

乳双歧杆菌 BL-99 在保护软骨中的应用

技术领域

5 本发明是关于一种具有软骨保护作用的乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)，具体而言，本发明是关于乳双歧杆菌 BL-99（保藏编号 CGMCC No. 15650）在制备用于保护软骨和/或促进软骨健康的组合物中的应用。

背景技术

软骨组织广泛存在于脊椎动物体内，是生物体维持正常活动不可缺的组织类型，
10 软骨作为脊椎动物重要的组织类型，参与骨骼系统的发生、发展过程。软骨细胞的发育过程受复杂的信号分子网络调控，关键基因的异常使得软骨细胞形成障碍，并与许多先天性及后天性软骨钙化骨疾病的发生相关，比如颅面骨发育畸形，骨性关节炎等，影响全球约 10-12%的人口健康。

硫酸软骨素（Chondroitin sulfate）是一种被认为具有软骨保护作用的功效成分，
15 可作为营养补充剂。然而，研究报道硫酸软骨素会带来一些副作用，常见的包括恶心和胃痛，有些情况下还有可能导致皮疹，反胃和脱发。

因此，研发无毒副作用的具有软骨保护功效的防治产品是非常重要的。

发明内容

20 本发明的一个目的在于提供一种乳双歧杆菌的新用途。

根据本发明的具体实施方案，本发明提供了乳双歧杆菌(*Lactobacillus paracasei*) BL-99 菌株的新用途，乳双歧杆菌 BL-99 菌株已于 2017 年 12 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 15650。乳双歧杆菌 BL-99 菌株是已在专利文献 CN 110964653 A 中公布的生物材料。现有技术研究
25 表明，乳双歧杆菌 BL-99 是一株食用安全的益生菌，其具有耐胃酸和耐肠液性能。此外，乳双歧杆菌 BL-99 具有提升肠道免疫力、提高肠道屏障完整性、抑制肠道炎症因子产生等作用。

本案发明人在研究中通过斑马鱼模型实验发现，保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)具有保护软骨的功效，具体可表现在促进软骨细胞

的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的调亡，从而可促进软骨发育、增加软骨密度和/或改善软骨损伤。

斑马鱼在骨骼发育方面与人类极其相似，其骨发育与人类骨生物矿化作用基本一致，存在软骨内骨化过程，发育完整的斑马鱼骨拥有与人类长骨一致的分层结构。

5 此外，斑马鱼与人类在骨骼生长发育的分子机理方面也极为相似。采用转基因软骨绿色荧光斑马鱼，可以在显微镜下直接观察、拍照并定量分析软骨荧光强度。

从而，本发明提供了一种乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)在制备用于保护软骨的组合物中的应用，其中，所述乳双歧杆菌为保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌（即本发明的乳双歧杆菌 BL-99）。

10 根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述保护软骨包括促进软骨发育、增加软骨密度、保护软骨免受损伤、促进软骨修复和/或改善软骨损伤。

根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述保护软骨包括促进软骨细胞的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的调亡。

15 根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述组合物包括食品组合物、饲料组合物或药品组合物。

根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述乳双歧杆菌可以固态或液态菌制剂的形式用于制备所述组合物。

20 根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述乳双歧杆菌可以活菌或灭活菌的形式用于制备所述组合物。

根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述乳双歧杆菌是与益生元、其他益生菌中的一种或多种联合制备用于保护软骨的组合物。优选地，所述益生元包括异构化乳糖、低聚果糖、低聚半乳糖中的一种或多种。所述益生元可以包括含有所述低聚糖的其他原料如菊粉等。优选地，所述其他益生菌
25 包括乳双歧杆菌，例如 HN019。HN019 是乳品发酵领域的成熟商业菌株。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述组合物为药品组合物。所述药品组合物还包括药学上可接受的辅料，所述辅料包括赋型剂、稀释剂、填充剂和/或吸收促进剂。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述

