



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115990194 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 21

(21) 申请号 202211288328.9

(22) 申请日 2022.10.20

(71) 申请人 海南大学

地址 570228 海南省海口市人民大道58号

(72) 发明人 张家超 沈思源 王珺 霍冬雪

(74) 专利代理机构 苏州中合知识产权代理事务

所(普通合伙) 32266

专利代理师 刘召民

(51) Int. Cl.

A61K 35/747 (2015.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

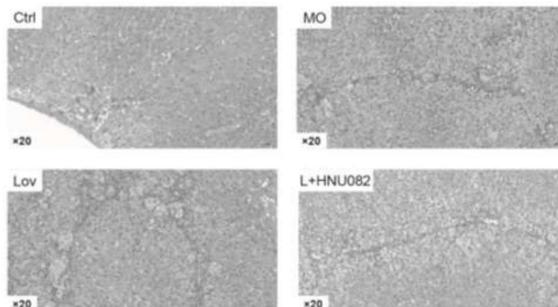
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用

(57) 摘要

本发明提供了植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用,以及洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082在制备治疗高脂血症的药物中的应用。本发明通过体外体内两阶段试验证实了植物乳杆菌HNU082的摄入不会影响洛伐他汀药效且可减缓肝脏炎性反应,从独特角度揭示植物乳杆菌HNU082对人体的影响,进而提示了治疗高脂血症时,服用洛伐他汀的同时服用植物乳杆菌HNU082的积极影响。植物乳杆菌HNU082可以被制成不同剂型的益生菌制剂,使其具有良好的应用前景。



1. 植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肝脏炎症是由洛伐他汀摄入引起的肝脏炎症。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述植物乳杆菌HNU082的保藏编号为GDMCC NO:61552。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括食品、药品及保健品。
5. 根据权利要求1或4所述的应用,其特征在于,所述产品为益生菌制剂。
6. 洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082在制备治疗高脂血症的药物中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述植物乳杆菌HNU082的保藏编号为GDMCC NO:61552。
8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,在制备治疗高脂血症的药物中,协同摄入的植物乳杆菌HNU082不影响洛伐他汀对高脂血症的疗效,并且可缓解洛伐他汀摄入引起的肝脏炎症。
9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,在制备治疗高脂血症的药物中,协同摄入的植物乳杆菌HNU082调控了洛伐他汀摄入后肠道代谢产物的改变。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述肠道代谢产物包括乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸。

## 植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,涉及植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用。

### 背景技术

[0002] 人体肠道中栖息着数百种不同种类的细菌群落,统称为肠道菌群,它们与人类的健康和疾病息息相关,并因人而异。同一种药物,有些人吃了作用明显,而有些人吃了无效,甚至会产副作用,这种“个体药物反应”,可能与人类肠道菌群有关。

[0003] 近期,科学家们开始探究药物与细菌之间相互作用的系统图谱,发现微生物可以通过对药物的化学转化改变药物的活性和功效。现代社会中,越来越多的人选择食用益生菌来保持身体健康,益生菌作为肠道菌群的一员,虽具有益生功能,但服用药物的同时食用益生菌可能会加速药物的化学转化,影响药物在特定位置发挥作用,从而影响药效。

[0004] 洛伐他汀是目前使用最广泛的降脂药物之一,常用于治疗高胆固醇血症和混合型高脂血症。洛伐他汀是一种无活性的前药,需要在体内水解为有活性的羟酸洛伐他汀才能发挥作用。有活性的羟酸洛伐他汀通过抑制合成胆固醇的关键酶HMG还原酶来抑制胆固醇的合成,从而发挥药效。然而,HMG还原酶位于人和动物的肝脏细胞膜上,所以洛伐他汀的主要作用部位为肝脏。口服洛伐他汀经过食道,到胃肠道,再到肝脏,在肝脏发挥作用。所以,如果洛伐他汀到胃肠道时就被肠道益生菌降解为有活性的羟酸洛伐他汀,发挥活性作用,那么到达肝脏上的洛伐他汀就会减少,从而影响药效。

