



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102940652 B

(45) 授权公告日 2015.03.25

(21) 申请号 201210228563.7

A61P 31/14(2006.01)

(22) 申请日 2008.05.28

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

200810108889.X 2008.05.28

WO 90/01335 A1, 1990.02.22, 权利要求 22-24, 说明书第 4 页第 2 行 - 倒数第 5 行, 第 6 页第 15-20 行.

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 2465 2008.04.25

CGMCC NO. 2466 2008.04.25

WO 90/01335 A1, 1990.02.22, 权利要求 22-24, 说明书第 4 页第 2 行 - 倒数第 5 行, 第 6 页第 15-20 行.

(73) 专利权人 青岛东海药业有限公司

地址 266400 山东省青岛胶南市上海中路 8 号

专利权人 北京普尔康医药高科技有限公司

US 2004028689 A1, 2004.02.12, 全文.

JP 2001046063 A, 2001.02.20, 全文.

于卓腾等. 肠道产丁酸细菌及其丁酸产生机制的研究进展. 《世界华人消化杂志》. 2006, 第 14 卷 (第 25 期), 2531-2534.

(72) 发明人 崔云龙 李洪福 王发合

段明霞. 益生菌及其在儿科的临床应用. 《儿科药理学杂志》. 2001, 第 7 卷 (第 03 期), 6-7.

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

A61P 1/10(2006.01)

A61P 1/12(2006.01)

A61P 1/14(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

审查员 田红梅

权利要求书1页 说明书29页

(54) 发明名称

两形真杆菌制剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及两形真杆菌制剂及其应用, 具体涉及两形真杆菌作为主要活性成份制成微生态制剂, 及该微生态制剂在治疗相关疾病中的应用, 该微生态制剂包括药品组合物、保健品、饮品、兽药和饲料添加剂。

1. 一种微生物制剂,其特征在于该微生物制剂的活性成分为两形真杆菌,所述两形真杆菌保藏编号为 CGMCC2466。
2. 根据权利要求 1 所述的微生物制剂,其特征在于两形真杆菌指活的生物个体。
3. 权利要求 1 所述的微生物制剂的应用,其特征在于有效剂量的两形真杆菌作为活性成份制成药品组合物、保健品、饮品、兽药或饲料添加剂。
4. 权利要求 1 所述的微生物制剂在制备提高免疫力、养颜美容、营养保健、促进消化吸收、促进小儿肠道发育成熟用组合物中的用途。
5. 权利要求 1 所述的微生物制剂在制备治疗腹泻用组合物中的用途。
6. 权利要求 1 所述的微生物制剂在制备治疗肠易激综合征、冷凉泻、喝酒泻、溃疡性结肠炎、克罗恩病、抗生素相关性腹泻、伪膜性肠炎、小儿肺炎继发性腹泻、肠癌、辅助治疗肿瘤放化疗引起的肠粘膜损伤性疾病、便秘、便臭、便臭中毒综合征、病毒性腹泻、喂养不耐受、坏死性小肠结肠炎、口腔溃疡、鹅口疮用组合物中的用途。
7. 权利要求 1 所述的微生物制剂在制备治疗类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、高脂血症、湿疹、手足口病用组合物中的用途。
8. 权利要求 1 所述的微生物制剂在制备预防肠癌用组合物中的用途。

两形真杆菌制剂及其应用

[0001] 说明

[0002] 本申请是分案申请,原申请日:2008年05月28日,原申请号:200810108889.X,原发明创造名称:凸腹真杆菌和两形真杆菌制剂及其应用。

技术领域

[0003] 本发明涉及凸腹真杆菌和两形真杆菌制剂及其应用,具体涉及凸腹真杆菌和两形真杆菌单独或组合作为主要活性成份制成微生态制剂,及该微生态制剂在治疗相关疾病中的应用,属于生物药领域。

背景技术

[0004] 目前,抗菌药在临床和养殖业等方面滥用的危害已引起重视,由于微生态制剂没有副作用,利用微生态制剂治疗相关疾病、保健及作为兽药和饲料添加剂已得到广泛应用。目前的微生态制剂主要成份包括双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等,治疗相关疾病疗效不是非常理想。丁酸(酪酸)已经被证实是结肠能量的首选来源,提供肠粘膜70%的能量,促进肠粘膜细胞增殖生长及消化系统发育成熟,同时丁酸也是调节免疫的重要物质。本发明微生态制剂进入肠道由于能够分泌大量酪酸,治疗相关疾病疗效显著,并可作为保健品、兽药和饲料添加剂应用,社会意义巨大,且未见相关研究报道,特申请此发明专利。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新型的微生态制剂,该微生态制剂中的主要活性成份进入肠道能产生大量丁酸,修复肠粘膜,调节免疫,抑制炎症因子过度表达,同时该微生态制剂还能恢复肠道菌群平衡和提高机体及粘膜免疫,有效治疗消化系统疾病、营养吸收障碍性疾病、自身免疫性疾病、心脑血管疾病、变态反应性疾病、手足口病及提高免疫和抗癌。其中所述消化系统疾病包括腹泻、肠易激综合征、冷凉泻、喝酒泻、溃疡性结肠炎、克罗恩病、抗生素相关性腹泻、伪膜性肠炎、小儿肺炎继发性腹泻、肠癌、肿瘤放疗辅助治疗、腹胀和消化不良、便秘、便臭、便臭中毒综合征、肝胆疾病、病毒性腹泻、喂养不耐受、坏死性小肠结肠炎、黄疸、口腔溃疡、鹅口疮、促进小儿肠道发育成熟、促进消化吸收、营养保健和生长发育;所述营养吸收障碍性疾病包括佝偻病;所述自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、强直性脊柱炎;所述心脑血管疾病包括高脂血症、高血压、脑血栓、脑栓塞、脑缺血、心肌梗塞、冠心病、脑梗死、脑出血、心绞痛、心肌炎、动脉粥样硬化;所述变态反应性疾病包括湿疹;所述提高免疫包括治疗反复呼吸道感染。

[0006] 本发明的微生态制剂的制备优选是通过下述步骤实施的,但不局限于此制备工艺,公知的能实现的制备工艺均可以:采取含凸腹真杆菌或两形真杆菌的样本,优选人或动物粪便,更优选健康婴儿粪便,然后将样品置于灭菌厌氧瓶内,吹入氮气同时充分混合,迅速从中取2克样品加入18mL灭菌的稀释液中,吹入氮气同时充分混匀,在无菌操作台内,

进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释梯度,分别涂布于凸腹真杆菌或两形真杆菌选择性单菌落分离固体培养基上,置于厌氧罐内,厌氧 37℃ 下培养 48 小时,选择长势良好的单菌落分别接种于液体扩增培养基中,置于厌氧罐内,厌氧 37℃ 下扩增培养 48 小时。将所得培养液离心 (12000rpm) 分离出菌体后,将菌体冷冻真空干燥,调制出各菌种的干燥菌粉,然后进行菌种鉴定、产丁酸实验和毒性试验,将鉴定的无毒性凸腹真杆菌或两形真杆菌干燥菌粉单独或组合按需要比例添加辅料制成片剂、胶囊和散剂等各种剂型或兽药、饲料添加剂。

[0007] 凸腹真杆菌或两形真杆菌选择性单菌落分离固体培养基优选但不局限于:纯化水 100mL,胰蛋白胨 1g,酵母浸膏 0.5g,磷酸氢二钠 0.4g,葡萄糖 0.15g,可溶性淀粉 0.05g,L-半胱氨酸 0.02g,L-半胱氨酸盐酸盐 0.05g,琼脂 1.5g,调 pH 值 7.7,115℃,20 分钟高压灭菌。灭菌后在冷却到 60℃ 后加入 5mL 脱纤维马血,ES 溶液 4mL。

[0008] 其中 ES 溶液:丙酸钠 30%,硫酸链霉素 4%,硫酸巴龙霉素 2%,硫酸多粘菌素 B0.02%。

[0009] 凸腹真杆菌或两形真杆菌液体扩增培养基优选但不局限于:绞碎的牛肉 500g,蒸馏水 11,1N NaOH 25.0mL,用精牛肉或马肉,绞碎去除脂肪和连接组织,混合肉、水和氢氧化钠煮沸,同时搅拌,冷却至室温,略去表面的脂肪并过滤,保留滤液,补充足够的蒸馏水滤液恢复 1 升原体积。向每 100mL 滤液中添加:蛋白胨 2.0g、葡萄糖 0.5g、酵母浸膏 1.0g、盐酸半胱氨酸 0.05g、盐溶液 4.0mL,维生素 K₁ 溶液 0.1mL、5mg/mL 氯化血红素溶液 0.5mL,调 pH 至 7.2 ± 0.1,在厌氧管内通入 97% 的氮,3% 的氢,盖紧丁基橡胶瓶塞帽,121℃ 高压灭菌 15min。其中:1、盐溶液的配制:称取无水氯化钙 0.2g,硫酸镁 0.2g,磷酸氢二钾 1g,磷酸二氢钾 1g,碳酸氢钠 10g,氯化钠 2g,加蒸馏水至 1000mL;2、氯化血红素溶液 (5mg/mL) 的配制:称取氯化血红素 0.5g 溶于 1mol/L 氢氧化钠 1mL 中,加蒸馏水至 100mL,121℃ 高压灭菌 15min,冰箱保存;3、维生素 K₁ 溶液的配制:称取维生素 K₁ 1g 加无水乙醇 99mL,过滤除菌,放冷暗处保存。

[0010] 本发明优选使用的凸腹真杆菌的细菌学性质:

[0011] 1、菌落形态

[0012] 显微镜观察:长 1.5-2 微米,宽 0.5 微米,短杆,革兰氏染色阳性。

[0013] 平板形态:菌体呈圆形、凸起、周边整齐、光滑;颜色灰色,不透明。

[0014] 2、生理生化鉴定

[0015] 石蕊牛奶:-;脂酶:-;明胶液化:-;过氧化氢酶:-;精氨酸产氨:-;七叶苷水解:+;吲哚:-;硫化氢:-;乙酰甲基甲醇试验 (V-P 试验):-;是否需氧:厌氧性。

[0016] 3、糖酵解实验鉴定

[0017] 纤维二糖:-;D-果糖:+;D-半乳糖:+;葡萄糖:+;D-甘露糖:+;D-棉子糖:-;鼠李糖:-;山梨糖:-;松三糖:-;蔗糖:-;海藻糖:-;木糖:+;麦芽糖:+;淀粉:+;蜜二糖:+;核糖:+;甘油:-;七叶灵:+;阿拉伯糖:-;果糖:+。

[0018] 本发明优选使用的两形真杆菌的细菌学性质:

[0019] 1、菌落形态

[0020] 显微镜观察:长 2.0-5 微米,宽 1.0 微米,中长杆,革兰氏染色阳性。

[0021] 平板形态:菌体呈圆形、凸起、周边整齐、光滑;颜色灰色,不透明。

[0022] 2、生理生化鉴定

[0023] 石蕊牛奶:-;脂酶:-;明胶液化:-;过氧化氢酶:-;精氨酸产氨:-;七叶苷水解:+;吡啶:-;硫化氢:-;V-P 试验:-;是否需氧:厌氧性。

[0024] 3、糖酵解实验鉴定

[0025] 纤维二糖:-;D-果糖:+;D-半乳糖:+;葡萄糖:+;D-甘露糖:+;D-棉子糖:-;鼠李糖:-;山梨糖:-;松三糖:-;蔗糖:-;海藻糖:+;木糖:-;麦芽糖:-;淀粉:-;蜜二糖:-;核糖:-;七叶灵:+;甘油:-;阿拉伯糖:-。

