



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117701429 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 15

(21) 申请号 202311683234.6

A61P 29/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.09

A61P 37/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/01 (2006.01)

CCTCC NO:M 20231906 2023.10.16

(71) 申请人 上海复漾生物科技有限公司

地址 200082 上海市杨浦区四平路1779号2
层2016室

(72) 发明人 刘训志 吴昊 史莹 韩欢

崔文锋 易德伟 刘曾丽 熊慧

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代

理事务所 12201

专利代理师 陆艺

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

权利要求书1页 说明书7页

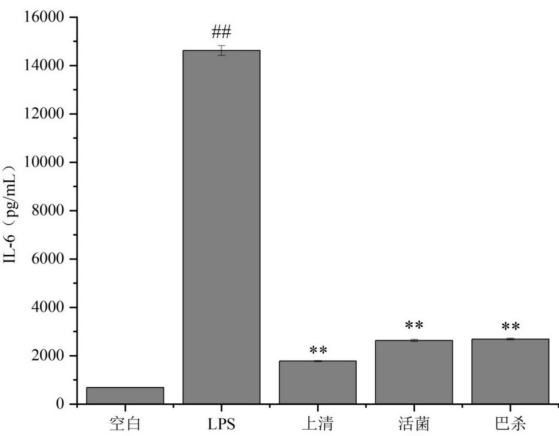
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌及应用,嗜黏蛋白阿克曼氏菌分类学命名为 *Akkermansia muciniphila*,于2023年10月16日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO:M 20231906;本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌,对酸、胆盐、人工胃液和人工肠液有较好的耐受性,采用LPS诱导RAW 264.7细胞炎症模型表明本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌具有抗炎功效,能显著抑制炎症因子NO、IL-6和IL-1 β 的产生;且当嗜黏蛋白阿克曼氏菌与RAW 264.7巨噬细胞共培养时,能产生少量NO,但又低于LPS组NO的分泌量,表明能调动细胞的免疫反应。



1. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌,其分类学命名为 *Akkermansia muciniphila*,于2023年10月16日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 20231906。
2. 权利要求1的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备抗炎药物中的应用。
3. 权利要求1的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备提高免疫力药物中的应用。
4. 根据权利要求2所述的应用,其特征是所述抗炎药物的剂型为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂或口溶膜剂。
5. 根据权利要求3所述的应用,其特征是所述提高免疫力药物的剂型为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂或口溶膜剂。

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌及应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,涉及一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌及应用。

背景技术

[0002] 炎症是一种免疫应激反应,是机体对外界刺激、感染、内源组织损伤等做出的保护性反应,广泛发生于机体的细胞、组织和器官等。根据发生程度和持续时间的不同,炎症可分为急性炎症和慢性炎症反应。急性炎症持续时间较短,如局部组织损伤导致的发炎、发热、红肿等。慢性炎症持续时间较长,炎症因子的分泌异常会对组织器官造成长期的影响。当机体发生炎症时,具有免疫应答反应的细胞产生异常水平的细胞因子并在组织损伤部位激活和募集,使内皮组织及器官产生炎症损伤。具有免疫调节作用的细胞因子包括白细胞介素类(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)、干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)及趋化因子等。由炎症引发的组织损伤和免疫功能紊乱与慢性炎症疾病,如II型糖尿病、炎症性肠病、关节炎、动脉粥样硬化和其它心血管疾病等的发生密切相关。目前预防和治疗炎症的方法主要是抑制细胞免疫反应,减少促炎细胞因子分泌,干预炎症信号通路等。但临床上常用的抗炎药物存在一定的副作用,长期使用可能会导致心血管疾病和消化道出血等。

