

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 9/78

A61K 38/50 //C12R1/24

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98813705.4

[43]公开日 2001年2月21日

[11]公开号 CN 1284994A

[22]申请日 1998.10.13 [21]申请号 98813705.4

[30]优先权

[32]1998.2.20 [33]IT [31]RM98A000103

[86]国际申请 PCT/IT98/00275 1998.10.13

[87]国际公布 WO99/42568 英 1999.8.26

[85]进入国家阶段日期 2000.8.18

[71]申请人 门德斯有限责任公司

地址 意大利罗马

[72]发明人 C·德希莫恩

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄革生

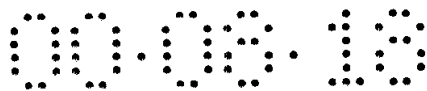
权利要求书4页 说明书9页 附图页数0页

[54]发明名称 具有精氨酸脱亚氨酶的细菌的用途以及
含有该细菌的组合物

[57]摘要

本发明公开了使用产精氨酸脱亚氨酶细菌以诱导细胞凋亡和/或减轻炎症反应的用途,以及含有这种细菌的药物或饮食组合物。还包括一株具有大量精氨酸脱亚氨酶的短乳杆菌。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权利要求书

1. 以具有精氨酸脱亚氨酶活性、其活性表示为 pmol 瓜氨酸/mg 细菌蛋白/分钟时不低于 0.1 为特征的一株细菌，以及保留此活性的传代物、变异株和衍生株。

2. 权利要求 1 所述菌株，其选自乳细菌。

3. 权利要求 2 所述菌株，其选自短乳杆菌、发酵乳杆菌和干酪乳杆菌。

4. 权利要求 3 所述菌株，它是保藏于 DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, 德国，保藏号为 DSM 11988 的短乳杆菌 CD2。

5. 具有精氨酸脱亚氨酶之细菌用于制备能诱导细胞凋亡和/或减轻炎症反应和/或治疗肠吸收障碍和胰功能不全，并调节受试对象的代谢和/或营养状况的药物或饮食组合物的用途。

6. 权利要求 5 的用途，其中所述细菌是革兰氏阳性细菌。

7. 权利要求 5 的用途，其中所述细菌是革兰氏阴性细菌。

8. 权利要求 5 的用途，其中所述细菌是乳细菌。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述乳细菌选自短乳杆菌、发酵乳杆菌和干酪乳杆菌。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述乳细菌属于权利要求 1 或 2 的任何一株细菌。

11. 权利要求 9 的用途，其中所述乳细菌属于保藏在 DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, 德国，保藏号为 DSM 11988 的短乳杆菌 CD2 菌株。

12. 权利要求 5 到 11 中任何一项的用途，其用于预防和治疗肿瘤，尤其是结肠-直肠癌、肝癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、口腔鳞状细胞癌、淋巴肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、胸膜和腹膜癌、严重的肌无力、系统性红斑狼疮以及其他一些自身免疫疾病包括甲状腺疾病、以急性和/或慢性发炎过程为特征的疾病、支气管哮喘、肠道炎性疾病、



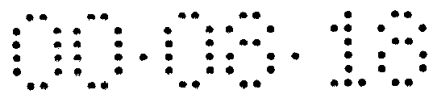
胃炎、十二指肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、肺炎和胸膜炎、腺病毒、杆状病毒和普通病毒因子感染、以急性和/或慢性发炎和/或中枢和/或周围神经系统变性过程为特征的疾病、胰腺炎、心肌内膜炎和局部缺血损伤（心肌、视网膜、脑和肾局部缺血）、尿石病、肾钙质沉着、高草酸盐尿、高磷酸盐尿、系统性和/或区域性动脉和/或静脉压力方面的肾异常如门静脉高血压、阴道病和阴道炎、直肠出血性炎症、前列腺炎、鼻窦炎和耳炎、结膜炎、龋炎、牙周病、过敏现象和免疫缺损症。

