



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112980734 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110313119.4 *A23C 9/123* (2006.01)

(22) 申请日 2021.03.24 *A23C 13/16* (2006.01)

(83) 生物保藏信息 *A23C 19/032* (2006.01)

GDMCC NO:60940 2019.12.30 *A23C 19/06* (2006.01)

GDMCC No:61481 2021.01.29 *A23L 11/50* (2021.01)

A23L 11/65 (2021.01)

(71) 申请人 江南大学 *A23L 33/135* (2016.01)

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号 *A61K 35/741* (2015.01)

A61P 1/10 (2006.01)

(72) 发明人 王琳琳 王刚 柴茂 赵建新 *A61P 1/00* (2006.01)

陈卫 张灏 *C12R 1/01* (2006.01)

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 张勇

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)

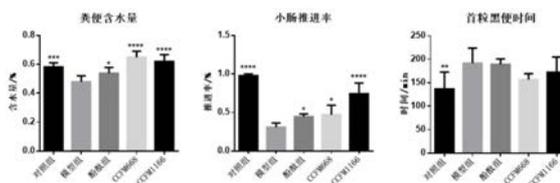
权利要求书1页 说明书14页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一株缓解便秘并调节肠道菌群紊乱的两歧双歧杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株缓解便秘并调节肠道菌群紊乱的两歧双歧杆菌及其应用,属于微生物领域。本发明提供的两歧双歧杆菌能够显著提高粪便含水量与小肠推进率,降低便秘小鼠的首粒黑便时间,具有明显改善便秘表观病理指标的作用;在生理指标的检测中,两歧双歧杆菌还能够提高胃动素的含量,降低生长抑素的含量,从根本上影响肠道蠕动;两歧双歧杆菌能够调节肠道中重要微生物的丰度,维持肠道稳态;两歧双歧杆菌CCFM1166比GDMCC NO:60940更好地增加血清中MTL的含量,降低血清中SS的含量,且对小肠蠕动的推进作用更为显著,因此在未来针对便秘患者可以采用更加个性化的治疗方案,具有非常可观的应用前景。



1. 一株两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*), 其特征在于, 所述两歧双歧杆菌于2021年1月29日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC No:61481。

2. 含有权利要求1所述的两歧双歧杆菌的微生物制剂。

3. 权利要求1所述的两歧双歧杆菌, 或权利要求2所述的微生物制剂在制备可缓解便秘产品中的应用。

4. 一种可缓解便秘的产品, 其特征在于, 所述产品中含有权利要求1所述的两歧双歧杆菌。

5. 如权利要求4所述的产品, 其特征在于, 所述两歧双歧杆菌在产品中的添加量不低于 1×10^8 CFU/g或 1×10^8 CFU/mL。

6. 权利要求4或5所述的产品, 其特征在于, 所述产品为食品、药品或保健品。

7. 如权利要求6所述的产品, 其特征在于, 所述食品为使用含有权利要求1所述两歧双歧杆菌, 或权利要求2所述的微生物制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品; 或所述食品为含有权利要求1所述两歧双歧杆菌, 或权利要求所述的微生物制剂的饮料或零食。

8. 如权利要求6所述的产品, 其特征在于, 所述药品含有权利要求1所述两歧双歧杆菌、药物载体和/或药用辅料。

9. 如权利要求8所述的产品, 其特征在于, 所述药用载体包括医学上通常使用的填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂中的一种或多种。

10. 权利要求1所述的两歧双歧杆菌在制备具有如下至少一种功能的药物或功能性食品中的应用:

(a) 提高粪便含水量、提高小肠推进率/全肠道的蠕动;

(b) 上调血清中胃动素含量、下调血清中生长抑素含量、下调结肠组织中水通道蛋白的基因表达、上调结肠组织中干细胞因子受体c-kit基因的表达;

(c) 增加结肠组织中血清素的水平;

(d) 增加肠道菌群的多样性, 显著提高粪便中双歧杆菌属的丰度;

(e) 显著提高盲肠内容物中SCFA的含量;

(f) 缓解便秘。

一株缓解便秘并调节肠道菌群紊乱的两歧双歧杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株缓解便秘并调节肠道菌群紊乱的两歧双歧杆菌及其应用,属于微生物领域。

背景技术

[0002] 众所周知,便秘是一类患病率极高,且波及范围较为广泛的一种全球性疾病,目前,便秘这种疾病已出现在全球各个年龄层中,使许多人都饱受困扰,因此,对于便秘相关的治疗手段需要得到更多关注与重视。

[0003] 便秘的诱因有很多,例如日常作息的紊乱、饮食的不均衡、一些药物所带来的副作用、甚至是一些疾病所带来的并发症。这些不同的发病原因也可能带来不同的便秘症状,因此,根据不同的分类方式,对便秘进行区分。根据起病方式可以分为急性便秘和慢性便秘;还可以通过有无器质性病变进行分类,可以分为器质性便秘和功能性便秘;另外对于慢性便秘的患者,其还可以进行分类,主要分为慢传输型便秘,出口梗阻型便秘以及混合型便秘等。

[0004] 便秘主要表现为排便频率低,每周次数少于3次,大便干结,有排不尽的感觉,甚至需要手指辅助排便。因此,针对便秘的不同表现,所采取的解决办法也会存在差异,比如多食用新鲜蔬菜、水果、豆类等膳食纤维含量丰富的食物;较为严重者可以进行手术切除病变部位;较轻者可以使用膨胀剂、湿润剂、渗透性、刺激性或混合泻药,如甲基纤维素、多库酯钠、聚乙二醇、乳果糖或蒽醌衍生物等,但是这类泻药常会引起依赖性,甚至恶心、腹痛、腹泻等副作用。因此,通过使用益生菌来缓解便秘的方法将会是一种可优先采取并且副作用较低的重要手段。

[0005] 益生菌缓解便秘的机制目前并没有一条清晰的定论,但是,有研究发现,便秘患者的肠道菌群中出现厚壁菌门丰度降低,而拟杆菌门的丰度升高的现象。从属水平来看,一些潜在致病菌(肠球菌、梭杆菌等)丰度升高,而部分有益菌(双歧杆菌属、乳杆菌属等)丰度降低。因此,这个现象进一步引导我们可以从调节肠道菌群紊乱的角度出发,利用双歧杆菌来缓解便秘的症状。

[0006] 目前,有研究人员采用含有长双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和粪肠球菌的双歧杆菌三联活菌胶囊治疗便秘,但是,需要三种菌株共同作用才能实现治疗便秘,并且,只能防治混合痔术后便秘(公开于“孙建华.双歧杆菌三联活菌胶囊防治混合痔术后便秘的临床疗效分析[J]”论文中)。

[0007] 到目前为止,已有国内外学者针对双歧杆菌的生理特性、功能特性进行相关的研究,但是我们仍然需要对便秘疾病的发病机制以及双歧杆菌对便秘缓解的作用机制继续深入研究。并且,王珺文等在“功能性便秘和便秘型肠易激综合征的治疗研究进展”中指出,双歧杆菌对慢性便秘的疗效不明显。