[0026] 发明人利用上述方法通过凸腹真杆菌或两形真杆菌选择性单菌落分离固体培养基分离鉴定出了凸腹真杆菌或两形真杆菌。

[0027] 本发明所述凸腹真杆菌优选但不限于凸腹真杆菌 (*Eubacterium ventriosum*)、CGMCC、保存编号 2465。

[0028] 本发明所述两形真杆菌优选但不限于两形真杆菌 (*Eubacterium bifforme*)、CGMCC、保存编号 2466。

[0029] 本发明所述的凸腹真杆菌或两形真杆菌指活生物个体。

[0030] 本发明是以有效剂量的上述凸腹真杆菌或两形真杆菌单独或组合作为主要药物活性成份,按照一定的制剂工艺,加入常规的赋形剂、调味剂、崩解剂、防腐剂、润滑剂、湿润剂、黏合剂、溶剂、增稠剂、增溶剂等药物辅料,制成任何一种适合于临床上使用的剂型,如片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、液体制剂、灌肠剂等剂型。

[0031] 本发明所述以有效剂量的上述凸腹真杆菌或两形真杆菌单独或组合作为主要药物活性成份制成活菌微生态制剂,也可以是上述凸腹真杆菌或两形真杆菌单独或组合与双歧杆菌、凝结芽孢杆菌、乳杆菌、链球菌、枯草芽孢杆菌等益生菌中的一种或几种或其他活性成份组合制成活菌微生态制剂,以起到协同治疗作用,提高治疗效果。

[0032] 本发明中的微生态制剂在临床上的用量,因患者年龄、体重及症状、用药目的所决定的用药方式和方法、治疗效果及用药时间等因素而不同,正确的用量应该由医师来决定,且应用剂量也是临床医生根据病情很容易掌握和调整的。

[0033] 本发明所指有效剂量是指以上述凸腹真杆菌或两形真杆菌根据上面所述单独或组合作为主要药物活性成份制成的固体活菌制剂包含的总活菌数不能低于 1×10^6 CFU/g,一般在 1×10^7 CFU/g 以上,最高可达到 1×10^{12} CFU/g 或 1×10^{12} CFU/g 以上。

[0034] 本发明所指有效剂量是指以上述凸腹真杆菌或两形真杆菌根据上面所述单独或组合作为主要药物活性成份制成的液体活菌制剂包含的总活菌数不能低于 1×10^6 CFU/mL,一般在 1×10^7 CFU/mL 以上,最高可达到 1×10^{12} CFU/mL 或 1×10^{12} CFU/mL 以上。

[0035] 由于本发明首次公开了凸腹真杆菌或两形真杆菌在作为主要活性成份制成微生态制剂中的应用,因此含上述凸腹真杆菌或两形真杆菌的药剂均属于本发明的保护范围。

[0036] 本发明所述的凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株,包括凸腹真杆菌 CGMCC2465 株和两形真杆菌 CGMCC2466 株,在制成任何一种剂型时,均具有治疗上述疾病的作用。任何药剂,如果其组份中含有上述凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株成份制备成药,在其包装或说明书等标识上或者在其他任何宣传品上只要注明或提示具有治疗上述疾病的作用,则落入本发明的保护范围之内。

[0037] 本发明所述的凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株,包括凸腹真杆菌

CGMCC2465 株和两形真杆菌 CGMCC2466 株可以制成保健品或饮品。将上述凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株制成的保健品或饮品, 如果在其包装或说明书等标识上或者在其他任何宣传品上只要注明或提示具有治疗上述疾病的作用, 则落入本发明的保护范围之内。

[0038] 本发明所述的凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株, 包括凸腹真杆菌 CGMCC2465 株和两形真杆菌 CGMCC2466 株可以制成兽药或饲料添加剂。将上述凸腹真杆菌或两形真杆菌中的任何一个菌株制成兽药或饲料添加剂, 则落入本发明的保护范围之内。

具体实施方式

[0039] 药物制备例说明: 上述已经对凸腹真杆菌和两形真杆菌的制备进行说明, 这里通过以凸腹真杆菌 CGMCC2465 株和两形真杆菌 CGMCC2466 株为例, 说明凸腹真杆菌散剂、两形真杆菌散剂和凸腹真杆菌两形真杆菌二联活菌散剂(以下简称二联活菌)的制备方法, 其他凸腹真杆菌和两形真杆菌菌株制剂的制备方法本领域技术人员通过本实施例很容易掌握, 其他剂型的制备方法本领域技术人员通过本实施例很容易掌握, 在此不再一一叙述说明。制备方法并不局限于本发明实施例所述, 公知的能够达到制备目的的方法均可以, 实施例的制备说明只是对本发明的说明, 并不是对本发明保护范围的限制。

[0040] 药物制备实施例 1 口服凸腹真杆菌活菌散剂、口服两形真杆菌活菌散剂和二联活菌散剂的制备

[0041] 1 菌粉的制备和菌种的鉴定

[0042] 采取山东省胶南市一健康婴儿粪便, 然后将粪便置于灭菌厌氧瓶内, 吹入氮气同时充分混合, 迅速从中取 2 克粪便加入 18mL 灭菌的稀释液中, 吹入氮气同时充分混匀, 在无菌操作台内, 进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释, 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释梯度, 涂布于凸腹真杆菌或两形真杆菌选择性单菌落分离固体培养基上, 置于厌氧罐内, 厌氧 37°C 下培养 48 小时, 选择长势良好的两个单菌落分别接种到凸腹真杆菌或两形真杆菌液体扩增培养基中, 置于厌氧罐内, 厌氧 37°C 下扩增培养 48 小时。将所得培养液离心 (12000rpm) 分离出菌体后, 将菌体冷冻真空干燥, 调制出两个菌种的干燥菌粉, 然后根据上述方法进行菌种鉴定, 经鉴定为凸腹真杆菌 CGMCC2465 株和两形真杆菌 CGMCC2466 株。

[0043] 2 产丁酸实验

[0044] 将分离到的凸腹真杆菌和两形真杆菌分别接种到液体扩增培养基中, 置于厌氧罐内, 厌氧 37°C 下扩增培养 48 小时, 离心 (12000rpm), 取上清液用气相检测代谢产物丁酸含量分别为 7.8mmol/L 和 8.2mmol/L , 表明均能产丁酸。

[0045] 3 生理生化鉴定 经鉴定均不产生硫化氢、吲哚、氨等有害物质。

[0046] 4 毒性试验

[0047] 4.1 动物及分组 取 30 只 SPF 级别小鼠, 6 ~ 8 周龄, 体重 $16 \sim 19\text{g}$, 随机分入凸腹真杆菌组、两形真杆菌组和未给药组, 每组 10 只。

[0048] 4.2 制备菌液 将上述凸腹真杆菌菌粉和两形真杆菌菌粉用纯化水调制为含菌数均为 $1 \times 10^{12}\text{CFU/mL}$ 的菌液。

[0049] 4.3 方法 凸腹真杆菌组、两形真杆菌组和未给药组均给予相同的基础饲料, 且饲养条件均一致, 凸腹真杆菌组每天灌服凸腹真杆菌菌液 0.5mL , 两形真杆菌组每天灌服两形

真杆菌菌液 0.5mL, 未给药组每天灌服纯化水 0.5mL, 饲喂 6 个月, 观察体重及毒性反应。

[0050] 4.4 结果

[0051] 各组小鼠均未出现异常情况, 未发生振颤、痉挛、运动失调、姿态异常, 无眼球突出, 排尿正常, 皮肤、呼吸正常, 无死亡情况, 且凸腹真杆菌组、两形真杆菌组的体重增加显著高于未给药组 ($P < 0.05$), 表明凸腹真杆菌和两形真杆菌有促进生长发育作用, 说明两菌株效果良好, 未见中毒反应, 结果见表 1。

[0052] 表 1 小鼠体重增加情况

[0053]

服用时间	凸腹真杆菌组	两形真杆菌组	未给药组
开始	18.25±0.30	18.34±0.41	18.31±0.25
服用 1 个月	39.13±1.12	38.67±1.54	35.13±1.28
服用 2 个月	45.67±1.59	45.57±1.67	39.68±1.58
服用 3 个月	47.16±2.58	47.10±2.42	41.25±3.15
服用 4 个月	49.21±3.68	50.11±4.13	44.15±3.67
服用 5 个月	51.65±5.01	51.29±4.35	45.89±4.65
服用 6 个月	52.56±4.95	52.45±4.28	46.98±4.63

[0054] 5 制备成散剂等剂型

[0055] 根据上述步骤和方法分离鉴定凸腹真杆菌和两形真杆菌后, 经实验检验产丁酸、不产毒素、无毒性, 就可制成菌粉, 然后按照需要添加相关辅料制成各种剂型, 优选据凸腹真杆菌和两形真杆菌菌粉的活菌数, 按比例添加脱脂奶粉、葡萄糖制成散剂, 使总活菌数不低于 1×10^7 CFU, 然后将两菌的菌粉单独或组合装袋, 制成口服凸腹真杆菌活菌散剂、口服两形真杆菌活菌散剂和二联活菌散剂。

[0056] 应用效果实施例说明: 虽然凸腹真杆菌和两形真杆菌有许多菌株, 但按上述方法分离的不同菌株具有相同的生物学特性, 且作用机理相同, 包括进入肠道分泌大量丁酸、补充肠道有益菌恢复肠道菌群平衡、提高机体和粘膜免疫等, 因此本发明选用按上述方法分离的凸腹真杆菌和两形真杆菌菌株为研究对象, 介绍凸腹真杆菌和两形真杆菌的应用效果。

[0057] 实施例 1、凸腹真杆菌和两形真杆菌对肠粘膜的修复作用研究

[0058] 1 材料与方法

[0059] 1.1 材料

[0060] 1.1.1 药物凸腹真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL); 两形真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL); 二联活菌菌液 (10^7 CFU/mL); 双歧杆菌菌液 (10^7 CFU/mL); 右旋葡聚糖硫酸钠 (DSS, 10g/瓶, Sino-American Biotec); 爱尔新蓝 (1g/瓶, Sino-American Biotec)。

[0061] 1.1.2 动物 SD 雄性大白鼠 70 只, 体重 80 ~ 100g, 标准 2 级, 购自中国药品生物制品检定所实验动物中心。

[0062] 1.2 方法

[0063] 1.2.1 肠粘膜损伤造型和治疗

[0064] 大鼠 70 只,10 只大鼠作为正常对照组,另 60 只大鼠用 3% DSS 溶液给空腹大鼠灌胃 (1mL/100g),每天 1 次,共 7 天,最后一次从肛门加注 DSS 1mL/只至直肠内。然后处死其中 10 只 (模型对照组),剖腹取结直肠,测定结直肠湿重 (g/100g 体重),甲醛固定,用爱尔新蓝溶液染色,肉眼观测溃疡和糜烂部分的点数,用卡尺测量蓝染点的蓝染面积 (cm²),证实溃疡形成后,将其余 50 只模型大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别灌胃生理盐水、凸腹真杆菌菌液 (10⁷CFU/mL)、两形真杆菌菌液 (10⁷CFU/mL)、二联活菌菌液 (10⁷CFU/mL)、双歧杆菌菌液 (10⁷CFU/mL),1mL/次,每天 2 次,共 21 天。21 天后处死全部大鼠,按上法处理结直肠标本,检测相应指标。