### 发明内容

[0005] 基于目前益生菌对药物降解研究方面的缺失,本发明的目的在于提供植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用,另一个目的在于提供洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082在制备治疗高脂血症的药物中的应用。本发明以植物乳杆菌HNU082为研究对象,明确了植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀治疗结果的影响以及协同摄入时能够产生的积极效果。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 本发明提供了植物乳杆菌HNU082在制备缓解肝脏炎症产品的应用。

[0008] 优选地,所述肝脏炎症是由洛伐他汀摄入引起的肝脏炎症。

[0009] 优选地,所述植物乳杆菌HNU082的保藏编号为GDMCC NO:61552。

[0010] 优选地,所述产品包括食品、药品及保健品。

[0011] 更优选地,所述产品为益生菌制剂。

[0012] 本发明还提供了洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082在制备治疗高脂血症的药物中的应用。

[0013] 优选地,所述植物乳杆菌HNU082的保藏编号为GDMCC NO:61552。

[0014] 优选地,在制备治疗高脂血症的药物中,协同摄入的植物乳杆菌HNU082不影响洛伐他汀对高脂血症的疗效,并且可缓解洛伐他汀摄入引起的肝脏炎症。

[0015] 优选地,在制备治疗高脂血症的药物中,协同摄入的植物乳杆菌HNU082调控了洛伐他汀摄入后肠道代谢产物的改变。

[0016] 更优选地,所述肠道代谢产物包括乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸。

[0017] 本发明的有益效果在于:

[0018] 本发明通过体外体内两阶段试验证实了植物乳杆菌HNU082的摄入不会影响洛伐他汀药效且可减缓肝脏炎性反应,从独特角度揭示植物乳杆菌HNU082对人体的影响,进而提示了治疗高脂血症时,服用洛伐他汀的同时服用植物乳杆菌HNU082的积极影响。植物乳杆菌HNU082可以被制成不同剂型的益生菌制剂,使其具有良好的应用前景。

## 附图说明

[0019] 图1显示洛伐他汀与植物乳杆菌HNU082孵育6小时及12小时消耗的百分比。

[0020] 图2显示洛伐他汀与植物乳杆菌HNU082协同孵育以及洛伐他汀单独孵育时的36个小时药物代谢动力学。

[0021] 图3显示血清中总胆固醇(T-CHO)及甘油三酯(TG)含量。

[0022] 图4显示血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量。

[0023] 图5显示血清中胰岛素(Insulin)含量。

[0024] 图6显示血清中总胆汁酸(TBA)及肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )含量。

[0025] 图7显示肝脏组织结果。

[0026] 图8显示肠内容物中乙酸及丙酸含量。

[0027] 图9显示肠内容物中异丁酸及丁酸含量。

## 具体实施方式

[0028] 为了更清楚地说明本发明,下面结合实施例并对照附图对本发明作进一步详细说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0029] 基于对洛伐他汀治疗机制的理解,本申请旨在探求以下三个方面的关键问题。第一个方面问题,植物乳杆菌HNU082是否可以降解洛伐他汀?第二个方面问题,植物乳杆菌HNU082是否影响洛伐他汀的作用功效?第三个方面问题,洛伐他汀和植物乳杆菌HNU082的协同摄入,是否会对机体其它器官产生影响?如果是,其作用机制是什么?

[0030] 于是,我们基于目前益生菌对药物降解研究方面的缺失对以上三个关键问题进行探究。针对益生菌降解洛伐他汀使其药效降低的这个假设,以植物乳杆菌HNU082为研究对象,设计体外与体内两阶段试验,探究植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀的降解作用。体外,使用高效液相色谱法初步评估植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀的降解效果。同时,监测植物乳杆菌HNU082在洛伐他汀作用下不同时间点转录情况的变化,探索植物乳杆菌HNU082降解洛伐他汀的可能原因。随后,体内,选择肝脏及脂类代谢特征最为接近人类的金黄地鼠构造混合型高脂血症模型,通过测定血液指标,肠道菌群宏基因组和肝脏转录组,明确洛伐他汀协同益生菌植物乳杆菌HNU082对金黄地鼠混合型高脂血症的治疗作用。从表征结果,宏基因组,菌群代谢和肝脏转录等方面进一步探讨了植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀治疗结果的影