[0008] 因此,获得一种可缓解便秘的菌株是目前研究的热点和难点。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明要解决的技术问题是,提供一株容易活化且能够明显提高肠道菌群丰富度,并能够有效缓解便秘的两歧双歧杆菌,并且提供了该菌株的应用。

[0011] 技术方案

[0012] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一株两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166,该菌株与归一化后的GDMCC NO:60940相比,小肠推进率能够明显增加48.35%,同时生长抑素的含量能够降低11.96%,使菌株在缓解便秘方面发挥出更加优异的效果,提供相应益生菌制剂、功能性食品,从而预防便秘,或使便秘患者能逐步摆脱药物治疗的副作用与局限性。

[0013] 本发明提供了一株两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*),所述两歧双歧杆菌于2021年1月29日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:61481。

[0014] 所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)是来源于江苏省苏州市自然分娩母乳喂养的男婴粪便样品,该菌株经测序分析,其16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示,将测序得到的序列在NCBI Standard Nucleotide BLAST中进行核酸序列比对,结果显示与双歧杆菌属的核酸序列相似度为99.55%;结果显示菌株为两歧双歧杆菌,将其命名为两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166具有如下特性:

[0016] (1) 菌体特征:为革兰氏染色阳性的无芽孢杆菌,在pH 3.0-8.0环境条件下生长良好。菌体约 $0.5-1.3\mu\text{m}\times 1.5-8\mu\text{m}$,分枝甚多,多形性明显;其菌株的一般特征是均一或分枝或分叉的Y和V类型,以及棍棒状或匙状类型,单生、成对、有时呈链。

[0017] (2) 菌落特征:在含0.1%L-半胱氨酸盐酸盐的MRS培养基上划线培养48h后形成明显的菌落,直径在0.2-2.5mm之间,圆形,凸面或透镜状,微白,不透明,有平滑至粘液状的柔软表面,不形成菌丝体;MRS培养基深层菌落的形态不定,靠近表面不生长。

[0018] (3) 生长特性:该菌株最适生长温度为36-38℃,32-38℃生长良好,但是能够在45℃下进行生长,成活率高达85%;最适初始pH为6-7,pH 5.5或以下生长较少;在含有葡萄糖的培养液中厌氧培养生长良好,培养20h即进入对数后期或稳定前期,液体管混浊,最终pH为4.0-4.8。

[0019] (4) 对模拟胃肠液具有较好的耐受能力。

[0020] (5) 具有粘附性,能够较好的粘附在结肠癌细胞HT-29上。

[0021] (6) 能显著提高便秘小鼠的肠道菌群丰富度、粪便含水量、小肠推进率以及降低首粒黑便时间,调节血清中胃肠活性肽的含量,并且改变结肠组织中一些特殊基因的表达,将盲肠内容物中乙酸、丙酸与丁酸的含量显著提高68.59%、100.06%与77.34%;其缓解便秘的效果良好。

[0022] (7) 与归一化后的GDMCC NO:60940相比,小肠推进率能够明显增加48.35%,同时生长抑素的含量能够降低11.96%。

[0023] (8) 对于提高粪便中双歧杆菌属丰度有非常明显的效果,能够显著提高0.8627%。

[0024] 本发明还提供了一种含有上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)

CCFM1166的微生物制剂。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166在微生物制剂中的添加量不低于 1×10^8 CFU/g或 1×10^8 CFU/mL。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述微生物制剂为固体制剂或液体制剂。

[0027] 本发明还提供了上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166,或上述微生物制剂在制备含有缓解便秘产品中的应用。

[0028] 在本发明的一种实施方式中,所述产品中,所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的添加量不低于 1×10^8 CFU/g或 1×10^8 CFU/mL。

[0029] 本发明还提供了一种可缓解便秘的产品,所述产品中含有上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166。

[0030] 在本发明的一种实施方式中,所述产品中,所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的添加量不低于 1×10^8 CFU/g或 1×10^8 CFU/mL。

[0031] 在本发明的一种实施方式中,所述产品为食品、药品或保健品。

[0032] 在本发明的一种实施方式中,所述食品为使用两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166,或上述微生物制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品。

[0033] 在本发明的一种实施方式中,所述乳制品包括发酵乳、风味发酵乳、发酵乳饮料等、奶油、乳酪、含乳饮料或乳粉;所述豆制品包括豆奶、豆乳粉;所述果蔬制品包括以白菜、白萝卜、黄瓜、甜菜、黄桃或杨梅制品中至少一种为原料制得的果蔬制品。

[0034] 在本发明的一种实施方式中,所述食品为发酵食品,包括固态食品、液态食品或半固态食品。

[0035] 在本发明的一种实施方式中,所述食品为含有上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166,或上述微生物制剂的饮料或零食。

[0036] 在本发明的一种实施方式中,所述药品含有上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166、药物载体和/或药用辅料。

[0037] 在本发明的一种实施方式中,所述载体包括医学上通常使用的填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂中的一种或多种。

[0038] 在本发明的一种实施方式中,所述药物的剂型是颗粒剂、胶囊剂、片剂、丸剂或口服液。

[0039] 本发明还提供了一种上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166在制备具有如下至少一种功能的药物或功能性食品中的应用:

[0040] (a) 提高粪便含水量、提高小肠推进率/全肠道的蠕动;

[0041] (b) 上调血清中胃动素含量、下调血清中生长抑素含量、下调结肠组织中水通道蛋白的基因表达、上调结肠组织中干细胞因子受体c-kit基因的表达;

[0042] (c) 增加结肠组织中血清素的水平;

[0043] (d) 增加肠道菌群的多样性,显著提高粪便中双歧杆菌属的丰度;

[0044] (e) 显著提高盲肠内容物中SCFA的含量;

[0045] (f) 缓解便秘。

[0046] 本发明还提供了一种组合物,所述组合物含有上述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的活菌。

[0047] 在本发明的一种实施方式中,所述组合中两歧双歧杆菌的活菌数量 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g或 1×10^8 CFU/mL。

[0048] 本发明还提供一种含有所述两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的益生菌制剂,所述菌剂为将含有两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的菌液干燥得到的粉剂。

[0049] 在本发明的一种实施方式中,所述干燥是指真空冷冻干燥。

[0050] 在本发明的一种实施方式中,所述菌剂中两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166的活菌数量 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g。

[0051] 有益效果

[0052] (1) 本发明的两歧双歧杆菌GDMCC No:61481容易活化,具有一定的耐酸碱性与粘附性,能显著提高便秘小鼠肠道菌群的多样性、粪便含水量、小肠推进率以及降低首粒黑便时间,其中针对便秘小鼠粪便干硬的症状,具有很好地治疗效果,能够比对照小鼠粪便含水量显著提高6.57%,很好地达到治疗效果;有效调节血清中兴奋型与抑制型胃肠活性肽的含量,将MTL的含量恢复甚至略高于对照小鼠,利于肠道推进,达到恢复健康水平的最终目的;能够将盲肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸的含量分别提高68.59%、100.06%与77.34%,效果显著,与酚酞药物相比同样具有对粪便含水量、小肠推进率、首粒黑便时间、短链脂肪酸等有更加突出的效果;且与归一化后的GDMCC NO:60940相比,两歧双歧杆菌CCFM1166比GDMCC NO:60940更能显著提高血清中MTL的含量,发挥出MTL对胃液分泌以及胃肠道肌肉收缩的作用,从而能够更加显著地提高小肠推进率,从而促进肠道蠕动,有效缓解便秘。

