



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111658676 B

(45) 授权公告日 2021.12.31

(21) 申请号 202010531440.5

A61P 29/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.11

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104622886 A, 2015.05.20

申请公布号 CN 111658676 A

审查员 白婧

(43) 申请公布日 2020.09.15

(73) 专利权人 湖州金诺康健康科技有限公司  
地址 313008 浙江省湖州市吴兴区织里镇  
大港路1088号12A

(72) 发明人 蒋增良 候国新 潘元根

(74) 专利代理机构 杭州知闲专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 33315

代理人 万静

(51) Int. Cl.

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/16 (2006.01)

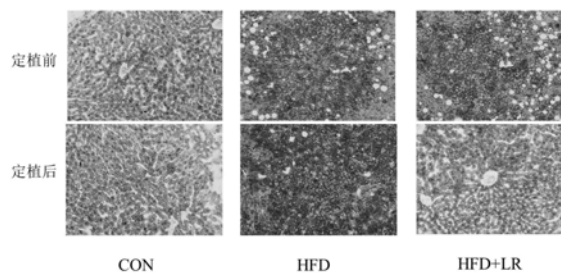
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

罗伊氏乳杆菌活菌在制备治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状的药物中的应用

(57) 摘要

本发明通过动物实验公开了罗伊氏乳杆菌活菌在制备治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状的药物、改善肝功能损伤的药物以及抗体内炎症的药物中的新用途,为罗伊氏乳杆菌的应用提供了新的方向。



1. 罗伊氏乳杆菌活菌 (*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938在制备治疗非酒精性脂肪肝症状的药物中的应用;其特征在於,所述药物通过抑制肝脏中脂肪的合成、增加外周组织对脂肪的利用和促进肝脏中脂肪的 $\beta$ 氧化来治疗或减轻脂肪肝症状。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物通过减少肝脏中脂肪含量治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在於,所述脂肪含量为总脂肪的含量,和/或甘油三酯的含量。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物通过至少以下方式中的一种来治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状;

(1) 降低肝脏中促进脂肪合成的关键基因PPAR $\gamma$ 、SREBP-1c和FAS的转录表达量;

(2) 升高肝脏中促进脂肪利用的关键基因LPL与促进脂肪 $\beta$ 氧化的关键基因PPAR $\alpha$ 的转录表达量。

5. 罗伊氏乳杆菌活菌 (*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938在制备非酒精性脂肪肝症状下抗体内炎症的药物中的应用。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在於,所述药物通过至少以下方式中的一种来抗体内炎症;

(a) 降低血清中促炎因子IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 的表达水平;

(b) 升高血清中抗炎因子IL-10的表达水平。

## 罗伊氏乳杆菌活菌在制备治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状的药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,尤其涉及罗伊氏乳杆菌活菌在制备治疗或减轻非酒精性脂肪肝症状的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞脂肪性病变为主要特征的病理综合征,包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎 (NASH) 和肝硬化。非酒精性脂肪肝是高血脂、二型糖尿病、动脉粥样硬化、心衰、心梗、中风的高风险因子。

[0003] 近年来,脂肪肝已经成为全球重要的公共健康问题。而在我国,非酒精性脂肪肝 (NASH) 已经超越慢性病毒性肝炎成为第一大肝脏疾病。在西方国家,大约20%-30%的成年人患有非酒精性脂肪肝。

[0004] 目前,我国上海、广州等发达地区成年人非酒精性脂肪肝约15%;然而,目前除了增加运动和低脂饮食,有效的预防和治疗药物仍很少。因此,有必要对治疗和减轻非酒精性脂肪肝的药物进行开发研究。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供罗伊氏乳杆菌活菌的新用途,具体为在制备治疗或减轻脂肪肝症状的药物,改善肝功能损伤的药物,以及抗体内炎症的药物的新用途。

[0006] 具体技术方案如下:

[0007] 本发明提供了罗伊氏乳杆菌活菌在制备治疗或减轻脂肪肝症状的药物中的应用。

[0008] 本发明通过器官组织切片观察发现灌胃罗伊氏乳杆菌菌液的试验组能够显著性改善脂肪肝症状。进一步地,所述药物通过减少肝脏中脂肪含量治疗或减轻脂肪肝症状。其中,所述脂肪含量为总脂肪的含量,和/或甘油三酯的含量。