[0065] 1.2.2 统计学分析各组间的数据差异的统计学显著性检验,用 t-student't 检验,差异显著性界限为 $p < 0.05$ 。

[0066] 2 结果

[0067] 2.1 结直肠溃疡 (或糜烂) 点数与面积

[0068] 用 DSS 灌胃,加直肠给 DSS 后可在整个结直肠形成典型的大鼠肠粘膜损伤,尤其结肠下端和直肠的肠标本用爱尔新蓝染色后,肠粘膜可见明显深染的不规则的溃疡点或糜烂点。结直肠溃疡 (糜烂) 点数及溃疡面积凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组与模型对照组、生理盐水模型对照组或双歧杆菌治疗组比较均有很显著性差异 ($P < 0.01$),而凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组之间无显著性差异 ($P > 0.05$),凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组和模型对照组治疗前排稀便,偶尔带血,治疗后凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组均排正常便,模型对照组仍然排稀便。见表 2。

[0069] 表 2 各种菌对肠粘膜的修复作用

[0070]

组 别	溃疡或糜烂点数	溃疡或糜烂面积 (cm ²)
正常组	0	0
模型对照组	4.60±0.62	0.75±0.15
生理盐水模型对照组	4.20±0.36	0.70±0.24
双歧杆菌治疗组	2.80±0.56	0.42±0.35
凸腹真杆菌治疗组	1.12±0.45	0.07±0.03
两形真杆菌治疗组	1.25±0.38	0.08±0.07
二联活菌治疗组	1.21±0.32	0.06±0.04

[0071] 3 结论

[0072] 凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,提供肠粘膜细胞能量,对肠粘膜细胞具有很好的促进增殖作用,能修复受损伤的肠粘膜,改变肠粘膜通透性,促进肠粘膜发育成熟,促进消化吸收,疗效显著好于双歧杆菌等非产丁酸益生菌。因此,凸腹真杆菌和两形真杆菌可以单独或组合治疗腹泻、溃疡性结肠炎、克罗恩病、抗生素相关性腹泻、伪膜性肠炎、小儿肺炎继发性腹泻、肿瘤放化疗辅助治疗、病毒性腹泻、坏死性小肠结肠炎等肠粘膜损伤性疾病,促进肠道发育成熟,促进消化吸收,消除腹胀和消化不良及治疗喂养不耐受,

促进生长发育和营养保健,对营养吸收障碍性疾病也有很好的治疗作用,包括佝偻病。

[0073] 实施例 2、凸腹真杆菌和两形真杆菌调节免疫和炎症因子表达的研究

[0074] 1 实验材料与方法

[0075] 1.1 实验动物:雄性 SD 大鼠,180-220g。

[0076] 1.2 实验药物:美沙拉嗪(200mg/mL);凸腹真杆菌菌液(10^7 CFU/mL);两形真杆菌菌液(10^7 CFU/mL);二联活菌菌液(10^7 CFU/mL);双歧杆菌菌液(10^7 CFU/mL)。由青岛东海药业有限公司提供。

[0077] 1.3 实验试剂:弗氏完全佐剂(sigma),MTT(sigma);伴刀豆素球蛋白(ConA)(Sigma);脂多糖(LPS)(Sigma);MTT(Sigma),购自北京舒伯伟化工仪器有限责任公司;1640 培养液(Gibco);牛结肠粘膜蛋白冻干粉(自制);IL-8ELISA 试剂盒(BD);TNF- α ELISA 试剂盒(Ebioscience);大鼠 IgG 参考血清;兔抗大鼠 IgG 抗血清,外购。

[0078] 2 实验方法

[0079] 2.1 牛结肠粘膜蛋白冻干粉的制备取新生小牛结肠,刮取牛结肠粘膜,反复冻溶法获取牛结肠粘膜蛋白,纯化浓缩,真空冻干后于 4℃ 保存备用。

[0080] 2.2 免疫紊乱性疾病模型的建立取牛结肠粘膜蛋白与完全弗氏佐剂(1:1)制成完全抗原,选用体重在 200 \pm 20g 的 SD 大鼠,造模大鼠首次每只足跖内注射抗原 4mg,于第 10、17、24、31 天分别于足跖、背部、腹股沟、腹腔内注射抗原 6mg,最后 1 次注射不加佐剂,至血清抗结肠抗体达到一定效价。第 35 天模型组大鼠用异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,并分别进行下列处理(处理前禁食 24h),先用 2% 的甲醛溶液 1.5mL 灌肠,留置 1h,用生理盐水洗净后排去。再用抗原液(4mg/mL,不加佐剂)2mL 灌肠,留置 2h,然后洗净排去。3d 后,随机抽取 2 只模型组大鼠处死,取其结肠标本(肛门向上 10 厘米),病理检查确认有充血、水肿、炎细胞浸润、溃疡形成等一系列炎症性肠病的病理变化。

[0081] 2.3 动物分组及治疗设正常对照组(10 只)。造模成功后,将造模大鼠随机分组,1) 模型对照组(10 只),给予生理盐水灌胃;2) 阳性药(美沙拉嗪,200mg/mL)治疗组(10 只);3) 凸腹真杆菌(10^7 CFU/mL)治疗组(10 只);4) 两形真杆菌(10^7 CFU/mL)治疗组(10 只);5) 二联活菌(10^7 CFU/mL)治疗组(10 只);6) 双歧杆菌(10^7 CFU/mL)治疗组(10 只)。每次 1mL/100g \cdot 体重,1 次/天,灌胃,连续给生理盐水或治疗药 21 天。期间每周称一次体重,并持续观察动物一般情况及粪便性状。

[0082] 2.4 指标测定给生理盐水或药物至第 21 天后,断头处死动物,测定模型对照组和 5 个治疗组结肠湿重指数、粘膜溃疡指数、粘膜损伤指数、肠系膜淋巴细胞转化率、IL-8、TNF- α 和 IgG 等指标。

[0083] 2.4.1 结肠湿重指数 结肠湿重指数=结肠湿重(g)/100g \cdot 体重。

[0084] 2.4.2 粘膜溃疡指数将新鲜结肠肠管纵行切开,清除肠内容物,将结肠中上段及结肠下段两部分分别编号,固定在硬纸板上,新鲜标本拍照后,在 10% 的甲醛液中固定,用卡尺测量结肠粘膜上细条索状或线形出血性病变,以全部病变总长度加以测量。溃疡指数的计算:病灶长度小于 1mm 为 1 分,1-2mm 为两分,2-3mm 为 3 分,3-4mm 为 4 分,如病灶长度大于 4mm,将其分为若干段,每段按上法计分,当病灶宽度大于 2mm 时,其得分加倍。一只动物全结肠各病灶得分的总和为其溃疡指数。

[0085] 2.4.3 肠系膜淋巴细胞转化率 无菌环境下取大鼠肠系膜淋巴细胞,过 200 目细

胞筛, 无菌 PBS 洗涤两次, 1000rpm, 5min。用完全 1640 培养液调整细胞浓度为 5×10^5 个 / mL, 每孔 100 μ l, 接种于 96 孔圆底细胞板中, 同时加 ConA (终浓度为 3 μ g/mL) 或 LPS (终浓度为 5 μ g/mL), 100 μ l / 孔。另设定空白对照孔 (未加诱导剂), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 72h, 培养结束前 4h, 加 MTT (5mg/ml) 20 μ l, 培养结束后, 测定 540nm 处测定 OD 值, 计算淋巴细胞刺激指数。淋巴细胞刺激指数 (SI) = 刺激组 OD 值 / 未刺激组 OD 值 药物。

[0086] 2.4. 4IL-8、TNF- α 和 IgG 断头处死大鼠, 取血, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 3000rpm, 20min 离心, 取上清, 分装, 放于 -20 $^{\circ}$ C 待测。使用 ELISA 试剂盒, 按照说明书, 测定大鼠血清中大鼠 IL-8 及 TNF- α 的含量。使用单向免疫扩散法测定血清中 IgG 的含量。

[0087] 2.5 统计学处理 各组间的数据差异的统计学显著性检验, 用 t-student' t 检验, 差异显著性界限为 $p < 0.05$ 。

[0088] 3 实验结果

[0089] 3.1 粪便性状、结肠湿重指数

[0090] 模型对照组大鼠在造型期间排白色粘液性稀便。治疗组大鼠在治疗前也排白色粘液性稀便, 治疗 21 天后均排正常便。

[0091] 美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组治疗 21 天后结肠湿重指数与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较呈显著性降低 ($P < 0.05$), 但美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组大鼠治疗后结肠湿重指数比较无显著性差异, 见表 3。

[0092] 表 3 免疫紊乱性模型大鼠结肠湿重指数变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

[0093]

组别	动物数	结肠湿重指数 (g) /100g. 体重
正常对照组	10	0.41 \pm 0.03
模型对照组	10	0.46 \pm 0.05
双歧杆菌治疗组	10	0.43 \pm 0.06
美沙拉嗪治疗组	10	0.37 \pm 0.07
凸腹真杆菌治疗组	10	0.37 \pm 0.05
两形真杆菌治疗组	10	0.37 \pm 0.06
二联活菌治疗组	10	0.36 \pm 0.07

[0094] 3.2 粘膜溃疡指数 (积分)

[0095] 美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组治疗 21 天后粘膜溃疡指数与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较呈显著性减小 ($P < 0.05$), 但美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组大鼠治疗后粘膜溃疡指数比较无显著性差异, 见表 4。

[0096] 表 4 免疫紊乱性模型大鼠肠粘膜溃疡指数变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

[0097]

组别	动物数	粘膜溃疡指数 (积分)
正常对照组	10	0.00
模型对照组	10	28.7±9.7
双歧杆菌治疗组	10	20.1±6.2
美沙拉嗪治疗组	10	16.4±6.3
凸腹真杆菌治疗组	10	9.1±4.2
两形真杆菌治疗组	10	9.5±3.6
二联活菌治疗组	10	9.4±4.6

[0098] 3.3 肠系膜淋巴细胞转化率

[0099] 建立免疫紊乱模型成功后, B 淋巴细胞转化率升高, T 淋巴细胞转化率降低, 美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组治疗 21 天后与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较 B 淋巴细胞转化率显著降低及 T 淋巴细胞转化率显著升高 ($P < 0.05$), 但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组之间比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 5。

[0100] 表 5 免疫紊乱性模型大鼠肠系膜淋巴细胞转化率变化情况($\bar{x} \pm s$)

[0101]

组别	刺激指数 (SI)	
	B 淋巴细胞转化率	T 淋巴细胞转化率
正常对照组	1.15±0.26	1.03±0.20
模型对照组	1.84±0.18	0.59±0.20
双歧杆菌治疗组	1.42±0.21	0.87±0.15
美沙拉嗪治疗组	1.23±0.22	0.94±0.32
凸腹真杆菌治疗组	1.13±0.26	1.06±0.29
两形真杆菌治疗组	1.15±0.35	1.04±0.26
二联活菌治疗组	1.12±0.27	1.05±0.27