[0053] (2) 本发明的两歧双歧杆菌GDMCC No:61481还能够调节结肠组织中水通道蛋白8与肠道收缩细胞发育相关的受体基因表达,增加结肠组织中血清素的水平,同时显著改善粪便中双歧杆菌属的丰度水平,增加肠道有益菌的定殖,效果比酚酞药物更加明显,并且同时避免一些泻药存在的副作用,因此,本发明可以视为一种缓解或治疗便秘的药物,还可以应用于药品或者是一些发酵食品以及功能性食品中,从而广泛发挥其作用,具有非常有价值的应用前景。

[0054] 生物材料保藏

[0055] 一株两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166,其分类学命名为:*Bifidobacterium bifidum*,已于2021年1月29日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No: 61481,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,广东省微生物研究所。

一株长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum* subsp.*longum*) CCFM1113,其分类学命名为:*Bifidobacterium longum* subsp.*longum*,已于2019年12月30日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC NO:60940,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼 广东省微生物研究所。

附图说明

[0056] 图1:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株对用洛哌丁胺诱导产生便秘的小鼠缓解便秘相关指标(排首粒黑便时间、粪便含水量、小肠推进率)的示意图。

[0057] 图2:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺

诱导便秘的小鼠血清中生长抑素(SS)含量变化示意图。

[0058] 图3:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺诱导便秘的小鼠血清中胃动素(MTL)含量变化示意图。

[0059] 图4:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺诱导便秘的小鼠结肠中干细胞因子受体(c-kit)基因表达量变化示意图。

[0060] 图5:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺诱导便秘的小鼠结肠组织中水通道蛋白8(AQP8)表达量变化示意图。

[0061] 图6:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺诱导便秘的小鼠粪便中双歧杆菌属丰度的变化示意图。

[0062] 图7:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166菌株干预后,洛哌丁胺诱导便秘的小鼠盲肠内容物中短链脂肪酸的变化示意图。

具体实施方式

[0063] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0064] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0065] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0066] 下述实施例中所涉及的雄性C57BL/6J小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

[0067]

[0068]

[0069] 下述实施例中所涉及的培养基如下:

[0070] MRS液体培养基:牛肉膏10g;胰蛋白胨10g;酵母粉5g;葡萄糖20g;无水乙酸钠5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g;柠檬酸氢二铵2g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g;吐温80 1mL; L-半胱氨酸盐酸盐0.8g;调节pH为 6.8 ± 0.2 ;定容至1L。高压灭菌 $115^\circ C$ 20min。

[0071] MRS固体培养基:在MRS液体培养基的基础上添加2%琼脂粉。

[0072] MRS+质量百分数(0.05%-0.1%)半胱氨酸的液体培养基:在MRS液体培养基的基础上添加0.08%半胱氨酸盐酸盐。

[0073] 下述实施例中所涉及的两歧双歧杆菌菌悬液的制备

[0074] 将两歧双歧杆菌接种至MRS固体培养基中,在 $37^\circ C$ 条件下培养72h得到单菌落,将制备得到的单菌落接种至MRS液体培养基中,在 $37^\circ C$ 条件下培养24h进行活化;

[0075] 将活化3代后的菌液以2%(v/v)的接种量接种至1L MRS液体培养基中,振荡混匀后于厌氧培养箱中 $37^\circ C$ 培养24h。在8000g/min, $4^\circ C$ 的条件下离心15min,去上清后,用含

0.05%-0.1%L-半胱氨酸盐酸盐的无菌生理盐水清洗2次,同样以相同条件进行离心,去上清后,用30%的甘油进行重悬,获得灌胃前备用菌液,-80℃冰箱冻存一周。

[0076] 在进行动物实验前,将冰箱中冻存的菌液取出,以6000r/min离心5min,再用无菌生理盐水清洗两遍,用10%脱脂乳重悬菌液,震荡均匀后用平板倾注法测定初始和冻存一周后的活菌数量。

[0077] 实验结果:初始活菌数为 7×10^9 CFU/mL,1周后活菌数为 5×10^9 CFU/mL,数量级并没有产生变化,说明将菌液冻存后不会对实验产生影响,可用于动物实验。

[0078] 下述实施例中所涉及的检测方法如下:

[0079] c-kit基因的表达量的检测如下:

[0080] 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)来测定c-kit基因的表达量,首先要从新鲜组织中提取RNA,具体方法如下:

[0081] 将小鼠解剖后取出的新鲜结肠组织0.2g在加有液氮的研钵(180℃,4h高温灭酶)中反复研磨,再向研钵中加入1mL Trizol试剂,继续研磨,待液体基本澄清后,收集至1.5mL无酶离心管中,室温静置15min,向离心管中加入200 μ L三氯甲烷溶液,轻摇15s,室温静置10min,4℃、12000r/min离心15min,取600 μ L上层无色水相至另一只无酶离心管中,加入500 μ L异丙醇。上下颠倒混匀,室温下静置10min,静置结束后,4℃、12000r/min离心10min,弃去上清,留下RNA在离心管底部形成的白色沉淀,加入1mL用DEPC水配制的75%的乙醇溶液,漩涡震荡重悬,4℃、7500r/min离心5min,弃去上清,室温自然挥发干燥。向干燥的RNA中加入30 μ L RNase free water,待RNA溶解后,以Nanodrop测定RNA浓度及纯度,并通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。以提取的总RNA为模板,根据康维世纪公司的HiFiScript gDNA RemovaL RT MasterMix反转录试剂盒说明书操作步骤逆转录合成cDNA,-20℃下保存。小鼠c-kit蛋白基因和内参基因mGAPDH基因引物如表1所示,

[0082] 表1小鼠c-kit蛋白基因和mGAPDH基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
[0083] <i>c-kit</i>	F:5'- GCAGGTTGTCCAACCTTATTGAGA-3'
	R:5'- GCAGTTTGCCAAGTTGGAGT-3'
<i>mGAPDH</i>	F:5'- TCCTGCACCACCAACTGCT-3'
[0084]	R:5'- GTCAGATCCACGACGGACACA-3'

[0085] qRT-PCR反应体系及条件:

[0086] 用Bio-Rad®CFX96TM实时荧光定量PCR仪进行PCR扩增,并读取荧光信号。

[0087] c-kit基因qRT-PCR反应体系为:

	iTaq™ UniversaL SYBR® Green Supermix	5 μL
	上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
[0088]	下游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
	cDNA模板	1 μL
	ddH ₂ O	3 μL

[0089] c-kit基因qRT-PCR反应条件为:

[0090] 95℃ 30s; 95℃ 10s, 60℃ 30s, 共40个循环。以mGAPDH基因作为内参基因, 通过CFX96Manager软件分析结果。

[0091] AQP8基因的表达量的检测方法如下:

[0092] 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)来测定AQP8基因的表达量。取超低温冰箱冻存新鲜结肠组织, 按说明书用Trizol法提取总RNA, 具体方法如下:

[0093] 将小鼠解剖后取出的新鲜结肠组织0.2g在加有液氮的研钵(180℃, 4h高温灭酶)中反复研磨, 再向研钵中加入1mL Trizol试剂, 继续研磨, 待液体基本澄清后, 收集至1.5mL无酶离心管中, 室温静置15min, 向离心管中加入200μL三氯甲烷溶液, 轻摇15s, 室温静置10min, 4℃、12000r/min离心15min, 取600μL上层无色水相至另一只无酶离心管中, 加入500μL异丙醇。上下颠倒混匀, 室温下静置10min, 静置结束后, 4℃、12000r/min离心10min, 弃去上清, 留下RNA在离心管底部形成的白色沉淀, 加入1mL用DEPC水配制的75%的乙醇溶液, 漩涡震荡重悬, 4℃、7500r/min离心5min, 弃去上清, 室温自然挥发干燥。向干燥的RNA中加入30μL RNase free water, 待RNA溶解后, 以Nanodrop测定RNA浓度及纯度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。以提取的总RNA为模板, 根据康维世纪公司的HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix反转录试剂盒说明书操作步骤逆转录合成cDNA, -20℃下保存。

[0094] 小鼠AQP8蛋白基因和内参基因mGAPDH基因引物如表2所示,

[0095] 表2小鼠AQP8蛋白基因和mGAPDH基因引物序列

目的基因	引物序列 (5'-3')
[0096] <i>AQP8</i>	F:5'- TGTGTAGTATGGACCTACCTGAG -3'
	R:5'- ACCGATAGACATCCGATGAAGAT -3'
[0097] <i>mGAPDH</i>	F:5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
	R:5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

[0098] qRT-PCR反应体系及条件:

[0099] 用Bio-Rad® CFX96™实时荧光定量PCR仪进行PCR扩增, 并读取荧光信号。

[0100] c-kit基因qRT-PCR反应体系为:

	iTaq™ UniversaL SYBR® Green Supermix	5 μL
	上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
[0101]	下游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
	cDNA模板	1 μL
	ddH2O	3 μL

[0102] AQP8基因qRT-PCR反应条件为:

[0103] 95℃ 30s; 95℃ 10S, 60℃ 30S, 共40个循环。以mGAPDH基因为内参基因, CFX96Manager 软件分析结果。

[0104] 小鼠粪便中微生物丰度的检测方法如下:

[0105] 从-80℃冰箱中取出小鼠粪便200mg,按照Fast DNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, catalog No.6570200)试剂盒的相关说明书进行提取,从而获得宏基因组DNA,并将所得的DNA进行PCR。

[0106] 50μL的PCR的体系为:

[0107] 2Taq Plus MasterMix (Dye) 25μL,上游引物(10μmol/L) 1μL,下游引物(10μmol/L) 1 μL,cDNA模板1μL,ddH2O 22μL。

[0108] PCR反应条件为:

[0109] 95℃5min;95℃30s,52℃30s,72℃30s,共40个循环;72℃7min;12℃5min。

[0110] PCR后,于4%核酸染料,1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,将所得的条带分装于2ml的EP管中,使用DNA Gel/PCR Purification Miniprep Kit (Biomiga,BW-DC3511-01)按照相关说明进行纯化回收。通过NanoDrop测定所提取的DNA浓度,将样品进行等浓度混样,并建立相应文库用MiSeq测序器测序(Illumina,Santiago,CA,USA)。

[0111] 下述实施例中所涉及的盲肠内容物中短链脂肪酸的浓度的检测方法如下:

[0112] 将实验结束前所收集的盲肠内容进行冷冻干燥,计算出盲肠内容物的干重,并冻存于-80℃。具体方法如下:

[0113] 称取20mg盲肠内容物,用500μL饱和NaCl溶液重悬,加入20μL 10%H₂SO₄溶液;加入1000μL无水乙醚,震荡均匀,提取脂肪酸,然后12000rpm 4℃离心15min;取上层乙醚相,加入0.25g无水Na₂SO₄进行干燥;静置30min后12000rpm 4℃离心5min取上层乙醚相,利用GC-MS测定小鼠冻干盲肠内容物中的短链脂肪酸含量。使用Rtx-Wax柱(柱长30m,内径25μm);载气为He,流速为2mL/min;进样体积1μL,按7.5℃/min升温至140℃,然后按60℃/min升温至200℃保持3min,离子化温度为20℃;分析采用全扫描模式,为通过外标法测得标准曲线,从而计算出各种短链脂肪酸的浓度。

[0114] 实施例1:两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)CCFM1166的获得

[0115] 具体步骤如下:

[0116] 1、双歧杆菌菌株的分离筛选:

[0117] (1)使用一次性无菌取便器采集江苏省苏州市自然分娩母乳喂养的男婴粪便样品,将粪便样品在含有低聚果糖的MRS+质量分数(0.05%-0.1%)半胱氨酸的液体培养基中,于厌氧培养箱(N₂:CO₂:H₂=80:10:10)中富集12h;

[0118] (2)将粪便样品用无菌生理盐水进行梯度稀释后涂布于添加了无菌的100μg/mL莫

匹罗星、50U/mL制霉菌素的MRS+质量分数(0.05%-0.1%)L-半胱氨酸盐酸盐的固体平板上,培养24-48h;

[0119] (3) 选取符合双歧杆菌基本形态的单菌落进行平板划线纯化,筛选分离出双歧杆菌所选菌株;

[0120] (4) 将上述单菌落培养于液体MRS+质量分数(0.05%-0.1%)半胱氨酸培养液中培养24h后进行革兰氏染色,选取革兰氏两歧双歧杆阳性菌进行后续试验。

[0121] 2、双歧杆菌的初步鉴定:果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶测定法

[0122] (1) 将步骤1所筛选得到的双歧杆菌乳酸菌在液体MRS+质量分数(0.05%-0.1%)半胱氨酸培养基中培养24h,然后取1mL培养物8000rpm离心2min;

[0123] (2) 用含0.05%(质量分数)半胱氨酸的pH 6.5的0.05M KH_2PO_4 溶液洗涤两次;

[0124] (3) 重悬于200 μL 添加了0.25%(质量分数)Triton X-100的上述磷酸盐缓冲液;

[0125] (4) 添加50 μL 浓度为6mg/mL氟化钠和10mg/mL碘乙酸钠的混合液以及50 μL 浓度为80mg/mL的果糖-6-磷酸,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1h;

[0126] (5) 添加300 μL 浓度为0.139g/mL、pH 6.5的盐酸羟胺,并于室温放置10min;

[0127] (6) 分别添加200 μL 15%(质量分数)的三氯乙酸和4M HCl;

