0
白糖	8.8
维生素C	0.6

[0245] 按照表8的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43℃,混入保护剂(维生素C),并接种 $1-100 \times 10^6$ cfu/g的加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和罗斯氏菌*Roseburia inulinivorans* DSM 16841三种混合益生菌的食品组合物。

[0246] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的组合菌2治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃组合菌2菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0247] 实施例五

[0248] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌3的组合物制成常见的食品,具体如下:

[0249] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和丁酸杆菌TF01-11按照表9的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0250] 表9含益生菌组合物的食品配方

原料	质量百分比(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.2

Butyribacter intestini TF01-11	0.2
牛奶	90.0
白糖	8.8
维生素C	0.6

[0252] 按照表9的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43℃,混入保护剂(维生素C),并接种1-100×10<sup>6</sup>cfu/g的加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和丁酸杆菌*Butyribacter intestini* TF01-11三种混合益生菌的食品组合物。

[0253] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的组合菌3治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃组合菌3菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0254] 实施例六

[0255] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌3的组合物制成常见的食品,具体如下:

[0256] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1和假小链状双歧杆菌TM12-14按照表10的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0257] 表10含益生菌组合物的食品配方

原料	质量百分比(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.15
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.15
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> TM12-14	0.15
牛奶	90.0
白糖	9.0
维生素C	0.55

[0259] 按照表10的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43℃,混入保护剂(维生素C),并接种1-100×10<sup>6</sup>cfu/g的加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和假小链状双歧杆菌*Bifidobacterium pseudocatenulatum* TM12-14三种混合益生菌的食品组合物。

[0260] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的组合菌4治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃组合菌4菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0261] 实施例七

[0262] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌5的组合物制成常见的食品,具体如下:

[0263] 将牛奶、维生素C和白糖等辅料,与培养的加氏乳杆菌TF08-1、嗜酸乳杆菌AM13-1、

单形巨单胞菌AF24-28AC和人粪厌氧棒形菌AM25-6、按照表11的配方混合,制备具有溃疡性肠炎治疗和预防功能的食品。

[0264] 表11含益生菌组合物的食品配方

原料	质量百分比(%)
Megamonas funiformis AF24-28AC	0.15
Anaerofustis stercorihominis AM25-6	0.15
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.15
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.15
牛奶	90.0
白糖	8.8
维生素C	0.6

[0266] 按照表11的配方比例混合牛奶、白糖,搅拌至完全混合,预热,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌5-10分钟,冷却至40-43℃,混入保护剂(维生素C),并接种 $1-100 \times 10^6$ cfu/g的加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1、嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1、单形巨单胞菌Megamonas funiformis AF24-28AC和人粪厌氧棒形菌Anaerofustis stercorihominis AM25-6四种混合益生菌的食品组合物。

[0267] 将本例的牛乳产品加入DSS造模的小鼠饲料中,按照实施例一的组合菌5治疗组进行饲喂和检测,所不同的是,本例仅仅在饲料中添加了本例的牛乳产品,不额外灌胃组合菌5菌液。检测结果显示,本例的牛乳产品同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0268] 实施例八

[0269] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的加氏乳杆菌TF08-1和嗜酸乳杆菌AM13-1组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药品,配方如表12所示:

[0270] 表12含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比(%)
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.75%
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.75%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	93%
维生素C	0.5%

[0272] 按照表12的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$ cfu/mL加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1和嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1和嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1两株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0273] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一益生菌组合物治疗组中的益生菌组合物菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0274] 实施例九

[0275] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌1的组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药物,配方如表13所示:

[0276] 表13含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比(%)
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.75%
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.75%
Collinsella shenzhenensis TF06-26	0.75%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	92.25%
维生素C	0.5%

[0278] 按照表13的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$  cfu/mL加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1、嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1和深圳柯林斯菌Collinsella shenzhenensis TF06-26活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含加氏乳杆菌Lactobacillus gasseri TF08-1、嗜酸乳杆菌Lactobacillus acidophilus AM13-1和深圳柯林斯菌Collinsella shenzhenensis TF06-26三株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0279] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一组合菌1治疗组中的组合菌1菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0280] 实施例十

[0281] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌2的组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药物,配方如表14所示:

[0282] 表14含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.75%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.75%
<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841	0.75%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	92.25%
[0284] 维生素 C	0.5%

[0285] 按照表14的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$  cfu/mL加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和罗斯氏菌*Roseburia inulinivorans* DSM 16841活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和罗斯氏菌*Roseburia inulinivorans* DSM 16841三株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0286] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一组合菌2治疗组中的组合菌2菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0287] 实施例十一

[0288] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌3的组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药物,配方如表15所示:

[0289] 表15含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.75%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.75%
<i>Butyribacter intestini</i> TF01-11	0.75%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	92.25%
维生素C	0.5%

[0291] 按照表15的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$  cfu/mL加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1和丁酸杆菌*Butyribacter intestini* TF01-11活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干

燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含加氏乳杆菌 *Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* AM13-1和丁酸杆菌 *Butyribacter intestini* TF01-11三株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0292] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一组合菌3治疗组中的组合菌3菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0293] 实施例十二

[0294] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌4的组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药品,配方如表16所示:

[0295] 表16含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比 (%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> TF08-1	0.75%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AM13-1	0.75%
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> TM12-14	0.75%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	92.25%
维生素C	0.5%

[0297] 按照表16的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$  cfu/mL加氏乳杆菌 *Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* AM13-1和假小链状双歧杆菌 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* TM12-14活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含加氏乳杆菌 *Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* AM13-1和假小链状双歧杆菌 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* TM12-14三株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0298] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一组合菌4治疗组中的组合菌4菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0299] 实施例十三

[0300] 本例将实施例一证实具有溃疡性肠炎治疗和预防效果的组合菌5的组合物制成用于治疗溃疡性肠炎的药品,配方如表17所示:

[0301] 表17含益生菌组合物的药品配方

原料	质量百分比 (%)
<i>Megamonas funiformis</i> AF24-28AC	0.75%

Anaerofustis stercorihominis AM25-6	0.75%
Lactobacillus gasseri TF08-1	0.5%
Lactobacillus acidophilus AM13-1	0.5%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	92%
维生素C	0.5%

[0303] 按照表17的比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀,预热到60-65℃,20Mpa压力均质,90℃左右杀菌20-30分钟,冷却至36-38℃,混入保护剂(维生素C),分别接入 $1-50 \times 10^6$  cfu/mL加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1、单形巨单胞菌*Megamonas funiformis* AF24-28AC和人粪厌氧棒形菌*Anaerofustis stercorihominis* AM25-6活菌,36-38℃发酵至pH值为6.0,离心,冷冻干燥至水份含量小于3%,即制备组合益生菌冷冻干燥物。称取0.5克冷冻干燥物与等量的麦芽糊精混合后装入胶囊中,即制成含单形巨单胞菌*Megamonas funiformis* AF24-28AC、人粪厌氧棒形菌*Anaerofustis stercorihominis* AM25-6、加氏乳杆菌*Lactobacillus gasseri* TF08-1和嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* AM13-1四株组合益生菌的胶囊剂药物组合物。

[0304] 采用本例的胶囊剂药物组合物替换实施例一组合菌5治疗组中的组合菌5菌液,按照实施例一相同的方式,灌胃本例的胶囊剂药物组合物,每天灌胃一粒胶囊,按照实施例一相同的方法进行检测。结果显示,本例的胶囊剂药物组合物同样能够控制UC小鼠体重降低、降低小鼠疾病活动指数DAI、改善肠道病变,具有溃疡性肠炎治疗和预防效果。

[0305] 以上各实施例证明加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌两者联合使用能够治疗和预防溃疡性肠炎;并且,在加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌的基础上,还可以添加深圳柯林斯菌、罗斯氏菌(*Roseburia inulinivorans*)、丁酸杆菌或假小链状双歧杆菌,或者添加单形巨单胞菌和人粪厌氧棒形菌,这些组合都能够治疗和预防溃疡性肠炎。以上组合的组合物可以制成各种食品或药品使用;当然,可以理解,以上组合的组合物既然可以制成各种食品和药品,同样也可以制成各种保健品或食品添加剂。

[0306] 另外,研究显示,加氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌组合的治疗效果很大程度上是基于微生态的改善,而这种微生态的改善不仅对溃疡性肠炎有治疗和预防效果,对其它与微生态相关疾病,例如普通肠炎、胃炎等,同样具有效果;因此,本申请的组合物可以用于预防或治疗炎症或炎症相关疾病,特别是各种肠炎、胃炎。