响。目的在于提示在给予洛伐他汀治疗的同时服用益生菌的影响。

[0031] 实施例

[0032] 一、在体外植物乳杆菌HNU082会降解药物洛伐他汀

[0033] 一) 体外实验

[0034] 1.1 益生菌与药物

[0035] 实验所用益生菌植物乳杆菌HNU082由海南大学热带益生乳酸菌菌种资源库提供(在专利申请CN202110619723.X中亦有明确公开)。实验药品洛伐他汀(制药二级标准,认证的参考材料)购买于西格玛奥德里奇美国生命科学与高科技集团公司。

[0036] 1.2 体外实验设计

[0037] 植物乳杆菌HNU082与洛伐他汀协同培养6小时和12小时,使用安捷伦科技有限公司的高效液相色谱仪(柱子:C-18Hypersil column;柱温:30℃;流动相:乙腈+0.1%正磷酸:水+0.1%正磷酸=80:20;流速:1.5mL/min检测:238nm紫外检测)测洛伐他汀表达峰面积。此外,协同植物乳杆菌HNU082培养的洛伐他汀峰面积与洛伐他汀单独培养的峰面积相比,计算植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀的降解率。

[0038] 洛伐他汀降解率计算公式如下:

$$[0039] \quad V = \frac{A-B}{A}$$

[0040] V: 植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀的降解率

[0041] A: 洛伐他汀的峰面积

[0042] B: 协同植物乳杆菌HNU082培养后洛伐他汀的峰面积

[0043] 与此同时,测定植物乳杆菌HNU082(单独培养和与洛伐他汀同时培养)在6个时间点(0小时,3小时,6小时,12小时,24小时和36小时)的转录组(北京诺禾致源科技股份有限公司),探究植物乳杆菌HNU082降解洛伐他汀的可能原因。

[0044] 二) 体内实验

[0045] 2.1 实验动物

[0046] 本研究获海南大学动物伦理委员会批准,且所有动物操作均按照海南大学《实验动物护理指南和使用指南》进行。24只雄性SPF级金黄地鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(5周龄)。金黄地鼠在实验前被允许适应环境一周,并在SPF条件下饲养,饲喂消毒饲料和水。空白对照组与混合型高脂血症模型组食用饲料均由江苏省协同医药生物工程有限责任公司所提供。空白对照组饲喂维持基础料(谷物类原材料80%,动物性蛋白10%,小料添加剂10%),模型组饲喂45%脂肪+0.5%胆固醇供能饲料(维持基础料43%,猪油17.5%,蔗糖12%,全脂奶粉10%,酪蛋白13%,实验动物预混料2%,磷酸氢钙2%,0.5%胆固醇)。

[0047] 2.2 体内实验设计

[0048] 实验将金黄地鼠随机分为4组(n=6),分别为:饲喂维持基础料的空白对照组(Control, Ctrl),饲喂高脂饲料造模成功且不给予任何治疗的高脂血症模型组(Model+Carboxymethyl Cellulose, M0),仅给予洛伐他汀治疗高脂血症模型组(Model+Lovastatin, Lov),洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082治疗高脂血症模型组(Model+Lovastatin+植物乳杆菌HNU082, L+HNU082)。第0天开始对3组模型组金黄地鼠饲喂45%脂

肪+0.5%胆固醇供能饲料,构造混合型高脂血症模型。8周时,对比饲喂维持基础料的空白对照组判断造模情况。

[0049] 随后,对已造模成功的3组金黄地鼠进行为期4周的治疗。M0组每日灌胃羧甲基纤维素钠(0.5mL);Lov组每日灌胃5mg/KG洛伐他汀(使用羧甲基纤维素钠溶解,0.5mL);L+HNU082组每日灌胃5mg/KG洛伐他汀+ $10^8$ cfu植物乳杆菌HNU082(使用羧甲基纤维素钠溶解,0.5mL)。治疗4周后,判断植物乳杆菌HNU082的存在对洛伐他汀的治疗效果产生的影响。

