

连翘叶提取物及其用于提高肠道 AKK 菌丰度的用途

技术领域

本发明属于医药技术领域，具体提供一种连翘叶提取物及其用于提高肠道
5 AKK 菌丰度的用途。

背景技术

随着基因组测序技术的发展，人们逐渐认识到了肠道菌群的重要性。肠道
菌群在宿主免疫调节，炎症反应和能量代谢中都起着至关重要的作用。嗜黏蛋
10 白艾克曼氏菌（*Akkermansiamuciniphila*）是一种椭圆形革兰氏阴性的存在于人
体肠道的原籍厌氧球菌，于 2004 年由荷兰环境微生物学家 Antoon Akkermans
等研究者分离纯化得到，并将其定名为 *Akkermansiamuciniphila*（简称 AKK 菌）。
该菌分布在人类的消化道中，约占人体主要微生物群落总数的 3-5%。当肠道中
AKK 菌的活性含量变低时，影响到黏膜层厚度，从而导致肠道的屏障保护功能
15 下降，引发肠道内的有毒物质、病原体更容易侵入人体进行危害，加大了患病
的机率，通过研究也总结出 AKK 菌的丰度会在伴有炎症性肠病、肥胖症等代
谢性疾病的患者体内有所下调。肠道微生物群组正在成为一种关键调节剂参与
多种系统的代谢，免疫和神经内分泌途径。AKK 菌的丰度被发现在疾病的发展
中起着关键的作用，AKK 菌对宿主的健康影响引起了人们越来越多的关注，有
20 实力成为潜在靶点以改善肥胖、抵抗糖尿病、抑制肝脏疾病和心脑血管系统紊
乱引发的疾病等。

连翘（*Forsythiasuspensa* (Thumb.) Vahl）属于木犀科（*Oleaceae*）连翘属
（*Forsythia*）的开花落叶灌木，广泛分布在我国山东，河南，河北，山西等省
份。现代研究发现，连翘中含有药物成分，但是目前关于连翘提取物在改善肠
25 胃功能方面鲜有报道。

发明内容

针对以上问题，本发明公开了一种连翘叶提取物的制备方法。

具体地，本发明实施例提供的连翘叶提取物的制备方法包括：

S1: 取连翘叶片，粉碎，加入溶剂 90℃ 以上处理 10~40min，过滤后加萃
5 取剂，萃取 6 小时以上，得到第一产物；

S2: 将所述第一产物过滤，取上清液，吸附，洗脱，并将洗脱液进行减压浓缩，获得第二产物；

S3: 将所述第二产物溶解，层析，然后洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，获得连翘叶提取物。

10 进一步地，步骤 S1 中所述溶剂为水，所述萃取剂为醇类，优选为乙醇。

进一步地，步骤 S2 中所述吸附方式为大孔吸附树脂柱。

进一步地，步骤 S2 中所述洗脱过程为：先用水洗脱，再用 30%-60% 乙醇洗脱，合并乙醇洗脱液。

进一步地，步骤 S3 中所述第二产物和水的体积比为 1-10:5-50。

15 进一步地，步骤 S3 中所述层析优选为反相硅胶柱层析。具体为 ODS-C-18 反相硅胶柱层析（WatersPrep150 LC，Waters BEH C18 VanGuard Pre-column, 5μM, 19×250 mm，流速 5 mL/min）。

本发明实施例还提供通过上述方法制备的连翘叶提取物。

20 本发明实施例还提供上述制备方法制得的连翘叶提取物用于制备提升动物肠道内菌种 *Akkermansia muciniphila* 或者菌属 *Akkermansia* 的药物的用途。

进一步地，所述药物还包含辅料。

进一步地，所述 AKK 菌丰度为肠道内的丰度。进一步地，所述动物是指哺乳动物。

25 本发明实施例提供的连翘叶提取物（AFK-6801），经过动物实验证明，对肠道内 AKK 菌具有明显的促进增殖作用，在用药剂量大于或者等于 75 mg /kg 时 AKK 菌的含量有显著提升。

具体实施方式

为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合具体实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

