



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104546935 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410522420. 6

(22) 申请日 2014. 09. 30

(71) 申请人 深圳华大基因科技有限公司

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山路  
146 号北山工业区综合楼 11F-3

申请人 深圳华大基因研究院

(72) 发明人 冯强 张东亚 贾慧珏 刘传

肖亮 王俊

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51) Int. Cl.

A61K 35/74(2015. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A23K 1/16(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称

多形拟杆菌在治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病中的应用

(57) 摘要

本发明提供了多形拟杆菌在治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病中的用途,还提供了包含多形拟杆菌的药物组合物、药物、食品和饲料。通过给动物提供多形拟杆菌,能够有效发挥抗炎的功效,关节发红和肿胀的症状得到有效改善,关节炎症状明显减轻,能够有效用于治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

1. 多形拟杆菌在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病,

任选地,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*,

任选地,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 中的至少一种。

2. 一种药物组合物,其特征在于,包括:

多形拟杆菌;以及

药学上可接受的辅料,

任选地,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*,

任选地,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 中的至少一种。

3. 根据权利要求 2 所述的药物组合物,其特征在于,当所述药物组合物呈固态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/g, 优选  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g, 更优选  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,

当所述药物组合物呈液态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/mL, 优选  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL, 更优选  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

4. 根据权利要求 2 所述的药物组合物,其特征在于,所述药学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种,

任选地,所述药学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种。

5. 一种药物,其特征在于,包括:

权利要求 2-4 中任一项所述的药物组合物。

6. 根据权利要求 5 所述的药物,其特征在于,所述药物呈选自颗粒剂、胶囊、片剂、粉末剂、口服液、混悬液和乳剂中的至少一种制剂形式。

7. 一种食品,其特征在于,包括:

多形拟杆菌;以及

食品学上可接受的辅料,

任选地,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*,

任选地,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 中的至少一种。

8. 根据权利要求 7 所述的食品,其特征在于,当所述食品呈固态时,所述食品包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/g, 优选  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g, 更优选  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g, 的所述多形拟杆菌,

当所述食品呈液态时,所述食品包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/mL, 优选  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL, 更优选  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

9. 根据权利要求 7 所述的食品, 其特征在于, 所述食品学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种,

任选地, 所述食品学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种,

任选地, 所述食品呈选自固体、乳品、溶液制品、粉末制品和悬浮液制品中的至少一种制剂形式。

10. 一种饲料, 其特征在于, 包括: 多形拟杆菌,

任选地, 所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*,

任选地, 所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 中的至少一种。

## 多形拟杆菌在治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物学领域,具体地,涉及多形拟杆菌在治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病中的用途,也涉及包含多形拟杆菌的药物组合物、药物、食品和饲料。

### 背景技术

[0002] 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 简称类风湿,是一种全身性自身免疫性疾病,主要累及关节滑膜,其次为浆膜、心、肺、血管、神经等结缔组织。急性期炎症主要表现为滑膜血管水肿、滑膜炎,若未被及时诊断和治疗,急性炎症反应消退,渗出逐渐吸收,滑膜中血管翳形成,滑膜细胞显著增生。继而引起关节软骨破坏,骨组织炎症、坏死和纤维结缔组织增生。而后发生钙化出现纤维性和骨性关节硬化,关节腔显著狭窄或完全消失。此期慢性炎症过程造成的关节功能障碍,在很大程度上难以恢复,可致永久性残疾。全世界每 100 ~ 150 人中就有 1 人患有 RA,我国患病率为 0.32% ~ 0.36%。RA 在各年龄皆可发病,成人中多发于中年女性,男女之比约 1:3。2003 年据 WHO 报道,在良好的医疗条件下,每人每年的治疗费用约为 6000 美元,由该病造成的间接损失也不容忽视。

[0003] 目前,西医主要采用药物治疗和基因治疗等方法。常用西药主要有非甾体抗炎药 (NSAIDs)、糖皮质激素、慢作用药、免疫抑制剂及生物制剂等。但西药普遍具有价格高、毒副作用较大的缺点,所以限制了它们的应用。基因治疗的选择性高,其可针对疾病从分子水平进行治疗,同时可以通过限制基因的长期高水平局部表达,为 RA 患者的治疗开辟了新的途径。但是,目前基因治疗还处于起步阶段,仍存在较多的问题。如缺乏理想的载体、不同的宿主对载体产生不同的免疫反应、导入的基因在机体内是否能稳定表达等都还有待进一步研究探讨。此外,基因治疗的安全性、治疗费用及伦理学问题等也是此项研究需要解决的问题。

[0004] 已有证据表明,肠道微生物与系统免疫应答和 RA 存在一定的联系。乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 可以在不影响调控细胞活素水平的前提下降低促炎细胞活素水平,从而发挥抗炎作用,减轻 RA 症状。因此可以推测,一些使肠道微生态恢复常态的治疗手段,在恢复肠道及免疫系统功能的同时,可能也会对减轻 RA 症状发挥一定的作用。研究证实,一种 LAB (Bacillus coagulans GBI-30, 6086) 可能成为一种安全高效的减轻 RA 症状的辅助药物

[0005] 由于病因与发病机制尚未完全明了,RA 的治疗虽取得一定进展,但至今仍处于控制或缓解症状阶段,并无有效治疗或治愈方法。因此本领域迫切需要开发一种有效的新的,无毒副作用的,用于治疗 and 预防类风湿性关节炎及其相关疾病的药物。

### 发明内容

[0006] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出多形拟杆菌在治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病中的用途。