[0050] 2.3样本收集与测定

[0051] 无菌条件下采集金黄地鼠的粪便、血清和组织样本。在第8周和第12周时收集粪便,在此之前,每只小鼠被允许在新清洗的笼子中排泄一夜。金黄地鼠在处死前取血离心取血清样本。粪便和血清样本保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 直至使用。粪便用于宏基因组的测定(北京诺禾致源科技股份有限公司),血清样本用于血液基本指标的测定(ELISA试剂盒,上海信裕生物科技有限公司)。解剖后取出肝脏组织和结肠内容物。肝脏组织被分为两部分:一部分用0.85%的生理盐水冲洗后放入多聚甲醛溶液中固定,随后用于测定肝脏组织切片(武汉赛维尔生物科技有限公司)。另一部分,用液氮将其速冻后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ ,用于测定肝脏转录组(北京诺禾致源科技股份有限公司)。结肠内容物保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 用于短链脂肪酸的测定。短链脂肪酸使用安捷伦科技有限公司的气相色谱质谱法分析(柱子Agilent DB-WAX:0.25mm $\times$ 0.25 $\mu\text{m}$  $\times$ 50cm;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$ ;气体界面温度:250 $^{\circ}\text{C}$ ;载气流量:1.5mL/min;分流比=3:1;分流比:1 $\mu\text{L}$ )测定。

[0052] 三)高通量宏基因组测序的质量控制与数据处理

[0053] 所有粪便DNA样本使用Illumina HiSeq 2500平台在同一批次进行鸟枪宏基因组测序。用于分析的数据经过严格的标准筛选。当任何一次读取的N个内容超过读取基数的10%时,成对的读取将被删除。当任意一次读操作中低质量的碱基数量( $Q\leq 5$ )超过50%时,取消配对的读操作。每个样本平均获得11.07Gb高质量的配对端测序数据,本项目共获得3189.48Gb高质量数据。

[0054] 对于宏基因组物种注释,采用Kraken2+Bracken软件。Kraken2高精度对宏基因组序列分类进行分类,Bracken计算宏基因组数据中物种丰度。随后,去除物种丰度 $<0.01\%$ 的假阳性。

[0055] 四)RNA测序和转录组分析

[0056] 对于转录组数据的分析,构建RNA文库后,使用标准协议对Illumina NovaSeq 6000进行测序。利用STAR比对器将筛选后的reads映射到参考基因组上。使用FeatureCounts估计基因的表达量。使用Bioconductor包DESeq2进行基因中心差异表达分析。

[0057] 五)统计分析

[0058] 所有统计分析均采用R(版本3.6.1)软件进行。数据以均数 $\pm$ 标准误差(SE)表示。用Wilcoxon秩和检验对属和种的差异丰度进行鉴定,根据p值阈值为0.05(\* $p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ )认为差异显著。使用“ggplot2”包生成柱状图。

[0059] 结果显示,在体外,植物乳杆菌HNU082可降解洛伐他汀。洛伐他汀与植物乳杆菌HNU082孵育6小时及12小时消耗的百分比如图1所示,协同孵育12小时,植物乳杆菌HNU082降解洛伐他汀17.6%。构建36个小时药物代谢动力学显示,自孵育2小时起,植物乳杆菌HNU082对的药物降解率均显著高于洛伐他汀单独孵育时的降解率( $p<0.05$ ),如图2所示。提

示在体外植物乳杆菌HNU082会降解药物洛伐他汀。

[0060] 二、在体内协同摄入植物乳杆菌HNU082对洛伐他汀治疗效果无影响且对肝脏有益

[0061] 为了研究植物乳杆菌HNU082是否会在宿主肠道加速洛伐他汀的消耗,进而影响药效。选择肝脏及脂类代谢特征最为接近人类的金黄地鼠,构造混合型高脂血症金黄地鼠模型,并在造模成功时分别给予洛伐他汀单独治疗,不给药治疗以及洛伐他汀协同植物乳杆菌HNU082治疗(n=6)。以血液指标总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和胰岛素(Insulin)全面评价治疗效果差异。