5 本发明实施例提供了一种连翘叶提取物的制备方法，包括：

S1: 取连翘叶片，干燥粉碎，加入溶剂 90℃ 以上处理 10~40min，过滤后加萃取剂，萃取 6 小时以上，得到第一产物；

S2: 将所述第一产物过滤，取上清液，吸附，洗脱，并将洗脱液进行减压浓缩，获得第二产物；

10 S3: 将所述第二产物溶解，层析，然后洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，获得连翘叶提取物。

优选地，步骤 S1 中干燥粉碎包括风干或者冻干的处理，优选为自然风干。

优选地，步骤 S1 中所述溶剂为水，所述萃取剂为醇类，包括甲醇，乙醇和丙醇等，优选为乙醇，进一步优选为 75% 食用乙醇。

15 具体地，溶剂水的用量为 5-20 倍粉碎后固体的体积，溶剂水处理后还包括过滤的步骤。

萃取剂萃取时间为 5 小时以上，常温或者 4℃。

优选地，步骤 S2 中所述吸附方式为大孔吸附树脂柱，优选为 HP-20 大孔吸附树脂。

20 优选地，步骤 S2 中所述洗脱过程为：先用水洗脱，再用 30%-60% 乙醇洗脱，合并乙醇洗脱液。

进一步优选地，该步骤还包括减压浓缩的操作。

优选地，步骤 S3 中第二产物和水的体积比为 1-10:5-50。

25 优选地，步骤 S3 中所述层析优选为反相硅胶柱层析。具体为 ODS-C-18 反相硅胶柱层析 (Waters Prep150 LC, Waters BEH C18 VanGuard Pre-column, 5μm, 19×250 mm, 流速 5 mL/min)。

本发明实施例还提供上述制备方法制得的连翘叶提取物用于制备提升动物体内 AKK 菌丰度的药物的用途。

进一步地，所述药物为口服药物，可以为膏剂，液体，糖浆，片剂，胶囊或者其他合适的剂型，进一步优选地，该药物还包含辅料。

- 5 进一步地，所述 AKK 菌丰度为肠道内的丰度。进一步优选地，所述动物是指哺乳动物。

本发明实施例提供的连翘叶提取物（AFK-6801），经过动物实验证明，对肠道内 AKK 菌具有明显的促进增殖作用。

以下通过具体实施例对本发明进行进一步描述。

10 **实施例 1：连翘叶提取物的制备方法**

连翘叶提取物制备方法包括以下步骤：

- （1）取连翘（*Forsythia suspensa*）叶片，自然风干，粉碎，加入 10 倍量体积的水煮 30 min，纱布过滤，加 95%食用乙醇，调乙醇浓度为 75%，置 4℃冰箱过夜，得到第一产物；
- 15 （2）将第一产物过滤，取上清液，加入 HP-20 大孔吸附树脂柱层析，上样量为柱体积的 30%。静置 4h，先用水洗脱 3 个柱体积，再用 40%乙醇洗脱 3 个柱体积，合并 40%乙醇洗脱液，将洗脱液在旋转蒸发仪上进行减压浓缩得到浸膏，减压浓缩的压力为 10 kPa，温度为 65℃。冷冻干燥，获得第二产物（粗提取物）；
- 20 （3）将第二产物按 1：5 体积加水溶解，采用 ODS-C-18 反相硅胶柱层析（WatersPrep150 LC，Waters BEH C18 VanGuard Pre-column, 5uM, 19×250 mm，流速 5 mL/min），上样量为 1ml 柱。依次采用 20%，40%甲醇水洗脱，收集 40%甲醇水洗脱液，减压浓缩，并冻干成粉末状，得最终提取物，（得率 0.2%，纯度 98.8%）；
- 25 （4）所得产物命名为 AFK-6801，其核磁数据为：棕色固体粉末，甲醇可溶，在 254 nm 处显荧光，I₂ 显黄色斑点，5% H₂SO₄-EtOH 加热显黄色至黑色。

分子式为 C₂₅H₃₈O₁₆, ESI-MS: *m/z* 594.2 [M-H]⁻。

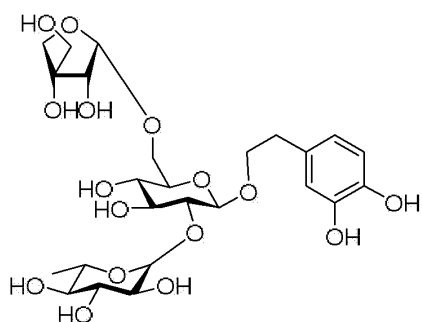
所述提取物经核磁共振谱可知所述 AFK-6801 化合物在 254 nm 处显荧光, I₂ 显黄色斑点, 5% H₂SO₄-EtOH 加热显黄色至黑色, ESI-MS: *m/z* 594.2 [M-H]⁻。