13. 权利要求 5 到 12 中任何一项的用途，其中所述细菌单独或互相联合或与嗜酸乳杆菌、布氏乳杆菌、干酪乳杆菌、链状乳杆菌、纤维二糖乳杆菌、卷曲乳杆菌、弯曲乳杆菌、德氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、雷氏乳杆菌、小乳杆菌、植物乳杆菌、罗氏乳杆菌、唾液乳杆菌、青春双歧杆菌、角双歧杆菌、双歧双歧杆菌、短双歧杆菌、链状双歧杆菌、齿双歧杆菌、埃氏双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、植物双歧杆菌、假链状双歧杆菌、假长双歧杆菌、乳酸链球菌、棉子糖乳链球菌、嗜热链球菌、发酵氨基酸球菌、发酵噬纤维菌、发酵红育菌、发酵纤维单胞菌和运动发酵单胞菌联合用药，和/或与精氨酸脱亚氨酶、鞘磷脂酶或其它酶，与可的松、抗炎剂、免疫调节剂、细胞生长抑制剂、免疫药物、内分泌药物、血管药物、麻醉药、血管舒张药物、生长因子、细胞因子、神经酰胺、维生素和矿物质、脂类、氨基酸和糖类、针对肠道使用的配方和饮食、益生菌或益生菌补充物，以及与制药工业或食品/饮食领域中经常使用的赋形剂联合使用。

14. 权利要求 5 到 13 任何一项的用途，其中所述细菌经冷冻干燥或超声处理过。

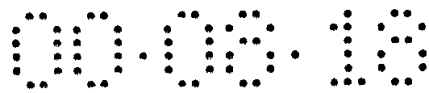
15. 能通过肠道、局部、直肠、鼻或非肠道途径用药以诱导细胞凋亡和/或减轻炎症反应的药物组合物，该药物组合物含有一定量的具有精氨酸脱亚氨酶的细菌，能有效地诱导细胞凋亡和/或减轻炎症反应和/或治疗肠吸收障碍和胰功能不全，并能调节受试对象的代谢和/或营养状况。

16. 权利要求 15 的组合物，其中所述细菌是革兰氏阳性细菌。



17. 权利要求 15 的组合物，其中所述细菌是革兰氏阴性细菌。
18. 权利要求 15 的组合物，其中所述细菌是乳细菌。
19. 权利要求 18 的组合物，其中所述乳细菌选自短乳杆菌、发酵乳杆菌和干酪乳杆菌。
20. 权利要求 19 的组合物，其中所述乳细菌属于权利要求 1、2 或 3 中的任何一株菌。
21. 权利要求 19 的组合物，其中所述乳细菌属于保藏在 DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, 德国，保藏号为 DSM 11988 的短乳杆菌 CD2 菌株。
22. 权利要求 15 到 21 中任何一项的组合物，其中所述细菌经冷冻干燥或超声处理过。
23. 权利要求 15 到 22 中任何一项的组合物，其中所述细菌的浓度为 1×10^1 CFU 到 1×10^{13} CFU/克组合物。
24. 权利要求 15 到 23 中任何一项的组合物，其可用于预防和治疗肿瘤，尤其是结肠-直肠癌、肝癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、口腔鳞状细胞癌、淋巴肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、胸膜和腹膜癌、严重的肌无力、系统性红斑狼疮以及其他一些自身免疫疾病包括甲状腺疾病、以急性和/或慢性发炎过程为特征性疾病、支气管哮喘、肠道炎性疾病、胃炎、十二指肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、肺炎和胸膜炎、腺病毒、杆状病毒和普通病毒因子感染、以急性和/或慢性发炎和/或中枢神经和/或周围神经系统变性过程为特征性疾病、胰腺炎、心肌内膜炎和局部缺血损伤（心肌、视网膜、脑和肾局部缺血）、尿石病、肾钙质沉着、高草酸盐尿、高磷酸盐尿、系统性和/或区域性动脉和/或静脉压力方面的肾异常如门静脉高血压、阴道病和阴道炎、直肠出血性发炎、前列腺炎、鼻窦炎和耳炎、结膜炎、龈炎、牙周病、过敏现象和免疫缺损症。
25. 权利要求 15 到 24 中任何一项的组合物，其中所述细菌单独或互相联合用药或与嗜酸乳杆菌、布氏乳杆菌、干酪乳杆菌、链状乳杆菌、

