



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103142656 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

-
- (21) 申请号 201310085701.5 *A23C 9/13* (2006.01)
- (22) 申请日 2013.03.18 *A23C 19/00* (2006.01)
- (83) 生物保藏信息 *A23G 9/36* (2006.01)
CGMCC No. 7280 2013.03.12 *A23K 1/16* (2006.01)
- (71) 申请人 广州知光生物科技有限公司
地址 510515 广东省广州市白云区云景路云
嘉街3号301房
- (72) 发明人 智发朝 白杨 刘洋洋
- (74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限
公司 44228
代理人 刘嫖
- (51) Int. Cl.
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及脆弱拟杆菌的应用技术领域,具体涉及脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,本发明通过实验证明,脆弱拟杆菌在体内诱导机体产生了抗肿瘤效应,抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡,延长生存期,对于防治结肠癌具有很好的效果。本发明发掘了脆弱拟杆菌新的用途,开拓了一个新的应用领域,预示了脆弱拟杆菌具有很好的食用和药用前景。脆弱拟杆菌作为一种益生菌,可用于制备防治结肠癌的食品或药物组合物,为临床提供一种适合人体服食的保健及预防良品。

1. 脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,其特征在在于:所述组合物为至少含有能防治结肠癌的脆弱拟杆菌的食品或药物组合物。
3. 根据权利要求 2 所述的脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,其特征在在于:所述组合物选自奶粉、干酪、凝乳、酸奶酪、冰激凌、奶基发酵食品、发酵谷类食品、婴儿食品或宠物食品中的任意一种。
4. 根据权利要求 2 所述的脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,其特征在在于:所述组合物为丸剂、片剂、颗粒制剂、胶囊、口服液或者管饲制剂。
5. 根据权利要求 1 所述的脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,其特征在在于:所述组合物为含有所述脆弱拟杆菌的液体细菌悬浮液。
6. 根据权利要求 1 所述的脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,其特征在在于:所述脆弱拟杆菌在所述组合物中的含量为 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu /mL。

脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及脆弱拟杆菌的应用技术领域,具体涉及脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是危害人类健康最严重的一类疾病,在欧美一些国家,癌症的死亡率仅次于心血管系统疾病而居第二位。我国随着人口老龄化,肿瘤的发病率和死亡率都有所增加,城市居民恶性肿瘤的死亡率已居死因第一位。20 世纪初,人们发现保加利亚的长寿老人比例在同地区中最高,肿瘤的发病率也相对较低。原来,保加利亚人有每天饮用酸奶的习惯。研究发现,保加利亚酸奶中含有的益生菌能促进胃中失误残渣的分解和吸收,还能分解乳蛋白,抑制肠胃中致病菌的生长。近年来,越来越多的研究表明益生菌对于肿瘤有一定的拮抗作用,并逐渐揭示其作用机制。研究发现益生菌拮抗肿瘤的机制主要有:优化肠道菌群的组合,抑制产生致癌因子的腐败菌生长;产生抗诱变物质和抗癌物质;增强宿主的免疫系统,预防慢性复发性炎症;结合蛋白性致突变物质和致癌物质;影响肿瘤细胞基因和酶的表达。

[0003] 结肠癌是常见的恶性消化道肿瘤之一,据 2012 年的统计资料显示,全世界每年结肠癌的新增病例数高达 120 万,每年约有 60.87 万患者死于结肠癌。而在我国,结肠癌的发病率和死亡率也呈不断上升趋势。所以,如何做好结肠癌的预防工作以及降低其发病率和死亡率已经成为当今医学界研究方向之一。

[0004] 脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 作为一种革兰氏染色阴性、杆状、两端钝圆而浓染,有荚膜、无芽胞、无动力的专性厌氧细菌,分产肠毒素型和非产肠毒素型。脆弱拟杆菌作为人及动物肠道正常菌群的一部分,主要存于结肠中,此外,呼吸道、胃肠道及泌尿生殖道粘膜也可定植生长。目前研究较多的是脆弱拟杆菌作为一种条件致病菌,当宿主粘膜受损时,可侵犯粘膜下层,引起感染,也可经血液流动,引起身体其它器官如肠道、腹腔、肝、肺、脑组织化脓性感染并伴发脓肿和引起急慢性腹泻等。此外,其对结肠、直肠癌的发生也有促进作用。

