



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108403930 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810395759.2

A61P 3/04(2006.01)

(22)申请日 2018.04.27

A61K 31/185(2006.01)

A61K 31/702(2006.01)

(71)申请人 美益添生物医药(武汉)有限公司

A61K 31/715(2006.01)

A61K 31/716(2006.01)

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新二路388号武汉光谷国际生
物医药企业加速器1号楼190号(自贸
区武汉片区)

(72)发明人 沈鹤霄 李国龙

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 史晶晶

(51)Int.Cl.

A61K 36/8969(2006.01)

A61K 36/8984(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合
制剂及制备方法与应用

(57)摘要

一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合
制剂及制备方法与应用,涉及口服制剂领域。本
发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的
复合制剂,其是由按质量百分数计的以下原料制
备而成:21%-64%低聚糖;21%-44%植物提取
物;9%-31%真菌提取物;0.5%-5%牛磺酸钠;
以及0.5%-5%沙枣提取物,该复合制剂的安全
性好,能有效调节肠道菌群。复合制剂的制备方
法是将低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺
酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得,该工艺简单,
易产业化生产。本发明实施例的提高肠道中AKK
菌/致病菌比值的复合制剂的应用是复合制剂用于
制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的
口服制剂。

1. 一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,其是由以下原料制备而成,按质量百分数计,所述原料包括:

低聚糖	21%-64%;
植物提取物	21%-44%;
真菌提取物	9%-31%;
牛磺酸钠	0.5%-5%; 以及
沙枣提取物	0.5%-5%。

2. 根据权利要求1所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述低聚糖选自菊粉、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、低聚异麦芽糖、聚葡萄糖、抗性糊精、L阿拉伯糖和魔芋葡甘聚糖组成的组合中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述植物提取物选自海藻提取物、昆布提取物、黄精提取物、茯苓提取物、枸杞提取物、葛根黄酮和人参提取物、圆苞车前子壳组成的组合中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述真菌提取物选自香菇提取物、虫草提取物、灵芝提取物、猴头菇提取物和酵母提取物组成的组合中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述原料还包括银耳提取物,所述银耳提取物的使用量为所述真菌提取物质量的1%-5%。

6. 根据权利要求5所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述原料还包括铁皮石斛提取物,所述铁皮石斛提取物为所述植物提取物质量的1%-5%。

7. 一种如权利要求1至6中任一项所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的制备方法,其特征在于,其包括以下步骤:

将低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

8. 根据权利要求7所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述植物提取物的制备方法如下:

将选取的植物原料清洗、粉碎后混合,添加4-6倍重量、60℃-80℃的热水提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液浓缩后,再用乙醇沉淀得到粗品多糖;将粗品多糖经层析分离、蒸馏水洗脱,得到多糖液;将多糖液浓缩后,再用乙醇沉淀,干燥得到粉状的植物提取物。

9. 根据权利要求7所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其特征在于,所述真菌提取物的制备方法如下:

将真菌原料干燥后充分研磨,再加10-20倍体积纯水,于70-80℃下提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液经3000-5000r/min离心10-15分钟后取上清液;将上清液浓缩后,用乙醇沉淀;取沉淀,干燥后得到粉状的真菌提取物。

10. 一种如权利要求1至6中任一项所述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用,其特征在于,所述复合制剂用于制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的口服制剂。

一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂及制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及口服制剂领域,且特别涉及一种提高肠道中AKK菌 /致病菌比值的复合制剂及制备方法与应用。

背景技术

[0002] 经研究表明,人体内的肠道菌群变化会导致肥胖,其产生机制为:高热量食物经过牙齿的咀嚼和胃的初步降解之后进入肠道,寄居在肠道里的微生物负责完成剩下的消化工作;在微生物的发酵过程中,会有大量的乙酸盐产生,这些乙酸盐被肠道吸收,随血液循环穿过血脑屏障,进入大脑;进入大脑的乙酸盐会激活副交感神经系统。被乙酸盐激活的副交感神经会给胰岛发出分泌胰岛素(insulin)的指令,于是 β 细胞开始大量分泌胰岛素,细胞启动储存能量的程序;于此同时,副交感神经又给胃发出了释放饥饿激素(ghrelin)和胃泌素(gastrin)的指令,饥饿激素大量产生,饥饿感随之而来。