组合物为食品组合物。其中，所述食品可以为发酵乳制品、乳酪、含乳饮料、固体饮料或乳粉。

根据本发明的具体实施方案，本发明中所述组合物还可包括所属领域中的常规用料组分。例如，对于药品组合物，可包括适量的辅料，所述辅料可以为赋型剂、
5 稀释剂、填充剂和/或吸收促进剂等。对于食品组合物，本发明的乳双歧杆菌可以按照现有技术中含乳双歧杆菌的食品进行生产。所述组合物可根据受施予者的需要，而采用不同形态。例如粉剂、锭剂、造粒、微胶囊和/或液体制剂等。

根据本发明的具体实施方案，本发明的乳双歧杆菌 BL-99 的应用中，所述乳双歧杆菌的应用量为 1.0×10^3 CFU/天- 1.0×10^{12} CFU/天，优选为 1.0×10^7 CFU/天-
10 1.0×10^{11} CFU/天。当本发明的 BL-99 与其他益生菌联用时，益生菌的总量应为 1.0×10^3 CFU/天- 1.0×10^{12} CFU/天，优选为 1.0×10^7 CFU/天- 1.0×10^{11} CFU/天。

当本发明的 BL-99 与益生元联用时，所述益生元的应用量为 0.3g/天-30g/天。

另一方面，本发明还提供了一种具有保护软骨功效的组合物，该组合物包括以下组合中的一种或多种：

15 乳双歧杆菌 BL-99 与益生元；

乳双歧杆菌 BL-99 与乳双歧杆菌 HN019；

乳双歧杆菌 BL-99、乳双歧杆菌 HN019 与益生元；

优选地，所述益生元包括异构化乳糖、低聚果糖、低聚半乳糖中的一种或多种。

根据本发明的具体实施方案，本发明的具有保护软骨功效的组合物中包括乳双歧杆菌 BL-99 与益生元时，所述保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与益生元的用量比为 1.0×10^3 CFU- 1.0×10^{12} CFU：0.3g-30g，优选为 1.0×10^7 CFU- 1.0×10^{11} ：
20 0.3g-30g。

根据本发明的具体实施方案，本发明的具有保护软骨功效的组合物中包括乳双歧杆菌 BL-99 与乳双歧杆菌 HN019 时，两种菌可以以任意比例组合，通常情况下，
25 两种菌以(0.01~100)：1 的比例组合。

另一方面，本发明还提供了一种保护软骨的方法，该方法包括给予受试者有效量的保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌。

根据本发明的具体实施方案，本发明的保护软骨的方法中，所述保护软骨包括：促进软骨发育、增加软骨密度、保护软骨免受损伤、促进软骨修复和/或改善软

骨损伤；或者

促进软骨细胞的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的调亡。

根据本发明的具体实施方案，本发明的保护软骨的方法中，所述乳双歧杆菌是以前述组合物（食品组合物、饲料组合物或药品组合物）的形式给予需要的受试者。

- 5 本发明提供了乳双歧杆菌 BL-99 在制备用于保护软骨的组合物中的新应用。本发明通过实验证明乳双歧杆菌 BL-99 可促进软骨细胞的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的调亡，从而可促进软骨发育、增加软骨密度和/或改善软骨损伤。

10 附图说明

图 1 为益生菌处理后斑马鱼软骨荧光强度典型图。注：图中绿色荧光为斑马鱼软骨。

图 2 显示益生菌乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X 处理后斑马鱼软骨荧光强度检测结果。与模型对照组比较， $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ 。

15

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现对本发明的技术方案进行以下详细说明，但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

实施例 1

20

1. 实验样品与材料

1.1. 样品

乳双歧杆菌 BL-99 和乳双歧杆菌 HN019，均用标准稀释水配制成 2.00 mg/mL 母液，现配现用。

益生菌固体配剂乳双歧杆菌 BL-99，由内蒙古伊利实业集团股份有限公司提供。

25

乳双歧杆菌 HN019 为商业菌株。

另设置菌株对照组，采用乳双歧杆菌商业益生菌菌株 X。

阳性对照：硫酸软骨素 A 钠盐，白色粉末，批号 I2003201，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，4℃避光储存。用超纯水配制成 100 mg/mL 母液，现配现用。