[0062] 结果显示,虽仅有洛伐他汀组总胆固醇显著降低( $p < 0.05$ ),但其总胆固醇含量与植物乳杆菌HNU082组无显著性差异,洛伐他汀组与植物乳杆菌HNU082组均可使甘油三酯( $p < 0.05$ )显著性降低,如图3所示。与此同时,洛伐他汀组与植物乳杆菌HNU082组低密度脂蛋白胆固醇均显著性降低( $p < 0.05$ ),此外,植物乳杆菌HNU082组高密度脂蛋白胆固醇有显著性升高( $p < 0.05$ ),如图4所示。随后,胰岛素结果显示,洛伐他汀组与植物乳杆菌HNU082组均可显著降低胰岛素含量( $p < 0.05$ )。然而,洛伐他汀组与植物乳杆菌HNU082组组间胰岛素含量并无差异,如图5所示。上述结果提示每项血液指标治疗效果虽有些许不同,但洛伐他汀单独治疗效果与其协同植物乳杆菌HNU082治疗效果并无显著性差异。

[0063] 值得注意的是,血液总胆汁酸显示,与不治疗相比,洛伐他汀的摄入使总胆汁酸极显著地增加( $p < 0.01$ ),与此同时,洛伐他汀组的TNF- $\alpha$ 显著高于MO组与植物乳杆菌HNU082组( $p < 0.05$ ),如图6所示。观察肝脏组织结果发现,植物乳杆菌HNU082组的肝脏炎性细胞浸润程度明显轻微于其他模型组,洛伐他汀组肝脏炎性细胞浸润相对严重,如图7所示。这表明,洛伐他汀的摄入使肝脏易产生炎性反应,但植物乳杆菌HNU082的摄入可一定程度地减缓炎症。

[0064] 三、植物乳杆菌HNU082调控了洛伐他汀摄入后肠道代谢产物的改变

[0065] 我们对地鼠肠内容物中的乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸进行了定性和定量鉴定。结果表明,洛伐他汀组乙酸和丁酸含量均显著低于益生菌组( $p < 0.05$ )。同时,植物乳杆菌HNU082组的丙酸和异丁酸含量显著性高于洛伐他汀组( $p < 0.05$ ),如图8和9所示。这可能表明,灌胃植物乳杆菌HNU082可以改善地鼠短链脂肪酸的积累。

[0066] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为更清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方法予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