[0102] 3.4 血清 IL-8 和 TNF- α 含量

[0103] 模型对照组大鼠血清中的 IL-8 和 TNF- α 含量比正常对照组的显著升高 ($P < 0.05$), 美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组治疗 21 天后血清 IL-8 和 TNF- α 含量与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较呈显著性降低 ($P < 0.05$), 但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组大鼠治疗后血清 IL-8 含量和 TNF- α 比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 6。

[0104] 表 6 免疫紊乱性模型大鼠血清 IL-8 和 TNF- α 含量变化情况($\bar{x} \pm s$)

[0105]

组别	IL-8 (pg/ml)	TNF- α (ng/ml)
正常对照组	37.3 \pm 14.7	17.6 \pm 5.0
模型对照组	81.0 \pm 10.9	57.4 \pm 7.7
双歧杆菌治疗组	60.3 \pm 11.2	42.5 \pm 5.3
美沙拉嗪治疗组	47.7 \pm 16.9	36.6 \pm 8.3
凸腹真杆菌治疗组	41.2 \pm 10.5	22.3 \pm 3.6
两形真杆菌治疗组	42.5 \pm 11.2	23.5 \pm 3.3
二联活菌治疗组	43.2 \pm 12.5	21.5 \pm 2.5

[0106] 3.5 血清 IgG 含量

[0107] 模型对照组大鼠血清中的 IgG 含量比正常对照组的显著升高 ($P < 0.05$), 美沙拉嗪治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组治疗 21 天后 IgG 含量与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较呈显著性降低 ($P < 0.05$), 但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组大鼠治疗后血清 IL-8 和 TNF- α 含量比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 7。

[0108] 表 7 免疫紊乱性模型大鼠血清 IgG 含量变化情况($\bar{x} \pm s$)

[0109]

组别	IgG (mg/ml)
正常对照组	7.5 \pm 0.3
模型对照组	13.9 \pm 0.4
双歧杆菌治疗组	11.8 \pm 0.6
美沙拉嗪治疗组	13.2 \pm 0.5
凸腹真杆菌治疗组	8.3 \pm 0.5
两形真杆菌治疗组	8.2 \pm 0.3
二联活菌治疗组	8.3 \pm 0.4

[0110] 4 结论

[0111] 各种原因导致的免疫紊乱及其炎症因子升高会引起各种疾病, 使肠道敏感性增强、耐受力下降引起肠易激综合征、冷凉泻、喝酒泻; 会使肠粘膜损伤, 引起溃疡性结肠炎或克罗恩病; 会引发自身免疫性疾病, 包括类风湿性关节炎、强直性脊柱炎; 血液中炎症因子升高会引发心脑血管疾病, 包括高脂血症、高血压、脑血栓、脑栓塞、脑缺血、心肌梗塞、冠心病、脑梗死、脑出血、心绞痛、心肌炎, 肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素 8 (IL-8)、白介素 1 β (IL-1 β) 等炎症性细胞因子促进了动脉粥样硬化及心脑血管疾病的发生和发展, 心脑血管疾病患者血清中的 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 等炎症性细胞因子水平明显高于健康人; 会引发变态反应性疾病, 包括变态反应性皮肤病, 进一步包括湿疹。研究表明凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸, 通过调节核转录因子 (NF- κ B) 的表达, 调节免疫平衡、消除免疫异常及抑制 TNF- α 、IL-8 等炎症因子过度表达, 有效治疗上述各种免疫紊乱及其炎症因子升高引起的疾病, 且效果好于双歧杆菌等非产丁酸益生菌。

[0112] 实施例 3、凸腹真杆菌和两形真杆菌促进肠道发育成熟的研究

[0113] 1 资料与方法

[0114] 1.1 资料选择喂养不耐受小儿 100 例, 诊断标准: 临床出现呕吐、腹胀、胃潴留等胃肠动力障碍表现, 喂奶前从胃管内抽出残留奶汁。所有患儿均排除胃肠道先天畸形、机械性肠梗阻、无脑肝肾功能不全及心肌损害。男 60 例, 女 40 例。按随机数字表将 100 例小儿分为五组, A 组 (凸腹真杆菌治疗组)、B 组 (两形真杆菌治疗组)、C 组 (二联活菌治疗组)、D 组 (双歧杆菌治疗组) 和对照组。每组 20 例患儿, 五组患儿胎龄、性别、体重、病情轻重程度经统计学处理, 差异无显著性 ($P > 0.05$), 具有可比性。

[0115] 1.2 方法所有患儿均给予常规护理, 输液泵补液, 治疗原发病及胃肠外营养支持等常规综合治疗。

[0116] A 组: 在常规综合治疗基础上给予口服凸腹真杆菌活菌散剂 (青岛东海药业有限公司生产, 500mg/袋, 含凸腹真杆菌为 1.0×10^7 CFU/g) 口服, 1 包/次, 3 次/天, 喂奶后口服或鼻饲, 疗程 7 天以上;

[0117] B 组: 在常规综合治疗基础上给予口服两形真杆菌活菌散剂 (青岛东海药业有限公司生产, 500mg/袋, 含两形真杆菌为 1.0×10^7 CFU/g) 口服, 1 包/次, 3 次/天, 喂奶后口服或鼻饲, 疗程 7 天以上;

[0118] C 组: 在常规综合治疗基础上给予口服二联活菌散剂 (青岛东海药业有限公司生产, 500mg/袋, 含凸腹真杆菌和两形真杆菌活菌总数为 1.0×10^7 CFU/g) 口服, 1 包/次, 3 次/天, 喂奶后口服或鼻饲, 疗程 7 天以上;

[0119] D 组: 在常规综合治疗基础上给予口服双歧杆菌活菌散剂 (青岛东海药业有限公司生产, 500mg/袋, 含双歧杆菌为 1.0×10^7 CFU/g) 口服, 1 包/次, 3 次/天, 喂奶后口服或鼻饲, 疗程 7 天以上;

[0120] 对照组: 常规综合治疗, 疗程 7 天以上。

[0121] 1.3 观察指标观察五组腹胀、呕吐、胃潴留和肠鸣音等症状变化, 生理性体重下降恢复至出生体重时间, 奶量增加情况及记录停用静脉营养达到完全胃肠道营养的时间, 有无黄疸并发症及黄疸持续时间, 及有无不良反应。

[0122] 1.4 疗效判断标准显效: 治疗 3~5 天腹胀、呕吐症状消失, 肠鸣音正常, 鼻饲奶每隔 2~3 小时 1 次, 能耐受, 无胃内容物储留; 好转: 治疗 5~7 天腹胀、呕吐症状减轻, 肠鸣音弱, 鼻饲奶每隔 2~3 小时 1 次, 胃内容物潴留 $< 1/3$; 无效: 治疗 7 天腹胀、呕吐症状无好转, 肠鸣音弱, 鼻饲奶每隔 2~3 小时 1 次, 胃内容物储留 $> 1/3$ 。显效和好转合计为有效。

[0123] 1.5 统计学处理采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0124] 2 结果

[0125] 2.1 六组疗效比较 A 组显效 15 例, 好转 5 例, 总有效率 100%; B 组显效 16 例, 好转 4 例, 总有效率 100%; C 组显效 14 例, 好转 6 例, 总有效率 100%; D 组显效 10 例, 好转 2 例, 无效 8 例, 总有效率 60%; 对照组显效 5 例, 好转 4 例, 无效 11 例, 总有效率 45%。经统计学检验, A 组、B 组、C 组总有效率显著高于 D 组和对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), A 组、B 组、C 组之间总有效率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

[0126] 2.2 两组观察指标比较恢复至出生体重时间,达到完全胃肠道营养时间,呕吐和腹胀消失时间,黄疸持续时间,A组、B组、C组与D组和对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);A组、B组、C组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表1。

[0127] 表8 两组治疗前后观察指标比较($\bar{x} \pm s$)

[0128]

观察指标	A组	B组	C组	D组	对照组
恢复至出生体重时间(天)	7.11±1.18	7.06±1.20	7.09±1.27	9.09±1.45	10.85±2.13
达到完全胃肠道营养时间(天)	12.25±1.65	13.17±1.34	12.16±1.22	15.38±1.16	17.32±2.16
呕吐消失时间(天)	3.47±1.37	3.52±1.24	3.29±1.31	5.23±1.27	7.38±1.49
腹胀消失时间(天)	3.56±1.27	3.36±1.32	3.48±1.27	5.75±1.61	7.45±1.57
黄疸持续时间(天)	13.49±1.21	13.36±1.75	13.31±1.26	15.27±1.31	19.55±2.41

[0129] 3 结论

[0130] 本研究表明凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,提供肠粘膜细胞能量,促进肠粘膜增殖及肠道发育成熟,治疗喂养不耐受疗效显著,并有效治疗呕吐、腹胀。同时,分泌丁酸,降低 β -葡萄糖醛酸苷酶的活性,竞争性地阻止结合胆红素分解为非结合胆红素,减少肝肠循环;通过产生丁酸,促进肠蠕动,促进排便,增加胆红素的排出;丁酸能促进肠道内结合胆酸分解为游离胆酸,减少结合胆酸在肠壁的重吸收,有利于消除胆汁淤积,因此缩短黄疸持续时间,有效预防和治疗黄疸。同时,凸腹真杆菌和两形真杆菌分泌丁酸,促进肠道发育成熟,明显缩短恢复至出生体重时间和达到完全胃肠道营养时间,表明能促进消化吸收和生长发育,具有营养保健作用。且凸腹真杆菌和两形真杆菌的上述治疗效果显著好于双歧杆菌等非产丁酸菌。

[0131] 实施例4、凸腹真杆菌和两形真杆菌对肠癌的预防作用研究

[0132] 1 实验方法

[0133] 选体重为18-20g的雌性昆明种小鼠100只,随机分为凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组、双歧杆菌治疗组和对照组(每组20只),实验时间为20周。

[0134] 致癌剂为1,2-二甲肼(symmetrical 1,1-dimethylhydrazine,DMH),为白色粉状结晶,每次临注射前以无菌生理盐水配成0.4%溶液,并用 NaHCO_3 将其pH调至6.5。每周给小鼠腹腔注射DMH 20mg/kg(即0.4%DMH溶液0.05ml/10g)一次,连续20周。于腹腔注射DMH 1周后,饮水中添加右旋葡聚糖苷钠(DSS),浓度为20g/L,连续饮用7天。

[0135] 腹腔注射 DMH 的同时,凸腹真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL),两形真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL),二联活菌菌液 (10^7 CFU/mL),双歧杆菌菌液 (10^7 CFU/mL),0.5mL/次,1次/天,连续 20 周。

[0136] 对照组,腹腔注射 DMH 的同时,生理盐水灌胃,0.5mL/次,1次/天,连续 20 周。

[0137] 2 实验结果

[0138] 实验结束的第 20 周后,用乙醚将小鼠麻醉致死,打开腹腔,观察肠道变化。结果表明对照组 20 只小鼠,大肠肠壁出现小结节,肠道皱褶减少或消失,肠道质地坚硬,100% 生成了肠癌;双歧杆菌治疗组有 14 只小鼠大肠肠壁出现小结节,肠道皱褶减少或消失,肠道质地坚硬,70% 生成了肠癌;凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组均有 9 只小鼠大肠肠壁出现小结节,肠道皱褶减少或消失,肠道质地坚硬,45% 生成了肠癌,显著低于对照组和双歧杆菌治疗组。