[0003] 经研究发现,肠道菌群可影响患者的炎症反应,肠道中存在着大量的“有益”菌,其中的嗜黏蛋白阿克曼氏菌是近年来发现的一类有益菌,寄居在消化道营养丰富的黏液层,是从人类粪便中分离培养的严格厌氧的革兰氏阴性菌,在健康肠道中的丰度是0.5-5%。目前,关于嗜黏蛋白阿克曼氏菌的报道还不多,筛选出来的新菌株数量有限,且由于嗜黏蛋白阿克曼氏菌为严格厌氧菌,其耐受性也较差。

[0004] 因此,针对以上问题,亟需具有较好耐受性且具有抗炎和调节免疫力的新菌株,可帮助患者对抗一些慢性炎症性疾病,提高患者免疫力,维持患者的肠道健康。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种具有较好耐受性的嗜黏蛋白阿克曼氏菌。

[0006] 本发明的第二个目的是提供一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备抗炎药物中的应用。

[0007] 本发明的第三个目的是提供一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备提高免疫力药物中的应用。

[0008] 本发明的技术方案概述如下:

[0009] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌,其分类学命名为Akkermansia muciniphila,于2023年10月16日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 20231906。

[0010] 上述一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备抗炎药物中的应用。

[0011] 上述一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备提高免疫力药物中的应用。

[0012] 上述抗炎药物的剂型优选片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、溶液剂、混悬剂、乳

剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂或口溶膜剂。

[0013] 上述提高免疫力药物的剂型为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂或口溶膜剂。

[0014] 本发明的优点：

[0015] 本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌，对酸、胆盐、人工胃液和人工肠液有较好的耐受性，采用LPS诱导RAW 264.7细胞炎症模型表明本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌具有抗炎功效，能显著抑制炎症因子NO、IL-6和IL-1 β 的产生；且当嗜黏蛋白阿克曼氏菌与RAW 264.7巨噬细胞共培养时，能产生少量NO，但又低于LPS组NO的分泌量，表明能调动细胞的免疫反应。

附图说明

[0016] 图1为本发明实施例1培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌落特征图。

[0017] 图2为本发明实施例1培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌进行革兰氏染色后的显微镜观察图。(图中深色部分为蓝色)

[0018] 图3为本发明实施例1培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的对巨噬细胞炎症因子NO分泌量的影响。

[0019] 图4为本发明实施例1培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的对巨噬细胞炎症因子IL-6分泌量的影响。

[0020] 图5为本发明实施例1培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的对巨噬细胞炎症因子IL-1 β 分泌量的影响。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0022] 实施例1

[0023] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的分离及鉴定

[0024] 用无菌取样勺采集健康男性成人粪便0.5g于10mL无菌离心管中，立即将样本转移到厌氧工作站中(85% N₂、10% H₂、5% CO₂)，加入5mL的BHI+液体培养基，于厌氧条件下孵育培养5天。孵育结束后，使用磷酸盐缓冲液(pH=7.4)按照1:10的稀释方式将样本稀释至10⁸倍，分别取各稀释梯度下100 μ L液体于BHI+固体培养基上涂布，厌氧培养3天，挑取菌落形态为圆形、凸起、表面光滑、边缘整齐的灰白色单菌落接种至BHI+液体培养基中，厌氧培养3天后对培养的菌液使用PCR扩增技术进行16s rDNA鉴定。

[0025] 本实施例中的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的PCR扩增体系以及反应程序如下：

[0026] 表1:PCR扩增体系

组分		添加量/ μL		
[0027]	2×Taq Plus Master Mix II	12.5		
	Forward primer	1		
	Reverse primer	1		
	菌液	1		
	ddH ₂ O	9.5		
	Total	25		
[0028]	其中,用于16s rDNA鉴定的特异性扩增引物为:			
[0029]	上游引物Forward primer:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:1);			
[0030]	下游引物Reverse primer:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO:2)。			
[0031]	表2:PCR反应程序			
[0032]	阶段	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间 s	} 30 个循环
	预变性	95	300	
	变性	95	30	
	退火	52	50	
	延伸	72	60	
	终止	72	600	
	保存	4	∞	