[0007] 在本发明的第一方面,本发明提供了多形拟杆菌在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。发明人发现,通过给动物提供该药物,能够有效发挥抗炎的功效,关节发红和肿胀的症状得到有效改善,关节炎症状明显减轻,即能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0008] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0009] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0010] 在本发明的第二方面,本发明提供了一种药物组合物。根据本发明的实施例,该药物组合物包括:多形拟杆菌;以及药学上可接受的辅料。发明人惊喜地发现,通过对动物提供该药物组合物,能够明显抑制关节炎的发生,关节发红和肿胀明显减退,关节炎症状明显减轻,动物行动灵活,表明该药物组合物能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0011] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0012] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0013] 根据本发明的实施例,当所述药物组合物呈固态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述药物组合物呈液态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。由此,抑制关节炎发生和改善关节炎症状的效果明显,如果多形拟杆菌含量过低,治疗或预防类风湿性关节炎的效果不理想,如果多形拟杆菌含量过高,则治疗或预防类风湿性关节炎的效果无明显提高,造成浪费。

[0014] 根据本发明的一个优选实施例,当所述药物组合物呈固态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述药物组合物呈液态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0015] 根据本发明的另一个优选实施例,当所述药物组合物呈固态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述药物组合物呈液态时,所述药物组合物包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0016] 根据本发明的实施例,所述药学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种。

[0017] 根据本发明的实施例,所述药学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种。

[0018] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种药物。根据本发明的实施例,该药物包

括：前面所述的药物组合物。通过对动物提供该药物，能够明显抑制关节炎的发生，关节发红和肿胀明显减退，关节炎症状明显减轻，动物行动灵活，表明该药物能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0019] 根据本发明的实施例，所述药物呈选自颗粒剂、胶囊、片剂、粉末剂、口服液、混悬液和乳剂中的至少一种制剂形式。由此，易于进行给药。

[0020] 在本发明的第四方面，本发明提供了一种食品。根据本发明的实施例，该食品包括：多形拟杆菌；以及食品学上可接受的辅料。发明人发现，通过对动物提供该食品，能够明显抑制关节炎的发生，关节发红和肿胀明显减退，关节炎症状明显减轻，动物行动灵活，表明该食品能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0021] 需要说明的是，本发明所使用的术语“食品”的种类不受特别限制，可以为任何已知的食品，包括但不限于奶制品、饼干、糕点、饮料、保健品等。

[0022] 根据本发明的实施例，所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此，能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0023] 根据本发明的实施例，所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此，治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0024] 根据本发明的实施例，当所述食品呈固态时，所述食品包含  $1 \times 10^{-1} \times 10^{20}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌，当所述食品呈液态时，所述食品包含  $1 \times 10^{-1} \times 10^{20}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。由此，抑制关节炎发生和改善关节炎症状的效果明显，如果多形拟杆菌含量过低，治疗或预防类风湿性关节炎的效果不理想，如果多形拟杆菌含量过高，则治疗或预防类风湿性关节炎的效果无明显提高，造成浪费。

[0025] 根据本发明的一个优选实施例，当所述食品呈固态时，所述食品包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌，当所述食品呈液态时，所述食品包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0026] 根据本发明的另一个优选实施例，当所述食品呈固态时，所述食品包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌，当所述食品呈液态时，所述食品包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0027] 根据本发明的实施例，所述食品学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种。

[0028] 根据本发明的实施例，所述食品学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种。

[0029] 根据本发明的实施例，所述食品呈选自固体、乳品、溶液制品、粉末制品和悬浮液制品中的至少一种制剂形式。

[0030] 在本发明的第五方面，本发明提供了一种饲料。根据本发明的实施例，该饲料包括：多形拟杆菌。发明人发现，通过对动物提供该饲料，能够明显抑制关节炎的发生，动物关节发红和肿胀明显减退，关节炎症状明显减轻，动物行动灵活，表明该饲料能够有效治疗或

预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0031] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0032] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0033] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

### 附图说明

[0034] 图 1 显示了根据本发明一个实施例,菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对小鼠关节炎发病的影响宏观评分结果;

[0035] 图 2 显示了根据本发明一个实施例,菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响结果;以及

[0036] 图 3 显示了根据本发明一个实施例,菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠细胞因子的影响结果。

### 具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。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。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照《微生物:实验手册》(James Cappuccino 和 Natalie Sherman 编, Pearson Education 出版社)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0038] 在本发明的第一方面,本发明提供了多形拟杆菌在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。发明人发现,通过给动物提供该药物,能够有效发挥抗炎的功效,关节发红和肿胀的症状得到有效改善,关节炎症状明显减轻,即能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0039] 需要说明的是,本文中所使用的术语“动物”不受特别限制,可以为任何具有肠道的动物,优选哺乳动物,更优选人、兔类或鼠类。

[0040] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0041] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0042] 根据本发明的实施例,受试动物经过造模形成关节炎模型动物,模型动物摄入 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron*

ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, 均能够明显改善动物关节发红和肿胀状况, 减轻关节炎症状。根据本发明的实施例, 分别经菌株 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 来治疗的关节炎 DBA/1J 小鼠, 与未接受治疗的对照组相比, 关节发红和肿胀明显消退, 关节炎症状明显减轻。由此, 表明所述菌株能够用以预防和/或治疗类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0043] 在本发明的第二方面, 本发明提供了一种药物组合物。根据本发明的实施例, 该药物组合物包括: 多形拟杆菌; 以及药学上可接受的辅料。发明人惊喜地发现, 通过对动物提供该药物组合物, 能够明显抑制关节炎的发生, 关节发红和肿胀明显减退, 关节炎症状明显减轻, 动物行动灵活, 表明该药物组合物能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0044] 根据本发明的实施例, 所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此, 能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0045] 根据本发明的实施例, 所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此, 治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果更佳。