其中 C 和 H 的归属数据如表 1 所示:

5 表 1AFK-6801 化合物的核磁共振氢谱和碳谱归属数据

Position	δ_{H} (mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1		131.7
2	6.69 (d, <i>J</i> = 2.0)	116.6
3		146.1
4		144.7
5	6.67(d, <i>J</i> = 8.0)	117.6
6	6.55 (dd, <i>J</i> = 8.0, 2.0)	121.5
β	2.78(m)	36.6
α	4.04(m)	72.4
Glc-1'	4.46(d, <i>J</i> = 8.0)	103.2
Glc-2'	3.40 (dd, <i>J</i> = 8.0, 9.0)	79.9
Glc-3'	3.55 (m)	71.6
Glc-4'	3.42(m)	78.0
Glc-5'	3.22(m)	78.0
Glc-6'	3.88(dd, <i>J</i> = 12.0, 2.2)	68.9
	3.70 (dd, <i>J</i> = 12.0, 4.8)	
Rha-1''	5.02 (d, <i>J</i> = 8.0)	102.8
Rha-2''	3.68(m)	72.4
Rha-3''	3.32(m)	72.4
Rha-4''	3.55(m)	73.7
Rha-5''	3.70(m)	70.5
Rha-6''	1.12(s)	18.6
Fur-1'''	5.52(d, <i>J</i> = 7.6)	103.1
Fur-2'''	4.03(m)	77.5
Fur-3'''		81.6
Fur-4'''	3.71(d, <i>J</i> = 12.0, 2.0)	74.2
	3.92(d, <i>J</i> = 12.0, 2.0)	
Fur-5'''	3.72 (d, <i>J</i> = 12.0, 2.4)	64.5
	2.73(d, <i>J</i> = 12.0, 2.4)	

鉴定化合物 AFK-6801 的结构式如式 1 所示, 命名为 1atifoside I (3,4-二羟基苯乙醇 β -O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-呋喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-葡萄糖苷), 结构式如下:



实施例 2：连翘叶提取物的制备方法

该实施例中，与实施例 1 不同的地方在于，步骤（1）中的 75%乙醇替换为甲
5 醇，其余操作步骤相同，结果表明提取物成分与实施例 1 接近。

实施例 3：连翘叶提取物对动物肠道 AKK 菌增殖的促进作用

1. 实验方法

1.1 小鼠与给药

10 取 6 周龄的野生雄型 C57BL / 6J (WT) 小鼠，36 只，购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。将小鼠饲养在动物房间中，温度控制在 20-22°C，光照/黑暗周期为 12h，适应性饲养 7d。

将实施例 1 制得的连翘叶提取物用水溶解后配置为 10 mg/ml 的溶液。

15 给 C57BL/ 6 小鼠饲喂 SPF 级繁殖饲料，自由饮水直至实验结束。适应性饲养 7d 后，将 C57BL / 6 小鼠随机分为四组（每组 n=9），即（1）正常对照组（CW），（2）高剂量给药组（D-H 100 mg /kg），（3）中剂量给药组（D-L，75 mg /kg），（4）低剂量给药组（D-L，50 mg /kg）。（1）正常对照组按体重灌胃给予纯净水，给药组（2）-（4）按剂量灌胃给药 8 周。

1.2 肠道菌 16S rRNA 分析

20 实验给药最后一天，收集各小鼠粪便，保存在 2ml 离心管，立刻送检。

提取粪便样品总 DNA 后，根据保守区设计得到引物，在引物末端加上测序接头，进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库，建

好的文库先进行文库质检，质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2500 进行测序。高通量测序（如 Illumina HiSeq 等测序平台）得到的原始图像数据文件，经碱基识别（Base Calling）分析转化为原始测序序列（Sequenced Reads），采用 Qiime1.91 标准化流程，运用 Open_Reference 算法，按照 97%相似度进行 OTU 聚类，显著增加了菌种注释效率。最终与 GreenGene 数据库比对，生成包含样本名称及菌种注释与丰度信息的 Biom 数据。

1.3 统计学分析

实验数据用 mean±SD 表示，采用 Graphpad Prism 7.0 软件对数据进行 One-wayANOVA 分析，考察数据间差异，*p<0.05 为有显著性差异，**p<0.01 为差异性极显著。

