



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117085046 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202311365361.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2023.10.20

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.23649 2021.10.22

(71) 申请人 潍坊君薇生物科技有限责任公司

地址 261100 山东省潍坊市寒亭区泰祥街
368号泰祥花苑39号楼5-201

申请人 天津小微生物科技有限责任公司

(72) 发明人 韩清波 郭芳先 李华文 马乐辉

刘瑞峰 李云旭 王海波 陈艺

高国久 刘金昉

(74) 专利代理机构 北京圣州专利代理事务所

(普通合伙) 11818

专利代理师 李春

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用

(57) 摘要

本发明公开了嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用,涉及微生物技术领域。本发明提供了嗜酸乳杆菌LS001,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.23649,保藏日期为2021年10月22日,保藏机构地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,嗜酸乳杆菌LS001的16SrDNA序列如SEQ ID NO.1所示。本发明还公开了嗜酸乳杆菌LS001后生元,其是由嗜酸乳杆菌LS001经处理得到的。本发明采用上述的嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用,可广泛用于制备抗过敏的药物。

1.嗜酸乳杆菌LS001后生元在制备抗过敏药物中的应用,其特征在于:嗜酸乳杆菌LS001后生元是由嗜酸乳杆菌LS001经处理得到的,嗜酸乳杆菌LS001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.23649,保藏日期为2021年10月22日,分类命名为嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus*,保藏机构地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,嗜酸乳杆菌LS001的16Sr DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述药物包括菌粉制剂或片剂。

嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其是涉及嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用。

背景技术

[0002] 过敏是将外来物,如细菌、病毒、花粉、灰尘等物质作为有害的物体而产生的免疫作用,使免疫细胞中的肥大细胞开始活化,释出组织胺,组织胺会引起微血管扩张、血管通透性增加、发痒、平滑肌收缩和反射等一连串的作用,小则皮肤出现红斑麻疹,重则导致皮肤肿胀、发热等炎症表现,自身免疫系统就是一个大的数据库,知道哪些物质是对身体有益的,哪些物质是对身体有害的,然后进行标记,对有害物质发起攻击,对有益物质,进行吸收。而过敏是自身免疫系统的亢进表现,不管进来的物质是否对身体有益,全部都标记为有害,然后进行攻击,就会使得过敏介质达到一定浓度,然后作用在粘膜上,从而导致过敏反应,其反应的特点是发作迅速、反应强烈、消退较快;一般不会破坏组织细胞,也不会引起组织损伤,有明显的遗传倾向和个体差异,现有的抗过敏药物使用效果不太理想。因此,提供了嗜酸乳杆菌LS001后生元及其在制备抗过敏药物中的应用。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用,可广泛用于制备抗过敏的药物。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供了嗜酸乳杆菌LS001后生元在制备抗过敏药物中的应用,嗜酸乳杆菌LS001后生元是由嗜酸乳杆菌LS001经处理得到的,嗜酸乳杆菌LS001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.23649,保藏日期为2021年10月22日,分类命名为嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus*,保藏机构地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,嗜酸乳杆菌LS001的16SrDNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0005] 优选的,应用于制备药物。

[0006] 优选的,所述药物包括菌粉制剂或片剂。

[0007] 本发明所述的嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用的优点和积极效果是:

1、本发明中嗜酸乳杆菌LS001可广泛用于制备抗过敏的药物。

[0008] 2、本发明中嗜酸乳杆菌LS001可以降低由于超敏反应而升高的血清IgE水平,嗜酸乳杆菌LS001可广泛用于制备抗过敏的药物。

[0009] 下面通过实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

具体实施方式

[0010] 以下通过实施例对本发明的技术方案作进一步说明。除非另外定义,本发明使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域内具有一般技能的人士所理解的通常意义。

[0011] 实施例1

嗜酸乳杆菌LS001,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.23649,保藏日期为2021年10月22日,保藏机构地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,分类命名:嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus*。嗜酸乳杆菌LS001的16SrDNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 实施例2 嗜酸乳杆菌LS001后生元的制备

S1、种子液的制备

菌种LS001在MRS液体培养基中进行活化,将3%接种量接入到100mL MRS液体培养基中,置于37℃条件下扩大培养12h,制得嗜酸乳杆菌LS001种子液,活菌数为 5×10^9 cfu/mL;

S2、菌种发酵

将种子液按3%接种量接种到发酵培养基中,置于37℃条件下发酵20h,得到发酵液;