[0139] 3 结论

[0140] 本实验表明凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,丁酸是一种去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂,主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质结构,调控 P²¹等多种基因的表达,终止肠癌细胞生长,诱导肠癌细胞成熟分化,诱导肠癌细胞凋亡,能有效预防癌变、防止肠癌复发和扩散转移,能明显预防溃疡性结肠炎的癌变,预防率达到了 55%,因此可以制成相关剂型,用于预防肠癌,尤其用于预防结或直肠息肉、血吸虫病、细菌性痢疾、阿米巴、克罗恩病及溃疡性结肠炎等肠道慢性疾病发生癌变,维护人类肠道健康。大部分肠癌患者都死于手术后的复发和转移,因此凸腹真杆菌和两形真杆菌也可以用于肠癌手术后预防复发和转移,同时手术后服用可以促进伤口的愈合,可以抑制有害菌、抗炎预防感染,可以提高机体免疫力。

[0141] 实施例 5、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗肠癌的实验研究

[0142] 1 实验方法

[0143] BALB/c 小鼠 100 只,取动物皮下传代的小鼠结肠癌 C26 瘤组织,以生理盐水按 1 : 3 的比例稀释成悬液,按 0.2ml/只接种于小鼠腋窝皮下,然后将小鼠随机分为凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组、双歧杆菌治疗组和模型对照组 (每组 20 只)。

[0144] 凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组、双歧杆菌治疗组分别在接种 72 小时、144 小时后于瘤组织内注射菌液 (10^7 CFU/mL)0.1mL/只。对照组分别在接种 72 小时、144 小时后于瘤组织内注射生理盐水 0.1mL/只。实验第 12 天测量各组动物的肿瘤体积,观察抑瘤率。

[0145] 2 实验结果

[0146] 凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组瘤重与模型对照组和双歧杆菌治疗组比较显著性降低 ($P < 0.05$),但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组比较无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 9。

[0147] 表 9 凸腹真杆菌和两形真杆菌的抗癌作用研究

[0148]

组别	瘤重 (mg)
模型对照组	1.10±0.12
双歧杆菌治疗组	0.75±0.13
凸腹真杆菌治疗组	0.32±0.07
两形真杆菌治疗组	0.31±0.06
二联活菌治疗组	0.33±0.04

[0149] 3 结论

[0150] 本实验表明凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,具有显著的抗癌作用,目前研究表明丁酸是一种抗癌剂。因此,凸腹真杆菌和两形真杆菌可以单独或组合治疗或辅助治疗肠癌及其他癌症。

[0151] 实施例 6、凸腹真杆菌和两形真杆菌对实验性腹泻小鼠的止泻作用研究

[0152] 1 材料与方法

[0153] BALB/C 小鼠,雄性,体重(20±1)g,标准 2 级。凸腹真杆菌菌液(10⁷CFU/mL);两形真杆菌菌液(10⁷CFU/mL);二联活菌菌液(10⁷CFU/mL);双歧杆菌菌液(10⁷CFU/mL)。由青岛东海药业有限公司提供。

[0154] 将小鼠随机分为凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组和双歧杆菌治疗组和对照组(每组 20 只),单笼饲养。造型前 1 天动物禁食给水,随后用氨苄青霉素钠(加生理盐水配制)0.15g 灌胃,0.5mL/只,2 次/天,引起小鼠腹泻,排水样或糊状便。将小鼠分别用菌液灌胃,0.5mL/次,2 次/天,空白对照组给等体积生理盐水,连续 3 天。造型前和治疗后取新鲜大便作粪便菌群分析。

[0155] 2 结果

[0156] 2.1 止泻作用

[0157] 凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组的止泻作用显著好于模型对照组和双歧杆菌治疗组($P < 0.05$),但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组比较无显著性差异($P > 0.05$),见表 10。

[0158] 表 10 凸腹真杆菌和两形真杆菌的止泻作用研究

[0159]

组别	水样便(例数)	稀便(例数)	正常便(例数)
空白对照组	7	10	3
双歧杆菌治疗组	2	12	6
凸腹真杆菌治疗组	0	0	20
两形真杆菌治疗组	0	0	20
二联活菌治疗组	0	0	20

[0160] 2.2 肠道菌群分析

[0161] 结果表明凸腹真杆菌和两形真杆菌对肠道有益菌具有显著的促增殖作用($P < 0.05$),能快速恢复肠道菌群平衡,见表 11。

[0162] 表 11 肠道菌群分析 ($\text{Log}_{10}\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 10$)

[0163]

组别	类杆菌 (KV 培养基)	乳杆菌 (MRS 培养基)	双歧杆菌 (TPY 培养基)
正常对照组	9.00±0.62	8.32±0.42	10.13±0.35
造型后	6.12±0.42	6.01±0.56	7.54±0.41
空白对照组	6.56±0.32	6.48±0.33	8.42±0.52
凸腹真杆菌治疗组	9.56±0.25	9.35±0.19	9.64±0.39
两形真杆菌治疗组	9.65±0.31	8.27±0.35	9.87±0.21
二联活菌治疗组	9.67±0.34	8.64±0.25	9.95±0.38

[0164] 3 结论

[0165] 本实验表明凸腹真杆菌和两形真杆菌对腹泻有显著的治疗作用,效果好于双歧杆菌 ($P < 0.05$)。且能促进肠道有益菌增殖,快速恢复肠道菌群平衡,证明对抗生素相关性腹泻、伪膜性肠炎、小儿肺炎继发性腹泻、肿瘤放化疗辅助治疗、便秘、便臭等肠道菌群失调性疾病具有很好的治疗和预防作用,同时揭示对冷凉泻、喝酒泻和肠易激综合征也有显著治疗作用。

[0166] 实施例 7、凸腹真杆菌和两形真杆菌对实验性便秘小鼠的治疗作用研究

[0167] 1 材料与方法

[0168] BALB/C 小鼠,雄性,体重 (20 ± 1)g,标准 2 级。凸腹真杆菌菌液 (10^7CFU/mL);两形真杆菌菌液 (10^7CFU/mL);二联活菌菌液 (10^7CFU/mL)。由青岛东海药业有限公司提供。

[0169] 将小鼠随机分为凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组、模型对照组和正常对照组 (每组 10 只),单笼饲养。除正常对照组外,其余各组造型前 1 天动物禁食给水,随后口服给予 50mg/Kg 复方地芬诺酯片诱发便秘。将小鼠分别用菌液灌胃,0.5mL/次,2 次/天,模型对照组和正常对照组给等体积生理盐水,2 次/天,连续 3 天。

[0170] 2 结果

[0171] 凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组对便秘的治疗作用显著好于模型对照组 ($P < 0.05$),但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组比较无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 12。

[0172] 表 12 凸腹真杆菌和两形真杆菌对便秘的治疗作用研究

[0173]

组别	首次排便时间 (分)	大便例数	大便重量 (g)
正常对照组	143.80±60.53	39.4±3.20	0.87±0.08
模型对照组	285.67±78.23	11.2±5.41	0.21±0.03
凸腹真杆菌治疗组	162.12±39.86	32.7±3.57	0.71±0.13
两形真杆菌治疗组	159.43±57.26	33.4±2.24	0.70±0.11
二联活菌治疗组	164.31±45.23	34.3±4.12	0.69±0.09

[0174] 3 结论

[0175] 由于凸腹真杆菌和两形真杆菌进入肠道能够分泌大量丁酸,促进肠道蠕动,并能快速恢复肠道菌群平衡,改善肠道微环境,恢复肠道正常功能,因此有效治疗便秘和便秘型肠易激综合征。

[0176] 实施例 8、凸腹真杆菌和两形真杆菌对便臭和便臭中毒综合征的治疗作用

[0177] 1 方法

[0178] 用 HP-6890 气相色谱仪,在知情同意的情况下,测定 15 例志愿者粪便中的吲哚及粪臭素含量。即取新鲜粪便 0.5g 精确称重后,置 50mL 三角瓶中,加乙醇 20mL 超声提取 20 分钟,滤过,加入内标液 (0.1% p-Isopropylphenol) 3mL,定容至 25mL 量瓶中,测定时,取 4 μ l 溶液注入色谱柱 (HP-INNO WAX 玻璃毛细管柱,30m \times 0.53mm、填充 17% Silicone SE-30) 进行分析。测定条件是,柱温度:200 $^{\circ}$ C;进样口温度 230 $^{\circ}$ C,检测器温度 260 $^{\circ}$ C,载气流量 N_2 90mL/min; H_2 流量:58mL/min;空气流量:60mL/min。

[0179] 15 例志愿者,男 5,女 10,年龄 25-55 岁,随机分为凸腹真杆菌治疗组 (口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋,含凸腹真杆菌为 1.0×10^7 CFU/g)、两形真杆菌治疗组 (口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋,含两形真杆菌为 1.0×10^7 CFU/g)、二联活菌治疗组 (口服凸腹真杆菌两形真杆菌二联活菌散剂,500mg/袋,含总活菌数为 1.0×10^7 CFU/g),在相同正常饮食情况下,饭后分别服用各制剂,每次 3 袋,一天 3 次,连用 14 天。服药前后,采粪便测定吲哚和粪臭素的含量,进行统计分析。

[0180] 2 结果

[0181] 给药后人体粪便中的吲哚和粪臭素的含量,均明显下降 ($P < 0.05$),见表 13。

[0182] 表 13 凸腹真杆菌和两形真杆菌消除便臭的作用研究

[0183]

组别		吲哚 (μ g/g)	粪臭素 (μ g/g)
凸腹真杆菌治疗组	治疗前	372.8 \pm 112.7	326.1 \pm 110.3
	治疗后	254.7 \pm 132.5	197.3 \pm 99.6
两形真杆菌治疗组	治疗前	368.2 \pm 121.3	323.5 \pm 131.7
	治疗后	221.2 \pm 111.5	210.2 \pm 105.4
二联活菌治疗组	治疗前	360.9 \pm 110.2	310.7 \pm 97.3
	治疗后	256.5 \pm 134.8	205.6 \pm 118.2

[0184] 3 结论

[0185] 凸腹真杆菌和两形真杆菌能明显降低吲哚和粪臭素等肠道毒素含量,有效消除便臭及便臭中毒综合征,养颜美容,并能减轻肝脏负担,可作为肝胆疾病的辅助治疗药物。

[0186] 实施例 9、凸腹真杆菌和两形真杆菌提高免疫力研究

[0187] 1 材料与方法

[0188] BALB/C 小鼠,雄性,体重 (20 \pm 1)g,标准 2 级。凸腹真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL);两形真杆菌菌液 (10^7 CFU/mL);二联活菌菌液 (10^7 CFU/mL);左旋咪唑 (50mg/Kg)。由青岛东海药业有限公司提供。

[0189] 将小鼠随机分为凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组、左旋咪唑治疗组、模型对照组和正常对照组 (每组 10 只),单笼饲养。除正常对照组外,采用皮下

注射 25mg/Kg 氢化可的松造模。将小鼠分别用菌液灌胃, 0.5mL/次, 2次/天, 左旋咪唑治疗组, 50mg/Kg, 2次/天, 模型对照组和正常对照组给等体积生理盐水, 2次/天, 连续 21 天。末次给药后, 印度墨汁法检测鼠血的碳粒廓清指数 (K 值) 和吞噬指数 (α 值), 同时考察鼠胸腺指数 (g/10g. B. W) 的变化。

[0190] 2 结果

[0191] 凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组和左旋咪唑治疗组与模型对照组相比, 显著提高免疫力 ($P < 0.05$), 但凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 14。