[0005] 然而,脆弱拟杆菌并非只是一种条件致病菌。1991 年张季阶发表了《一种无毒脆弱拟杆菌的分离鉴定》,报导了关于 1983 年 9 月从一个发育良好的婴儿粪便中分离出量大而又较纯的细菌,经以系列的鉴定、基础试验和临床应用观察,属于脆弱拟杆菌群中的一株无毒菌,是人体的益生菌,定名为 BF839 菌株。由此,研究发现了,脆弱拟杆菌也是一种益生菌。但是,脆弱拟杆菌作为一种益生菌,并且在制备防治结肠癌组合物的相关应用,目前尚未有报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用,所述的脆弱拟杆菌保藏单位名称为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏单位地址

为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,保藏日期为 2013 年 3 月 12 日,保藏编号为 CGMCC NO. 7280,分类命名为 *Bacteroides fragilis*。

[0007] 为了解决上述问题,本发明所采用的技术方案是:

提供脆弱拟杆菌在制备防治结肠癌组合物中的应用。

[0008] 其中,所述组合物为至少含有防治结肠癌的脆弱拟杆菌的食品或药物组合物。

[0009] 其中,所述组合物选自奶粉、干酪、凝乳、酸奶酪、冰激凌、奶基发酵食品、发酵谷类食品、婴儿食品或宠物食品中的任意一种。

[0010] 其中,所述组合物为丸剂、片剂、颗粒制剂、胶囊、口服液或者管饲制剂。

[0011] 其中,所述组合物为含有所述脆弱拟杆菌的液体细菌悬浮液。

[0012] 其中,所述脆弱拟杆菌在所述组合物中的含量为 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu /mL。

[0013] 本发明的有益效果是:

本发明发掘了脆弱拟杆菌新的用途,开拓了一个新的应用领域。本发明通过实验证明,脆弱拟杆菌在体内诱导机体产生了抗肿瘤效应,抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡,延长生存期,对于防治结肠癌具有很好的效果;而且脆弱拟杆菌安全无毒,药理作用强,从而预示了脆弱拟杆菌具有很好的食用和药用前景。脆弱拟杆菌作为一种益生菌,可用于制备防治结肠癌的食品或药物组合物,为临床提供一种适合人体服食的保健及预防良品。

具体实施方式

[0014] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0015] 实施例 1 脆弱拟杆菌菌液的制备

(1) 由婴儿粪便中分离脆弱拟杆菌

按“正常菌群检查法”称取 0.5 克大便,置于先装有 4.5ml 生理盐水的试管中,以此连续稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$,由高稀积度向低稀积度滴到 Bd 培养基平板上,置于厌氧产气盒中加厌氧产气袋进行厌氧培养。置 37°C , 2~7 天后开罐检查。选取单一菌落进行纯培养、染色镜检、培养特性、生理生化检测。

[0016] (2) 脆弱拟杆菌的增菌培养及菌液制备

选取纯化后的单个菌落接种于改良的胰蛋白胍肉汤中进行增菌培养,所得菌液离心沉淀,转速 3000r/min,离心 15min,去上清,沉淀物用生理盐水洗涤后,沉淀物用生理盐水稀释,用麦氏比浊管做菌数测定,稀释至 10^8 cfu /ml, 10^9 cfu /ml, 10^{10} cfu /ml,保存备用。

[0017] 实施例 2 脆弱拟杆菌毒力实验

采用实施例 1 制备的脆弱拟杆菌菌液进行以下实验:

(1) 小鼠急性毒力实验

取体重 22 ± 2 克 C57BR/C 小鼠(雌雄各半)60 只,分成高剂量组、低剂量组和对照组,各组 20 只。高剂量组每只小鼠每天灌胃 10^{12} cfu /ml 菌液 0.5ml,低剂量组每天灌胃 10^9 cfu /ml 菌液 0.5ml,对照组每天灌胃 0.5ml 生理盐水。连续观察 14 天。

[0018] 实验结果:小鼠正常生长,未见死亡,LD50 测不出。

[0019] (2) 大鼠毒力实验

取 150 ± 20 克 SD 大鼠 30 只(雌雄各半),分为 3 组:高低剂量组和对照组。高剂量组每

只大鼠每天灌胃 10^{12} cfu/ml 菌液 2ml,低剂量组每天灌胃 10^9 cfu/ml 菌液 2ml,对照组每天灌胃 2ml 生理盐水。连续观察 14 天,14 天后抽静脉血测血象、肝肾功。取胃肠肝脾组织做病理切片电镜观察。