[0033] 扩增产物送擎科生物测序。

[0034] 测序得到的16s rDNA结果SEQ ID No.3所示:

[0035] 本申请的发明人分离得到了菌株AkkTimepie001,根据16s rDNA分析,与嗜黏蛋白阿克曼氏菌ATCC BAA-835的16S序列比对结果显示Per.Ident值为99.93%,鉴定为嗜黏蛋白阿克曼氏菌。为了进一步确定两株菌的进化关系,对菌株AkkTimepie001进行了全基因组测序,并将其与嗜黏蛋白阿克曼氏菌ATCC BAA-835进行了ANI分析,结果显示菌株AkkTimepie001与嗜黏蛋白阿克曼氏菌ATCC BAA-835比对的ANI值为97.24%,满足同种物种划分的ANI评判标准(>95%),并通过形态分析、代谢物成分分析、功效分析(如耐受性和人工胃肠液耐受性)等综合分析,菌株AkkTimepie001属于嗜黏蛋白阿克曼氏菌,而且鉴定为不同于835(标准菌株)等嗜黏蛋白阿克曼氏菌的新菌种。

[0036] 将嗜粘蛋白阿克曼菌AkkTimepie001划线接种至BHI+固体培养基上,厌氧培养3天后,观察菌落形态特征,菌落呈圆形凸起,边缘整齐、白色、大小不一,见图1。

[0037] 使用亚甲基蓝对嗜粘蛋白阿克曼菌AkkTimepie001进行革兰氏染色,镜检为革兰氏阴性菌,呈椭圆形,单个或多个组成链装排列,见图2。

[0038] 本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌,分类学命名为Akkermansia muciniphila (AkkTimepie001)于2023年10月16日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:M 20231906。

[0039] BHI+液体培养基(BHI液体培养基基础上添加0.25%质量分数粘蛋白以及5%质量

分数的L-苏氨酸)。

[0040] BHI+固体培养基 (BHI液体培养基基础上添加0.25%质量分数粘蛋白、5%质量分数的L-苏氨酸、2%质量分数的琼脂粉)。

[0041] 实施例2:嗜黏蛋白阿克曼氏菌AkkTimepie001 (以下简称AkkTimepie001)的耐酸性能

[0042] 冷冻保存的AkkTimepie001按1%接种量接种至BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养3天后按5%接种量转接至新鲜的BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养60-72h后,无菌条件下收集5mL菌液,8000rpm离心5min分离菌体。将菌体沉淀用0.9%氯化钠水溶液重悬并充分混匀,8000rpm离心5min收集菌体。将菌体分别用等体积pH=2和pH=3的BHI+液体培养基重悬并充分混匀后,置于37℃的厌氧环境下进行孵育。分别在孵育0h、1.5h和3h菌液,并用0.9%氯化钠水溶液对菌液进行10倍梯度稀释,选择合适的稀释度进行涂板。每个样品选择2-3个稀释梯度,每个稀释梯度做2个平板。涂布后的平板倒置于37℃培养箱中厌氧培养,培养3-5天后观察平板上菌落的生长状态,并记录菌落数,计算存活率。

[0043] 存活率 = $\frac{A_n}{A_0} \times 100\%$

[0044] 其中 A_0 为孵育0小时的菌落数, A_n 为孵育n小时的菌落数。

[0045] 实验结果:AkkTimepie001和标准株(嗜黏蛋白阿克曼氏菌ATCC BAA-835)在酸性环境下的存活情况如表1所示。在pH=3的酸性环境下,AkkTimepie001的存活率为32.09%,在pH=2的环境下,存活率为16.46%,存活情况均优于标准株。

[0046] 表1嗜粘蛋白阿克曼菌酸耐受情况统计表

	组别	孵育时间/h	存活率%	
			标准株	AkkTimepie001
[0047]	pH=2	1.5	19.43±6.63	32.38±9.90
		3	4.00±0.69	16.46±5.52
	pH=3	1.5	37.55±7.30	50.39±2.97
		3	23.49±6.63	32.09±7.58