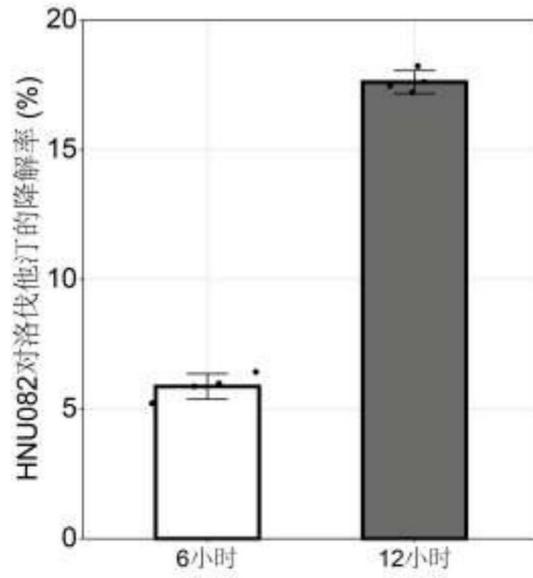


图1

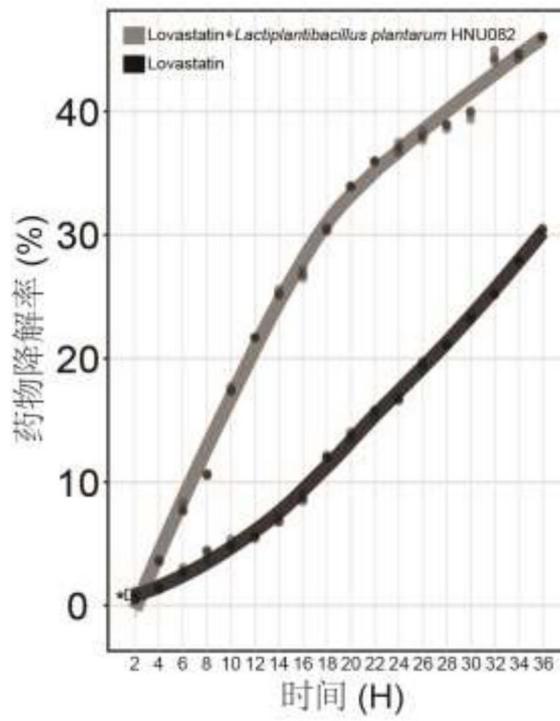


图2

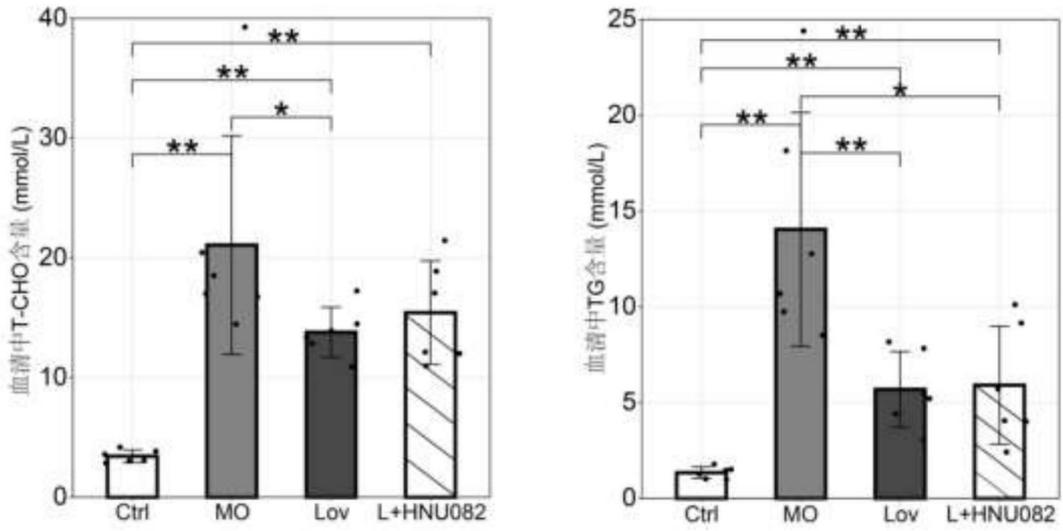


图3