[0003] 另外,长期摄入高脂肪食物会导致肠道菌群失调,使肠道中存在更高水平的乙酸,这种正向的调节机制使食量越来越大,从而促进肥胖,和产生胰岛素抵抗。肥胖发展过程中肠道优势菌群变化会促使肠道微生物环境进一步失调:

[0004] 1、肠道中SCFA产生菌(比如:Butyrivibrio丁酸弧菌属; Bifidobacterium bifidum双歧杆菌;Bifidobacterium pseudocatenulatum 假链状双歧杆菌;Megasphaera 巨球型菌属)的比重显著降低;

[0005] 2、肠道中厚壁菌门/拟杆菌门的比值显著增加;

[0006] 3、有益菌群(比如:Akkermansia muciniphila,Akk菌; Bifidobacterium双歧杆菌属)比重显著降低;

[0007] 4、条件致病菌(比如:Enterobacter cloacae阴沟肠杆菌)比重显著增加,诱发炎症反应;

[0008] 5、肠道菌群能够抑制禁食诱导脂肪细胞因子(Fiaf)的表达,增加脂肪细胞脂蛋白酯酶(LPL)活性,诱导脂肪的沉积。

[0009] 总之,肠道菌群作为与人体共生的一个重要部分,影响着宿主的营养、能量代谢和免疫状况。目前已验证的结论有:肠道菌群失调参与了肥胖和2型糖尿病等代谢性疾病的发病,涉及的机制包括过度能量存储以及代谢性内毒素血症导致的慢性低度炎症等。

[0010] 因此,需要一种能有效调节肠道菌群、且安全性高的口服制剂。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其安全性好,能有效调节肠道菌群。

[0012] 本发明的另一目的在于提供一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的制备方法,该工艺简单,易产业化生产。

[0013] 本发明的另一目的在于提供一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用,复合制剂用于制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的口服制剂。

[0014] 本发明解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。

[0015] 本发明提出一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其是由以下原料制备而成,按质量百分数计,原料包括:

	低聚糖	21%-64%;
	植物提取物	21%-44%;
[0016]	真菌提取物	9%-31%;
	牛磺酸钠	0.5%-5%; 以及
	沙枣提取物	0.5%-5%。

[0017] 进一步地,在本发明较佳实施例中,低聚糖选自菊粉、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、低聚异麦芽糖、聚葡萄糖、抗性糊精、L阿拉伯糖和魔芋葡甘聚糖组成的组合中的至少一种。

[0018] 进一步地,在本发明较佳实施例中,植物提取物选自海藻提取物、昆布提取物、黄精提取物、茯苓提取物、枸杞提取物、葛根黄酮和人参提取物、圆苞车前子壳组成的组合中的至少一种。

[0019] 进一步地,在本发明较佳实施例中,真菌提取物选自香菇提取物、虫草提取物、灵芝提取物、猴头菇提取物和酵母提取物组成的组合中的至少一种。

[0020] 进一步地,在本发明较佳实施例中,原料还包括银耳提取物,银耳提取物的使用量为真菌提取物质量的1%-5%。

[0021] 进一步地,在本发明较佳实施例中,原料还包括铁皮石斛提取物,铁皮石斛提取物为植物提取物质量的1%-5%。

[0022] 本发明提出一种上述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的制备方法,其包括以下步骤:

[0023] 将低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

[0024] 进一步地,在本发明较佳实施例中,植物提取物的制备方法如下:

[0025] 将选取的植物原料清洗、粉碎后混合,添加4-6倍重量、60℃-80℃的热水提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液浓缩后,再用乙醇沉淀得到粗品多糖;将粗品多糖经层析分离、蒸馏水洗脱,得到多糖液;将多糖液浓缩后,再用乙醇沉淀,干燥得到粉状的植物提取物。

[0026] 进一步地,在本发明较佳实施例中,真菌提取物的制备方法如下:

[0027] 将真菌原料干燥后充分研磨,再加10-20倍体积纯水,于70-80℃下提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液经3000-5000r/min离心 10-15分钟后取上清液;将上清液浓缩后,用乙醇沉淀;取沉淀,干燥后得到粉状的真菌提取物。

[0028] 本发明提出一种上述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用,复合制剂用于制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的口服制剂。