[0009] 进一步地,所述药物通过抑制肝脏中脂肪的合成、增加外周组织对脂肪的利用和促进肝脏中脂肪的 $\beta$ 氧化来治疗或减轻脂肪肝症状。

[0010] 进一步地,所述药物通过至少以下方式中的一种来治疗或减轻脂肪肝症状;

[0011] (1)降低肝脏中促进脂肪合成的关键基因PPAR  $\gamma$ 、SRERP-1c和FAS的转录表达量;

[0012] (2)升高肝脏中促进脂肪利用的关键基因LPL与促进脂肪 $\beta$ 氧化的关键基因PPAR $\alpha$ 的转录表达量。

[0013] 本发明还提供了罗伊氏乳杆菌活菌在制备改善肝功能损伤的药物中的应用。

[0014] 进一步地,所述药物通过降低血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶表达水平的方式改善肝功能损伤。

[0015] 本发明通过测定肝功能指标谷丙转氨酶ALT和谷草转氨酶AST的含量发现罗伊氏乳杆菌活菌能够改善肝功能损伤。

- [0016] 本发明还提供了罗伊氏乳杆菌活菌在制备抗体内炎症的药物中的应用。
- [0017] 进一步地,所述药物通过至少以下方式中的一种来抗体内炎症;
- [0018] (a)降低血清中促炎因子IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ 的表达水平;
- [0019] (b)升高血清中抗炎因子IL-10的表达水平。
- [0020] 本发明所述的药物包括罗伊氏乳杆菌活菌和可药用载体,可以活菌片剂、活菌粉剂、活菌胶囊等形式存在。
- [0021] 进一步地,所述罗伊氏乳杆菌的菌株名称为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)DSM 17938。
- [0022] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:
- [0023] 本发明提供了罗伊氏乳杆菌活菌的新用途在制备治疗或减轻脂肪肝症状的药物,改善肝功能损伤的药物,以及抗体内炎症的药物的新用途,为罗伊氏乳杆菌的应用提供了新的方向。

### 附图说明

- [0024] 图1为不同试验组对脂肪肝病理的影响。
- [0025] 图2为不同试验组对脂肪肝总脂含量和总甘油三酯含量的影响。
- [0026] 图3为不同试验组对肝功能的影响。
- [0027] 图4为不同试验组对血清免疫因子IL-1 $\beta$ ,IL-10,IL-6,TNF- $\alpha$ 的影响。
- [0028] 图5为不同试验组对肝脏脂代谢关键基因PPAR $\gamma$ 、SRERP-1c、FAS、LPL和PPAR $\alpha$ 的影响。

### 具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述,以下列举的仅是本发明的具体实施例,但本发明的保护范围不仅限于此。

#### [0030] 实施例1

##### [0031] 一、实验设计

##### [0032] (1) 高脂膳食诱导小鼠肥胖模型建立

[0033] 选取36只4周龄、体重相近的健康雄性C57BL/6小鼠为实验对象,随机分为3组:①组饲喂基础饲料,作为建模的阴性对照组,②和③组饲喂高脂饲料,进行8周高脂膳食非酒精性脂肪肝模型的构建。模型构建后,每组取1笼进行模型评价。

##### [0034] (2) 罗伊氏乳杆菌定植试验

[0035] 罗伊氏乳杆菌LR分离自健康人粪便,菌株名称为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)DSM 17938,是广泛使用的商业化益生菌,已于2014年被列入我国的《可用于婴幼儿食品的菌种名单》,为公众可获取的遗传资源。

[0036] 试验设置4组分别为:

[0037] ①正常组(阴性对照,CON,n=8/组):基础饲料+1周200 $\mu$ L生理盐水灌胃+11周自由饮水;

[0038] ②肥胖模型组(简称HFD,n=8/组):高脂饲料+1周200 $\mu$ L生理盐水灌胃+11周自由饮水;

[0039] ③肥胖模型+罗伊氏乳杆菌组(简称HFD+LR, n=8/组):高脂饲料+1周200 $\mu$ L LR菌液灌胃+11周自由饮LR水。

[0040] 每组12只,进行12周的菌群定植试验。定植时间为前7天,每天灌胃一次,灌胃体积100 $\mu$ L,灌胃菌量为 $10^8$ CFU/天,之后,采用饮水补充,饮水菌浓度为 $10^8$ CFU/mL。试验过程中每周准确测定小鼠生长指标(体重、采食量);每周收集新鲜粪便和血液样本。试验结束后,经CO<sub>2</sub>安乐死,收集粪便、血样和组织器官待测。