纤维二糖乳杆菌、卷曲乳杆菌、弯曲乳杆菌、德氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、雷氏乳杆菌、小乳杆菌、植物乳杆菌、罗氏乳杆菌、唾液乳杆菌、青春双歧杆菌、角双歧杆菌、双歧双歧杆菌、短双歧杆菌、链状双歧杆菌、齿双歧杆菌、埃氏双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、植物双歧杆菌、假链状双歧杆菌、假长双歧杆菌、乳酸链球菌、棉子糖乳链球菌、嗜热链球菌、发酵氨基酸球菌、发酵噬纤维菌、发酵红育菌、发酵纤维单胞菌和运动发酵单胞菌联合用药，和/或与精氨酸脱亚氨酶、鞘磷脂酶或其它酶，与可的松、抗炎剂、免疫调节剂、细胞生长抑制剂、免疫药物、内分泌药物、血管药物、麻醉药、血管舒张药物、生长因子、细胞因子、神经酰胺、维生素和矿物质、脂类、氨基酸和糖类、针对肠道使用的配方和饮食、益生菌或益生菌补充物，以及与制药工业或食品/饮食领域中经常使用的赋形剂联合使用。



说 明 书

具有精氨酸脱亚氨酶的细菌的用途 以及含有该细菌的组合物

本发明涉及使用具有精氨酸脱亚氨酶 (arginine deiminase) 的细菌以诱导细胞凋亡和/或减轻炎症反应, 以及含有这种细菌的药物或饮食组合物。本发明还涉及一株具有大量精氨酸脱亚氨酶的短乳杆菌。

通过调节组成细胞的增殖、分化或死亡速率可以控制一个有机体的细胞群体间的平衡 (Collins. M. K. L. 等, 生化科学进展 18:307. 1993)。在胚胎发生、变态、激素依赖性组织萎缩和正常组织代谢过程中的细胞死亡被称为“程序性细胞死亡”。这些活动在很大程度上以“细胞凋亡”的形式进行, 此过程以细胞核的浓缩与分隔、细胞质的浓缩和断裂以及经常发生的染色体 DNA 断裂成核小体单位为特征 (Schwartz, L. M. 等 现代免疫 14:582, 1993)。当细胞没有接受到抑制内在的细胞自杀程序必需的胞外存活信号时, 在脊椎动物的发育过程中经常会发生细胞凋亡: 周围不同类型的细胞 (旁分泌机制) 或相同类型的细胞 (自分泌机制) 能产生这种存活因子。细胞凋亡尤其发生在复杂器官的胚胎发育中, 其中特定的细胞亚群被杀死。例如, 与在胸腺内去除自我应答的 T 淋巴细胞一样, 在发育过程中许多神经元会迁入脑部。在成体内, 能发生可逆扩张的组织中尤其会发生细胞凋亡, 例如依赖于激素的乳腺细胞和前列腺细胞在失去激素后或骨髓造血细胞在发生细胞因子依赖性扩张之后即会如此。

细胞凋亡过程中细胞内发生的变化已有详细研究和描述 (Cohen. J. J. 等 Lab. Clin. Med. 124:761, 1994)。对应于由细胞损伤导致细胞死亡时发生的变化的细胞坏死与细胞凋亡有显著区别。实际上, 在细胞坏死中损伤的细胞膨胀并崩解, 释放出对组织中其它细胞有害的内含物, 从而引发炎症反应。与此不同的是, 凋亡小体被非常迅速地吞噬, 不会导致细胞内含物在胞外的扩散, 否则将导致细胞坏死中典型的病灶

周围的炎症。

近来的实验证据表明，细胞存活的变化会导致包括癌症、病毒感染、自身免疫疾病、植物性神经系统的异常和爱滋病等诸多人类疾病的病理发生 (Thompson, C. B. 科学 267:1456)。一种目的在于特异改变细胞凋亡的治疗方法有望更改某些疾病的自然过程。化学治疗剂和放射治疗主要损伤 DNA，其又触发细胞自杀，从而诱导肿瘤细胞的死亡。另外，许多肿瘤保留着某些生理性细胞死亡控制系统，此控制系统是它们所来源的细胞的特征。例如前列腺癌和乳腺癌分别依赖于雄激素和雌激素。因此在前列腺癌的治疗中抗雄激素疗法或在乳腺癌的治疗中使用抗雌激素剂如他莫西芬 (tamoxifen) 以除去雌激素是基础和广为接受的方法。这些方法都诱导原来分别依赖于雄激素或雌激素而存活的肿瘤细胞的凋亡。另外，糖皮质类固醇对淋巴样白血病患者有益效果可归功于其导致细胞凋亡：用于肿瘤的化学治疗中的其它物质如环磷酰胺、氮甲喋呤、依托泊苷和顺铂诱发了肿瘤细胞的凋亡 (Thatte, U.等 细胞凋亡, 药物 54:511, 1997)。