S3、后生元制备

在常温条件下,将发酵液在6000rpm离心30min,弃上清,取湿菌泥加入30-50mg/mL溶菌酶,37℃条件下保温30min,再加入等量灭菌玉米淀粉,均匀搅拌,造粒,40目过筛后,沸腾干燥,制得嗜酸乳杆菌LS001后生元。

[0013] 实施例3

[0014] 人体过敏根本原因是免疫系统,通过实验对嗜酸乳杆菌与免疫反应的关系进行研究。嗜酸乳杆菌LS001对吞噬细胞的吞噬能力的影响。

[0015] 在体内腹腔巨噬细胞能吞噬鸡红细胞,据此判断巨噬细胞的吞噬功能。

[0016] 仪器和材料:显微镜、鸡红细胞、丙酮、甲醇、生理盐水、Giemsa染液。

[0017] 实验小鼠雄性40只,体重 20 ± 5 g,分为A、B、C、D四组,A组对照组,B组低剂量组,C组中剂量组,D组高剂量组,A、B、C、D四组小鼠均适应环境饲养7天,然后B组小鼠每天饲喂嗜酸乳杆菌LS001菌悬液(总菌数不少于 3×10^9 个/mL)0.5mL,C组小鼠每天饲喂嗜酸乳杆菌LS001菌悬液(总菌数不少于 9×10^9 个/mL)0.5mL,D组小鼠每天饲喂嗜酸乳杆菌LS001菌悬液(总菌数不少于 2.7×10^{10} 个/mL)0.5mL,A组小鼠饲喂相同体积的蒸馏水。

[0018] 实验步骤

S1、鸡红细胞悬液制备,取鸡血置于有玻璃珠的锥形瓶中,朝一个方向充分摇动,以脱纤维。用生理盐水洗涤2~3次,离心(2000r/min,10min),去上清,用生理盐水配成20%(v/v)的鸡红细胞悬液。

[0019] S2、吞噬功能测定,每只小鼠腹腔注射20%鸡红细胞悬液1mL。间隔30min-1.5h,颈椎脱臼处死动物,将其仰位固定于鼠板上,正中剪开腹壁皮肤,经腹腔注入生理盐水2mL,转动鼠板1min。然后吸出腹腔洗液1mL,平均分滴于2片载玻片上,放入垫有湿沙布的搪瓷盒内,移置37℃孵箱温育30min。孵毕,于生理盐水中漂洗,以除去未贴片细胞。晾干,以1:1丙酮甲醇溶液固定,4%(v/v)Giemsa-磷酸缓冲液染色3min,再用蒸馏水漂洗晾干。

[0020] S3、油镜下计数巨噬细胞,每张片计数100个,按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。

[0021] 吞噬百分率(%) = $\frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$;

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}。$$

[0022] 在计数时,应同时观察鸡红细胞被消化的程度。借以判定巨噬细胞吞噬与消化功能,通常分为4级:

I级:未消化。被吞噬的鸡红细胞完整,胞质浅红或浅黄带绿色,胞核浅紫色。

[0023] II级:轻度消化。胞质浅黄绿色、胞核固缩呈紫蓝色。

[0024] III级:重度消化。胞质淡染,胞核淡淡灰色。

[0025] IV级:完全消化。巨噬细胞内仅见形态类似鸡红细胞大小的空泡,边缘整齐,胞核隐约可见。

[0026] 以吞噬百分率或吞噬指数表示小鼠巨噬细胞的吞噬能力。结果如表1所示:

表 1

	吞噬百分率 (%)	吞噬指数
A	24.93 ± 15.07	0.37 ± 0.18
B	32.68 ± 19.62*	0.64 ± 0.43*
C	37.95 ± 18.76*	0.79 ± 0.49*
D	39.07 ± 20.19*	0.82 ± 0.56*

注:*与对照组比较,P<0.05。

[0027] 由表1可知,本发明在喂食嗜酸乳杆菌LS001菌悬液后,能增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,随着喂食嗜酸乳杆菌LS001菌悬液剂量(总菌数)的增加,小鼠的吞噬功能增强,低、中、高剂量组与对照组相比均有显著差异性(P<0.05)。

[0028] 实施例4 嗜酸乳杆菌LS001抗过敏功能试验

实验动物

小鼠,雄性,体重18-20g,36只。

[0029] 试剂与仪器

卵清白蛋白(OVA);氢氧化铝:分析纯;无菌生理盐水;IgE ELISA试剂盒;离心机,酶标仪,洗板机。

[0030] 实验步骤

S1、动物饲养

所有小鼠适应性喂养7天给予标准膳食,自由饮水。环境温度:24±1℃,湿度:55±10%。每2天灌胃一次生理盐水或嗜酸乳杆菌LS001后生元(实施例2中制备的)菌液,于实验开始后第8天、第22天、第29天、第36天分别进行腹腔OVA注射,于最后一次腹腔OVA注射7天后处死。