[0046] 根据本发明的实施例, 当所述药物组合物呈固态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌, 当所述药物组合物呈液态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。由此, 抑制关节炎发生和改善关节炎症状的效果明显, 如果多形拟杆菌含量过低, 治疗或预防类风湿性关节炎的效果不理想, 如果多形拟杆菌含量过高, 则治疗或预防类风湿性关节炎的效果无明显提高, 造成浪费。

[0047] 根据本发明的一个优选实施例, 当所述药物组合物呈固态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌, 当所述药物组合物呈液态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0048] 根据本发明的另一个优选实施例, 当所述药物组合物呈固态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g, 的所述多形拟杆菌, 当所述药物组合物呈液态时, 所述药物组合物包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0049] 根据本发明的实施例, 所述药学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种。

[0050] 根据本发明的实施例, 所述药学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种。

[0051] 在本发明的第三方面, 本发明提供了一种药物。根据本发明的实施例, 该药物包括: 前面所述的药物组合物。通过对动物提供该药物, 能够明显抑制关节炎的发生, 关节发红和肿胀明显减退, 关节炎症状明显减轻, 动物行动灵活, 表明该药物能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0052] 根据本发明的实施例, 所述药物呈选自颗粒剂、胶囊、片剂、粉末剂、口服液、混悬



液和乳剂中的至少一种制剂形式。由此,易于进行给药。

[0053] 在本发明的第四方面,本发明提供了一种食品。根据本发明的实施例,该食品包括:多形拟杆菌;以及食品学上可接受的辅料。发明人发现,通过对动物提供该食品,能够明显抑制关节炎的发生,关节发红和肿胀明显减退,关节炎症状明显减轻,动物行动灵活,表明该食品能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0054] 需要说明的是,本发明所使用的术语“食品”的种类不受特别限制,可以为任何公知的食品,包括但不限于奶制品、饼干、糕点、饮料、保健品等。

[0055] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0056] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0057] 根据本发明的实施例,当所述食品呈固态时,所述食品包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述食品呈液态时,所述食品包含  $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{20}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。由此,抑制关节炎发生和改善关节炎症状的效果明显,如果多形拟杆菌含量过低,治疗或预防类风湿性关节炎的效果不理想,如果多形拟杆菌含量过高,则治疗或预防类风湿性关节炎的效果无明显提高,造成浪费。

[0058] 根据本发明的一个优选实施例,当所述食品呈固态时,所述食品包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述食品呈液态时,所述食品包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0059] 根据本发明的另一个优选实施例,当所述食品呈固态时,所述食品包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g, 的所述多形拟杆菌,当所述食品呈液态时,所述食品包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0060] 根据本发明的实施例,所述食品学上可接受的辅料为选自载体、赋形剂、稀释剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂以及香料中的至少一种。

[0061] 根据本发明的实施例,所述食品学上可接受的辅料为选自乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的至少一种。

[0062] 根据本发明的实施例,所述食品呈选自固体、乳品、溶液制品、粉末制品和悬浮液制品中的至少一种制剂形式。

[0063] 在本发明的第五方面,本发明提供了一种饲料。根据本发明的实施例,该饲料包括:多形拟杆菌。发明人发现,通过对动物提供该饲料,能够明显抑制关节炎的发生,动物关节发红和肿胀明显减退,关节炎症状明显减轻,动物行动灵活,表明该饲料能够有效治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病。

[0064] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为 *Bacteroides thetaiotaomicron*。由此,能够有效发挥治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的功效。

[0065] 根据本发明的实施例,所述多形拟杆菌为选自 *Bacteroides thetaiotaomicron*

ATCC29148、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 700349 和 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 中的至少一种。由此,治疗或预防类风湿性关节炎或其相关疾病的效果较佳。

[0066] 根据本发明的实施例,当所述饲料呈固态时,所述饲料包含  $1 \times 10^{-1} \times 10^{20}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述饲料呈液态时,所述饲料包含  $1 \times 10^{-1} \times 10^{20}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。由此,抑制关节炎发生和改善关节炎症状的效果明显,如果多形拟杆菌含量过低,治疗或预防类风湿性关节炎的效果不理想,如果多形拟杆菌含量过高,则治疗或预防类风湿性关节炎的效果无明显提高,造成浪费。

[0067] 根据本发明的一个优选实施例,当所述饲料呈固态时,所述饲料包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/g 的所述多形拟杆菌,当所述饲料呈液态时,所述饲料包含  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{15}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0068] 根据本发明的另一个优选实施例,当所述饲料呈固态时,所述饲料包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/g, 的所述多形拟杆菌,当所述饲料呈液态时,所述饲料包含  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{11}$  cfu/mL 的所述多形拟杆菌。

[0069] 实施例 1 确定治疗或预防类风湿性关节炎的有益菌

[0070] 1.1 样品收集和 DNA 提取

[0071] 从北京协和医院共采集到 212 个志愿者的粪便、牙垢及唾液样品,样品信息见表 1,其中,分为训练组和试验组。训练组包括 157 个志愿者,其中 77 个为没有治疗过的 RA 病例,80 个为健康者(对照)。试验组中,其中 34 个志愿者形成 17 个“病例-健康”对,其中有 8 对有血缘关系,另外 9 对没有血缘关系;其他 21 个志愿者为 DMARD (disease-modifying antirheumatic drugs) 治疗 RA 病例。