[0192] 表 14 凸腹真杆菌和两形真杆菌对免疫功能的影响

[0193]

组别	K 值	α 值	胸腺指数
正常对照组	0.017±0.003	5.312±0.425	0.019±0.002
模型对照组	0.008±0.004	3.032±0.325	0.009±0.005
左旋咪唑治疗组	0.015±0.005	5.098±0.215	0.018±0.006
凸腹真杆菌治疗组	0.017±0.002	5.321±0.104	0.016±0.006
两形真杆菌治疗组	0.016±0.003	5.214±0.154	0.017±0.004
二联活菌治疗组	0.017±0.004	5.234±0.172	0.018±0.005

[0194] 3 结论

[0195] 本实验表明凸腹真杆菌和两形真杆菌能显著提高免疫力, 因此肿瘤患者可以应用凸腹真杆菌或两形真杆菌提高免疫力, 尤其放化疗免疫力降低时, 作为辅助治疗药物; 凸腹真杆菌和两形真杆菌, 能够修复肠粘膜, 快速恢复肠道菌群平衡, 并能提高免疫力抗病毒, 因此能有效治疗病毒性腹泻; 凸腹真杆菌和两形真杆菌通过提高免疫力, 对口腔溃疡、鹅口疮、手足口病和反复呼吸道感染也有显著的治疗作用, 并可作为肝胆疾病的辅助治疗药物。

[0196] 实施例 10、凸腹真杆菌和两形真杆菌对肠易激综合征治疗作用研究

[0197] 1 对象与方法

[0198] 1.1 观察对象 选择 2006 ~ 2008 年就诊的按 1999 年提出的罗马 II 诊断标准诊断明确的肠易激综合征 (IBS) 患者随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组。

[0199] 1.2 观察治疗前后症状的改善情况。

[0200] 1.3 安全性评价

[0201] 治疗中认真观察可能与治疗药有关的不良反应, 记录发生时间、症状及持续时间、处理结果。

[0202] 1.4 统计学分析

[0203] 采用 SAS 统计分析软件, 数据分别用百分率或均数 ± 标准差表示, 治疗前后的差异显著性测验, 用 χ^2 检验和精确概率法, 或 t 检验, 差异的显著性水平为 $P < 0.05$ 。

[0204] 2 结果

[0205] 各组均 30 例患者, 详细疗效观察结果如下:

[0206] 2.1 口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗肠易激综合征 30 例疗效观察结果

[0207] 2.1.1 临床资料 男性 16 例,女性 14 例,平均年龄 36.8 岁,平均病程 21.9 月。IBS 分型,腹泻为主型 13 例,便秘为主型 14 例,腹泻便秘交替型 3 例。

[0208] 2.1.2 给药方法 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g) 由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天,疗程 60 天。

[0209] 2.1.3 疗效观察结果

[0210] 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较 30 例 IBS 患者的腹泻和便秘等症状,治疗后均有显著的改善 ($P < 0.05$),见表 15。

[0211] 表 15 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较

[0212]

症状	治疗前 (例数)	治疗后 (例数)	*显著性检验 (P 值)
腹泻	13	0	$P < 0.05$
便秘	14	0	$P < 0.05$
腹泻+便秘	3	0	$P < 0.05$
腹痛	17	0	$P < 0.05$
腹胀	8	0	$P < 0.05$
腹部不适	9	1	$P < 0.05$

[0213] ※ 用卡方检验或精确概率法

[0214] 2.2 口服两形真杆菌活菌散剂治疗肠易激综合征 30 例疗效观察结果

[0215] 2.2.1 临床资料 男性 17 例,女性 13 例,平均年龄 40.2 岁,平均病程 19.5 月。IBS 分型,腹泻为主型 20 例,便秘为主型 6 例,腹泻便秘交替型 4 例。

[0216] 2.2.2 给药方法 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天,疗程 60 天。

[0217] 2.2.3 疗效观察结果

[0218] 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较,30 例 IBS 患者的腹泻和便秘等症状,治疗后均有显著的改善 ($P < 0.05$),见表 16。

[0219] 表 16 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较

[0220]

症状	治疗前 (例数)	治疗后 (例数)	*显著性检验 (P 值)
腹泻	20	0	$P < 0.05$
便秘	6	0	$P < 0.05$
腹泻+便秘	4	0	$P < 0.05$
腹痛	18	0	$P < 0.05$
腹胀	6	0	$P < 0.05$
腹部不适	7	3	$P < 0.05$

[0221] ※ 用卡方检验或精确概率法

[0222] 2.3 口服二联活菌散剂治疗肠易激综合征 30 例疗效观察结果

[0223] 2.3.1 临床资料 男性 18 例,女性 12 例,平均年龄 35.6 岁,平均病程 26.2 月。IBS 分型,腹泻为主型 16 例,便秘为主型 9 例,腹泻便秘交替型 5 例。

[0224] 2.3.2 给药方法 口服二联活菌散剂,500mg/袋,(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天,疗程 60 天。

[0225] 2.3.3 疗效观察结果

[0226] 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较,30 例 IBS 患者的腹泻和便秘等症状,治疗后均有显著的改善 ($P < 0.05$),见表 17。

[0227] 表 17 肠易激综合征患者治疗前后的症状改善比较

[0228]

症状	治疗前 (例数)	治疗后 (例数)	*显著性检验 (P 值)
腹泻	16	0	$P < 0.05$
便秘	9	0	$P < 0.05$
腹泻+便秘	5	0	$P < 0.05$
腹痛	8	0	$P < 0.05$
腹胀	11	2	$P < 0.05$
腹部不适	18	1	$P < 0.05$

[0229] ※ 用卡方检验或精确概率法

[0230] 3 结论

[0231] 肠易激综合征是一组包括腹痛、腹部不适、排便习惯改变和大便性状异常等表现的临床综合征,非器质性疾病。冷凉、喝酒性腹泻是指受凉、食用冷凉食物或喝酒后出现的腹泻、腹痛、腹部不适等症状或以上症状加重,在临床上诊断为腹泻型肠易激综合征,属于腹泻型肠易激综合征的一种。目前医学研究表明 IBS(包括冷凉泻和喝酒泻)是由于肠道免疫功能紊乱,炎症因子过度表达,使肠道耐受力下降,敏感性增强导致的。凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,调节免疫平衡,抑制炎症因子过度表达,增强肠道耐受力,降低敏感性,恢复肠道正常功能,有效治疗 IBS、冷凉泻和喝酒泻。

[0232] 实施例 11、凸腹真杆菌和两形真杆菌对口腔溃疡的治疗作用研究

[0233] 1 对象与方法

[0234] 1.1 病例资料经常复发的口腔溃疡患者 15 例,男 10 例,女 5 例,平均年龄 35 岁。溃疡复发史 2 ~ 13 年,每例患者平均每年复发 6 次以上。口腔溃疡发作时,随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组 5 例口腔溃疡患者,观察治疗口腔溃疡和预防口腔溃疡复发的疗效。

[0235] 1.2 给药方法

[0236] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0237] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g)

g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,2次/天。

[0238] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,2次/天。

[0239] 以上疗程均为2周。

[0240] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后溃疡面积、疼痛程度和服用2周口腔溃疡的复发时间。

[0241] 1.4 治疗口腔溃疡疗效评定标准(周平秀,孟祥勇.联合用药治疗复发性阿弗他溃疡的临床观察.华北煤炭医学院学报,2006,8:81-82)

[0242] 显效:3天内溃疡愈合或明显缩小,疼痛消失;

[0243] 有效:5天内溃疡愈合或明显缩小及疼痛消失;

[0244] 无效:溃疡愈合或明显缩小均在7天后。

[0245] 1.5 预防口腔复发评定标准

[0246] 显效:口腔溃疡发作,服用2周药物后,3个月内未复发。

[0247] 有效:口腔溃疡发作,服用2周药物后,2个月内未复发。

[0248] 无效:口腔溃疡发作,服用2周药物后,2个月内复发。

[0249] 2 结果

[0250] 2.1 治疗效果所有患者均在5天内溃疡愈合、疼痛消失,三组治疗口腔溃疡有效率均为100%。

[0251] 2.2 预防口腔溃疡复发效果所有患者服药2周后,随访3个月,口腔溃疡均未复发,三组预防口腔溃疡复发有效率均达到了100%。且未发现任何副作用。

[0252] 3 结论

[0253] 口腔溃疡是最常见的口腔粘膜疾病之一。有人偶尔发生,有人频繁发作,还有人从口腔溃疡开始,最终发展到白塞氏病综合症并导致了口腔肿瘤,专家们在临床中发现复发性口腔溃疡的患者患口腔鳞癌发病率有逐年增高的趋势。对口腔溃疡的治疗方法虽然很多,但基本上都是对症治疗,目的主要是减轻疼痛,很难完全控制复发,传统医学认为要想完全避免其复发,可能性不大,而本发明的药物用途通过恢复肠道菌群平衡,增强粘膜免疫功能,使治疗和控制口腔溃疡复发成为现实。并通过口服治疗口腔溃疡,解决了大部分治疗口腔溃疡的药物是局部用药,用药不方便的难题,且没有任何副作用。

[0254] 实施例12、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗克罗恩病疗效观察

[0255] 1 对象与方法

[0256] 1.1 病例资料经临床、结肠镜、组织学或X线钡餐等检查诊断为克罗恩病患者,共15例,男9例,女6例,平均年龄35岁,均具有腹痛、腹泻等症状。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组5例患者。

[0257] 1.2 给药方法

[0258] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0259] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0260] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0261] 以上疗程均为6~8周。

[0262] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后腹痛、腹泻等临床症状和炎症的改善情况。

[0263] 1.4 治疗克罗恩病疗效评定标准(参照2000年中华医学会消化病学分会修订的对炎症性肠病诊断与治疗规范的建议)

[0264] 临床缓解:经治疗后临床症状消失,X线或结肠镜检查发现炎症趋于稳定;

[0265] 有效:经治疗后临床症状减轻,X线或结肠镜检查发现炎症减轻;

[0266] 无效:经治疗后临床症状、X线、内镜及病理检查结果无改善。

[0267] 2 结果

[0268] 治疗后,15例患者临床症状和炎症均有不同程度的改善。凸腹真杆菌组有4例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了临床缓解;1例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率100%。两形真杆菌组有3例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了临床缓解;2例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率100%。二联活菌组有3例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了临床缓解;2例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率100%。三组间疗效比较无显著性差异($P > 0.05$)

[0269] 3 结论

[0270] 克罗恩病是炎症性肠病的一种,属于过度免疫反应引起的自身免疫性疾病,炎症因子过度表达,凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌免疫调节剂丁酸,调节免疫恢复正常,抑制炎症因子过度表达,并能修复肠粘膜,对克罗恩病具有显著的治疗作用,且没有任何毒副作用。

[0271] 实施例13、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗溃疡性结肠炎疗效观察

[0272] 1 对象与方法

[0273] 1.1 病例资料经临床、结肠镜、组织学或X线钡餐等检查诊断为溃疡性结肠炎患者,共30例,男18例,女12例,27~65岁,平均年龄46.4岁。病程最短的6个月,最长15年,平均4年。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组10例患者。

[0274] 1.2 给药方法

[0275] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0276] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0277] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3~4次/天。

[0278] 以上疗程均为8周。

[0279] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后腹痛、腹泻、粘液便、血便等临床症状和肠粘膜的改善情况。