以前的研究已经表明，在食物中和/或在饮食/药物配方中存在的乳细菌 (lactic bacteria) 能在肠中暂时寄居并带来益处。它们在肠道转运中的存活或粘附于上皮似乎对改变宿主的免疫反应是重要的 (Schiffrin, E. J.等 美国临床营养杂志 66:515S, 1997)。乳细菌潜在的益处包括预防肠道感染、刺激 IgA 的分泌以及抑制肠癌的生长，增强 IgA、T 细胞和巨噬细胞的活力 (Perdigon, G.等 乳品科学杂志 78: 1597, 1995)。在体外，对人单核细胞而言，乳细菌表现出能刺激产生 α -TNF、白介素 (IL) -6 和白介素-10 的能力，其程度甚至高于使用脂多糖 (LPS) 作为刺激剂时的产量，验证了其对宿主非特异免疫的潜在作用 (Miettinen, M.等 传染与免疫, 64:5403, 1996)。在体外，乳细菌还表现出能吸收烹制食品中诱变物质的能力，证实了用乳杆菌对人进行给药能降低摄入烤肉后诱变物质的分泌，从而降低身患结肠癌的危险 (Lidbeck, A.等 欧洲癌症预防杂志 1:341, 1992)。在乳腺癌细胞 MCF7 生长过程中使用婴儿双歧杆菌、双歧双歧杆菌、动物双歧杆

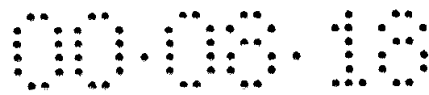
菌、嗜酸乳杆菌或类干酪乳杆菌发酵乳进行实验证实了各种发酵后的乳能抑制肿瘤细胞的生长，只是程度有所差异。抗增殖的效果与发酵乳中细菌的存在无关，与乳或其组分也无关，而认为是由于乳发酵过程中乳细菌从头合成的一种可溶性物质的存在，或者是由于将乳中的某些成分经微生物转化成为生物活性形式所致。

许多微生物利用精氨酸作为碳源、氮源和能源。在水的存在下精氨酸脱亚氨酶将精氨酸转化为瓜氨酸和氨。在各种病原菌或潜在病原菌如假单胞菌和芽孢杆菌以及一些种类的支原体中也可见到这种酶解过程。还验证了在口腔生态、pH 降至 4 或更低时保护较不耐酸的生物、牙菌斑、由抗酸较强的细菌引起的糖酵解中，这个系统可发挥一定作用 (Curran, T. M. 应用和环境微生物学 61:4494, 1995)。

对可分离自支原体的精氨酸脱亚氨酶进行了研究，并用于治疗癌症 (Takaku, H.等 日本肿瘤研究杂志 1:840, 1995)。支原体是同细菌类似的微生物，与后者不同的是它缺乏细胞壁，基因组只有大肠杆菌的大约 1/6；但它们对人、动物和植物有致病性，并且由于缺乏细胞壁而不易处理。支原体如果在体内使用将成为免疫原并有副作用 (MaGarrity, J. G.等 USA 5 372 942)，因此对于从支原体获得的精氨酸脱亚氨酶要进行纯化。由于潜在的致病性和致热性，不能使用具有精氨酸脱亚氨酶的其它微生物（如假单胞菌和芽孢杆菌）。

现在我们惊奇地发现一些细菌富含精氨酸脱亚氨酶，尤其是一些革兰氏阳性细菌和阴性细菌以及一些乳细菌菌株，特别是短乳杆菌或发酵乳杆菌，尤其特别的是被称为 CD2，保藏于 DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, 德国，保藏号是 DSM 11988 的短乳杆菌菌株，这株菌能诱导细胞凋亡，因此可以用于预防或治疗以细胞凋亡的丧失或不足或者以发炎为特征的临床情况。