1.2. 实验动物

斑马鱼均饲养于 28 ℃ 的养鱼用水中（水质：每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450 ~ 550 μS/cm；pH 为 6.5 ~ 8.5；硬度为 50 ~ 100 mg/L CaCO₃），实验动物使用许可证号为：SYXK（浙）2012-0171。饲养管理符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。

- 5 转基因软骨绿色荧光斑马鱼，以自然成对交配繁殖方式进行。年龄为受精后 2 天（2 dpf）的斑马鱼用于益生菌软骨保护功效最大检测浓度（MTC）测定及其功效评价。

1.3. 斑马鱼剂量与人体剂量换算

- 根据已公开发表（SCI 收录）的化药、天然药物和部分中成药、保健食品数据，
- 10 通过数学模型处理和拟合，确定斑马鱼与哺乳动物等效剂量换算公式后，目前本公司斑马鱼与人体等效剂量换算公式为：斑马鱼（mg/L）=[人(g/天)×1000]/6。如斑马鱼一次给药浓度为 1000 μg/mL，根据上述公式换算为人用剂量，即每日服用量 6 g。关于保健食品套用斑马鱼与人体等效剂量换算公式（斑马鱼（mg/L）=[人(g/天)×1000]/6）使用依据及范围说明：利用 WHO 在《食品中化学物风险评估原则和方法》中提到的健康指导值计算公式（HBGV=NOAEL/UFs）和不确定系数（UFs）
 - 15 的定义，通过相关文献及环特内部实验数据验证，一般人群不确定系数为 10，敏感人群不确定系数为 100。

1.4. 仪器、耗材与试剂

- 解剖显微镜（SZX7, OLYMPUS, Japan）；CCD 相机（VertA1, 上海土森视觉
- 20 科技有限公司，China）；电动聚焦连续变倍荧光显微镜（AZ100, Nikon, Japan）；精密电子天平（CP214, OHAUS, USA）；6 孔板（Nest Biotech, China）。
- 乙酸地塞米松（批号 B1828095, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司，China），二甲基亚砜（DMSO, 批号 BCCD7238, Sigma, Switzerland）；甲基纤维素（批号 079K0054V, Sigma, USA）。

2. 检测方法

2.1. 实验原理

地塞米松是一种人工合成的糖皮质激素，地塞米松诱导斑马鱼，可破坏斑马鱼软骨细胞的代谢平衡，抑制细胞增殖，引起软骨细胞的死亡或凋亡，从而引起软骨损伤。早期采用地塞米松可以缓解关节疼痛及炎症，但是，长期应用地塞米松可破

坏软骨细胞的代谢平衡，并可以引起软骨细胞的死亡或凋亡，从而减少软骨细胞数量和导致膝关节软骨组织退变程度进一步加重。

2.2.MTC 测定

随机选取 2 dpf 转基因软骨绿色荧光斑马鱼于 6 孔板中，每孔（实验组）30 尾。除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予地塞米松建立斑马鱼软骨损伤模型。28 □处理 24 h 后，移除地塞米松，分别水溶给予乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X（浓度见表 1），同时设置模型对照组和正常对照组，每孔容量为 3 mL。除正常对照组外，其余各实验组均再次水溶给予地塞米松，各实验组同地塞米松继续处理 48 h，期间每天换液。处理结束后，测定乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X 对模型斑马 10 鱼的 MTC。

2.3.软骨保护功效评价

随机选取 2 dpf 转基因软骨绿色荧光斑马鱼于 6 孔板中，每孔（实验组）30 尾。除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予地塞米松建立斑马鱼软骨损伤模型。28 □处理 24 h 后，移除地塞米松，分别水溶给予乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X 15 （浓度见表 2），同时设置模型对照组和正常对照组，每孔容量为 3 mL。除正常对照组外，其余各实验组均再次水溶给予地塞米松，各实验组同地塞米松继续处理 48 h，期间每天换液。处理结束后，每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件分析并采集数据，分析软骨荧光强度，以该指标的统计学分析结果评价乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X 软骨保护功 20 效。统计学处理结果采用 mean ± SE 表示。用 SPSS26.0 软件进行统计学分析，p < 0.05 表明差异具有统计学意义。