[0280] 1.4 治疗溃疡性结肠炎疗效评定标准(参照2000年中华医学会消化病学分会修订

的对炎症性肠病诊断与治疗规范的建议)

[0281] 完全缓解:经治疗后临床症状消失,结肠镜检查发现粘膜大致正常;

[0282] 有效:经治疗后临床症状基本消失,结肠镜检查发现粘膜轻度炎症或假息肉形成;

[0283] 无效:经治疗后临床症状、内镜及病理检查结果无改善。

[0284] 2 结果

[0285] 治疗后,30 例患者临床症状和炎症均有不同程度的改善。凸腹真杆菌组有 6 例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了完全缓解;4 例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率 100%。两形真杆菌组有 5 例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了完全缓解;5 例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率 100%。二联活菌组有 7 例腹痛、腹泻等临床症状消失,达到了完全缓解;3 例腹痛、腹泻、炎症减轻,治疗有效,总有效率 100%。三组间疗效比较无显著性差异 ($P > 0.05$)

2.3 不良反应治疗过程中未发现任何不良反应。

[0286] 3 结论

[0287] 溃疡性结肠炎是炎症性肠病的一种,病变主要局限于肠粘膜,属于过度免疫反应引起的自身免疫性疾病,炎症因子过度表达,使肠粘膜出现溃疡,凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌免疫调节剂丁酸,调节免疫恢复正常,抑制炎症因子过度表达,并能修复肠粘膜,对溃疡性结肠炎具有显著的治疗作用,且没有任何毒副作用。

[0288] 实施例 14、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗类风湿性关节炎疗效观察

[0289] 1 对象与方法

[0290] 1.1 病例资料

[0291] 经临床明确诊断为类风湿性关节炎的患者,共 15 例,平均年龄 36 岁,病史在 2 年~10 年。临床症状为:关节肿胀、疼痛、晨僵或有关节摩擦音。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组 5 例患者。

[0292] 1.2 给药方法

[0293] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0294] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0295] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0296] 以上疗程均为 12~24 周。

[0297] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后关节肿胀、疼痛、晨僵或关节摩擦音的改善情况。

[0298] 1.4 疗效评定标准(按国家中医药管理局 1994 年发布的《中医病证诊断标准》)。

[0299] 痊愈:关节疼痛肿胀消失、晨僵消除;

[0300] 好转:关节疼痛肿胀消失,偶有痛感,晨起稍有僵硬;

[0301] 无效:关节疼痛肿胀、晨僵同治疗前。

[0302] 2 结果

[0303] 用口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗 5 例中,痊愈 2 例,好转 3 例,无效 0 例,总有效率 100%,且未见任何不良反应。

[0304] 用口服两形真杆菌活菌散剂治疗 5 例中,痊愈 1 例,好转 4 例,无效 0 例,总有效率 100%,且未见任何不良反应。

[0305] 用二联活菌散剂治疗 5 例中,痊愈 4 例,好转 1 例,无效 0 例,总有效率 100%,且未见任何不良反应。

[0306] 3 结论

[0307] 类风湿性关节炎属于自身免疫性疾病,目前治疗类风湿性关节炎的药物很多,但均存在各种副作用制约临床的应用,有的副作用甚至可以导致死亡,尤其类风湿性关节炎患者需要长时间服药,病人很难耐受副作用。凸腹真杆菌和两形真杆菌通过调节免疫和炎症因子表达、预防感染等多个方面发挥作用,疗效显著,且没有任何毒副作用,病人可以长时间服用,并且凸腹真杆菌和两形真杆菌除可以制成药品外,还可以制成保健品或饮品应用治疗类风湿性关节炎。实施例 15、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗强直性脊柱炎疗效观察

[0308] 1 对象与方法

[0309] 1.1 病例资料

[0310] 经临床明确诊断为强直性脊柱炎的患者,共 15 例,平均年龄 37 岁,病史在 1 年~13 年。临床症状为:腰脊疼痛,遇寒加重,脊柱僵硬,俯仰不利,或有双髋部痛,双腿活动受限,畏寒肢冷,乏力多汗。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组 5 例患者。

[0311] 1.2 给药方法

[0312] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0313] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0314] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,2 次/天。

[0315] 以上疗程均为 12~24 周。

[0316] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后腰脊疼痛、双髋部痛等临床症状的改善情况。

[0317] 1.4 疗效评定标准根据全国中西医结合研究会风湿类疾病专业委员会 1987 年 8 月讨论修订的疗效标准制定。

[0318] 显著好转:经治疗后受累部位疼痛消失,活动功能改善或恢复正常,血沉恢复正常,X 线示骨质病变有改善或无发展,恢复日常劳动;

[0319] 好转:受累部位疼痛减轻,活动范围增大,血沉降低;

[0320] 无效:经治疗 3 个疗程(90 天)以上,受累部位症状无改善。

[0321] 2 结果

[0322] 用口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗 5 例中,显著好转 3 例,好转 2 例,无效 0 例,总有效率 100%,且未见任何不良反应。

[0323] 用口服两形真杆菌活菌散剂治疗 5 例中,显著好转 3 例,好转 2 例,无效 0 例,总有效

效率 100%，且未见任何不良反应。

[0324] 用口服二联活菌散剂治疗 5 例中，显著好转 1 例，好转 4 例，无效 0 例，总有效率 100%，且未见任何不良反应。

[0325] 3 结论

[0326] 强直性脊柱炎病程长、病情重，需要长时间吃药，尚无根治的办法，目前治疗主要缓解症状，保持良好姿势和减缓病情进展。目前治疗药物虽很多，但均存在各种副作用制约临床的应用，有的副作用甚至可以导致死亡，因此目前疗效好和没有副作用的药物是临床最需要的。目前认为强直性脊柱炎是遗传因素和肠道因素相互作用所致，是肠道感染和肠粘膜通透性增加等因素在遗传因素的基础上引起免疫异常诱发强直性脊柱炎发病和使病情进展。凸腹真杆菌和两形真杆菌一方面，调节免疫恢复正常和下调炎症因子表达，缓解症状；另一方面，分泌丁酸修复肠粘膜，改变肠粘膜通透性，恢复肠道健康，消除强直性脊柱炎发病和病情进展的诱发因素。疗效显著，且没有任何毒副作用，病人可以长时间服用，并且凸腹真杆菌和两形真杆菌除可以制成药品外，还可以制成保健品或饮品应用治疗强直性脊柱炎。

[0327] 实施例 16、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗与预防手足口病疗效观察

[0328] 1 对象与方法

[0329] 1.1 病例资料按手足口病诊断标准明确诊断为手足口病的 30 例患者，男 25 例，女 15 例，平均年龄 1.6 周岁，最大 3 周岁。病例均发热， $37.5 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 。手足口均有米粒至绿豆大小的圆形、椭圆形的疱疹。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组，每组 10 例患者，观察凸腹真杆菌和两形真杆菌对手足口病的治疗效果。

[0330] 1.2 给药方法

[0331] 口服凸腹真杆菌活菌散剂，500mg/袋（含凸腹真杆菌活菌数不低于 $1.0 \times 10^7\text{CFU/g}$ ），由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次，3 次/天。

[0332] 口服两形真杆菌活菌散剂，500mg/袋（含两形真杆菌活菌数不低于 $1.0 \times 10^7\text{CFU/g}$ ），由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次，3 次/天。

[0333] 口服二联活菌散剂，500mg/袋（含总活菌数不低于 $1.0 \times 10^7\text{CFU/g}$ ），由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次，3 次/天。

[0334] 以上疗程均为 7 天。

[0335] 1.3 观察方法设自身对照，观察治疗前后体温、皮疹和饮食情况。

[0336] 1.4 治疗手足口病疗效评定标准（刘素琴．更昔洛韦治疗婴幼儿手足口病的疗效．实用儿科临床杂志，2006，21（24）：1731-1732）

[0337] 显效：体温正常，皮疹基本消退，饮食正常；

[0338] 好转：体温下降，皮疹部分消失，能少量进食；

[0339] 无效：体温、皮疹或饮食无改善。

[0340] 显效及好转为有效，同时观察不良反应。

[0341] 2 结果

[0342] 2.1 治疗效果

[0343] 凸腹真杆菌组，显效 6 例，好转 4 例，总有效率 100%。

[0344] 两形真杆菌组,显效 5 例,好转 5 例,总有效率 100%。

[0345] 二联活菌组,显效 7 例,好转 3 例,总有效率 100%。

[0346] 各组间总有效率无统计学差异 ($P > 0.05$)

[0347] 2.2 不良反应临床观察未见任何不良反应。

[0348] 3 结论

[0349] 由于手足口病多发生于婴幼儿,这与婴幼儿肠粘膜未发育成熟,通透性高,肠道菌群屏障也不完善和免疫力低等有关,凸腹真杆菌和两形真杆菌进入肠道能分泌大量丁酸,修复肠粘膜,促进肠粘膜发育成熟,同时建立完善的肠道菌群屏障和提高机体、粘膜免疫,在治疗和预防感染手足口病方面疗效显著,本次选择病例都是婴幼儿,但可以预见到治疗 3 周岁以上的儿童或成人手足口病同样有效,所需要的剂量是临床医生根据病情和年龄能很容易掌握的。同时,根据凸腹真杆菌和两形真杆菌的临床疗效和作用机理,可以很容易预见到手足口病暴发流行时,口服凸腹真杆菌和两形真杆菌制剂可以预防感染手足口病,降低手足口病的发病率。

[0350] 实施例 17、凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗伪膜性肠炎疗效观察

[0351] 1 对象与方法

[0352] 1.1 病例资料按伪膜性肠炎诊断标准明确诊断为伪膜性肠炎的 15 例患者,男 10 例,女 5 例,平均年龄 38 周岁。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组,每组 5 例患者,观察凸腹真杆菌和两形真杆菌对伪膜性肠炎的治疗效果。

[0353] 1.2 给药方法

[0354] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0355] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0356] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0357] 以上疗程 15 天。

[0358] 1.3 观察方法设自身对照,观察治疗前后腹泻、肠粘膜修复、病菌消失情况。

[0359] 2 结果

[0360] 2.1 经 15 天治疗后,15 例患者全部治愈,症状消失,便检艰难梭菌转阴,肠镜检查粘膜病灶消失。

[0361] 2.2 不良反应临床观察未见任何不良反应。

[0362] 3 结论

[0363] 伪膜性肠炎是由于大量使用抗菌药后,引起肠道菌群失调,合并艰难梭菌感染后导致肠粘膜损伤,引起伪膜。本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌,由于能够分泌大量丁酸,修复受损肠粘膜,及抑制有害菌,促进有益菌生长,快速恢复肠道菌群平衡,并能提高免疫力,因此对伪膜性肠炎具有显著的治疗作用。

[0364] 实施例 18、凸腹真杆菌和两形真杆菌对鹅口疮治疗作用疗效观察

[0365] 1 对象与方法

[0366] 1.1 病例资料按鹅口疮诊断标准明确诊断为鹅口疮的 40 例患者,男 30 例,女 10 例,平均年龄 1.5 周岁。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组和对照组,每组 10 例患者,观察凸腹真杆菌和两形真杆菌对鹅口疮的治疗效果。

[0367] 1.2 给药方法

[0368] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0369] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0370] 口服二联活菌散剂,500mg/袋(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0371] 对照组予局部涂抹 10 ~ 20 万 U/mL 制霉菌素鱼肝油混悬液,2 次/天。