[0307] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本申请的保护范围。

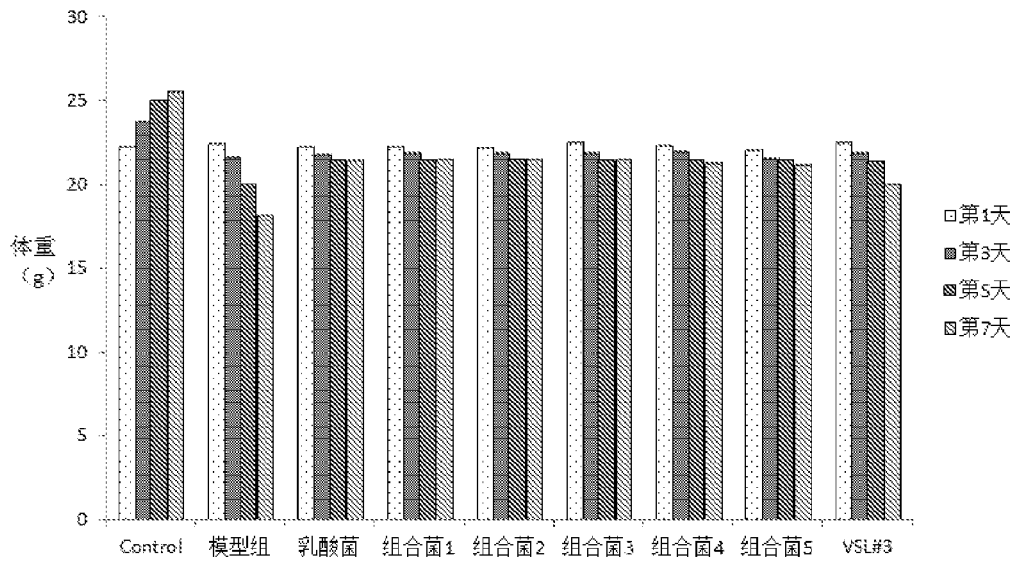


图1

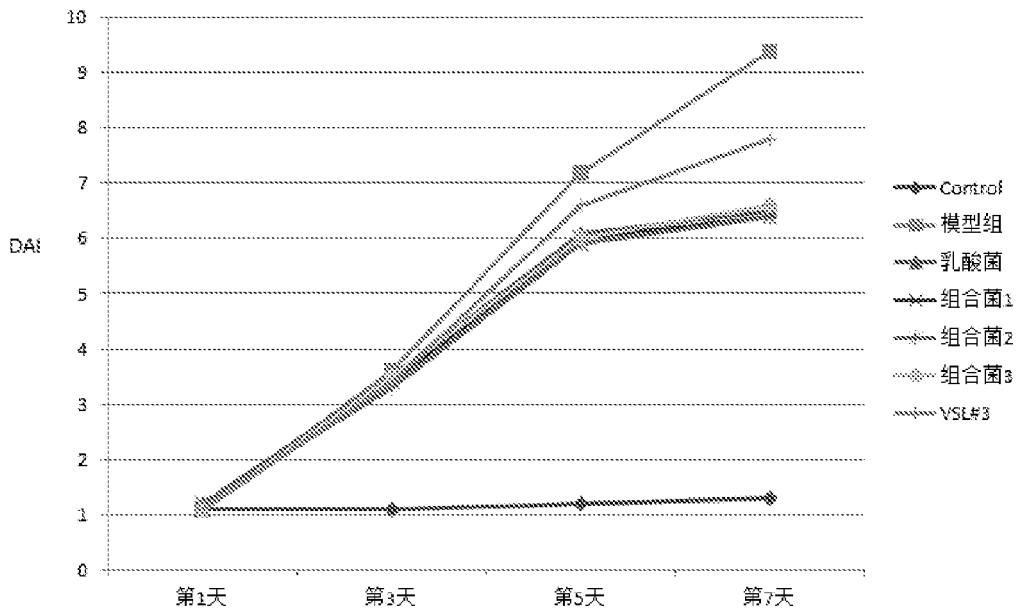


图2