[0029] 本发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂及制备方法与应用的

有益效果是：本发明实施例的提高肠道中AKK菌 /致病菌比值的复合制剂，其是由按质量百分数计的以下原料制备而成：21%-64%低聚糖；21%-44%植物提取物；9%-31%真菌提取物；0.5%-5%牛磺酸钠；以及0.5%-5%沙枣提取物，该复合制剂的安全性好，能有效调节肠道菌群。复合制剂的制备方法是将低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得，该工艺简单，易产业化生产。本发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用是复合制剂用于制备增大肠道中AKK菌丰度，减少致病菌丰度的口服制剂。

具体实施方式

[0030] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0031] 下面对本发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂及制备方法与应用进行具体说明。

[0032] 本发明实施例提供一种提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂，其是由以下原料制备而成，按质量百分数计，原料包括：21%-64%低聚糖；21%-44%植物提取物；9%-31%真菌提取物；0.5%-5%牛磺酸钠；以及0.5%-5%沙枣提取物。优选的，原料包括：34%-51%低聚糖；29%-36%植物提取物；14%-26%真菌提取物；2%-5%牛磺酸钠；以及1%-4%沙枣提取物。

[0033] 其中，低聚糖选自菊粉、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、低聚异麦芽糖、聚葡萄糖、抗性糊精、L阿拉伯糖和魔芋葡甘聚糖组成的组合中的至少一种。例如，按质量百分数计，原料包括1%-10%菊粉、1.5%-10%低聚木糖、2%-5%低聚半乳糖、2%-5%低聚异麦芽糖、5%-10%聚葡萄糖、5%-10%抗性糊精、5%-10%L阿拉伯糖和0.5%-4%魔芋葡甘聚糖。

[0034] 其中，植物提取物是采用植物提取得到的，多为植物多糖。本实施例中，植物提取物选自海藻提取物、昆布提取物、黄精提取物、茯苓提取物、枸杞提取物、葛根黄酮（即葛根提取物）和人参提取物、圆苞车前子壳组成的组合中的至少一种。圆苞车前子壳是人工种植的车前科车前属圆苞车前（拉丁学名：*Plantago ovata*）种子的外壳，可以直接磨粉使用。例如，按质量百分数计，原料包括5%-10%海藻提取物、3%-5%昆布提取物、1.5%-5%黄精提取物、3%-5%茯苓提取物、5%-10%枸杞提取物、1%-3%葛根黄酮、2.5%-6%圆苞车前子壳。

[0035] 其中，真菌提取物是采用真菌提取得到的，多为真菌多糖。本实施例中，真菌提取物选自香菇提取物、虫草提取物、灵芝提取物、猴头菇提取物和酵母提取物组成的组合中的至少一种。例如，按质量百分数计，原料包括4-10%香菇提取物、0.5%-5%虫草提取物、0.5%-6%猴头菇提取物和4%-10%酵母提取物。

[0036] 在其他实施例中，原料还可以包括银耳提取物，银耳提取物的使用量为真菌提取物质量的1%-5%。

[0037] 在其他实施例中，原料还包括铁皮石斛提取物，铁皮石斛提取物为植物提取物

量的1%-5%。

[0038] 在其他实施例中,原料还包括鲜花提取物,鲜花提取物的使用量为植物提取物质量的2%-10%。鲜花提取物选自牡丹花提取物、金银花提取物和蒲公英提取物组成的组合中的至少一种。

[0039] 本实施例的复合制剂采用低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物制成,其中低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠协同作用,能够有效调节肠道中AKK菌和致病菌的比重。

[0040] 本发明实施例提供一种上述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的制备方法,其包括以下步骤:

[0041] 将低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

[0042] 其中,植物提取物可以购买得到的高纯度提取物,也可以按照以下制备方法制备得到:

[0043] 将选取的植物原料清洗、粉碎后混合,添加4-6倍重量、60℃-80℃的热水提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液浓缩后,再用乙醇沉淀得到粗品多糖;将粗品多糖经层析分离、蒸馏水洗脱,得到多糖液;将多糖液浓缩后,再用乙醇沉淀,干燥得到粉状的植物提取物。

[0044] 其中,真菌提取物可以购买得到的高纯度提取物,也可以按照以下制备方法制备得到:

[0045] 将真菌原料干燥后充分研磨,再加10-20倍体积纯水,于70-80℃下提取3-4小时,过滤得到提取液;将提取液经3000-5000r/min离心 10-15分钟后取上清液;将上清液浓缩后,用乙醇沉淀;取沉淀,干燥后得到粉状的真菌提取物。

[0046] 其中,鲜花提取物可以购买得到,也可以按照以下制备方法制备得到:

[0047] 将鲜花原料加入酵母进行发酵,过滤、后熟、澄清得到花果发酵液;将发酵液过滤、浓缩,得到粉状的鲜花提取物。

[0048] 其中,沙枣提取物可以购买得到,也可以按照以下制备方法制备得到:称取沙枣置微波提取装置中,微波功率500W-900W,温度70℃,共提取3次,第1次加50%-90%的乙醇,提取10min-30min;第2次加50%-90%乙醇,提取10min-30min;第3次加蒸馏水,提取 20min-40min。

[0049] 再将第1、2次的乙醇提取液浓缩,除去乙醇,再加入第3次的水提取液,混合,浓缩,得到粉状的沙枣提取物。

[0050] 本发明实施例提供一种上述的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用。针对肠道菌群失调的关键因素,复合制剂具有显著增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的功能,从而使失衡的肠道菌相正常化。相应的,复合制剂可用于制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度口服制剂。更具体的,复合制剂可用于制备改善肥胖者肥胖症状的口服制剂。

[0051] 肠道菌群失调的关键因素之一是有益菌群的丰度,而复合制剂的功能之一是可显著提高肠道中Akkermansia muciniphila,即AKK菌的丰度,从而可以改善肥胖者的肥胖症状:

[0052] 1、Akkermansia muciniphila是人体肠道中一种可降解黏蛋白的细菌,它与肥胖、

糖尿病、炎症和代谢紊乱呈负相关；健康人的粪便中含有较多的Akk菌细胞外囊泡 (AmEV) 降低LPS诱导的Caco-2 细胞肠道通透性；

[0053] 2、复合制剂可显著提高肠道中AmEV含量，使肠道紧密连接功能增强，体重增加降低，葡萄糖耐受得到改善；

[0054] 3、Akkermansia muciniphila可以调节肠道内黏液厚度和维持肠道屏障完整性从而改善肠道代谢功能；

[0055] 4、Akkermansia muciniphila依附肠道黏膜而生(禁食期间也可蓬勃繁殖)可通过竞争作用保护肠道免受病原体侵害；

[0056] 5、Akkermansia muciniphila在降解黏蛋白的同时，会释放各包含乙酸在内的多种的SCFA，促进Foxp3+Treg、IL-10、TGF- β 以减少胰岛炎症；

[0057] 6、Akkermansia muciniphila可以诱导禁食诱导脂肪细胞因子 (Fiaf) 的表达，可降低脂肪储存能力。

[0058] 肠道菌群失调的另一关键因素是肠道中致病菌的比重，而复合制剂的功能之一是可显著降低肠道中多种致病菌，如阴沟肠杆菌的比重，从而改善肥胖者的肥胖症状；

[0059] 本发明针对肠道菌群失调的关键因素，使失衡的肠道菌相正常化；

[0060] 1、降低肠道中阴沟肠杆菌 (Enterobacter cloacae) 等条件致病革兰氏阴细菌的丰度进而减少循环中LPS的含量，减少炎症因子，进而提高胰岛素敏感性。

[0061] 2、复合制剂能改善肠黏膜屏障功能和免疫功能，从而抑制肠道有害菌的生长；

[0062] 3、降低肠道中LPS主要产生菌 (Proteobacteria、Escherichia) 的比重，可降低肠道渗透率(促进紧密连接蛋白ZO-1, occluding, and Cb-1的表达)，抑制TNF- α 信号通路并减少释放促炎症因子，IL-1、IL-6，有利于维持上皮屏障的完整性，有益于逆转肥胖引起肠道炎症，恢复免疫平衡。