[0372] 以上疗程均为 15 天。

[0373] 1.3 疗效判定:症状消失,口腔白膜消失,粘膜恢复正常。

[0374] 2 结果 各个治疗组与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 18。

[0375] 表 18 鹅口疮疗效比较

[0376]

组别	治愈 (%)	治愈时间 (天)
对照组	6 (60%)	8.60 ± 1.12
凸腹真杆菌治疗组	7 (70%)	8.53 ± 0.87
两形真杆菌治疗组	6 (90%)	8.97 ± 1.23
二联活菌治疗组	7 (70%)	8.48 ± 1.02

[0377] 3 结论

[0378] 鹅口疮是由白色念珠菌所致的口腔粘膜炎症。白色念珠菌可在健康人消化道寄生,当腹泻、使用广谱抗生素或激素、营养不良和机体免疫力下降时可使正常菌群失调而发病,本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够提高免疫力、恢复菌群平衡、促进营养物质吸收和抗炎,对鹅口疮具有显著的治疗作用。

[0379] 实施例 19、凸腹真杆菌和两形真杆菌对湿疹的治疗作用疗效观察

[0380] 1 对象与方法

[0381] 1.1 病例资料 按湿疹诊断标准明确诊断为湿疹的 40 例患者,男 25 例,女 15 例,平均年龄 1.5 周岁。随机分入口服凸腹真杆菌活菌散剂治疗组、口服两形真杆菌活菌散剂治疗组、口服二联活菌散剂治疗组和对照组,每组 10 例患者,观察凸腹真杆菌和两形真杆菌对湿疹的治疗效果。

[0382] 1.2 给药方法

[0383] 对照组用尿素软膏涂患处,每日 3 次,10 天为一疗程。治疗组在对照组的基础上,加用:

[0384] 口服凸腹真杆菌活菌散剂,500mg/袋,(含凸腹真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3 袋/次,3 次/天。

[0385] 口服两形真杆菌活菌散剂,500mg/袋,(含两形真杆菌活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3次/天。

[0386] 口服二联活菌散剂,500mg/袋,(含总活菌数不低于 1.0×10^7 CFU/g),由青岛东海药业有限公司提供。3袋/次,3次/天。

[0387] 以上疗程均为10天。

[0388] 1.3 疗效判定:显效:用药10天内皮疹治愈;有效:用药10天内皮疹大部分消退;无效:用药10天皮疹未消退或增多。

[0389] 2 结果

[0390] 治疗组与对照组比较,经统计学处理, $P < 0.05$,有显著性差异,说明本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗湿疹有效,见表19。

[0391] 表19 凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗湿疹疗效比较

[0392]

组别	显效(例)	有效(例)	无效(例)	总有效率
对照组	4	3	3	60%
凸腹真杆菌治疗组	7	2	1	90%
两形真杆菌治疗组	6	4	0	100%
二联活菌治疗组	8	1	1	90%

[0393] 3 结论

[0394] 湿疹属于变态反应性疾病,是肠道菌群失调引起的免疫紊乱,导致的皮肤损伤。本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌由于能够分泌丁酸,调节免疫平衡,并能恢复肠道菌群平衡,对变态反应性疾病具有很好的治疗作用,尤其对变态反应性皮肤病,包括湿疹疗效显著。

[0395] 实施例20、凸腹真杆菌和两形真杆菌对动脉粥样硬化(AS)大鼠细胞因子和血脂的调节作用研究

[0396] 1 材料与方法

[0397] 1.1 实验动物、药品和试剂雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,180-220g。凸腹真杆菌菌液(10^7 CFU/mL);两形真杆菌菌液(10^7 CFU/mL);二联活菌菌液(10^7 CFU/mL);双歧杆菌菌液(10^7 CFU/mL),由青岛东海药业有限公司生产。大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10ELISA 试剂盒。

[0398] 1.2 大鼠 AS 模型的建立 大鼠在腹腔注射维生素 D₃(60 万单位 /Kg) 后,给予高脂饲料(3%胆固醇,0.5%胆酸钠,0.2%丙基硫氧嘧啶,5%的白糖,10%猪油,81.3%基本饲料)喂养8周,可形成典型的 AS 病变。

[0399] 1.3 分组及给药方法 将大鼠随机分成6组,即正常对照组、模型对照组、双歧杆菌治疗组、凸腹真杆菌治疗组、两形真杆菌治疗组、二联活菌治疗组,每组6只。除正常对照组喂饲基础饲料外,其余各组均在腹腔注射维生素 D₃后给予高脂饲料,同时药物治疗组给予菌液灌胃,每次1mL/100g(体重),1次/天。正常对照组和模型对照组给予同体积的水。8周后,腹腔注射水合氯醛麻醉,取主动脉血进行指标测定。

[0400] 1.4 指标测定

[0401] 1.4.1 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 测定按 4mL/g 组织的比例加入生理盐水,用玻璃匀浆器匀浆,匀浆液 3000r/min 离心 10min 后吸取上清,采用 ELISA 法测定,按试剂盒说明进行。

[0402] 1.4.2 按常规方法测定血清血脂参数,包括:总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。

[0403] 2 结果

[0404] 2.1 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 与正常对照组比较,模型对照组动脉中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平均显著升高($P < 0.01$);本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌可显著降低动脉中 TNF- α 、IL-1 β 水平,显著增加 IL-10 水平($P < 0.01$),且效果好于双歧杆菌($P < 0.05$) 见表 20。

[0405] 表 20 凸腹真杆菌和两形真杆菌对 AS 大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 的影响($\bar{x} \pm s$)

[0406]

组别	TNF- α (ng/g)	IL-1 β (ng/g)	IL-10 (ng/g)
正常对照组	4.80 \pm 0.21	0.59 \pm 0.18	0.27 \pm 0.05
模型对照组	10.58 \pm 0.15	1.49 \pm 0.25	0.36 \pm 0.07
双歧杆菌治疗组	7.28 \pm 0.30	1.05 \pm 0.23	0.39 \pm 0.03
凸腹真杆菌治疗组	5.68 \pm 0.32	0.86 \pm 0.12	0.48 \pm 0.05
两形真杆菌治疗组	5.27 \pm 0.41	0.71 \pm 0.15	0.51 \pm 0.06
二联活菌治疗组	5.35 \pm 0.27	0.75 \pm 0.21	0.52 \pm 0.05

[0407] 2.2 血清血脂参数 模型对照组 TC、TG 显著高于正常对照组($P < 0.05$),模型对照组 HDL-C 显著低于正常对照组($P < 0.05$);本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌治疗后与模型对照组相比 TC、TG 显著降低($P < 0.05$),HDL-C 显著升高($P < 0.05$),且效果好于双歧杆菌($P < 0.05$),见表 21。

[0408] 表 21 凸腹真杆菌和两形真杆菌对 AS 大鼠 TC、TG、HDL-C 的影响($\bar{x} \pm s$)

[0409]

组别	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
正常对照组	85.79 \pm 11.12	30.55 \pm 9.57	26.78 \pm 8.32
模型对照组	358.85 \pm 56.27	159.62 \pm 53.42	9.67 \pm 1.25
双歧杆菌治疗组	256.25 \pm 35.68	125.42 \pm 35.41	13.89 \pm 0.98
凸腹真杆菌治疗组	145.65 \pm 31.12	92.71 \pm 28.12	18.31 \pm 1.25
两形真杆菌治疗组	158.65 \pm 28.35	89.56 \pm 25.27	19.22 \pm 1.23
二联活菌治疗组	152.53 \pm 22.31	90.31 \pm 22.56	19.76 \pm 1.85

[0410] 3 结论

[0411] 动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病发病的主要病理基础,而高血脂症又是动脉粥样硬化的主要诱因。AS 与其他的炎症性疾病如类风湿关节炎、牛皮癣、哮喘和炎症性肠疾

病相似,伴有炎症免疫反应异常,TNF- α 、IL-8、IL-1 β 等炎症性细胞因子过度表达,加速了AS的发生和发展,进而加速了心脑血管疾病的发生和发展。

[0412] 研究表明高脂血症、高血压、脑血栓、脑栓塞、脑缺血、心肌梗塞、冠心病、脑梗死、脑出血、心绞痛、心肌炎等心脑血管疾病患者 TNF- α 、IL-1 β 等炎症性细胞因子水平均显著升高。TNF- α 作为一个细胞凋亡的胞内信号能诱导血管内皮细胞凋亡、促进血浆内皮素(ET-1)的产生而加重血管壁的损伤,并且有促进白介素6(IL-6)分泌的作用,还可控制脂溶酶活性,抑制脂蛋白酶(LPL)活性,抑制斑块局部LPL的产生,从而不利于脂质溶解,而易于沉积在血管壁,促进动脉硬化形成,导致各种心脑血管疾病的发生。TNF- α 能诱发心肌炎,减低心功能和通过坏死或凋亡引起心肌细胞坏死,引起心绞痛和心律失常等。心脑血管疾病患者IL-1 β 的阳性检测率随着TNF- α 检测率的升高也相应升高,TNF- α 、IL-1 β 两种细胞因子通过相互诱导、相互作用,共同参与了高脂血症、高血压、脑血栓、脑栓塞、脑缺血、心肌梗塞、冠心病、脑梗死、脑出血、心绞痛、心肌炎等心脑血管疾病的病理生理过程,从而引发心脑血管疾病的发生和发展。

[0413] IL-10是一种具有强免疫调节作用的抗炎细胞因子,在心脑血管疾病中发挥保护作用。本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌通过分泌丁酸,能使异常的细胞因子表达恢复正常或得到改善,对阻止炎症性细胞因子对心脑血管及细胞的损害起到了很好的作用,能有效预防、治疗心脑血管疾病。

[0414] 血脂主要是指血清中的胆固醇和甘油三酯。无论是胆固醇含量增高,还是甘油三酯的含量增高,或是两者皆增高,统称为高脂血症。高脂血症是发生动脉粥样硬化、心脑血管疾病及微循环障碍的重要因素。临床资料表明,心脑血管疾病的发生率随血清胆固醇和甘油三酯的浓度升高而增加。降血脂可以明显减少冠心病危险是无可置疑的事实,血清胆固醇降低1%,冠心病危险性降低2%。因此,高脂血症的及早发现和积极治疗对心脑血管病的防治有着极为重要的意义。高密度脂蛋白(HDL)的功能之一是运输内源性胆固醇至肝脏处理,故有抗动脉粥样硬化作用。在检查中,通过检查HDL-C的含量间接反映HDL的水平。动脉粥样硬化时HDL-C降低,表明HDL降低。本发明所述凸腹真杆菌和两形真杆菌通过降低TC、TG和升高HDL达到降低血脂的作用,并能降低TNF- α 、IL-1 β 等炎症性细胞因子过度表达,从而有效预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病及微循环障碍。

[0415] 本发明在实施过程中所使用的微生物菌种已分别于2008年04月25日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所邮编100101)保藏,共两个下述微生物菌种,但本发明所述的凸腹真杆菌和两形真杆菌并不局限于这两种微生物菌株。

[0416] (1) 分类命名:凸腹真杆菌 *Eubacterium ventriosum*, 保存编号 2465。

[0417] (2) 分类命名:两形真杆菌 *Eubacterium bifforme*, 保存编号 2466。

[0418] 上述两个微生物菌种经该微生物中心检测,检测结果均为存活。