[0041] 二、指标测定方法

[0042] (1)体脂和肌肉比例的测定

[0043] 体脂比采用核磁共振法(核磁身体组成分析仪MesoQMR06-100H,苏州纽迈)测定。

[0044] (2)器官组织切片观察

[0045] 肝组织切片油红O染色观察:取4%多聚甲醛溶液中固定的肝脏组织,石蜡包埋切片,进行油红O染色,显微镜下观察肝脏内的脂滴大小变化,使用Imag-Pro Plus软件进行分析(图1)。

[0046] (3)血清、肝脏脂代谢相关指标分析

[0047] 采用统一的方法和标准对收集到的样本进行生化参数检测,试剂盒测定血清的总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)和肝脏总甘油三酯(TG)的含量;采用氯仿抽提法测定肝脏组织总脂质含量;采用试剂盒测定肝功能指标谷丙转氨酶ALT和谷草转氨酶AST的含量;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清炎症因子IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 水平(图2~4)。

[0048] (4)肝脏脂代谢关键基因分析

[0049] qPCR技术:液氮碾磨肝脏组织,提取组织中总RNA,采用反转录试剂盒将RNA转化为cDNA,再采用相应的脂代谢关键基因的引物序列,使用qPCR荧光染色试剂盒,测定脂代谢过程的关键基因(PPAR  $\gamma$  /SRERP-1c/FAS/LPL/PPAR $\alpha$ )的转录表达情况。

[0050] 三、实验结果

[0051] 结果如图1~5所示。

[0052] 由图1油红O染色结果可知,定植前,由于8周高脂饲料建模,HFD和HFD+LR组均颜色较深(原图中为红色,灰度图中体现为深灰色),即表现为严重的脂肪肝现象;而罗伊氏乳杆菌LR定植12周后,HFD组的颜色仍然较深,HFD+LR组的颜色变浅,也就是说,即使继续饲喂高脂饲料,LR也能显著性改善脂肪肝现象。

[0053] 由图2可知,定植前,由于8周高脂饲料饲喂,HFD和HFD+LR组肝脏中均显著积累脂肪和甘油三酯,而罗伊氏乳杆菌LR定植12周后,即使继续饲喂高脂饲料,LR也能显著减少肝脏中总脂肪含量和甘油三酯含量。

[0054] 由图3可知,定植前,8周高脂饲料饲喂显著升高HFD和HFD+LR组血清的谷丙转氨酶ALT和谷草转氨酶AST水平,表明在高脂饲料的作用下导致脂肪肝而肝功能损伤很大,而罗伊氏乳杆菌LR定植12周后,即使继续饲喂高脂饲料,LR也能显著降低血清ALT和AST水平,表明LR具有很好的治疗脂肪肝和护肝的作用。

[0055] 由图4可知,与HFD组相比,HFD+LR组显著降低血清中促炎因子IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 水平,显著升高血清中抗炎因子IL-10,表明了罗伊氏乳杆菌LR能显著改善体内炎症水平,增强抵抗力。

[0056] LPL负责把肝脏和血液中的甘油三酯从VLDL中分解下来,促进甘油三酯被其他细胞或运到外周组织利用的功能。由图5可知,与HFD组相比,HFD+LR组显著降低肝脏中促进脂肪合成的关键基因PPAR $\gamma$ 、SRERP-1c和FAS的转录表达情况,显著升高肝脏中促进脂肪利用的关键基因LPL与促进脂肪 $\beta$ 氧化的关键基因PPAR $\alpha$ ,说明了罗伊氏乳杆菌LR能通过增加外周组织对脂肪的利用、促进肝脏中脂肪的 $\beta$ 氧化和抑制肝脏中脂肪的合成来治疗或减轻脂肪肝。