[0063] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0064] 实施例1

[0065] 本实施例提供一种复合制剂，其是采用以下制备方法制得：

[0066] 准备原料：630g低聚糖(100g菊粉、100g低聚果糖、100g低聚木糖、90g低聚半乳糖、50g低聚异麦芽糖、50g聚葡萄糖、50g抗性糊精、50g阿拉伯糖和40g魔芋葡甘聚糖)；230g植物提取物(50g 昆布提取物、80g黄精提取物、50g茯苓提取物、50g枸杞提取物)；120g真菌提取物(60g香菇提取物、40g虫草提取物、20g酵母提取物)；10g牛磺酸钠；以及10g沙枣提取物。

[0067] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

[0068] 实施例2

[0069] 本实施例提供一种复合制剂，其是采用以下制备方法制得：

[0070] 准备原料：220g低聚糖(50g低聚半乳糖、50g低聚异麦芽糖、50g聚葡萄糖、50g阿拉伯糖和20g魔芋葡甘聚糖)；430g植物提取物(100g昆布提取物、80g黄精提取物、100g茯苓提取物、100g枸杞提取物、20g葛根黄酮和30g人参提取物)；300g真菌提取物(100g 香菇提取物、50g虫草提取物、100g猴头菇提取物和50g酵母提取物)；25g牛磺酸钠；以及25g沙枣提取物。

[0071] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

[0072] 实施例3

[0073] 本实施例提供一种复合制剂,其是采用以下制备方法制得:

[0074] 准备原料:500g低聚糖(100g菊粉、100g低聚果糖、100g低聚木糖、100g低聚半乳糖、100g低聚异麦芽糖);300g植物提取物(100g 海藻提取物、100g黄精提取物、50g茯苓提取物、50g枸杞提取物);150g真菌提取物(50g香菇提取物、50g虫草提取物、50g猴头菇提取物);25g牛磺酸钠;以及25g沙枣提取物、10g铁皮石斛提取物。

[0075] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物、铁皮石斛提取物混合、研磨即得。

[0076] 实施例4

[0077] 本实施例提供一种复合制剂,其是采用以下制备方法制得:

[0078] 准备原料:350g低聚糖(50g菊粉、50g低聚果糖、50g低聚木糖、50g低聚半乳糖、50g低聚异麦芽糖、50g聚葡萄糖、50g抗性糊精);350g植物提取物(50g海藻提取物、50g昆布提取物、100g黄精提取物、50g茯苓提取物、50g枸杞提取物和50g人参提取物);250g 真菌提取物(100g香菇提取物、50g虫草提取物、50g猴头菇提取物和50g酵母提取物);25g牛磺酸钠;以及25g沙枣提取物;8g银耳提取物。

[0079] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物、银耳提取物混合、研磨即得。

[0080] 实施例5

[0081] 本实施例提供一种复合制剂,其是采用以下制备方法制得:

[0082] 准备原料:420g低聚糖(50g菊粉、50g低聚木糖、50g低聚半乳糖、30g低聚异麦芽糖、50g聚葡萄糖、50g抗性糊精、100gL阿拉伯糖和40g魔芋葡甘聚糖);320g植物提取物(50g海藻提取物、50g昆布提取物、50g黄精提取物、30g茯苓提取物、60g枸杞提取物和30g葛根黄酮、50g圆苞车前子壳);200g真菌提取物(40g香菇提取物、40g虫草提取物、40g猴头菇提取物和40g酵母提取物);20g 牛磺酸钠;以及40g沙枣提取物。

[0083] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物混合、研磨即得。

[0084] 实施例6

[0085] 本实施例提供一种复合制剂,其是采用以下制备方法制得:

[0086] 准备原料:420g低聚糖(50g菊粉、50g低聚木糖、50g低聚半乳糖、30g低聚异麦芽糖、50g聚葡萄糖、50g抗性糊精、100gL阿拉伯糖和40g魔芋葡甘聚糖);320g植物提取物(50g海藻提取物、50g昆布提取物、50g黄精提取物、30g茯苓提取物、60g枸杞提取物和30g葛根黄酮、50g圆苞车前子壳);200g真菌提取物(40g香菇提取物、40g虫草提取物、40g猴头菇提取物和40g酵母提取物);20g 牛磺酸钠;以及40g沙枣提取物;30g牡丹花提取物。