[0020] 实验结果:均未见明显异常。

[0021] (3) 恒河猴毒力实验

取恒河猴 10 只(雌雄各半),分为 2 组:高低剂量组和对照组。高剂量组每只恒河猴每天口服 10^{12} cfu/ml 菌液 100ml,低剂量组每天口服 10^9 cfu/ml 菌液 100ml。连续观察 60 天。14 天、30 天、45 天、60 天后分别抽静脉血测血象、肝肾功,测心电图。取胃肠肝脾组织做病理切片电镜观察。

[0022] 实验结果:均未见明显异常。

[0023] 实施例 3 脆弱拟杆菌对于结肠癌的预防作用

采用实施例 1 制备的脆弱拟杆菌菌液进行以下实验:

动物模型建立:将 60 只 ICR 小鼠随机分为 2 大组,即:生理盐水组(10 只)和模型组(50 只)。将 1,2-二甲肼(DMH)溶于生理盐水中,使其终浓度为 20mg/kg,用 0.25mol/L NaOH 调整 pH 至 6.5,腹腔注射予小鼠。1 周后,在模型组的饮水中添加右旋葡聚糖苷钠(DSS),浓度为 20g/L,给予小鼠连续饮用 7 天。在小鼠出现第二次血便时,及给予 DMH 后的第 9 周,按体质量随机将模型小鼠分为 4 组,即:模型组(20 只)和脆弱拟杆菌组:高剂量组(10^9 cfu/ml)、中剂量组(10^8 cfu/ml)、低剂量组(10^7 cfu/ml)。脆弱拟杆菌菌液灌胃,每天 1 次,每次 0.5ml,共 11 周。

[0024] 评价指标:实验第 20 周,乙醚麻醉小鼠。剪开小鼠腹腔,在冰浴中从肛门向上截取结肠 8cm,用生理盐水冲洗后,滤纸吸干,称体质量。记录结肠肿瘤数目,取结肠约 1cm 做病理检查。

[0025] 结果:模型组小鼠在第 20 周,50% 的小鼠出现脱肛,而脆弱拟杆菌三个剂量组未见脱肛小鼠。模型组有超过 80% 的小鼠结肠出现了一个或者多个肿瘤,结肠充血增厚。而脆弱拟杆菌低剂量组仅有 3 只出现结肠肿瘤,高中剂量组仅有 1 只出现。病理结果表明,模型组细胞排列紊乱、浸润性生长,边界模糊,诊断为腺瘤样增生;脆弱拟杆菌三个剂量组粘膜缺失,炎症细胞广泛浸润,呈典型炎症改变。

[0026] 实验结果表明,脆弱拟杆菌成功地将小鼠结肠停留在炎症状态,阻止了结肠炎向结肠癌的转变。由此可见,脆弱拟杆菌对结肠癌有很好的预防作用。

[0027] 实施例 4 脆弱拟杆菌对于结肠癌的治疗作用

采用实施例 1 制备的脆弱拟杆菌菌液进行以下实验:

BALB/c 小鼠 30 只,每只鼠背部皮下接种 CT26 细胞(1×10^5 细胞/只),接种次日将小鼠随机分为 2 组,每组 15 只。第一组为生理盐水组,每天灌胃 0.5ml 生理盐水;第二组为脆弱拟杆菌组,灌胃脆弱拟杆菌菌液,每只灌胃量 $0.5\text{ml} \times 10^9$ cfu/ml,共 30 天。观察用药 30 天时肿瘤大小,荷瘤鼠生存期,部分小鼠处死进行原位细胞凋亡分析(TUNEL)。

[0028] 实验结果:脆弱拟杆菌组结肠肿块明显小于生理盐水组,平均生存时间明显长于生理盐水组。脆弱拟杆菌组小鼠肿瘤细胞(CT26)凋亡阳性数明显高于生理盐水对照组。

[0029] 实验结果表明,脆弱拟杆菌在体内诱导机体产生了抗肿瘤效应,抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡,延长生存期。说明了脆弱拟杆菌对于结肠癌有很好的治疗作用。