上述细菌令人惊奇地含有能诱导细胞凋亡的精氨酸脱亚氨酶，它们可以直接或经合适的冻干后或经超声处理后使用。实际上，根据本发明，所讨论的细菌可以是活体或经超声处理，根据预期目的和菌种含



精氨酸脱亚氨酶的量，细菌浓度可以从每克组合物 1×10^1 CFU 到 1×10^{13} CFU。可以使用相同的菌株缓解或终止由一氧化氮 (NO) 引起的炎症反应。由一氧化氮合成酶 (NOS) 从 L-精氨酸合成的一氧化氮是生物活动的胞间和胞内信息分子。NO 合成水平的变化是诸如动脉高血压、肾功能不全、败血症性休克、缺氧诱发的血管舒张、蛛网膜下出血导致的血管痉挛、血管梗塞或其它神经变性疾病引起的神经损伤、慢性炎症病理、过敏反应和免疫缺损等许多其它病理生理状况的基础。精氨酸脱亚氨酶将精氨酸转化为瓜氨酸和氨，并不产生一氧化氮，因此有抗炎作用，并具有治疗或补救效果，例如可改善肠道吸收障碍和胰功能不全患者的代谢和/或营养状况。用于参考的非限制性实施例中的一种效果是可以降低血中和尿中草酸盐和/或磷酸盐的水平。

可以使用富含精氨酸脱亚氨酶的细菌治疗和/或预防的疾病或异常的非限制性实例总的说有癌症，尤其是结肠-直肠癌、肝癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、口腔鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma)、淋巴瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、胸膜和腹膜癌、严重的肌无力、系统性红斑狼疮以及其他一些自身免疫疾病包括甲状腺疾病、以急性和/或慢性发炎过程为特征性疾病、支气管哮喘、肠道炎性疾病、胃炎、十二指肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、肺炎和胸膜炎、腺病毒、杆状病毒和普通病毒因子感染、以急性和/或慢性发炎和/或中枢和/或周围神经系统变性过程为特征性疾病、胰腺炎、心肌内膜炎和局部缺血损伤 (心肌、视网膜、脑和肾局部缺血)、尿石病、肾钙质沉着、高草酸盐尿、高磷酸盐尿、系统性和/或区域性动脉和/或静脉压力方面的肾异常如门静脉高血压、阴道病和阴道炎、直肠出血性发炎 (procto-haemorrhoidal inflammation)、前列腺炎、鼻窦炎和耳炎、结膜炎、龈炎、牙周病、过敏现象和免疫缺损症。

可以单独或相互组合或其他乳细菌联合使用这些富含精氨酸脱亚氨酶的微生物，所述乳细菌如嗜酸乳杆菌、布氏乳杆菌、干酪乳杆菌、链状乳杆菌、纤维二糖乳杆菌、卷曲乳杆菌、弯曲乳杆菌、德氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、雷氏乳杆菌 (*Lactobacillus leichmanii*)、小乳杆菌



(*Lactobacillus minutus*)、植物乳杆菌、罗氏乳杆菌、唾液乳杆菌、青春双歧杆菌、角双歧杆菌、双歧双歧杆菌、短双歧杆菌、链状双歧杆菌、齿双歧杆菌、埃氏双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、植物双歧杆菌 (*Bifidobacterium plantarum*)、假链状双歧杆菌、假长双歧杆菌、乳酸链球菌、棉子糖乳链球菌、嗜热链球菌、发酵氨基酸球菌、发酵噬纤维菌、发酵红育菌、发酵纤维单胞菌和运动发酵单胞菌。

根据本发明，这些细菌还可以与精氨酸脱亚氨酶、鞘磷脂酶或其它酶、可的松、抗炎剂、免疫改善剂、细胞生长抑制剂、免疫药物、内分泌药物、血管药物、麻醉药、血管舒张药物、生长因子、细胞因子、神经酰胺、维生素和矿物质、脂类、氨基酸和糖类、针对肠道使用的配方和饮食、益生菌或益生菌 (*probiotic*) 补充物，以及制药工业或食品/饮食领域中经常使用的赋形剂联合使用。用药优选的方式是口服，但并没有限制，还可通过局部、直肠、鼻、非肠道等途径用药。因此本发明组合物的外型可以是丸剂、片剂、胶囊、球剂、栓剂、乳剂、悬浮液、贴膏、霜剂、油膏剂、喷雾液、洗眼剂、漱口剂或洁牙剂。