[0087] 将上述低聚糖、植物提取物、真菌提取物、牛磺酸钠和沙枣提取物、牡丹花提取物混合、研磨即得。

[0088] 以下通过动物实验对本发明实施例的复合制剂的功效进行验证。

[0089] 一、肠道菌群的属、种水平分析

[0090] (1)实验动物:

[0091] 雌性BALB/c小鼠,4周龄(体重 20 ± 1 g),SPF级,购于湖北省实验动物研究中心。饲养在SPF级动物房。喂养小鼠的普通饲料(脂肪热量10%)和高脂高蛋白饲料(脂肪热量40%)

以上)均购于湖北省动物研究中心,小鼠在喂养期间自由饮水。

[0092] (2) 分组与干预:

[0093] 小鼠适应性喂养1周后进行随机分组共分为3组,每组12只:

[0094] 1、空白对照组:连续喂饲普通饲料;

[0095] 2、条件对照组:连续喂饲高脂饲料6周后改为喂饲普通饲料1 周;

[0096] 3、实验组:连续喂饲高脂饲料6周后改为喂实施例5的复合制剂,每只小鼠每天以1g/kg的剂量灌喂1周。

[0097] 小鼠样品收集:小鼠解剖后,采集肠道新鲜粪便至相应标记的冻存管,-80℃保存备用。

[0098] (3) 肥胖小鼠模型的建立:

[0099] 表1肥胖小鼠模型

组别	体重 g						
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42
[0100] 空白组	20.5±1.8	22.7±1.26	25±2.3	28.9±2.84	29.5±2.94	30.2±3.14	30.7±2.66
对照组	20.6±1.7	24.2±2.96	27.3±3.56	32.5±4.46	34.2±5.34	35.6±6.3	37.2±4.74*
实验组	20.2±1.2	24.4±3.66	26.2±2.94	33.8±6.15	34.7±4.43	35.8±4.65	36.8±3.66*

[0101] *P<0.05

[0102] 小鼠肥胖模型诱导结果从表中可以看出条件对照组和实验组饲喂6周高脂饲料体重变化(P<0.05)显著大于对照组;对比空白组体重增加≥20%可视为典型的小鼠肥胖模型。

[0103] (4) 结果分析:

[0104] 表2不同分组小鼠肠道菌群的属、种水平

分类	空白组	对照组	实验组
Akkermansia muciniphila	0.5±0.5	0.008±0.005*	5.5±4.5##
Bacteroides 拟杆菌属	19.1±8.4	5.6±4.6*	39.1±4.4##
Bacteroides uniformis	0.5±0.2	1.5±1.0*	0.4±0.3
Bacteroides eggerthii	0.02±0.02	0.007±0.005*	3.5±2.1##
埃氏拟杆菌	0.02±0.02	0.007±0.005*	3.5±2.1##
Escherichia coli 大肠杆菌	1.2±0.8	1.3±1.4	0.6±0.5
[0105] Prevotella 普雷沃菌	11.6±6.7	22.6±5.6	4.4±1.7*#
Ruminococcus 瘤胃球菌属	1.0±1.1	1.2±0.8	0.2±0.3*
Ruminococcus gnavus	1.5±1.0	6.2±4.3	0.02±0.01*#
扭链瘤胃球菌	0.02±0.03	0.4±0.3	0.008±0.005*#
Ruminococcus torques	0.02±0.03	0.4±0.3	0.008±0.005*#
活泼瘤胃球菌	0.02±0.03	0.4±0.3	0.008±0.005*#
Lachnospira 毛螺菌属	0.02±0.01	0*	0.06±0.02
Coprococcus	0.9±0.5	0.3±0.4	1.8±0.6*#
Coprococcus eutactus	0.05±0.08	0.04±0.05	0.9±0.6*#

[0106] 对比空白组*P<0.05,对比条件对照组#P<0.05,##P<0.01

[0107] 从结果看,高脂高蛋白饲料喂养的条件对照组在产丁酸菌(毛螺菌属)显著减少,拟杆菌属显著减少但单形拟杆菌增加,大肠埃希菌有一定丰度增加,Akkermansia muciniphila显著减少;总之对照组条件致病菌增加,肠屏障菌减少的肠道紊乱状态。对比

对照组经过1周复合制剂干预的实验组Akkermansia muciniphila丰度显著富集,条件致病菌数量减少,产SCFA菌明显增加,认为肠道免疫功能显著加强。