[0072] 采集粪便样品后冷冻运输并迅速转移到  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,进行 DNA 提取(参考 Qin, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55 - 60 (2012))。采集牙垢样品时,利用医用钳从牙齿表面刮取  $3 \mu\text{l}$  的牙垢,转移至  $200 \mu\text{l}$   $1 \times$  裂解缓冲液 (10mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% 吐温 20,  $200 \mu\text{g/ml}$  蛋白酶 K) 中,在  $55^{\circ}\text{C}$  培养 2 小时,然后在  $95^{\circ}\text{C}$  培养 10 分钟,终止裂解反应,最后于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。采集唾液样品时,取  $100 \mu\text{l}$  样品至含  $100 \mu\text{l}$   $2 \times$  裂解缓冲液的收集管中,同时,刮取后咽表面样品也加至该管中,后续裂解步骤与牙垢样品相同,同样于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。牙垢样品和唾液样品经冷冻运输至深圳华大基因研究院,参照粪便样品进行 DNA 提取。

[0073] 当志愿者首次入院时,按照标准程序收集表型信息。21 个 DMARD 治疗病例的粪便样品仅包含在用来构建肠道微生物基因集的 212 个粪便样品之中,在本文不再进行分析。本研究得到北京协和医院和深圳华大基因研究院伦理审查委员会批准。

[0074] 表 1 样品信息

[0075]

样品组		病例个数	对照个数	总数
用于构建基因集样品	粪便样品	115 (包括 21 个 DMARD 治疗病例)	97	212
	牙垢样品	54	51	105
	唾液样品	51	47	98
仅用作宏基因组关联分析	粪便样品	32 (DMARD 治疗前 RA 病例)	32 (DMARD 治疗后, 病情好转)	64

#### [0076] 1.2 宏基因组测序与组装

[0077] 利用所提取的 DNA 样本构建测序文库, 在 Illumina 测序平台上进行双向 (Paired-end) 宏基因组测序 (插入片段 350bp, 读长 100bp)。对测序产生的数据进行过滤 (quality-controlled, 去除 adapter 污染序列、去低质量序列和去宿主基因组污染序列), 并利用 SOAPdenovo 软件 (v2.04) 进行重头组装。

[0078] 粪便、牙垢和唾液样品的平均宿主基因组污染分别是 0.37%、5.55% 和 40.85%。

#### [0079] 1.3 基因集构建

[0080] 对于组装好的组装片段 (contigs), 利用 GeneMark 软件 (v2.7d) 进行基因预测, 接着利用 BLAT 软件进行去冗余 (比对相似度 (identity) 在 95% 以上, 比对的覆盖度 (overlap) 在 90% 以上, 没有缺口 (gaps)), 对于 212 个粪便样品 (其中包括 21 个 DMARD 治疗样品), 得到了包含 3,800,011 个基因的非冗余基因集; 对于 203 个口腔样品 (包括 105 个牙垢样品和 98 唾液样品), 得到了包含 3,234,997 个基因的非冗余基因集。利用 BLAT 软件将粪便样品基因集进一步补充到已公开的包含 430 多万个基因的肠道微生物参考基因集中 (比对相似度在 95% 以上, 比对覆盖度在 90% 以上, 参考上述文献 Qin, J. et al. 2012), 最终得到了包含 590 多万个基因的新基因集。

[0081] 将高质量测序片段 (reads) 与肠道或口腔参考基因集进行比对, 从而得到基因的相对丰度 (参考上述文献 Qin, J. et al. 2012)。

#### [0082] 1.4 物种分类注释与丰度计算

[0083] 通过与 IMG (v400) 数据库进行比对, 对预测的基因进行物种分类 (参考上述文献 Qin, J. et al. 2012), 分别得到门水平的物种分类 (比对相似度在 65% 以上, 比对覆盖度在 70% 以上), 属水平的物种分类 (比对相似度在 85% 以上) 及种水平的物种分类 (比对相似度在 95% 以上)。利用基因的相对丰度计算该物种的相对丰度 (参考上述文献 Qin, J. et al. 2012), 并用秩和检验 (Wilcoxon rank-sum test) 进行统计检验 ( $p < 0.05$ ), 确定病例与对照之间的相对丰度存在显著差异的物种。

#### [0084] 1.5 宏基因组关联分析

[0085] 通过比较病例与对照的粪便微生物基因集 (microbiome), 在 3,110,085 个基因

(每个基因都至少出现在 6 个样品中,样品  $n = 157$ ,不含表 1 所述 21 个 DMARD 治疗病例)中,发现 83,858 个基因的相对丰度具有显著差异 ( $p < 0.01$ , 秩和检验,  $FDR = 0.3285$ ),这些基因即为标记基因。根据这些标记基因在样品中的相对丰度差异,进一步聚类,得到粪便的宏基因组连锁群 (Metagenomic Linkage Group, MLG, 一个 MLG 近似于一个物种,聚类方法参考上述文献 Qin, J. et al. 2012)。同样的方法,从牙垢的 2,247,835 个基因 (每个基因都至少出现在 6 个样品中,样品  $n = 105$ ) 中,筛选出 209,820 个标记基因 ( $p < 0.01$ , 秩和检验,  $FDR = 0.072$ ),聚类,得到牙垢的 MLG。从唾液的 2,404,726 个基因 (每个基因都至少出现在 6 个样品中,样品  $n = 98$ ) 中,筛选出 206,399 个标记基因 ( $p < 0.01$ , 秩和检验,  $FDR = 0.088$ ),聚类,得到唾液 MLG。另外,通过比较 DMARD 治疗前后的粪便微生物基因,从 1,538,688 个基因 (每个基因都至少出现在 6 个样品中,样品  $n = 64$ ) 中,筛选出 86158 个标记基因 ( $p < 0.05$ , paired Wilcoxon rank-sum test,  $FDR = 0.912$ ),聚类到 DMARD 治疗病例的粪便 MLGs 中。