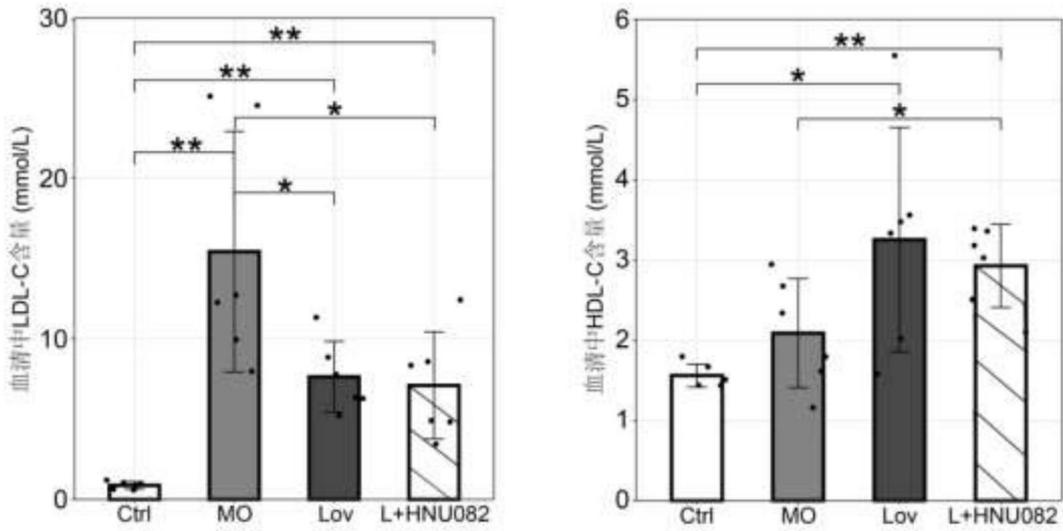


图4

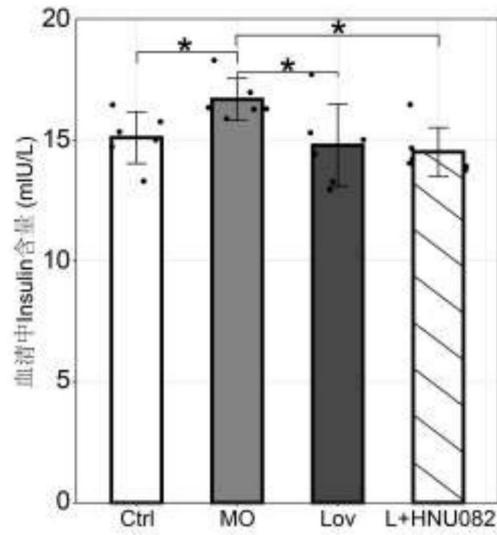


图5

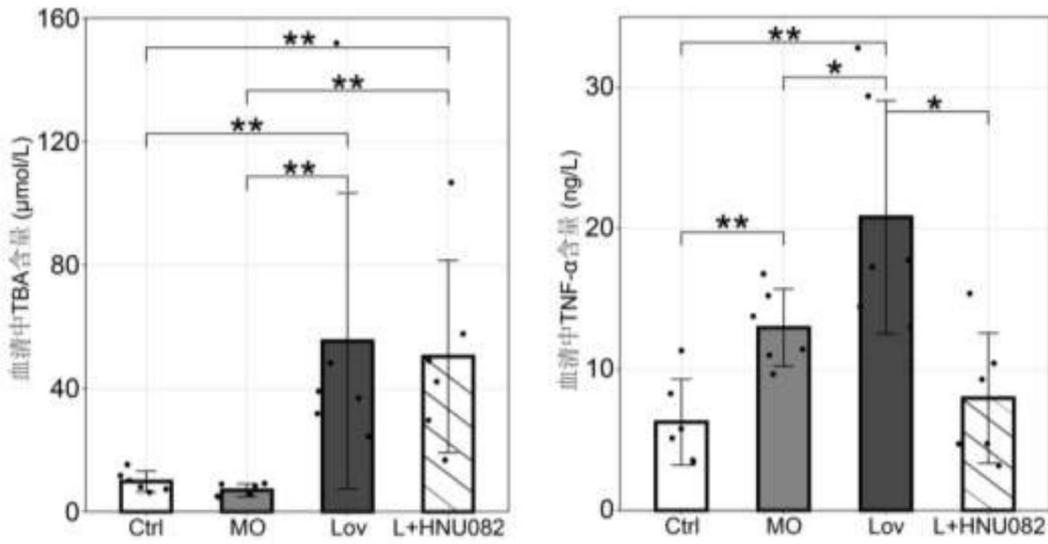


图6