[0031] S2、动物分组及益生菌干预

将36只小鼠随机分为3组,如下:

空白对照组(A组):12只,每2天灌胃无菌生理盐水一次(0.2mL/次);

OVA阳性对照组 (B组): 12只, 每2天灌胃0.2mL无菌生理盐水一次, 进行3次腹腔OVA注射;

嗜酸乳杆菌LS001菌株组 (C组): 12只, 每2天灌胃0.2mL菌液一次 (含菌量 10^9 个/mL), 进行4次腹腔OVA注射。

[0032] S3、OVA的配制及过敏反应激发

采用腹腔注射卵清白蛋白 (OVA) 的方式激发小鼠过敏反应。激发所用OVA需自行配制, 配制方法如下: 400 μ g OVA溶于1mL磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 400mg $Al(OH)_3$ 配于10mL磷酸盐缓冲液 (PBS) 中形成混悬液, 并用超声破碎仪破碎10分钟, 使用时将OVA溶液和 $Al(OH)_3$ 混悬液等体积混合, 配得浓度为200 μ g OVA, 20mg $Al(OH)_3$ /mL的混悬液, 现配现用。

[0033] 分别于实验开始后第8天、第22天、第29天、第36天对OVA阳性对照组 (B组) 和嗜酸乳杆菌LS001菌株组 (C组) 小鼠进行腹腔OVA注射, 每只小鼠每次注射0.1mL混悬液。

[0034] S4、小鼠体重测定

实验开始时称取各组小鼠基础体重, 并于实验过程中每隔7天称取一次体重以监测小鼠生长发育情况。

[0035] S5、血清总IgE测定

于最后一次腹腔OVA注射7天后处死动物, 分别测定各组小鼠体重血液总IgE浓度。实验开始时, 采用尾部动脉法收集小鼠血液, 实验结束处死小鼠时, 采用眼球取血法收集小鼠血液, 室温静置30分钟后, 离心1000r/min 10min, 收集血清冻存于-80 $^{\circ}$ C备用。

[0036] 血清总IgE的测定, 采用小鼠血清总IgE ELISA试剂盒 (市购) 进行测定。

[0037] S6、统计学分析

用SPSS 17.0进行统计学分析, 各组间均数比较采用方差分析, 部分均数间两两比较采用Dunnett-t检验。

[0038] 实验结果

体重及一般情况:

实验结束时各组体重及各组体重增长结果如表2。实验结束时, 各组体重增长无统计学差异。体重增长均为正, 表明菌株对小鼠无毒性。实验期间小鼠生长状况良好, 无明显腹泻等不良表现。

[0039] 表2

组别	结束时 (g)	前后增长 (g)
A	43.06 \pm 2.38	23.61 \pm 0.93
B	42.87 \pm 3.15	24.07 \pm 1.25
C	43.16 \pm 2.93	24.18 \pm 0.85

血清总IgE浓度:

根据试剂盒要求, 在测定血清总IgE时, 对血清进行25倍稀释后进行测定, 结果如表3。实验前血清总IgE水平均较低或未检出, 实验结束时, OVA阳性对照组 (B组) 及嗜酸乳杆菌LS001菌株组 (C组) 血清总IgE明显高于空白对照组, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。菌株组血清总IgE低于OVA阳性对照组, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0040] 表3

	实验前血清总 IgE (ng/mL)	实验后血清总 IgE (ng/mL)
A	1.95±0.37	2.49±0.52
B	1.89±0.19	61.37±4.85 ^a
C	1.92±0.24	23.82±1.04 ^{ab}

注:a:P<0.05(与空白组比较);b:P<0.05(和阳性对照组比较)。

[0041] 综上所述,在OVA刺激小鼠后,血清IgE升高,小鼠发生超敏反应,而使用嗜酸乳杆菌LS001后可以降低由于超敏反应而升高的血清IgE水平,因此推测嗜酸乳杆菌LS001可以用于制备抗过敏的药物。

[0042] 试验结果表明,本发明的嗜酸乳杆菌LS001可降低OVA致敏小鼠的血清总IgE水平。

[0043] 因此,本发明采用上述的嗜酸乳杆菌LS001后生元及其应用,可广泛用于制备抗过敏的药物。

[0044] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其进行限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而这些修改或者等同替换亦不能使修改后的技术方案脱离本发明技术方案的精神和范围。