[0108] 一、肠道中阴沟肠杆菌分析

[0109] (1) 实验动物

[0110] 雌性BALB/c小鼠,4周龄(体重 20 ± 1 g),SPF级,购于湖北省实验动物研究中心。饲养在SPF级动物房。喂养小鼠的普通饲料(脂肪热量10%)和高脂高蛋白饲料(脂肪热量40%以上)均购于湖北省动物研究中心,小鼠在喂养期间自由饮水。

[0111] (2) 分组与干预

[0112] 小鼠适应性喂养1周后进行随机分组共分为3组,每组6只:

[0113] 1、空白对照组:连续喂饲普通饲料;

[0114] 2、条件对照组:普通饲料喂饲同时阴沟肠杆菌菌液灌胃处理1周,喂饲高脂饲料4周后改为喂饲普通饲料1周;

[0115] 3、实验组:普通饲料喂饲同时阴沟肠杆菌菌液灌胃处理1周,喂饲高脂饲料4周后改为复合制剂每只小鼠每天以1g/kg的剂量灌喂1周。

[0116] (3) 实验过程:

[0117] 阴沟肠杆菌的定植:条件对照组和实验组小鼠经过适应性喂养1周后,将体外分离鉴定的人阴沟肠杆菌(*E. cloacae*菌株来源于武汉金开瑞生物工程有限公司微生物实验室)菌液灌胃处理,连续7天后检测肠道菌群中阴沟肠杆菌是否定植。

[0118] 阴沟肠杆菌的分离鉴定:条件对照组和实验组小鼠经过阴沟肠杆菌的定植后,收集新鲜的粪便样品常规接种培养,阴沟肠杆菌分离琼脂(ECIA)获得单菌落样品进行生化反应鉴定。

[0119] 粪便样品收集:小鼠实验结束时,采集肠道新鲜粪便至相应标记的冻存管, -80°C 保存备用;

[0120] 肠道菌群总DNA的提取:所有样品均按照QIAamp DNASTool Mini Kit试剂盒操作说明提取粪便细菌基因组DNA, -20°C 保存。

[0121] 阴沟肠杆菌的16SrRNA分析:

[0122] PCR分析引物:

[0123] 16SrRNA F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

[0124] 16SrRNA R:TTACCGCGGCTGCTGGCAC

[0125] 所有粪便细菌基因组DNA样品均照THUNDERBIRD qPCR Mix (QPS-201-TOY0B0)操作说明进行荧光定量PCR。

[0126] PCR产物的454GS FLX测序:将PCR回收产物并使用PicoGreen dsDNA定量检测试剂盒进行检测定量,按照样品的测序量要求,送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行454GS FLX测序。

[0127] 统计学分析:本实验所涉及的数据结果均为计量资料,全部数据以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

[0128] (4) 结果分析:

[0129] ①阴沟肠杆菌的分离鉴定结果

[0130] 条件对照组和实验组小鼠经过1周阴沟肠杆菌定植后采集新鲜粪便样品分离获得

的样品,镜检均为革兰阴性粗短杆菌、血琼脂培养不溶血、EMB培养呈粉红色、MacConkey琼脂培养为粉红色或红色、SS琼脂培养呈白色不透明;

[0131] 阴沟肠杆菌生化特性:氧化酶实验(+)、IMViC实验(— —++)、赖氨酸脱羧酶实验(—)、精氨酸双水解酶实验(+)、鸟氨酸脱羧酶实验(+)、蔗糖(+)、棉子糖(+)、山梨醇(+)

[0132] 表3阴沟肠杆菌生化特性

分组	条件对照组	实验组
氧化酶实验	+	+
IMViC 实验	— —++	— —++
赖氨酸脱羧酶实验	~	~
精氨酸双水解酶实验	+	+
鸟氨酸脱羧酶实验	+	+
[0133] 蜜二糖	+	+
蔗糖	+	+
棉子糖	+	+
鼠李糖	+	+
核糖醇	+	+
山梨醇	+	+
黄色素	~	~