3. 检测结果

3.1. MTC

在本实验条件下，乳双歧杆菌 BL-99 和商业菌株 X 对模型斑马鱼的 MTC 分别 25 为 500 μg/mL、500 μg/mL、1000 μg/mL 和 2000 μg/mL。详见表 1。

表 1. 益生菌软骨保护功效浓度实验结果（n = 30）

组别	浓度 μg/mL	计数 CFU/mL	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	表型
正常对照组	/	/	0	0	未见明显异常
模型对照组	/	/	0	0	未见明显异常

乳双歧杆菌 BL-99	125	1.26*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	250	2.34*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	500	4.98*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	1000	1.01*10 ⁹	0	0	较模型对照组状态差
	2000	超出检测范围	-	-	-
商业菌株 X	125	0.180*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	250	0.420*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	500	0.600*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	1000	1.20*10 ⁸	0	0	与模型对照组状态相似
	2000	2.61*10 ⁸	30	100	-

3.2. 软骨保护功效评价

在本实验条件下，乳双歧杆菌 BL-99 有软骨保护功效，乳双歧杆菌 HN019 软骨保护功效不明显。详见表 2、图 1 和图 2。

表 2. 益生菌软骨保护功效评价实验结果（n = 10）

组别	浓度 CFU/mL	人体每日 服用量 (g)	人体每日 服用量 (CFU/g)	软骨荧光强度 (像素，mean ± SE)
正常对照组	-	-	-	283826 ± 9652***
模型对照组		-	-	186061 ± 12621
硫酸软骨素	1000 µg/mL	-	-	277530 ± 20981**
乳双歧杆菌 BL-99	4.74*10 ⁴	0.0003	4.50*10 ⁷	248008 ± 17302***
	4.74*10 ⁵	0.003	4.50*10 ⁸	252162 ± 19399*
	4.74*10 ⁶	0.030	4.50*10 ⁹	230991 ± 21685
	4.74*10 ⁷	0.300	4.50*10 ¹⁰	236812 ± 17724*
	4.74*10 ⁸	3.00	4.50*10 ¹¹	229537 ± 14435*
商业菌株 X	1.44*10 ⁴	0.0006	1.80*10 ⁷	164897 ± 15904
	1.44*10 ⁵	0.006	1.80*10 ⁸	195132 ± 5720
	1.44*10 ⁶	0.060	1.80*10 ⁹	189841 ± 12593
	1.44*10 ⁷	0.600	1.80*10 ¹⁰	187068 ± 7443
	1.44*10 ⁸	6.00	1.80*10 ¹¹	188542 ± 12270

5 与模型对照组比较，*p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001。

乳双歧杆菌 BL-99（干预浓度约为 10⁸CFU/天，对应人体剂量）具有促进软骨发育、增加软骨密度、保护软骨的功效。

实施例 2、乳双歧杆菌 BL-99 与益生元或其他益生菌组合物的软骨保护功效

本实施例中，将乳双歧杆菌 BL-99 与不同种类的益生元或其他益生菌组合，考
10 察组合物的软骨保护功效。软骨保护功效的评价实验方法同实施例 1。

本实施例中的乳双歧杆菌 BL-99 与不同种类的益生元或其他益生菌组合的组合物
的软骨评价结果见表 3。

表 3. 乳双歧杆菌 BL-99 与益生元或其他益生菌组合物的软骨保护功效评价实验结果
(n = 10)