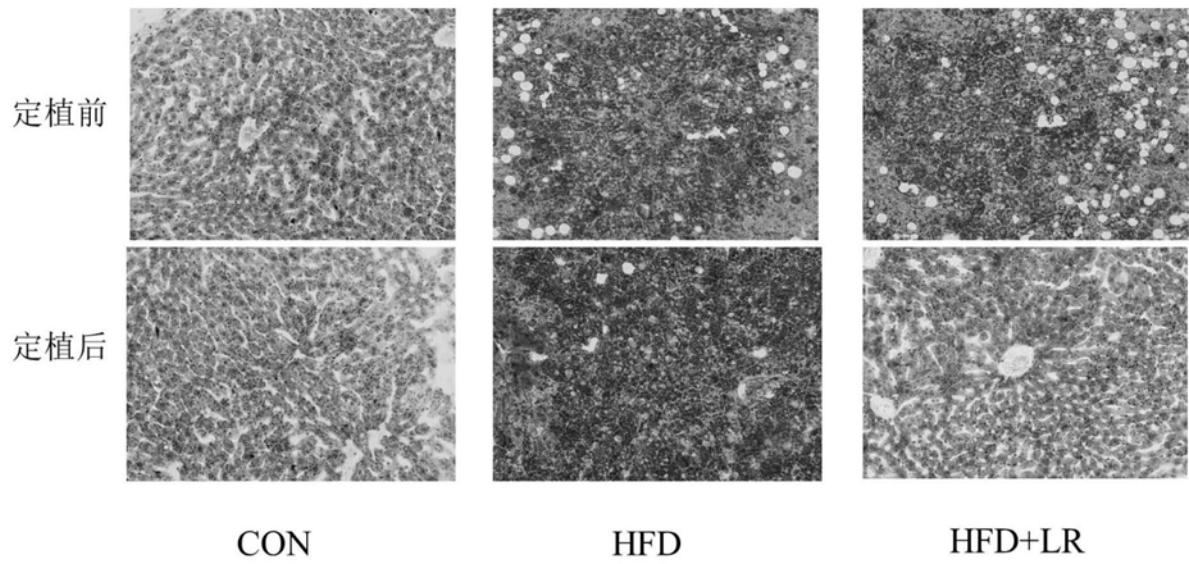


图1

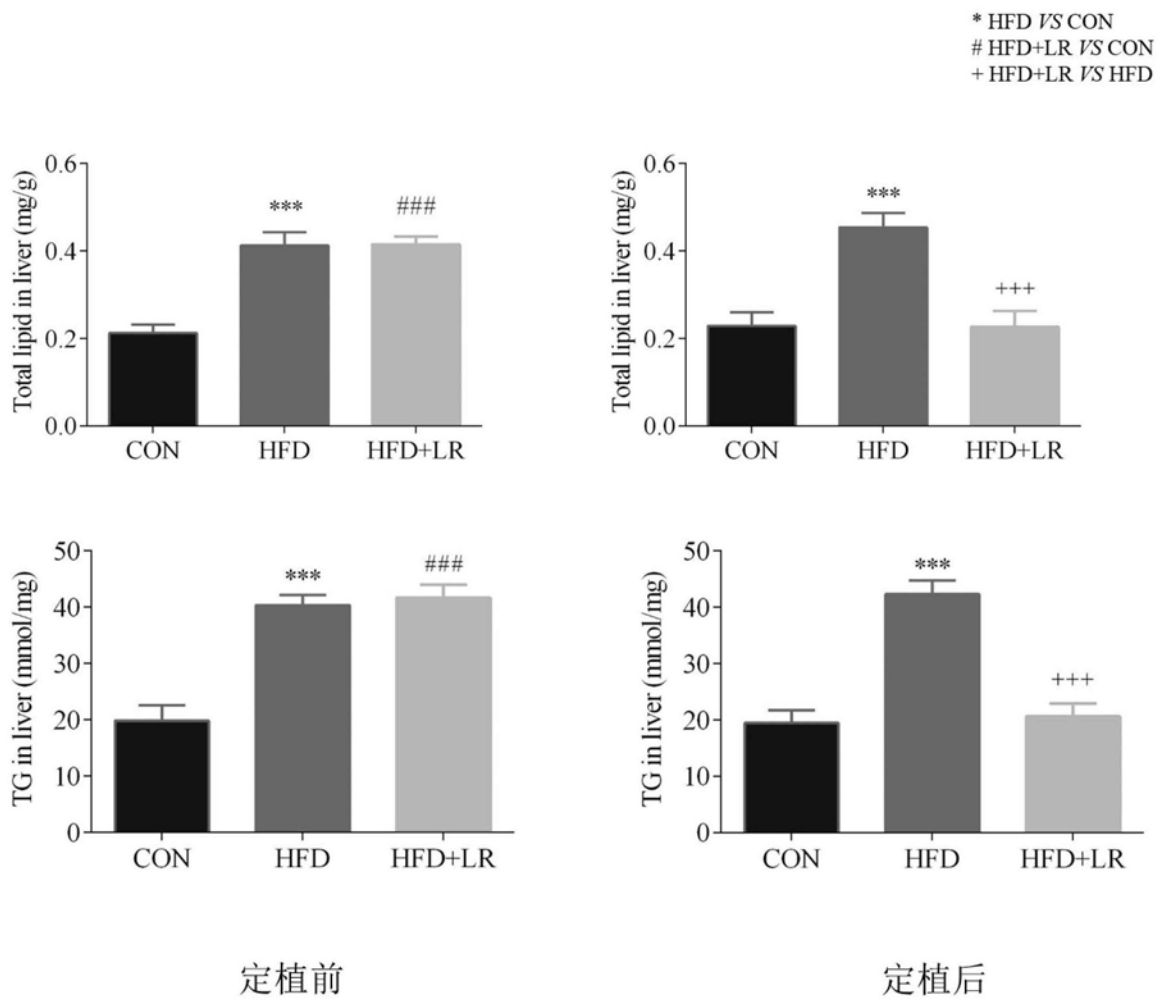