[0128] (7) 添加200 μL 含有5%(质量分数)三氯化铁的0.1M HCl,若体系迅速变为红色,即为F6PPK阳性,可初步断定其为双歧杆菌。

[0129] 3、双歧杆菌的分子生物学鉴定

[0130] (1) 取步骤2筛选出并且活化3代的菌体(培养12-48h)1mL用于菌种鉴定,6000r/min离心3min,弃上清得菌体。

[0131] (2) 加入1mL无菌水吹打洗菌体后,10000r/min离心1min,弃上清得菌体,加入500 μL 无菌水重悬,作为菌液模板。

[0132] (3) 16S rDNA PCR体系:

[0133] A.细菌16S rDNA,20 μL PCR反应体系:

[0134] 27F,0.5 μL ;1492R,0.5 μL ;Taq酶,1 μL ;模板,1 μL ;ddH₂O,8 μL 。

[0135] B.PCR条件:

[0136] 94 $^\circ\text{C}$ 5min;94 $^\circ\text{C}$ 30s;55 $^\circ\text{C}$ 30s;72 $^\circ\text{C}$ 2min;72 $^\circ\text{C}$ 10min;step2-4 30 \times ;12 $^\circ\text{C}$ 2min。

[0137] (3) 制备1%琼脂糖凝胶,之后将PCR产物与10000 \times Loading buffer混合,上样量2 μL ,120V跑30min,然后进行凝胶成像;

[0138] (4) 将16S rDNA的PCR产物进行测序分析,其测序结果为序列如SEQ ID NO.1所示,并将得到的序列结果使用BLAST在GenBank中进行搜索和相似性比对,选取测序结果,结果显示菌株为两歧双歧杆菌,将其命名为两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166, -80 $^\circ\text{C}$ 保藏备用。

[0139] 实施例2:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166对洛哌丁胺诱导产生便秘相关症状的缓解

[0140] 具体步骤如下:

[0141] (1) 两歧双歧杆菌CCFM1166菌悬液的制备

[0142] 将两歧双歧杆菌CCFM1166菌种于-80 $^\circ\text{C}$ 冰箱取出后,划线于MRS固体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 培养48h,挑取单菌落于MRS液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 培养24h,制备得到种子液;

[0143] 将制备得到的种子液以2% (v/v) 的接种量接种于新的MRS液体培养基中,于37℃培养24h,按照同样的方式再次培养一代,制备得到两歧双歧杆菌CCFM1166发酵液;

[0144] 然后将制备得到的两歧双歧杆菌CCFM1166发酵液在6000r/min、4℃条件下离心5min,然后用10% (质量体积比w/v) 的脱脂乳进行重悬,制得菌悬液,用于动物实验。

[0145] (2)取6周龄的健康雄性C57BL/6J小鼠25只,适应环境1周,随机分为5组:

[0146] 对照组、模型组、酚酞组(治疗组)、两歧双歧杆菌CCFM668组(两歧双歧杆菌CCFM668 菌株公开于“*Bifidobacteria exert species-specific effects on constipation in BALB/c mice*.*Food& Function*,2017,8(10):3587-3600”的文章中)、两歧双歧杆菌干预组(CCFM1166),每组含小鼠5只,灌胃菌悬液的剂量为 5×10^9 CFU/mL,每天早上9点开始灌胃,每次0.2mL。

[0147] 实验动物分组及处理方法见表3:

[0148] 表3实验动物分组

[0149]

组别	只数/组	处理方法	
对照组	5	第1天-第30天每天灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液	第31天-38天,先灌胃0.2mL生理盐水,1h后再灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液
模型组	5		第31天-38天,先灌胃0.2mL生理盐水重悬的洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),1h后再灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液
酚酞组	5	第1天-第30天每天灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液	第31天-38天,先灌胃0.2mL生理盐水重悬的洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),1h后再灌胃0.2mL 酚酞溶液(70mg/kg b.w)
CCFM1166组	5	第1天-第30天每天灌胃0.2mL用10%的脱脂乳溶液重悬的菌悬液	第31天-38天,先灌胃0.2mL生理盐水重悬的洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),1h后再灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液重悬的菌悬液
CCFM668组	5	第1天-第30天每天灌胃0.2mL用10%的脱脂乳溶液重悬的菌悬液	第31天-38天,先灌胃0.2mL生理盐水重悬的洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),1h后再灌胃0.2mL 10%的脱脂乳溶液重悬的菌悬液

[0150] 在第38天,灌胃结束后,将小鼠单只放入垫有吸水纸的笼盒中,收集粪便,称重即为湿重,冻干后,即为干重,按照如下公式计算粪便含水量。

[0151] 粪便含水量(%) = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重。

[0152] 在第39天,空白对照组给予0.2mL生理盐水;模型组、酚酞组和灌菌组均给予0.2mL盐酸洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),1h后,分别向每组灌胃墨汁,从灌胃墨汁开始,记录每一只小鼠排首粒黑便的时间。

[0153] 第39天,各组小鼠禁食不禁水过夜。第40天上午9点空白对照组给予0.2mL生理盐

水,模型组、酚酞组和灌菌组均给予0.2mL盐酸洛哌丁胺溶液(10mg/kg b.w),30min后,各组分别灌胃墨汁,30min后处死小鼠,打开腹腔,剪取上端自幽门,下端至盲肠,测量小肠全长为“小肠总长度”,从幽门到墨汁前沿为“墨汁推进长度”,按照以下公式计算小肠推进率。

[0154] 小肠推进率(%) = (墨汁推进长度(cm)) / (小肠总长度(cm)) × 100 粪便含水量、排首粒黑便时间、小肠推进率实验结果如图1所示,由图1可知,两歧双歧杆菌CCFM1166组相对于便秘模型组,灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166能显著提高小肠推进率、提高粪便含水量,其中灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166后小肠推进率可达74.15%,比便秘模型组提高了138.35% ($P < 0.0001$),粪便含水量可达61.98%,比便秘模型组提高了29.45% ($P < 0.0001$);与对照小鼠相比,粪便含水量显著提高6.57%,同时与酚酞组(粪便含水量53.84%,小肠推进率44.47%)相比,粪便含水量提高了15.11%,小肠推进率提高了66.74%,表明两歧双歧杆菌CCFM1166对粪便含水量与小肠推进率的效果明显优于酚酞药物。因此,两歧双歧杆菌CCFM1166在恢复便秘小鼠粪便干硬与小肠蠕动缓慢的症状具有良好效果。

[0155] 灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166后在一定程度上缩短排首粒黑便时间(为172.4min),比便秘模型组缩短了10.11%;与酚酞组(首粒黑便时间189min)相比,首粒黑便时间降低了8.99%,且提高小肠推进率要优于两歧双歧杆菌CCFM668(小肠推进率为47.06%),证明两歧双歧杆菌CCFM1166对小肠推进率的作用更为显著($P < 0.0001$),这说明它对小肠的影响更为显著。

[0156] 总体来说,两歧双歧杆菌CCFM1166具有良好的缓解便秘效果。

[0157] 实施例3:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) CCFM1166可显著降低便秘小鼠血清中生长抑素(SS)的含量

[0158] 具体步骤如下:

[0159] (1) C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。

[0160] (2) 第40天处死小鼠后,将收集到的小鼠血液静置2h,3000×g离心15min后获得血清,采用生长抑素(SS)检测试剂盒,根据说明书进行实验,由标准曲线计算出血清中SS的浓度。