1.4 肠道菌群分析实验结果

下列表格（表 2）显示了肠道菌群分析结果。

表 2 连翘叶提取物对肠道菌群门水平的影响

Legend	Taxonomy	D-H %	D-M %	D-L %	CW %
	Unassigned;Other	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria	0.8%	2.1%	1.9%	2.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes	15.6%	5.4%	9.7%	27.3%
	k_Bacteria;p_Chlamydiae	0.0%	0.3%	0.4%	0.1%
	k_Bacteria;p_Deferribacteres	0.1%	1.4%	0.5%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes	35.7%	77.9%	66.4%	61.4%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria	18.7%	10.8%	20.2%	7.7%
	k_Bacteria;p_TM7	0.0%	0.9%	0.7%	0.8%
	k_Bacteria;p_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.2%	0.3%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	29.1%	0.9%	0.0%	0.0%

从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75 mg /kg)对于菌群门级别 Verrucomicrobia 有实质的提升作用,尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。

进一步地，选择 Verrucomicrobia 级别下面菌群纲进行检测分析，结果如表 3 所示。

表 3 连翘叶提取物对肠道菌群纲水平的影响

Legend	Taxonomy	D-H	D-M	D-L	CW
		%	%	%	%
	Unassigned;Other;Other	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia	0.8%	2.1%	1.9%	2.0%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia	15.6%	5.4%	9.7%	27.3%
	k_Bacteria;p_Chlamydiae;c_Chlamydiia	0.0%	0.3%	0.4%	0.1%
	k_Bacteria;p_Deferribacteres;c_Deferribacteres	0.1%	1.4%	0.5%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli	0.4%	10.6%	15.6%	6.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia	20.3%	57.6%	44.0%	40.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi	15.0%	9.7%	6.7%	14.6%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria	1.9%	0.0%	0.0%	1.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria	0.7%	7.8%	19.4%	2.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria	0.0%	2.6%	0.7%	0.8%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria	16.0%	0.3%	0.1%	3.6%
	k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-3	0.0%	0.9%	0.7%	0.8%
	k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes	0.0%	0.0%	0.2%	0.3%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Verrucomicrobiae	29.1%	0.9%	0.0%	0.0%

从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75 mg /kg）对于菌群门级别 Verrucomicrobia 下面的纲级别 Verrucomicrobiae 有实质的提升作用，尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。

进一步的试验中,选择 Verrucomicrobiae 下面的菌群目级别进行检测分析,结果如表 4 所示。

表 4 连翘叶提取物对肠道菌群目水平的影响

Legend Taxonomy	D-H %	D-M %	D-L %	CW %
Unassigned;Other;Other;Other	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales	0.8%	2.1%	1.9%	2.0%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales	15.6%	5.4%	9.7%	27.3%
k_Bacteria;p_Chlamydiae;c_Chlamydiia;o_Chlamydiales	0.0%	0.3%	0.4%	0.1%
k_Bacteria;p_Deferribacteres;c_Deferribacteres;o_Deferribacterales	0.1%	1.4%	0.5%	0.1%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales	0.4%	10.6%	15.6%	6.4%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Turicibacterales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales	20.3%	57.6%	44.0%	40.4%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales	15.0%	9.7%	6.7%	14.6%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales	1.9%	0.0%	0.0%	1.1%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales	0.7%	7.8%	19.4%	2.1%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteriales	0.0%	2.6%	0.7%	0.8%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales	16.0%	0.1%	0.1%	3.6%
k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-3;o_CW040	0.0%	0.9%	0.7%	0.8%
k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes;o_Anaeroplasmatales	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes;o_RF39	0.0%	0.0%	0.2%	0.2%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Verrucomicrobiae;o_Verrucomicrobiales	29.1%	0.9%	0.0%	0.0%

- 从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75 mg /kg）对于菌群 Verrucomicrobiae 下面的目级别菌群中 Verrucomicrobiales
- 5 有实质的提升作用，尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。
- 对于该目级别菌群包括的菌种继续进行分析，结果如表 5 所示。