[0134] 由上可知,阴沟肠杆菌定植的成功率为100%。

[0135] ②不同分组小鼠阴沟肠杆菌的丰度分析

[0136] 分别在不同时间点采集不同分组小鼠粪便样品的结果分析,以适应性喂养1周后为实验起始时间:空白组、条件对照组在第6周取样,实验组在第5周、第6周取样。

[0137] 表4阴沟肠杆菌的丰度

分组	空白组	条件对照组	实验组	
			干预前	干预后
[0138] 阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	0.08±0.06	26.5±8.3*	24.6±6.5*	1.8±1.1#

[0139] 对比空白组* $P < 0.01$,对比条件对照组# $P < 0.01$ 。

[0140] 结果表明,经过复合制剂1个疗程的干预作用,条件致病菌阴沟肠杆菌*E. cloacae*丰度非常显著降低。

[0141] 按照上述相同的动物实验方法对本发明其他实施例的复合制剂的功效进行验证,结果显示本发明其他实施例的复合制剂具有相同或类似的功效。由上述不同分组小鼠肠道菌群的属、种水平分析和阴沟肠杆菌分析可知,本发明实施例的复合菌剂具有增加肠道中有益菌丰度,减少致病菌丰度的作用。因此,本发明实施例的复合菌剂能有效调节肠道菌群,从而改善肥胖者的肥胖症状。

[0142] 以下通过临床实验对本发明实施例的复合制剂的功效进行验证。

[0143] (1) 实验对象:

[0144] 研究对象的总体特征:有430名受试者参与,其中男性202名,平均年龄为34.5±11.2岁;女性228名,平均年龄为36.9±12.1岁。本次项目的所有受试者随机选自国内10个不同省份地区。

[0145] 已有研究表明,男性体脂率(PBF%)平均值为22.7%,低于女性的28.9%,标准体脂率(PBF%))如下:

[0146] 表5标准体脂率

	年龄段	男性 (PBF%)	女性 (PBF%)
	20-29 岁	19.2±8.5	27.5±8.0
[0147]	30-39 岁	22.5±6.7	28.1±7.4
	40-49 岁	22.2±6.5	28.6±7.8
	50-59 岁	22.5±6.0	31.7±8.7

[0148] 表6成年人超重与肥胖评判标准

	体型	男性 (PBF%)		女性 (PBF%)	
		20-29 岁	30-59 岁	20-29 岁	30-59 岁
[0149]	超重	21.3-29.4	22.1-29.9	28.7-33.4	30.7-36.0
	肥胖	≥29.5	≥30	≥33.5	≥36.1

[0150] 表7受试者体型分布

		男性		女性组	
	分组	超重组	肥胖组	超重组	肥胖组
[0151]	案例数	134	68	171	57

[0152] (2) 干预治疗

[0153] 不同体型分组的受试者统一剂量服用实施例6的复合制剂;服用复合制剂期间(7天)禁食;禁食前,3天预先调整饮食,清淡素食为主。禁食期:本产品完全代替一日三餐,早中晚各服用15g/袋,粉剂使用37℃温水冲服,每日饮水3-5L。禁食期之后经7天复食期恢复正常饮食。

[0154] (3) 数据统计:

[0155] 本试验所涉及的数据结果均为计量资料,全部数据以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

[0156] 表8不同分组体脂率变化

		男性超重组		男性肥胖组	
	年龄段	干预前	干预后*	干预前	干预后*
	20-29 岁	26.7±3.97	20.2±2.10	31.0±4.53	26.21±3.81
	30-59 岁	28.8±5.72	22.1±2.79	32.8±6.51	28.7±3.62
[0157]					
		女性超重组		女性肥胖组	
	年龄段	干预前	干预后*	干预前	干预后*
	20-29 岁	32.8±2.76	26.9±2.85	34.7±2.44	28.5±2.68
	30-59 岁	34.4±3.11	27.8±3.46	36.6±3.92	30.1±4.21

[0158] 对比干预前*P<0.05

[0159] 结果显示,连续7天使用复合制剂代替正常饮食的干预治疗的减脂效果具有统计学显著意义(P<0.05)。

[0160] 综上所述,本发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂,其安全性好,能有效调节肠道菌群;该复合制剂的制备方法的工艺简单,易产业化生产。本发明实施例的提高肠道中AKK菌/致病菌比值的复合制剂的应用是复合制剂用于制备增大肠道中AKK菌丰度,减少致病菌丰度的比重的口服制剂。

[0161] 以上所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的

所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。