图2

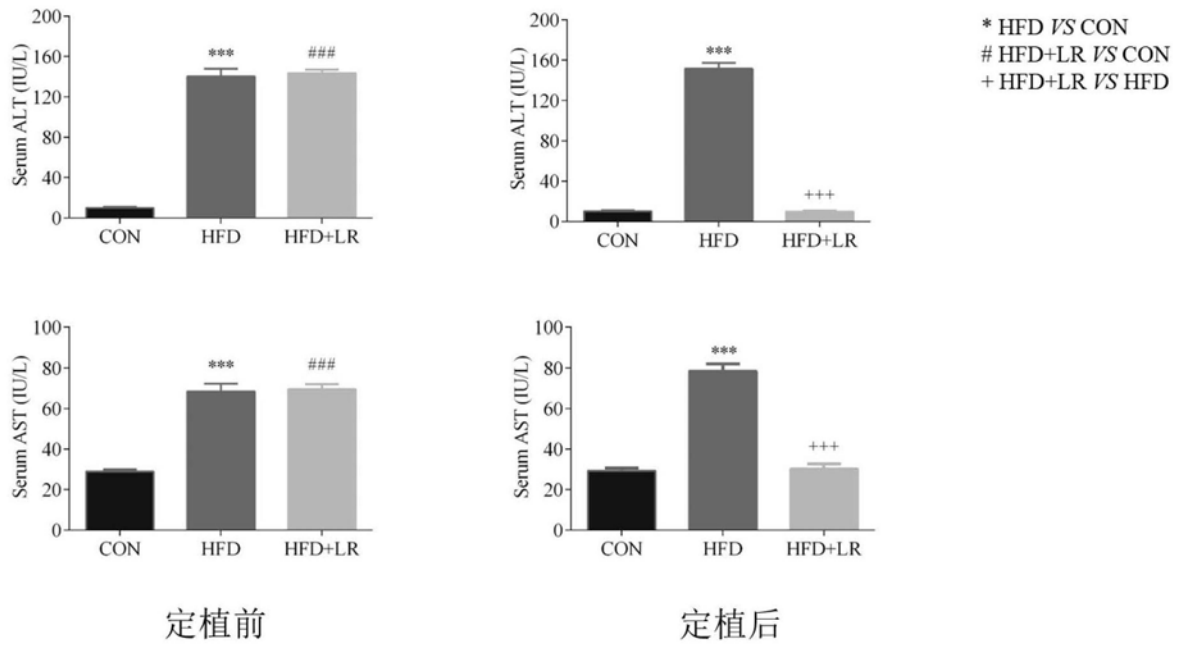


图3