表 5 连翘叶提取物对肠道菌群科水平的影响

Legend	Taxonomy	D-H %	D-L %	D-M %	CW %
	Unassigned;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae	0.8%	2.1%	1.9%	2.0%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_	0.1%	0.2%	1.3%	0.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Bacteroidaceae	13.3%	1.0%	0.8%	0.3%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Porphyromonadaceae	2.1%	0.1%	0.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae	0.0%	0.5%	1.1%	0.8%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_S24-7	0.1%	3.5%	5.2%	21.7%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae]	0.0%	0.1%	1.0%	0.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Paraproteobacteria]	0.0%	0.0%	0.2%	3.4%
	k_Bacteria;p_Chlamydiae;c_Chlamydia;o_Chlamydiales;f_Chlamydiaceae	0.0%	0.3%	0.4%	0.1%
	k_Bacteria;p_Deferribacteres;c_Deferribacteres;o_Deferribacterales;f_Deferribacteraceae	0.1%	1.4%	0.5%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Enterococcaceae	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae	0.1%	2.4%	11.8%	6.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae	0.2%	8.2%	3.6%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;Other	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_	0.1%	19.6%	20.4%	22.9%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae	0.0%	0.3%	0.1%	0.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae	7.0%	17.7%	10.7%	9.5%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae	13.2%	18.8%	11.2%	6.9%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae	0.0%	0.5%	0.7%	0.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae]	0.0%	0.5%	0.3%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae	15.0%	9.7%	6.7%	14.6%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae	1.9%	0.0%	0.0%	1.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae	0.7%	7.8%	19.4%	2.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteriales;f_Helicobacteriaceae	0.0%	2.6%	0.7%	0.8%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae	16.0%	0.1%	0.1%	3.6%
	k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-3;o_CW040;f_F16	0.0%	0.9%	0.7%	0.8%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Verrucomicrobiae;o_Verrucomicrobiales;f_Verrucomicrobiaceae	29.1%	0.9%	0.0%	0.0%

从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75

mg /kg) 对于菌群科级别菌群中 Verrucomicrobiaceae 有实质的提升作用，尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。

进一步对该科级菌群中各属级菌种进行检测分析。

5 表 6 连翘叶提取物对肠道菌群属水平的影响

Legend	Taxonomy	D-H	D-L	D-M	CW
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Actinobacteria:c Coriobacteriia:o Coriobacteriales:f Corioba	0.0	0.4	0.6	0.7
	cteriaceae:g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Actinobacteria:c Coriobacteriia:o Coriobacteriales:f Corioba	0.1	1.6	1.2	0.7
	cteriaceae:g Adlercreutzia	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f	0.1	0.2	1.3	0.4
	cteroidetes:c	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidacea	13.5	1.0	0.8	0.3
	eu Bacteroides	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Porphyromona	2.1	0.1	0.0	0.1
	daceae:g Parabacteroides	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Rikenellaceae:	0.0	0.5	0.6	0.2
	g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f S24-7:g	0.1	3.5	5.2	21.7
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f [Odoribacterac	0.0	0.0	1.0	0.4
	ae]:g Odoribacter	%	%	%	%
k	Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f [Paraprevotell	0.0	0.0	0.2	3.4
	ae]:g [Prevotella]	%	%	%	%
k	Bacteria:p Chlamydiae:c Chlamydia:o Chlamydiales:f Chlamydiaceae:	0.0	0.3	0.4	0.1
	g Chlamydiae	%	%	%	%
k	Bacteria:p Deferribacteres:c Deferribacteres:o Deferribacteres:f Deferri	0.1	1.4	0.5	0.1
	bacteriaceae:g Magspirillum	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Lactobacillales:f Lactobacillaceae:g	0.1	2.4	11.8	6.3
	Lactobacillus	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Lactobacillales:f Streptococcaceae:g	0.1	7.8	3.4	0.9
	Lactococcus	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Lactobacillales:f Streptococcaceae:g	0.0	0.4	0.2	0.1
	Streptococcus	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f	0.1	19.6	20.4	22.9
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:G	0.1	0.5	0.1	0.1
	her	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	2.6	3.1	1.9	5.0
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	3.3	0.1	0.0	0.0
	ilactia	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	0.0	1.0	0.2	0.2
	Coprothermobacter	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	0.2	6.1	5.9	1.2
	Dorea	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	0.0	2.0	0.4	0.2
	Roseburia	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Lachnospiraceae:g	0.9	4.9	2.3	2.7
	[Ruminococcus]	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Ruminococcaceae:g	11.9	8.3	1.9	2.3
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Ruminococcaceae:g	0.7	9.1	8.5	2.8
	Oscillospira	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Ruminococcaceae:g	0.1	1.2	0.5	1.6
	Ruminococcus	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f Veillonellaceae:g	0.0	0.4	0.7	0.4
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:o Clostridiales:f [Moryellaaceae]:g	0.0	0.5	0.3	0.0
	g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Erysipelotrichi:o Erysipelotrichales:f Erysipelo	14.4	2.0	1.4	0.2
	trichaceae:g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Firmicutes:c Erysipelotrichi:o Erysipelotrichales:f Erysipelo	0.5	7.7	5.3	14.3
	trichaceae:g Alloprevotella	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Betaproteobacteria:o Burkholderiales:f Ale	1.9	0.0	0.0	1.1
	aligenaceae:g Sutterella	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Deltaproteobacteria:o Desulfobibrionales:f	0.7	7.0	18.4	1.9
	Desulfobibrionaceae:g Desulfobivium	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Epsilonproteobacteria:o Campylobacteriales:f	0.0	0.8	1.0	0.2
	Helicobacteriaceae:g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Epsilonproteobacteria:o Campylobacteriales:f	0.0	0.3	0.2	0.6
	Helicobacteriaceae:g Flexispira	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Epsilonproteobacteria:o Campylobacteriales:f	0.0	1.9	0.3	0.0
	Helicobacteriaceae:g Helicobacter	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f	2.6	0.0	0.1	3.6
	Enterobacteriaceae:g	%	%	%	%
k	Bacteria:p Proteobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f	13.2	0.1	0.0	0.0
	Enterobacteriaceae:g Klebsiella	%	%	%	%
k	Bacteria:p TM7:c TM7-3:o CW040:f F16:g	0.0	0.9	0.7	0.8
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Tenericutes:c Mollicutes:o RF39:f	0.0	0.0	0.2	0.2
		%	%	%	%
k	Bacteria:p Verrucomicrobia:c Verrucomicrobia:o Verrucomicrobiales:f	29.1	0.9	0.0	0.0
	Verrucomicrobiaceae:g Akkermansia	%	%	%	%