[0161] 有研究表明生长抑素作为一种作用广泛的神经激素,它能够抑制各种胃肠激素的释放,例如,胃泌素、胃动素、胰高血糖素以及降钙素等。因此,它对胃肠运动具有一定的抑制作用。

[0162] 实验结果如图2所示,由图2可知,模型组(含量为6.410ng/L)与对照组相比,生长抑素SS有明显增加($P = 0.0181$),CCFM668也能显著降低SS的含量(含量为4.978ng/L) ($P < 0.0001$)。但是两歧双歧杆菌CCFM1166组(含量为4.908ng/L)相比于模型组,SS的含量降低了23.43%,相比于酚酞组(含量为6.106ng/L),SS的含量降低了19.62%;两歧双歧杆菌CCFM1166组相比较于CCFM668组能够下降1.41%,它下调便秘小鼠血清中SS的含量更为显著($P < 0.0001$)。

[0163] 实施例4:两歧双歧杆菌CCFM1166可提高便秘小鼠血清中胃动素(MTL)的含量

[0164] 具体步骤如下:

[0165] (1) C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。

[0166] (2) 第40天处死小鼠后,将收集到的小鼠血液静置2h,3000×g离心15min后获得血清,采用胃动素(MTL)检测试剂盒,根据说明书进行实验,由标准曲线计算出血清中MTL的浓

度。

[0167] 结果如图3所示,模型组与对照组相比,其血清中MTL出现了显著降低的现象,从文献中可知,MTL是由22个氨基酸组成的多肽,分布在全部小肠,能够促进和影响胃肠运动及胃肠道对水、电解质的运输,从而促进胃的收缩与肠道蠕动,血清中MTL的含量越高,其对胃的收缩与肠道蠕动的促进作用就越强。

[0168] 从图3中可以看出,两歧双歧杆菌CCFM1166能显著提升便秘小鼠血清中MTL的含量,此 MTL的含量为323.3ng/L,使其含量能够与空白对照组(此时,MTL的含量为321.3ng/L)相近($P < 0.0001$),甚至提高0.62%,且增加的效果比CCFM668更为明显,同时与酚酞组(此时,MTL的含量为225.6ng/L)相比,增加了43.31%。

[0169] 因此,两歧双歧杆菌CCFM1166可以通过提高血清中MTL的含量,促进胃与肠道的收缩与蠕动,从而有效缓解便秘。

[0170] 实施例5:两歧双歧杆菌CCFM1166可提高便秘小鼠结肠组织中c-kit基因表达量

[0171] C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。

[0172] 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)来测定c-kit基因(干细胞因子受体)的表达量。

[0173] Cajal间质细胞(ICC)是肠道的起搏细胞,能够控制平滑肌电慢波的产生,而电慢波决定平滑肌的收缩活动,因此,ICC在肠道蠕动方面具有不可替代的作用。ICC的生长与发育离不开c-kit基因,因此,需要检测c-kit基因的表达量来表示发挥作用的ICC的数量。

[0174] 实验结果如图4所示,由图4可知,灌胃洛哌丁胺后,便秘模型小鼠的c-kit蛋白表达量显著下降,说明便秘小鼠结肠组织中ICC的数量有明显下降,而灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166后,结肠组织中c-kit基因的相对表达量(相对表达量为2.291)与模型组(相对表达量为0.8311)相比显著提高1.757倍,证明Cajal间质细胞的数量得到了显著提高($P = 0.0078$),同时,与酚酞药物(相对表达量为0.8455)相比,显著提高了170.96%,效果较酚酞更为突出。

[0175] 因此,两歧双歧杆菌CCFM1166可以通过促进c-kit基因的表达,有利于增加便秘小鼠肠道Cajal细胞的数量,从而促进肠道平滑肌收缩,缓解便秘。

[0176] 实施例6:两歧双歧杆菌CCFM1166可降低便秘小鼠结肠组织中AQP8基因表达量

[0177] C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)来测定AQP8基因的表达量。

[0178] 水通道蛋白(AQP)是指一类可以高效选择性转运水分子的细胞膜通道蛋白,其中,AQP8主要参与空肠和结肠大量水分子的转运,AQP8表达的异常会导致水分吸收及肠液分泌的异常。当AQP8的表达量增高时,结肠会对粪便中吸水增加,从而导致粪便含水量下降,粪便干结,不易排出。

[0179] 实验结果如图5所示,由图5可知,灌胃洛哌丁胺后,便秘模型小鼠的AQP8蛋白表达量与对照组相比有显著上升($P = 0.0003$),从而导致粪便中水分被过度吸收,使粪便干硬。灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166后,其AQP8蛋白表达量显著下降,此时的AQP8蛋白相对表达量为0.6100,与模型组(AQP8蛋白相对表达量为1.256)相比,其AQP8蛋白表达量比模型组降低了51.43%($P = 0.0118$)。此外,与酚酞组(AQP8蛋白相对表达量为0.9559)相比,其AQP8蛋白表达量比降低了36.19%。

[0180] 因此,两歧双歧杆菌CCFM1166能够通过降低便秘小鼠结肠中AQP8蛋白的表达量,避免粪便中水分的过度吸收,从而提高便秘小鼠的粪便含水量,使粪便更容易排出。

[0181] 实施例7:两歧双歧杆菌CCFM1166显著调节小鼠粪便中微生物的丰度

[0182] C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。

[0183] 将下机数据进行分析后,结果如图6所示,

[0184] 结果显示,模型组与酚酞组小鼠粪便中几乎不存在双歧杆菌属,但是对照组中双歧杆菌属的丰度为0.3873%,使其丰度有所增加($P=0.0951$)。同时,模型组中粪杆菌属的丰度较对照组与酚酞组分别来说增加了139.26%与15.06%(模型组的粪杆菌属丰度为9.336%,对照组为3.902%,酚酞组粪杆菌属丰度为8.114%),而模型组艾克曼菌属的丰度比对照组与酚酞组下降了26.96%与18.76%(模型组的艾克曼菌属丰度为6.149%,对照组为8.419%,艾克曼菌属丰度为7.569%)。

[0185] 灌胃两歧双歧杆菌CCFM668与CCFM1166后,CCFM668组中双歧杆菌属丰度为0.7324%,艾克曼菌属丰度为9.723%。CCFM1166组中双歧杆菌属丰度为0.8627%,艾克曼菌属丰度为10.31%。双歧杆菌属与艾克曼菌属的丰度都有明显增加(对于艾克曼属 $P_{CCFM668}=0.0684$, $P_{CCFM1166}=0.0364$),其中双歧杆菌属丰度的变化最为显著(对于双歧杆菌属 $P_{CCFM668}=0.0034$, $P_{CCFM1166}=0.0008$)。但是,灌菌后粪杆菌属的丰度有显著下降,CCFM668组中粪杆菌属丰度为5.097%,CCFM1166组中粪杆菌属丰度为4.604%,与对照组的丰度相近(对于粪杆菌属 $P_{CCFM668}=0.0046$, $P_{CCFM1166}=0.0019$)。因此,两歧双歧杆菌CCFM1166干预后,对于提高双歧杆菌属丰度、降低粪杆菌属丰度,具有突出作用,能够通过调节便秘小鼠的肠道菌群,维持菌群稳态,从而缓解便秘。