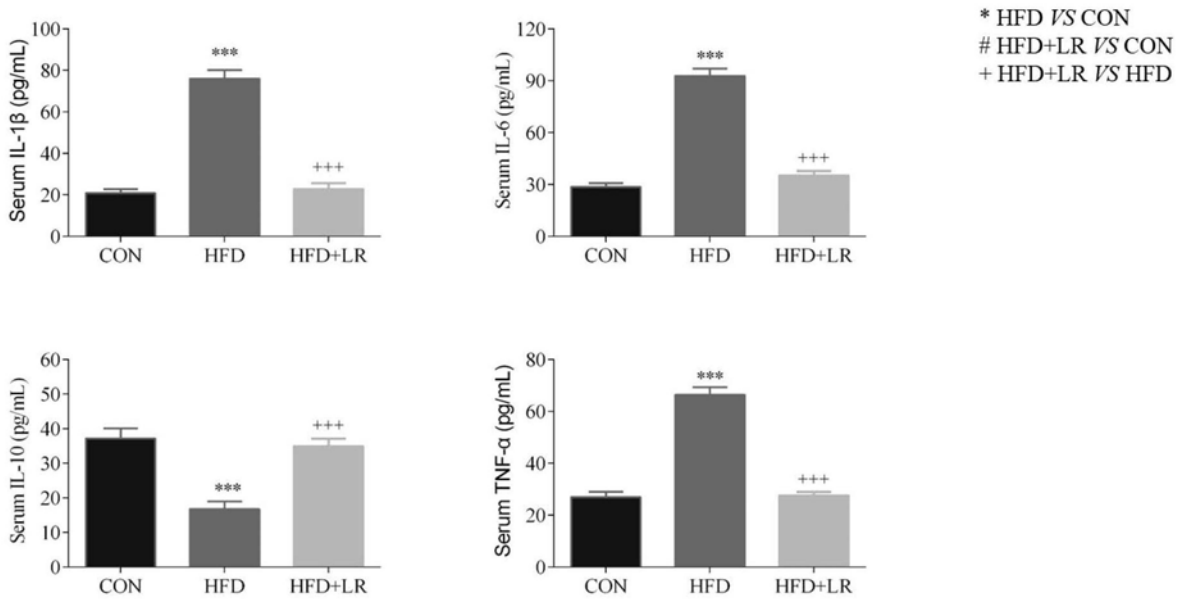


图4



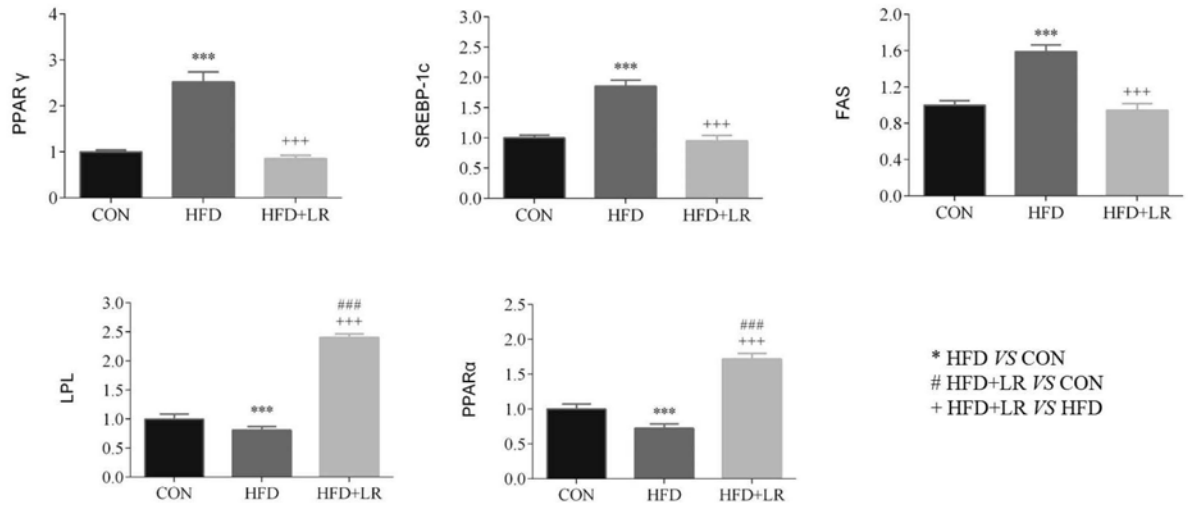


图5