从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75 mg /kg）对于菌属 *Akkermansia* 的数量有实质的提升作用，尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。

进一步实验中，对于菌属 *Akkermansia* 包括的菌种进行进一步分析测试。

5 表 7 连翘叶提取物对肠道菌种水平的影响

Legend	Taxonomy	D-H-D-		D-L-CW	
		%	%	%	%
	Total				
	k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Corinobacteriia.o_Corinobacteriales.f_Corinobacteriaceae.g_	0.0	0.4	0.6	0.7
	k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Corinobacteriia.o_Corinobacteriales.f_Corinobacteriaceae.g_Adlercreutzia.s_	0.1	1.6	1.2	0.7
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_	0.1	0.2	1.3	6.4
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Bacteroidaceae.g_Bacteroides.s_	12.8	0.7	0.6	0.2
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Bacteroidaceae.g_Bacteroides.s_acidifaciens	0.0	0.3	0.2	0.1
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Pomphyrionomadaeae.g_Parabacteroides.s_	1.8	0.0	0.0	6.0
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Rikenellaceae.g_	0.0	0.5	0.6	0.2
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_S24-7.g_	0.1	3.5	5.2	21.7
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Odoribacteraceae.g_Odoribacter.s_	0.0	0.0	1.0	0.4
	k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Paraprevotellaceae.g_Prevotella.s_	0.0	0.0	0.1	3.4
	k_Bacteria.p_Deferribacteres.c_Deferribacteres.o_Deferribacterales.f_Deferribacteraceae.g_Mucispirillum.s_schaefferi	0.1	1.4	0.5	0.1
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus.s_	0.1	2.2	6.2	5.8
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus.s_reusci	0.0	0.1	5.6	0.4
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Streptococcaceae.g_Lactococcus.s_	0.1	7.8	3.4	0.0
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_	0.1	19.6	20.4	22.9
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_	2.6	3.1	1.9	5.0
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Bifidobacterium.s_	0.8	0.0	0.0	0.0
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Bifidobacterium.s_probiota	2.5	0.1	0.0	0.0
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Optococcus.s_	0.0	1.0	0.2	0.2
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Dorea.s_	0.1	5.9	1.2	1.1
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Dorea.s_fornaceaeae	0.1	0.2	4.5	0.0
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Ruminococcus.s_	0.9	0.5	0.9	0.1
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Ruminococcus.s_gammas	0.0	4.3	1.4	2.6
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaceae.g_	11.9	8.3	1.9	2.3
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaceae.g_Oscillospira.s_	0.7	9.1	8.5	2.8
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaceae.g_Ruminococcus.s_	0.1	1.2	0.5	1.6
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Veillonellaceae.g_	0.0	0.4	0.7	0.4
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Erysipelotrichi.o_Erysipelotrichales.f_Erysipelotrichaceae.g_	14.4	2.0	1.4	0.2
	k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Erysipelotrichi.o_Erysipelotrichales.f_Erysipelotrichaceae.g_Allobaculum.s_	0.5	7.7	5.3	14.3
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Betaproteobacteria.o_Burkholderiales.f_Alcaligenaceae.g_Sutterella.s_	1.9	0.0	0.0	1.1
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Deltaproteobacteria.o_Desulfovibrionales.f_Desulfovibrionaceae.g_	0.7	7.0	18.4	1.9
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Deltaproteobacteria.o_Desulfovibrionales.f_Desulfovibrionaceae.g_Desulfovibrio.s_	0.0	0.8	1.0	0.2
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Epsilonproteobacteria.o_Campylobacteriales.f_Helicobacteraceae.g_	0.0	0.3	0.2	0.6
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Epsilonproteobacteria.o_Campylobacteriales.f_Helicobacteraceae.g_Flexispira.s_	0.0	1.9	0.3	0.0
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Enterobacteriales.f_Enterobacteriaceae.g_	2.6	0.0	0.1	3.6
	k_Bacteria.p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Enterobacteriales.f_Enterobacteriaceae.g_Klebsiella.s_	13.2	0.1	0.0	0.0
	k_Bacteria.p_TM7.c_TM7-3.o_CW046.f_F16.g_	0.0	0.9	0.7	0.8
	k_Bacteria.p_Verrucomicrobia.c_Verrucomicrobiae.o_Verrucomicrobiales.f_Verrucomicrobiaceae.g_Akkermansia.s_muciphila	29.1	0.9	0.0	0.0