[0048] 实施例3:AkkTimepie001的胆盐耐受性能评价

[0049] 冷冻保存的AkkTimepie001按1%接种量接种至BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养3天后按5%接种量转接至新鲜的BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养60-72h后,无菌条件下收集5mL菌液,8000rpm离心5min分离菌体。将菌体沉淀用0.9%氯化钠水溶液重悬并充分混匀,8000rpm离心5min收集菌体。将菌体分别用等体积含0.3%和1%浓度胆盐的BHI+液体培养基重悬并充分混匀后,置于37℃的厌氧环境下进行孵育。分别在孵育0h、4h和8h菌液,并用0.9%氯化钠水溶液对菌液进行10倍梯度稀释,选择合适的稀释度进行涂板。每个样品选择2-3个稀释度,每个稀释度做2个平板。涂布后的平板倒置于37℃培养箱中厌氧培养,培养3-5天后观察平板上菌落的生长状态,并记录菌落数,计算存活率。

[0050] 存活率 = $\frac{A_n}{A_0} \times 100\%$

[0051] 其中 A_0 为孵育0小时的菌落数, A_n 为孵育n小时的菌落数。

[0052] 实验结果:AkkTimepie001和标准株在胆盐环境下的存活情况如表2所示。通常情况下,人体生理环境中胆盐浓度不超过0.3%,在胆盐浓度为0.3%的环境下,AkkTimepie001的存活率较好且高于标准株。

[0053] 表2AkkTimepie001胆盐耐受情况统计表

胆盐浓度	孵育时间/h	存活率%	
		标准株	AkkTimepie001
0.3%	4	57.72±7.86	96.59±2.53
	8	27.64±4.53	65.08±4.37
1%	4	19.11±4.85	40.00±6.51
	8	18.08±3.59	10.95±2.64

[0055] 实施例4:AkkTimepie001的人工胃液耐受性能评价

[0056] 冷冻保存的AkkTimepie001按1%接种量接种至BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养3天后按5%接种量转接至新鲜的BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养60-72h后,无菌条件下收集5mL菌液,8000rpm离心5min分离菌体。将菌体沉淀用0.9%氯化钠溶液重悬并充分混匀,8000rpm离心5min收集菌体。将菌体分别用等体积pH=2和pH=3的人工胃液重悬并充分混匀后,置于37℃的厌氧环境下进行孵育。分别在孵育0h、1.5h和3h菌液,并用0.9氯化钠水溶液对菌液进行10倍梯度稀释,选择合适的稀释度进行涂板。每个样品选择2-3个稀释度,每个稀释度做2个平板。涂布后的平板倒置于37℃培养箱中厌氧培养,培养3-5天后观察平板上菌落的生长状态,并记录菌落数,计算存活率。

[0057] 存活率 = $\frac{A_n}{A_0} \times 100\%$

[0058] 其中 A_0 为孵育0小时的菌落数, A_n 为孵育n小时的菌落数。

[0059] 实验结果:AkkTimepie001和标准株在人工胃液中存活情况如表3所示。在pH=3的人工胃液环境下,菌株AkkTimepie001的存活率为42.54%,在pH=2的人工胃液环境下,存活率为13.45%,存活情况均优于标准株。

[0060] 表3AkkTimepie001人工胃液耐受情况统计表

	组别	孵育时间/h	存活率	
			标准株	AkkTimepie001
[0061]	pH=2	1.5	6.18±3.52	28.68±6.71
		3	4.59±1.27	13.45±3.49
	pH=3	1.5	55.38±6.75	76.87±5.64
		3	12.58±3.42	42.54±7.13