[0086] 根据 MLGs 组成基因的分类及相对丰度,进行 MLGs 物种分类和构建 MLGs 相对丰度谱 (参考上述文献 Qin, J. et al. 2012)。若要分类到种的水平,需要满足 MLGs 中 90% 的基因可以比对到该物种的基因组上 (比对相似度在 95% 以上,比对覆盖度在 70% 以上)。若要分类到属水平,则需要 MLGs 中 80% 的基因,无论是在 DNA 序列还是蛋白质序列,与该属的相似度都要高于 80%。根据所有样品丰度之间的 Kendall's 相关性 (regardless of case-control status),可以将 MLGs 进行进一步地聚类。肠道 MLG、唾液 MLG、牙垢 MLG 和 DMARD 治疗相关 MLG 的物种分类结果分别见表 2、表 3、表 4、表 5。

[0087] 表 2 肠道 MLG 的物种分类信息

[0088]

MLG 编号	P 值	富集 方向 (0, 正常 对照 组)	基因数 目 ( $\geq 30$ )	MLG 物种分类 注释 (种水平的比对 相似度在 95%以 上, 属水平比对相 似度在 85%以上)	比对的菌株	覆盖度 (Gene s annotat ed to strain (85% identity ))	基因平均 相似度 (Averag e identity for genes with >85% identity (%))
4158	0.000004	0	311	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> SI7	98.7	99.26
7220	0.001071	0	43	<i>Coprococcus catus</i>	<i>Coprococcus catus</i> GD/7	100.0	98.99
4243	0.000018	0	73	<i>Dialister invisus</i>	<i>Dialister invisus</i> DSM 15470	100.0	98.00
1921	0.000835	0	508	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1	90.6	95.45
1911	0.000381	0	67	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1	89.6	93.79
2135	0.000004	0	2210	<i>Megamonas hypermegale</i>	<i>Megamonas hypermegale</i>	93.3	98.32

[0089]

					ART12/1		
5492	0.000037	0	1812	<i>Sutterella</i> <i>wadsworthensis</i>	<i>Sutterella</i> <i>wadsworthensis</i> 3 1 45B	98.2	98.86
5494	0.000041	0	33	<i>Sutterella</i> <i>wadsworthensis</i>	<i>Sutterella</i> <i>wadsworthensis</i> 3 1 45B	97.0	99.78

[0090] 表 3 唾液 MLG 的物种分类信息

[0091]

MLG 编号	P 值	富集方向 (0,正常对照组)	基因数目 (>=30)	MLG 物种分类注释 (种水平的比对相似度在 95%以上,属水平比对相似度在 85%以上)	比对的菌株	覆盖度 (Genes annotated to strain (85% identity))	基因平均相似度 (Average identity for genes with >85% identity (%))
1076	2.43E-04	0	54	<i>Actinomyces naeshundii</i>	<i>Actinomyces naeshundii</i> MG1	0.981	97.71
6509	5.77E-04	0	148	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i> M21621	0.966	96.73
6415	2.50E-04	0	210	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	0.976	97.68
6411	1.42E-04	0	32	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	0.875	96.52
6431	2.50E-04	0	32	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	0.969	97.69

[0092]

1932	6.09E-04	0	35	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1	0.800	93.94
13	2.91E-12	0	2450	<i>Lactococcus sp.</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i> KF147	0.806	98.29

[0093] 表 4 牙垢 MLG 的物种分类信息

[0094]

MLG 编号	P 值	富集 方向 (0, 正常 对照组)	基因数 目 ( $\geq 30$ )	MLG 物种分类 注释 (种水平的 比对相似度在 95%以上, 属水 平比对相似度 在 85%以上)	比对的菌株	覆盖度 (Genes annotate d to strain (85% identity) )	基因平均 相似度 (Averag e identity for genes with >85% identity (%))
26	2.08E-04	0	1245	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	0.941	97.49
4661	5.13E-05	0	59	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392	0.864	96.45
4655	4.09E-05	0	62	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1	0.952	94.95
2948	1.52E-03	0	228	<i>Prevotella maculosa</i>	<i>Prevotella maculosa</i> OT 289	0.974	98.11

[0095] 表 5DMARD 治疗相关 MLG 的物种分类信息

[0096]



MLG 编号	P 值	富集 方向 (0,正 常对 照 组)	基因数 目 (>=30)	MLG 物种分类 注释 (种水平的比对 相似度在 95%以 上, 属水平比对 相似度在 85%以 上)	比对的菌株	覆盖 度 (Gen es annota ted to strain (85% identit y))	基因平 均相似 度 (Aver age identit y for genes with >85% identit y (%))
2440	0.014746833	0	94	<i>Alistipes shahii</i>	<i>Alistipes shahii</i> WAL 8301	0.958	99.569
4222	0.026594988	0	215	<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185	0.971	99.451
1208	0.000127559	0	519	<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4	0.919	99.316
1078	0.017460348	0	76	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i> SD CC 2a	0.921	98.702
1261	0.006075614	0	44	<i>Bacteroides plebeius</i>	<i>Bacteroides plebeius</i> M12, DSM 17135	1.000	99.266
5062	0.010757652	0	49	<i>Bacteroides thetaitaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaitaomicron</i> VPI-5482	0.980	99.625
3945	0.010167986	0	74	<i>Clostridium nexile</i>	<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787	1.000	97.677
2705	0.008045237	0	40	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	0.875	99.411

[0097]

					125-2-CHN		
5256	0.035953714	0	37	<i>Parabacteroides merdae</i>	<i>Parabacteroides merdae</i> ATCC 43184	1.000	99.750

[0098] 实施例 2 动物实验验证

[0099] 为了验证实施例 1 在表 2、表 3、表 4、表 5 确定治疗或预防类风湿性关节炎的有益菌,发明人对每个菌种进行动物实验,利用该菌种可获得的菌株验证其功效。