[0186] 实施例8:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)CCFM1166提高便秘小鼠盲肠内容物中短链脂肪酸含量

[0187] 具体步骤如下:

[0188] C57BL/6J小鼠分组、造模及处理方法同实施例2。

[0189] 将实验结束前所收集的盲肠内容物进行冷冻干燥,利用GC-MS测定小鼠冻干盲肠内容物中的短链脂肪酸含量。从而计算出各种短链脂肪酸的浓度。

[0190] 实验结果如图7所示,用洛哌丁胺造模后,模型组小鼠盲肠内容物中乙酸、丁酸与丙酸的含量与对照组相比都有一定程度的降低,其中模型组乙酸含量为73.79 $\mu\text{mol/g}$,丁酸含量为15.59 $\mu\text{mol/g}$,丙酸含量为17.74 $\mu\text{mol/g}$,分别比空白组下降了40.49%、29.8%与26.14% ($P_{\text{乙酸}}=0.0066$, $P_{\text{丁酸}}=0.2619$, $P_{\text{丙酸}}=0.0954$)。酚酞组中乙酸含量为69.10 $\mu\text{mol/g}$,丁酸含量为17.83 $\mu\text{mol/g}$,丙酸含量为16.97 $\mu\text{mol/g}$,只有丁酸含量比模型组提高了14.37% ($P_{\text{乙酸}}=0.7787$, $P_{\text{丁酸}}=0.6998$, $P_{\text{丙酸}}=0.8308$)。但灌胃两歧双歧杆菌CCFM1166后,乙酸、丁酸与丙酸的含量分别为124.4 $\mu\text{mol/g}$ 、31.19 $\mu\text{mol/g}$ 与31.46 $\mu\text{mol/g}$,较模型组相比存在显著上升,分别上升了68.59%、100.06%与77.34% ($P_{\text{乙酸}}=0.0092$, $P_{\text{丁酸}}=0.0189$, $P_{\text{丙酸}}=0.0018$),且比酚酞组的改善效果更好,分别较酚酞组提高了80.03%、74.93%、85.39%。而短链脂肪酸能够降低肠道pH值,促进肠道中钙镁离子的吸收,抑制有害菌的侵染,刺激肠道蠕动。

[0191] 因此,两歧双歧杆菌CCFM1166对于增加盲肠内容物中SCFA含量重要作用,主要是通过增加盲肠中乙酸、丁酸与丙酸的含量来缓解便秘。

[0192] 实施例9:两歧双歧杆菌CCFM1166能够比GDMCC NO:60940更好地增加血清中MTL的

含量,降低血清中SS的含量,且对小肠蠕动的推进作用更为显著

[0193] 将动物实验中CCFM1166与GDMCC NO:60940的结果与其模型组进行归一化后进行比较(造模及动物处理方法同实施例2,且MTL、SS与小肠推进率的测定方法完全相同),结果如表4所示:

[0194] 表4 CCFM1166与GDMCC NO:60940的结果比较

[0195]	分组	CCFM1166 组	GDMCC NO:60940 组	增长率 (%)
[0196]	MTL Mean±SD (归一化)	1.474±0.1659	1.278±0.1932	15.34
	小肠推进率 Mean±SD (归一化)	2.383±0.4545	1.607±0.2498	48.29

[0197] 从结果可以看出,两歧双歧杆菌CCFM1166比GDMCC NO:60940更能显著提高血清中MTL的含量,发挥出MTL对胃液分泌以及胃肠道肌肉收缩的作用,从而能够更加显著地提高小肠推进率,从而促进肠道蠕动,有效缓解便秘。