[0062] 实施例5:AkkTimepie001的人工肠液耐受性能评价

[0063] 冷冻保存的AkkTimepie001按1%接种量接种至BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养3天后按5%接种量转接至新鲜的BHI+液体培养基中,37℃培养箱中厌氧培养。菌液培养60-72h后,无菌条件下收集5mL菌液,8000rpm离心5min分离菌体。将菌体沉淀用0.9%氯化钠水溶液重悬并充分混匀,8000rpm离心5min收集菌体。将菌体分别用等体积人工肠液重悬并充分混匀后,置于37℃的厌氧环境下进行孵育。分别在孵育0h、4h和8h菌液,并用0.9%氯化钠水溶液对菌液进行10倍梯度稀释,选择合适的稀释度进行涂板。每个样品选择2-3个稀释度,每个稀释度做2个平板。涂布后的平板倒置于37℃培养箱中厌氧培养,培养3-5天后观察平板上菌落的生长状态,并记录菌落数,计算存活率。

[0064]
$$\text{存活率} = \frac{A_n}{A_0} \times 100\%$$

[0065] 其中 A_0 为孵育0小时的菌落数, A_n 为孵育n小时的菌落数。

[0066] 实验结果:AkkTimepie001和标准株在人工肠液中的存活情况如表4所示。孵育4h时菌株AkkTimepie001的存活率为87.80%,孵育8h时存活率降为78.32%,存活情况均优于标准株。

[0067] 表4AkkTimepie001人工肠液耐受情况统计表

	组别	孵育时间/h	存活率	
			标准株	AkkTimepie001
[0068]	人工肠液	4	26.58±6.83	87.80±4.57
		8	10.95±4.71	78.32±3.55

[0069] 实施例6:AkkTimepie001对NO和细胞因子IL-6、IL-1 β 分泌量的影响

[0070] 实验设计与流程

[0071] 将生长状态良好的小鼠巨噬细胞RAW 264.7细胞以 10^5 个/mL,每孔1mL转接至6孔细胞培养板内,24h待细胞贴壁后,吸弃旧培养基,将 10^8 安全浓度的益生菌各组分分别与RAW264.7共培养,对照组加入等量的RPMI-1640完全培养基(在1640基础培养基的基础上添加1%的双抗和10%的胎牛血清),于37℃、5%CO₂培养箱中孵育24h,设定活菌干预组(活菌)、上清干预组(上清)、巴氏灭菌干预组(巴氏灭菌);或者利用LPS(2 μ g/mL)诱导RAW 264.7细胞建立炎症模型,将10mg的脂多糖粉末用10mL 1640基础培养基充分溶解,配置为1mg/mL的母液,于-20℃保存,实验时再用完全培养基稀释到2 μ g/mL,将 10^8 安全浓度的益生

菌各组分对其LPS (2 μ g/mL) 诱导的RAW264.7细胞进行共培养,对照组加入等量的RPMI-1640完全培养基,设定对照组(CK)、LPS诱导组(LPS)、上清干预组(LPS+上清)、活菌干预组(LPS+活菌)、巴氏杀菌干预组(LPS+巴杀),于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24h后,收集每孔细胞培养上清,3000rpm离心5min去除细胞沉淀。使用一氧化氮试剂盒检测细胞上清液中NO的含量或使用ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-6、IL-1 β 的含量。

[0072] 所有数据采用SPSS25.0进行统计学分析。#:P<0.05,与空白组相比有显著差异,##:P<0.01,与空白组相比有非常显著差异;*:P<0.05,与LPS模型组相比有显著差异,**:P<0.01,与LPS模型组相比有非常显著差异。