[0100] 实验方法

[0101] 1. 造模及给药

[0102] 6~8 周龄 SPF (Specific pathogen free) 级雄性 DBA/1J 小鼠,购于中国科学院上海实验动物中心,饲养于 IVC (individual ventilated cage) 鼠笼系统 (购自苏州冯氏实验动物设备有限公司),室内保持温度 22~24℃,湿度 40%~60%,每日光照 12h,自由进食及饮水。适应性饲养 2 周后随机分为 5 组 (模型对照组、菌剂 1 组、菌剂 2 组、菌剂 3 组、正常对照组),每组 12 只。Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148 (菌剂 1)、Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 700349 (菌剂 2) 和 Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29741 (菌剂 3) 均购自 ATCC (American Type Culture Collection)。于改良庖肉培养液 (ATCC Medium 1490) 中,37℃ 厌氧培养 48h,经 16S rDNA 测序鉴定无误后开始实验。菌株信息见表 6。

[0103] 表 6 菌株信息

[0104]

编号	菌种名
菌剂1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29148
菌剂2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 700349
菌剂3	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741

[0105] 参考 S. Yoshino 的方法 (S. Yoshino, E. Sasatomi, M. Ohsawa, Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice, 2000) 的造模方法,简言之:

[0106] 自实验第 1 天起,菌剂 1 组 (菌剂 1+CIA/LPS)、菌剂 2 组 (菌剂 2+CIA/LPS)、菌剂 3 组 (菌剂 3+CIA/LPS) 分别以 500  $\mu$  l/50g. BW 剂量,灌胃菌 1、菌 2、菌 3 新鲜培养液 (10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup>cfu/ml),模型对照组 (M+CIA/LPS) 和正常对照组 (M+AA+PBS) 分别灌胃等体积无菌培养液,隔天给药 28 天。在第 1 天、第 21 天,利用 II 型胶原 (CIA) 结合脂多糖 (LPS) 诱导 3 个模型组 (菌剂 1 组、菌剂 2 组及菌剂 3 组) 及模型对照组小鼠关节炎的发生。具体操作为:将 100mg II 型胶原蛋白 (取自小牛关节软骨, Funakoshi Co) 溶于 100ml 5mM 乙酸 (AA), 4℃ 搅拌过夜,腹腔注射小鼠。随后取 E. coli 011:B4 的脂多糖 (上海生物制品研究所) 1  $\mu$  g, 溶于 0.1ml 磷酸缓冲液 (PBS), 同样经腹腔注射给药。正常对照组在相同时间点经同体积的 5mM 乙酸及 PBS 缓冲液腹腔注射。每天观察小鼠足爪状态,每周对关节炎指

数进行评分。于实验开始后 35 天, 每组随机选取 6 只处死, 取脾脏细胞进行后续实验。剩余小鼠继续观察关节炎病程进展情况并在实验开始后 50 天颈椎脱臼处死。

#### [0107] 2. 关节炎评价

[0108] 利用肉眼根据红斑的增加以及关节周围组织水肿情况对关节炎的严重程度进行宏观评分得到关节炎指数, 具体评分标准描述如下: 0: 没有关节炎的迹象; 1: 1 个关节肿胀和 / 或发红; 2: 2 个关节肿胀和 / 或发红; 3: 大于 2 个关节肿胀和 / 或发红; 4: 整个足爪发生严重关节炎。每只小鼠关节炎指数为每只动物 4 爪得分之和。

#### [0109] 3. 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对胶原诱导的关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响

[0110] 随机选取模型组 (菌剂 1 组、菌剂 2 组及菌剂 3 组)、模型对照组和正常对照组每组各 6 只小鼠, 常规分离脾细胞。后续操作参考赵晓辉等的方法 (塞隆骨提取物对牛 II 型胶原诱导的小鼠关节炎的治疗作用及机制研究, 赵晓辉, 岳会兰, 梅丽娟, 邵赞, 陶燕铎, 2008 年 5 月); 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液将细胞浓度调成  $4 \times 10^6$  cell/ml。于 96 孔板中每孔加入  $100 \mu\text{l}$  细胞悬液,  $100 \mu\text{l}$  胶原蛋白抗原。细胞于含 5%  $\text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养, 培养结束前 8h 每孔加入  $25 \mu\text{l}$   $^3\text{H}$ - 胸腺嘧啶核苷酸。继续培养至实验结束。用细胞收集仪将细胞收集至玻璃纤维膜上, 加入闪烁液后于  $\beta$  计数器上读取细胞 DNA 中  $^3\text{H}$ - 胸腺嘧啶核苷酸量, 以每分钟脉冲数 (counts per minute, cpm) 表示细胞增殖情况。

#### [0111] 4. 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠炎性细胞因子的影响

[0112] 常规方法分离脾细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液将细胞浓度调成  $4 \times 10^6$  cell/ml, 以脾细胞悬液 1ml/ 孔接种于 24 孔组织培养板中, 其中含 1mM 谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素, 100mg/ml 链霉素,  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  2- 巯基乙醇及 1% 热灭活自体血清。48h 后, 收集上清液于  $-70^\circ\text{C}$  保存, 利用 ELISA 试剂盒 (购于上海酶联生物科技有限公司) 检测其中细胞因子 IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平。

#### [0113] 实验结果

[0114] 1. 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对小鼠关节炎发病的影响。

[0115] 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对小鼠关节炎发病的影响的宏观评分结果见表 7 和图 1。由实验结果可知, 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 给药 4 周后, 相比模型对照组, 能够明显抑制 CIA 小鼠关节炎的发生, 小鼠足肿胀明显减退, 关节炎症状明显减轻, 小鼠行动较灵活。