[0198] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

SEQUENCE LISTING

<110> 江南大学

<120> 一株缓解便秘并调节肠道菌群紊乱的两歧双歧杆菌及其应用

<130> BAA210350A

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 455

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```
agctggcggc ggcgtcgccg tcatcaaagt cggcgcggcc accgaggtcg aggccaagga 60
gcgtaagcac cgcctcgaag acgcccgtcg caacgcccaag gccgctatcg aagagggcct 120
gctgcccggc ggtggcgtgg cgtctgtcca ggctgcccaag aaggccgagt ccgcagaagc 180
cgtcacttcg ctgaccggcg aagaggccac tgggtgccgc atcgtgttcc gcgccatcga 240
ggccccgatc aagcagatcg ccgagaactc cggcgtgtcc ggtgacgtgg tgttcaacaa 300
ggttcgcbag ctgccggagg gtcagggttt caacgccgcc accgacacct acgaggatct 360
gctggccgcc ggcgtcgccg acccgggtcaa ggtcaccgcg tccgctctgc agaacgccgc 420
gtccatcgcc ggctgttcc tgacaccga ggccg 455
```

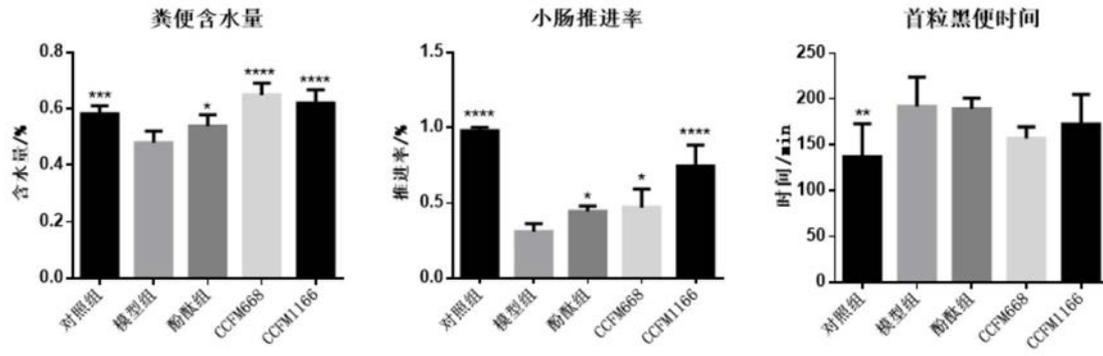


图1

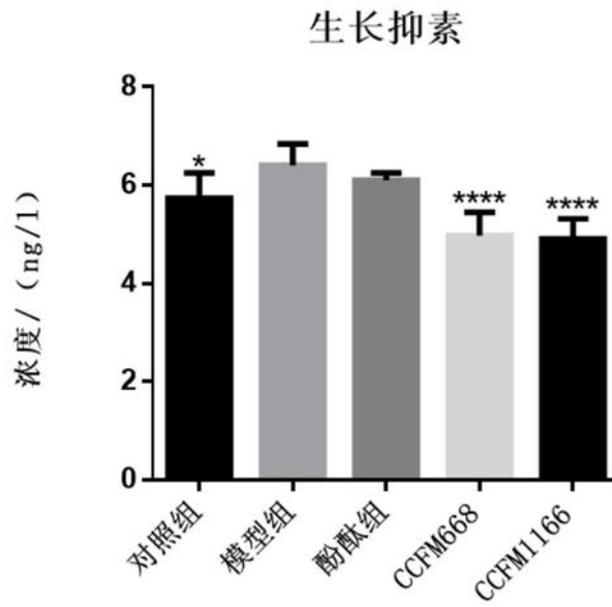


图2

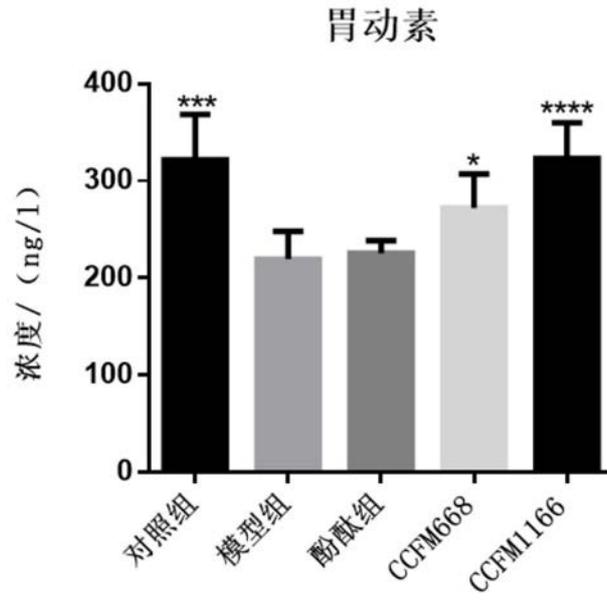


图3

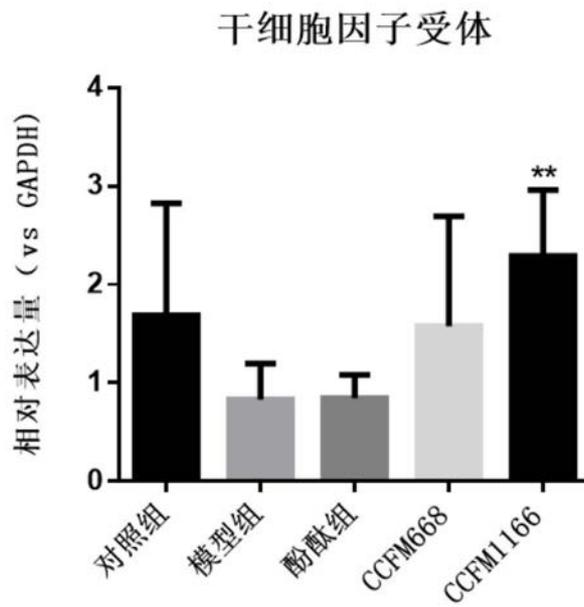


图4

水通道蛋白8

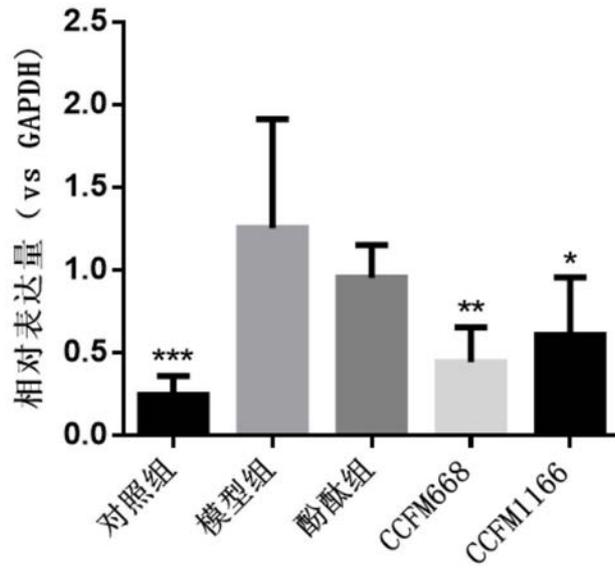


图5

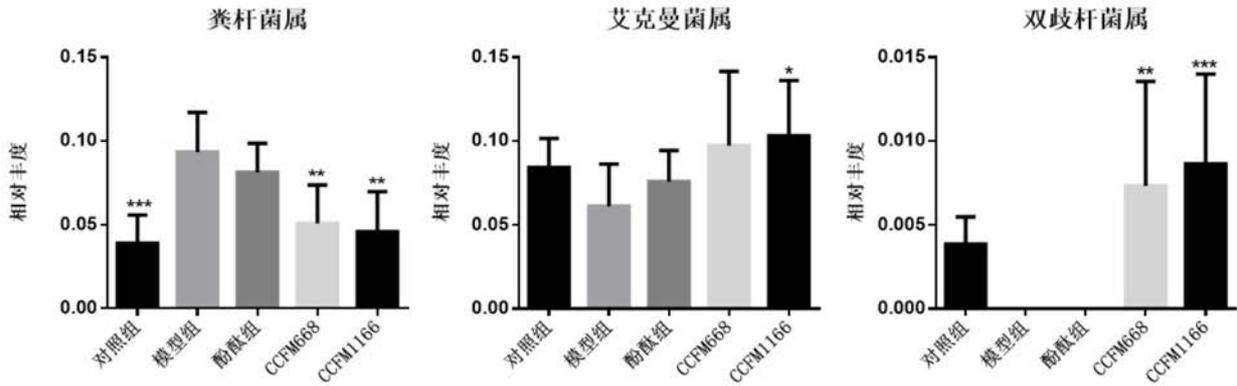


图6

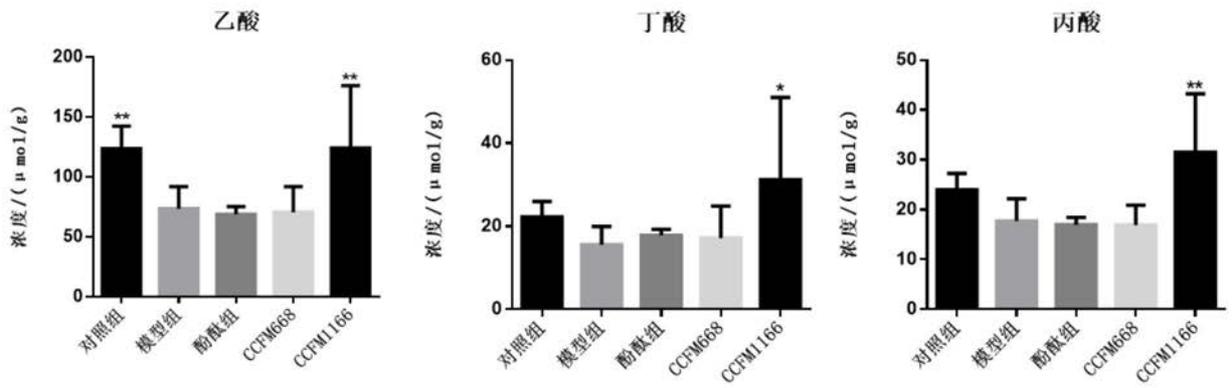


图7