[0073] 实验结果:如图3所示,与正常对照组相比,模型组LPS组的NO的含量显著上升,表明造模成功。NO的过量产生会引起各种疾病的发展,与造模组相比,AkkTimepie001上清、AkkTimepie001活菌及AkkTimepie001巴杀组均能不同程度的使NO的分泌量降低,说明AkkTimepie001具有抑制炎症的功效。IL-6、IL-1 β 是典型的炎症细胞因子,如图4、图5所示,与正常对照组相比,模型组LPS组的IL-6、IL-1 β 的含量显著上升,表明造模成功。与造模组相比,AkkTimepie001上清、AkkTimepie001活菌及AkkTimepie001巴杀均能较大程度的使IL-6、IL-1 β 的分泌量降低,说明AkkTimepie001具有抑制炎症的功效。

[0074] 如图3所示,仅仅与巨噬细胞共培养时,AkkTimepie001上清、AkkTimepie001活菌及AkkTimepie001巴杀均能刺激细胞上清液中NO的产生,说明AkkTimepie001上清、AkkTimepie001活菌及AkkTimepie001巴杀均能调动细胞内的免疫反应。

[0075] 用本发明的一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌、上清液、灭活菌或者活菌与灭活菌的组合物与药学可接受的辅料或食品可接受的辅料制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂或口溶膜剂,用于抗炎或用于提高免疫力。