[0116] 表 7 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对小鼠关节炎发病的影响结果 (每组 6 只小鼠)

[0117]

分组	时间 (周)						
	1	2	3	4	5	6	7
菌剂1+CIA/LPS	0.0±0.0	1.1±0.4	2.3±0.4	5.1±0.6	4.3±1.0	3.0±0.7	2.4±1.2
菌剂2+CIA/LPS	0.2±0.2	1.2±0.8	2.6±0.6	5.4±1.1	3.8±0.2	2.4±0.7	1.9±0.4
菌剂3+CIA/LPS	0.1±0.2	1.1±0.9	2.5±0.9	5.8±0.8	4.7±0.3	3.3±0.6	2.4±0.7
M+CIA/LPS	0.3±0.2	1.5±0.4	2.7±0.4	6.7±0.9	6.3±0.6	5.7±1.1	5.2±0.9
M+AA/PBS	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

[0118] 2. 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响

[0119] 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响结果见表 8 和图 2,

其中,用相同字母标注表示两组间数值经 Tukey's Test 检测差异不显著 ( $p>0.05$ )。由试验结果可知,通过灌服菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3,在加抗原的情况下,关节炎小鼠脾细胞体外经抗原刺激后的增殖反应与模型对照组相比明显降低,在不加抗原的条件下,各模型组也显示了不同程度的脾细胞增殖抑制作用。

[0120] 表 8 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响 (每组 6 只小鼠)

[0121]

分组	细胞增殖 (cpm)	
	加抗原	无抗原
菌剂1+CIA/LPS	3303.6±133.5	2165.6±235.7
菌剂2+CIA/LPS	3484.4±214.0	2319.7±232.3
菌剂3+CIA/LPS	3433.2±183.8	2263.4±156.6
M+CIA/LPS	4063.2±181.0	3311.2±219.7
M+AA/PBS	1059.3±233.3	742.5±155.6

[0122] 3. 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠细胞因子的影响

[0123] 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠细胞因子的影响结果见表 9 和图 3,其中,相同字母标注表示两组间数值经 Tukey's Test 检测差异不显著 ( $p>0.05$ )。由实验结果可知,通过 ELISA 检测可以发现,与正常对照组比较,3 个模型组小鼠细胞抑炎因子 IL-10 分泌显著减少 ( $p<0.05$ ),炎症因子 IL-12 和 TNF- $\alpha$  分泌显著增多 ( $p<0.05$ ),而炎症因子 IFN- $\gamma$  分泌没有显著变化 ( $p>0.05$ );与模型对照组比较,模型组小鼠细胞 IL-10 分泌显著增多 ( $p<0.05$ ),IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  分泌显著减少 ( $p<0.05$ ),且 3 个模型组之间无显著差异 ( $p>0.05$ )。说明菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 灌胃能够抑制脾细胞培养上清中炎症因子 IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  的分泌,并提高抑炎因子 IL-10 的分泌,显示菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠脾细胞免疫功能亢进有明显抑制作用。

[0124] 表 9 菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 对关节炎小鼠细胞因子的影响 (每组 6 只小鼠)

[0125]

分组	细胞因子 (pg/mL)			
	IL-12	INF- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10
菌剂1+CIA/LPS	272.0±16.6	369.8±22.1	310.6±30.8	244.5±41.3
菌剂2+CIA/LPS	288.8±14.6	382.0±25.5	307.0±18.8	259.1±28.3
菌剂3+CIA/LPS	261.9±30.1	375.0±26.0	295.8±22.8	252.6±14.2
M+CIA/LPS	375.9±62.2	471.7±36.3	399.1±42.6	200.4±29.5
M+AA/PBS	165.7±24.9	366.8±28.2	239.1±28.9	330.7±16.4

[0126] 结论

[0127] 上述结果表明,在 CIA 小鼠类风湿性关节炎模型上,菌剂 1、菌剂 2 和菌剂 3 能够明显抑制小鼠关节炎的发病,减轻 CIA 小鼠的相关症状,显示出较好的抗炎作用。

[0128] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0129] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