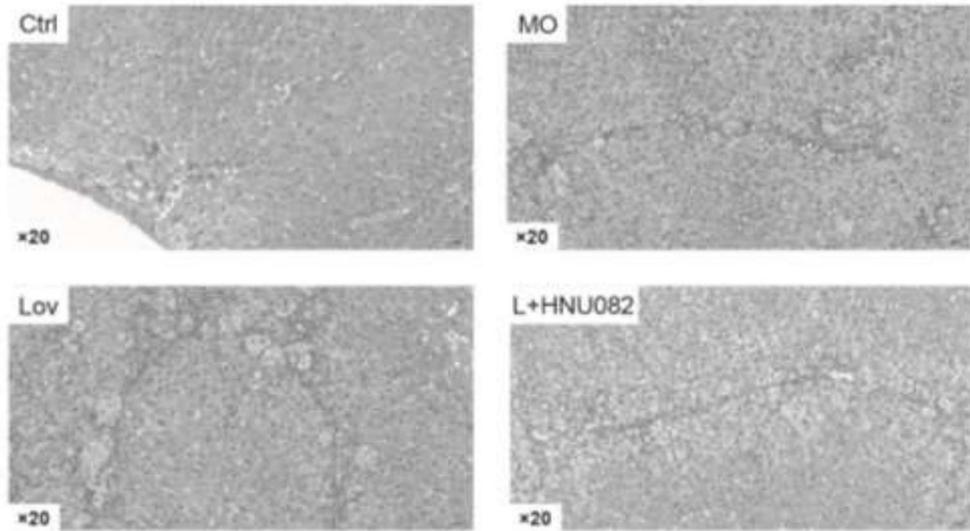


图7

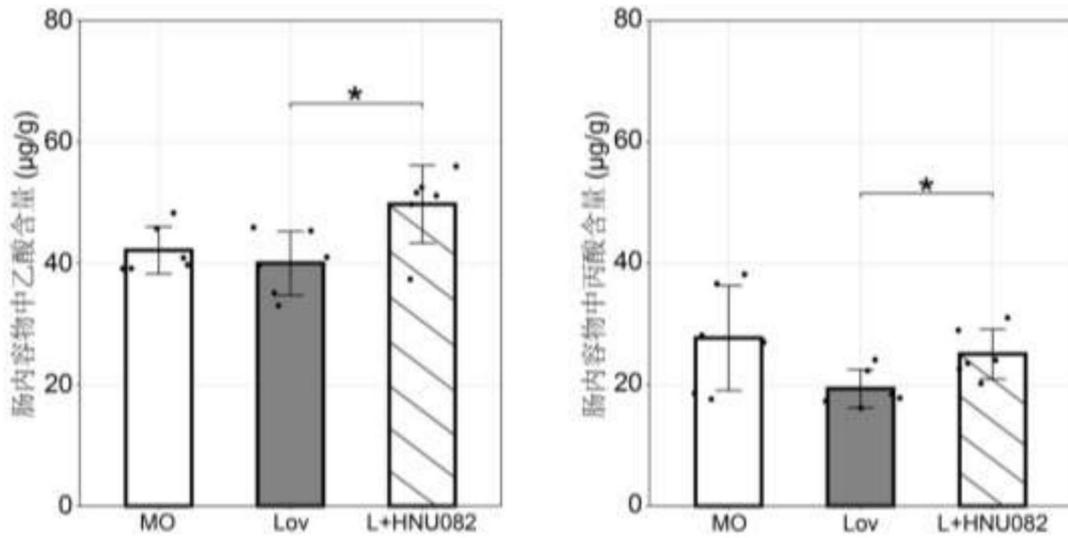


图8

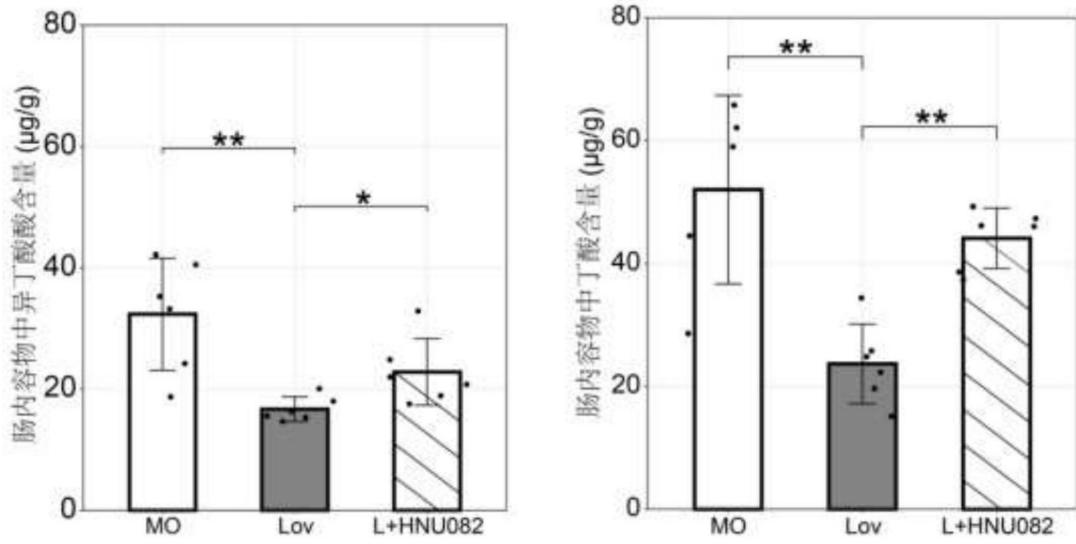


图9