从上表可以看出，高剂量给药组（D-H 100 mg /kg）和中剂量给药组（D-L，75 mg /kg）对于菌种 *Akkermansia muciniphila* 的数量有实质的提升作用，尤其是高剂量组，相对于对照组提升比例为 29.1%。

- 5 上述实验结果表明，AKK 菌在小鼠的肠道内相对含量较低，从肠道菌群的门、纲、目、科、属、种的水平分析，正常未给药组肠道内 AKK 菌的含量为 0，通过高、中、低剂量给药后，低剂量（50 mg /kg）组的肠道 AKK 菌的含量仍然为 0，但是高（100 mg /kg）和中剂量（75 mg /kg）的 AKK 菌含量分别为 29.1% 和 0.9%，因此，证明了连翘叶提取物能够有效的提高肠道 AKK 菌的丰度，并
- 10 且随之用量的提高，AKK 菌的丰度随之增加，并且在用量为 100 mg /kg 时作用效果极为明显。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

-
- 1.一种连翘叶提取物的制备方法，包括：
- S1: 取连翘叶片，粉碎，加入溶剂 90℃ 以上处理 10~40min，过滤后加萃取剂，萃取 6 小时以上，得到第一产物；
- 5 S2:将所述第一产物过滤，取上清液，吸附，洗脱，并将洗脱液进行减压浓缩，获得第二产物；
- S3:将所述第二产物溶解，层析，然后洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，获得连翘叶提取物。
- 2.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S1 中所述溶剂为水，
- 10 所述萃取剂为甲醇，乙醇或丙醇。
- 3.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 S2 中所述洗脱过程为：先用水洗脱，再用 30-60%乙醇洗脱，合并乙醇洗脱液。
- 4.如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 S3 中所述第二产物与水的体积比为 1-10:5-50。
- 15 5.一种连翘叶提取物，其特征在于，通过如权利要求 1-4 中任一项所述的制备方法值得。
6. 如权利要求 5 所述的连翘叶提取物用于制备提升动物肠道内菌种 *Akkermansia muciniphila* 或者菌属 *Akkermansia* 的丰度的药物的用途。
7. 如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述药物为口服药物。
- 20 8. 如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述动物为哺乳动物。
9. 如权利要求 6-8 中任一项所述的用途，其特征在于，所述药物剂型为膏剂，糖浆，片剂或胶囊。