组别及用量	人体每日服用 量	软骨荧光强度 (像素, mean ± SE)	与模型组相 比软骨保护 功效提升 (%)
正常对照组	-	331506 ±20833***	-
模型对照组	-	205834 ±15373	-
硫酸软骨 1000 µg/mL	-	296517 ±25160**	44
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)	4.50*10 ⁸ CFU	265318 ±19296*	29
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL) + 异构化乳糖 62.5 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 0.375g	303568±27956**	47
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)+ 异构化乳糖 250 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 1.50g	329001±13573***	60
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)+ 低聚果糖 62.5 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 0.375g	288975±11468***	40
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)+ 低聚果糖 250 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 1.50g	313361±17804***	52
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)+ 低聚半乳糖 62.5 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 0.375g	255114±17120*	28
乳双歧杆菌 BL-99 (4.74*10 ⁵ CFU/mL)+ 低聚半乳糖 250 µg/mL	4.50*10 ⁸ CFU + 1.50g	311695±21099***	57
乳双歧杆菌 BL-99+ 乳双歧杆菌 HN019 (总菌 4.74*10 ⁵ CFU/mL)	4.50*10 ⁸ CFU	306386±27734**	54

5 与模型对照组比较, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001。

可以看出, 乳双歧杆菌 BL-99 与不同种类的益生元或其他益生菌组合的组合物,
均具有良好的促进软骨发育、增加软骨密度、保护软骨的功效。

权利要求书

1. 一种乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)在制备用于保护软骨的组合物中的应用, 其中, 所述乳双歧杆菌为保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌。
2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述保护软骨包括促进软骨发育、增加
5 软骨密度、保护软骨免受损伤、促进软骨修复和/或改善软骨损伤。
3. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述保护软骨包括促进软骨细胞的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的调亡。
4. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述组合物包括食品组合物、饲料组合物或药品组合物。
- 10 5. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述乳双歧杆菌以固态或液态菌制剂的形式用于制备所述组合物; 和/或
所述乳双歧杆菌以活菌或灭活菌的形式用于制备所述组合物。
6. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述乳双歧杆菌是与益生元、其他益生菌中的一种或多种联合制备用于保护软骨的组合物;
- 15 优选地, 所述益生元包括异构化乳糖、低聚果糖、低聚半乳糖中的一种或多种;
优选地, 所述其他益生菌包括乳双歧杆菌, 例如 HN019。
7. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的应用, 其中, 所述组合物为食品组合物。
8. 根据权利要求 7 所述的应用, 其中, 所述食品为发酵乳制品、乳酪、含乳饮料、固体饮料或乳粉。
- 20 9. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的应用, 其中, 所述乳双歧杆菌的应用量为 1.0×10^3 CFU/天- 1.0×10^{12} CFU/天, 优选为 1.0×10^7 CFU/天- 1.0×10^{11} CFU/天;
当所述乳双歧杆菌与益生元联用时, 其中, 所述益生元的应用量为 0.3g/天-30g/天。
10. 一种具有保护软骨功效的组合物, 该组合物包括以下组合中的一种或多种:
- 25 保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与益生元;
保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与乳双歧杆菌 HN019;
保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌、乳双歧杆菌 HN019 与益生元;
优选地, 所述益生元包括异构化乳糖、低聚果糖、低聚半乳糖中的一种或多种。
11. 根据权利要求 10 所述的组合物, 其中:

所述组合物中包括保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与益生元时，所述保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与益生元的用量比为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU}$ - $1.0 \times 10^{12} \text{CFU}$ ：0.3g-30g，优选为 $1.0 \times 10^7 \text{CFU}$ - 1.0×10^{11} ：0.3g-30g 和/或

所述组合物中包括保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌与乳双歧杆菌
5 HN019 时，两种菌以任意比例组合，例如，两种菌以(0.01~100)：1 的比例组合。

12. 一种保护软骨的方法，该方法包括给予受试者有效量的保藏编号 CGMCC No. 15650 的乳双歧杆菌。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述保护软骨包括：

促进软骨发育、增加软骨密度、保护软骨免受损伤、促进软骨修复和/或改善软
10 骨损伤；或者

促进软骨细胞的增殖、促进软骨细胞代谢平衡和/或抑制软骨细胞的凋亡。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法，其中，所述乳双歧杆菌是以权利要求
10 或 11 所述的组合物的形式给予需要的受试者。