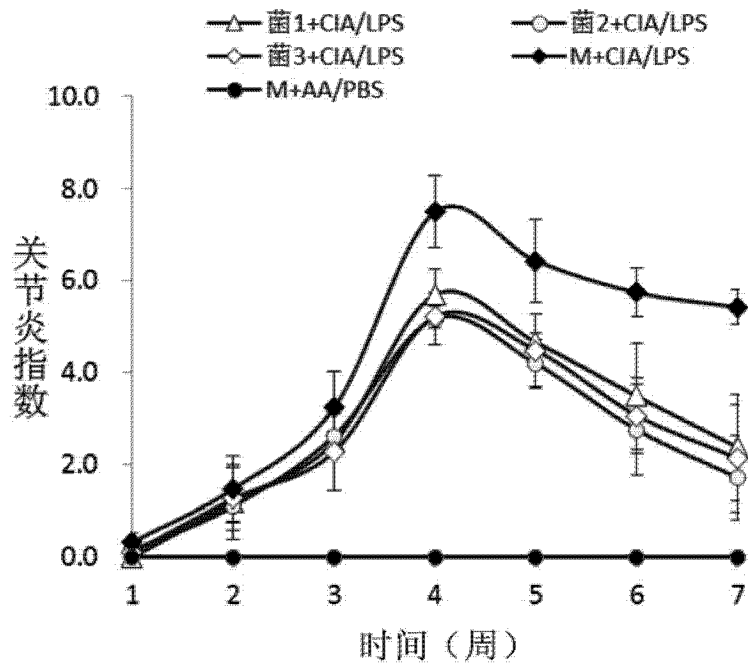


图 1

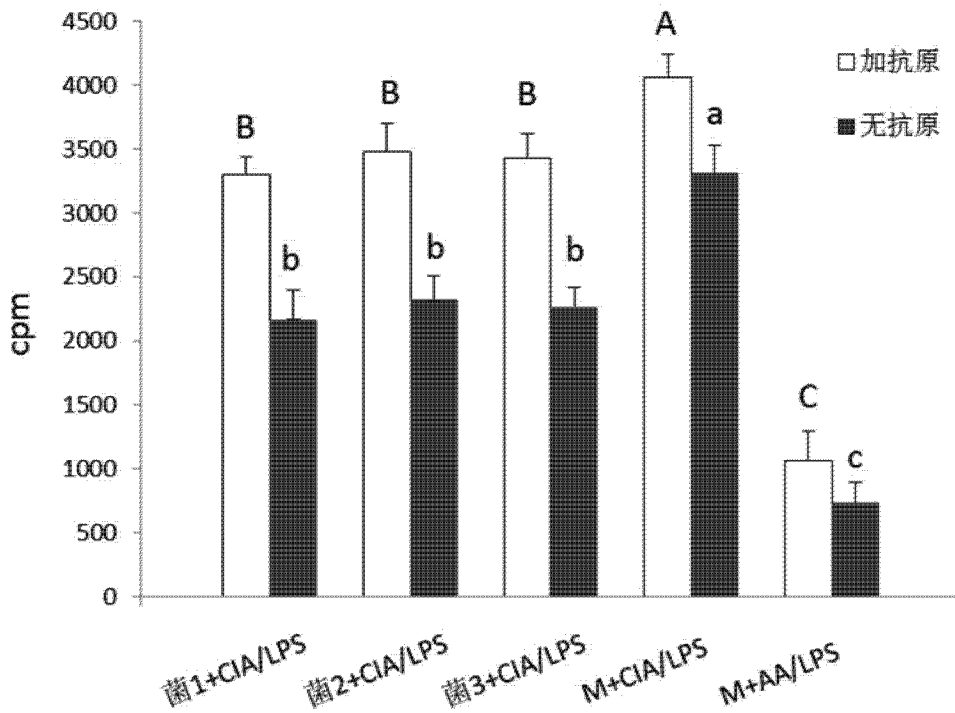


图 2

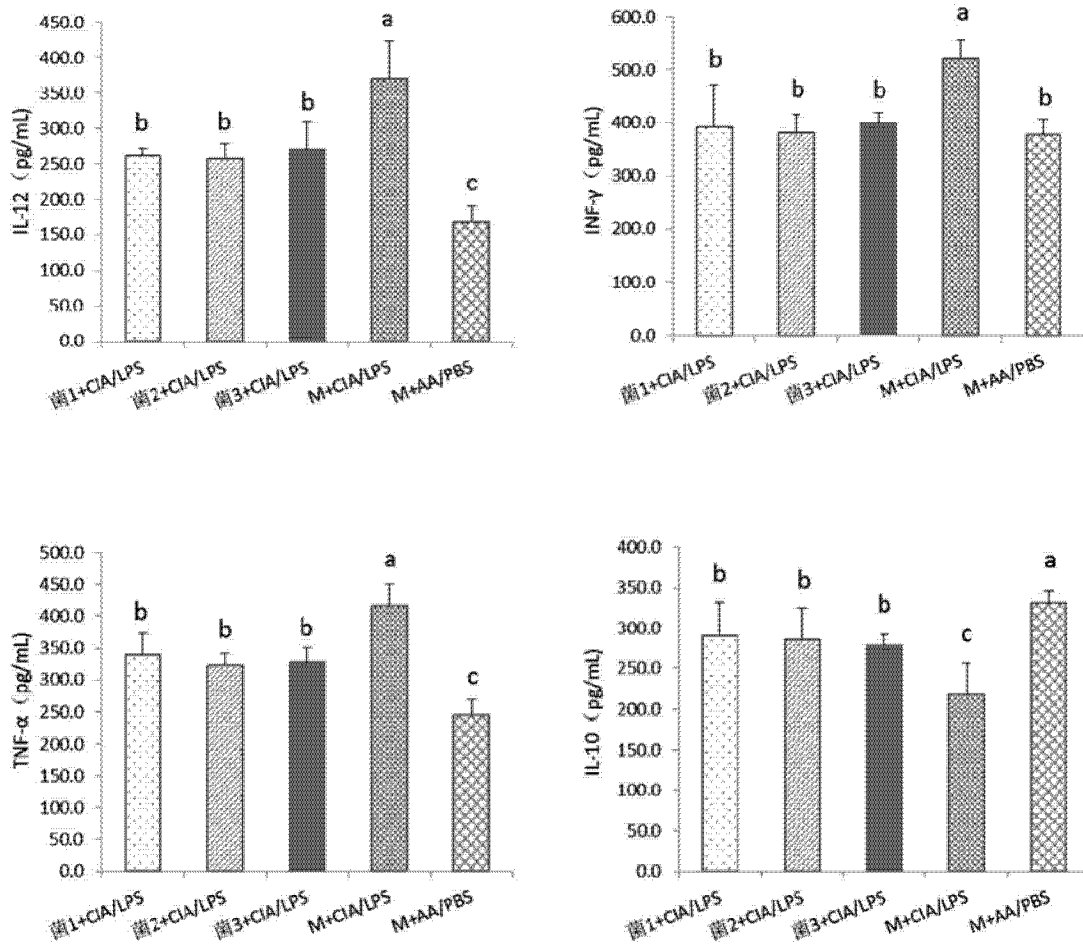


图 3