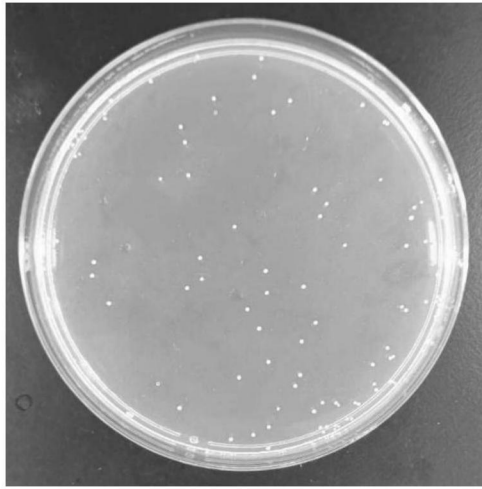


图1

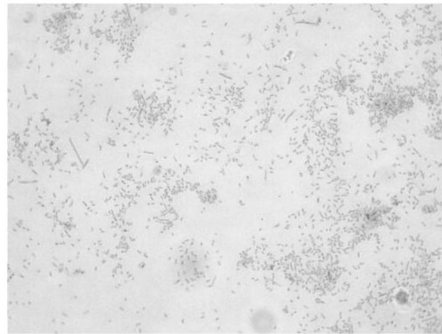


图2

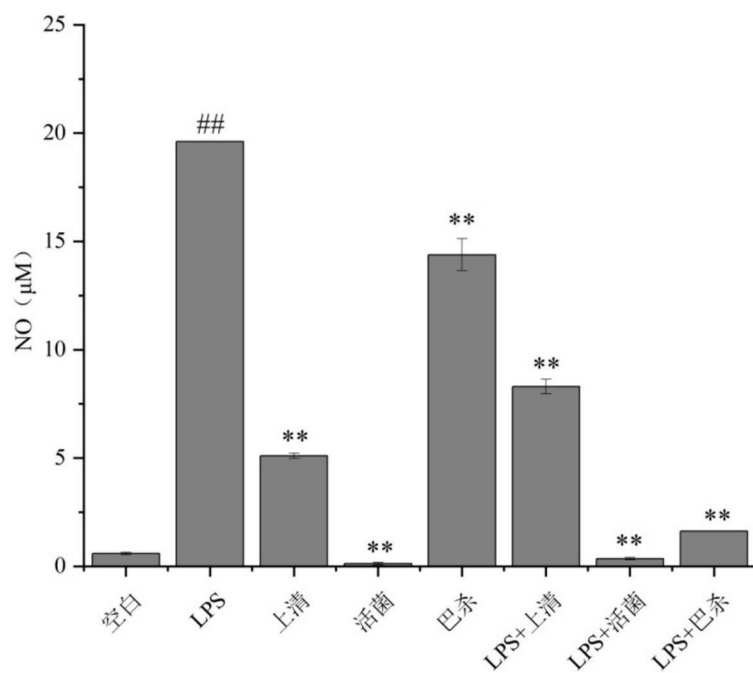


图3

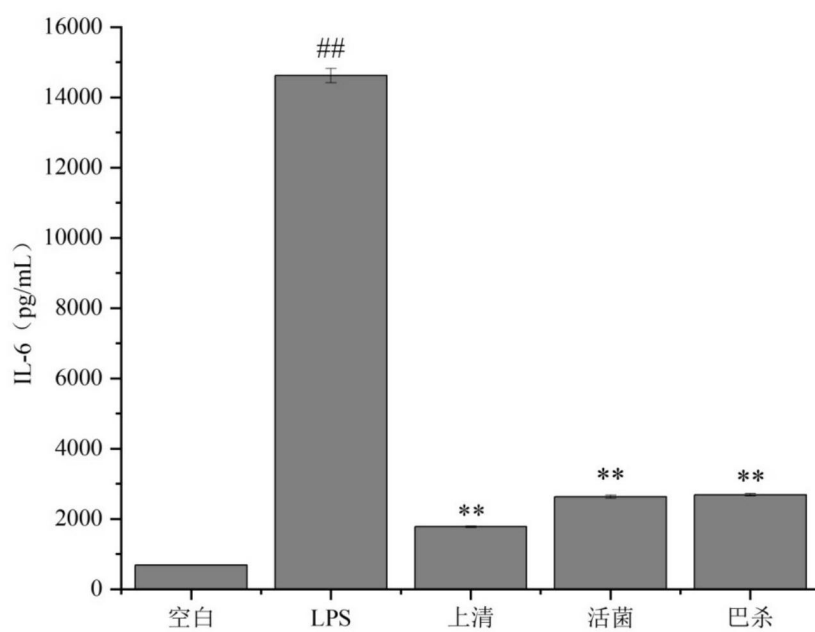


图4

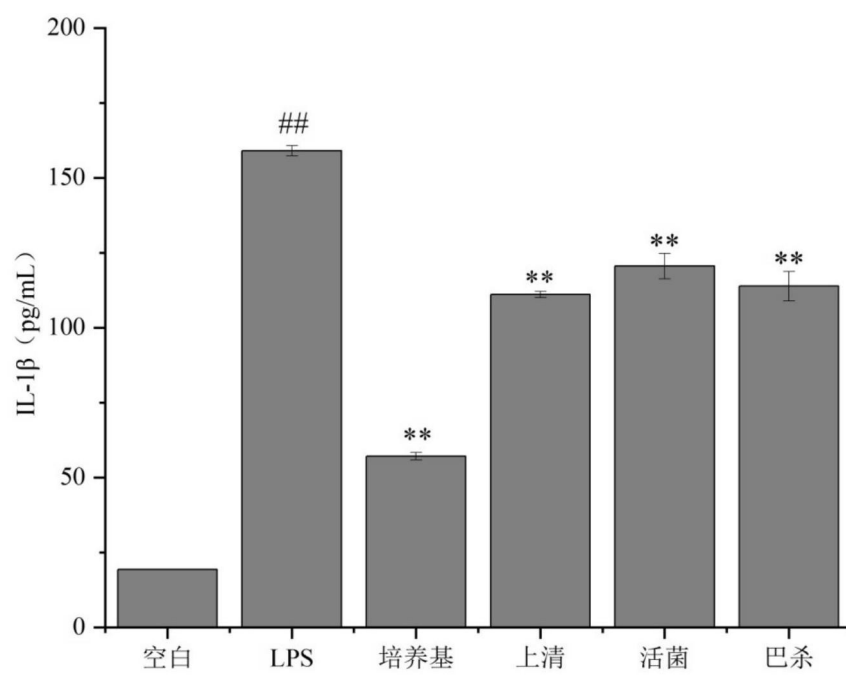


图5