下面以非限制性例证的方式给出的实施例将更加详细地阐述本发明。

实施例 1

不同细胞体系中细胞凋亡的诱导

所用细胞

1 正常细胞:

PBL (人外周血淋巴细胞)

HS27 (正常的人成纤维细胞)

HaCaT (永生化的正常人角质形成细胞)

2 肿瘤细胞:

Jurkat (人 T 白血病)

P815 (鼠肥大细胞瘤)

J744 (鼠肿瘤巨噬细胞)

在含有 10% 血清的合适培养基中，分别添加或不加经超声处理、



悬浮于磷酸缓冲溶液 (PBS) 的短乳杆菌制剂, 于 37°C (5%CO₂) 培养细胞 18-72 小时 (细胞悬液中的终浓度为 100mg/10ml)。在培养结束时, 给细胞计数, 并根据对染料台盼蓝的排斥测定细胞活力。根据以下来测定经细菌处理后可能因细胞凋亡而诱导的死亡:

- 经苏木精/伊红染色后, 在光学显微镜下的形态。
- 经吖啶橙/溴乙锭染色后通过荧光显微术和细胞荧光测定法检测,
- 和
- 通过 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 梯度化降解。

表 1
细胞凋亡 (%)

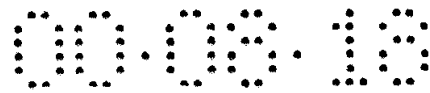
	对照	短乳杆菌
PBL	0	0
HS27	0	0
HaCaT	0	0
Jurkat	2-3	15-20
P815	0	1-3
J744	0	1-3

以上报道的结果清楚地说明: 使用本发明中经超声的细菌处理 14-18 小时确实诱导了肿瘤细胞相当水平的细胞凋亡, 而对所分析的正常细胞体系没有任何影响。

实施例 2

细菌菌株中存在精氨酸脱亚氨酶的验证

根据将水溶液中放射性标记的精氨酸转变为瓜氨酸和氨的情况, 测定一些细菌菌株中精氨酸脱亚氨酶的活性。存在能特异性抑制影响精氨酸转变的其它酶 (分别为一氧化氮合成酶和精氨酸酶) 的合适抑制剂 (L-N-硝基-精氨酸甲酯盐酸盐和 L-缬氨酸) 能保证测得的酶促活性



是由精氨酸脱亚氨酶，而不是其它酶引起的。另外，使用精氨酸脱亚氨酶的特异抑制剂（甲脒）能证实结果的可信性。

表 2

精氨酸脱亚氨酶的活性（表示为每 mg 细菌蛋白每分钟产生的 pmol 放射性瓜氨酸）

菌株	pmol 瓜氨酸/mg 蛋白/分钟
短乳杆菌 CD2	6.72
发酵乳杆菌	0.46
干酪乳杆菌	0.13
嗜酸乳杆菌	0.002
植物乳杆菌	0.05
双歧双歧杆菌	0.03
嗜热链球菌	0.020

对于本发明的目的，有用菌株的值大于 0.1pmol 瓜氨酸/mg 细菌蛋白/分钟。

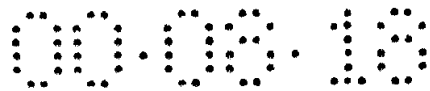
一氧化氮合成酶抑制剂（L-NAME, L-硝基单甲基精氨酸）或精氨酸酶抑制剂（L-缬氨酸）的存在丝毫不会影响精氨酸转变为瓜氨酸的酶活性，因此可以将用不同细菌观察到的瓜氨酸的产生归因于精氨酸脱亚氨酶。此外，对细菌而言，分析系统中缺乏对于组成型一氧化氮合成酶的活性必不可少的钙和钙调蛋白丝毫不会改变以精氨酸转化表示的活性，这进一步证实了负责转化的酶是精氨酸脱亚氨酶。

此后给出的结果表明所讨论细菌中的精氨酸脱亚氨酶活性进一步能完全抑制组成型和诱导型一氧化氮合成酶（NOS）的活性。这可能是因为它们的存在耗尽了各种一氧化氮合成酶的底物（精氨酸）。为了这个目的，在体外分别使用大肠杆菌的脂多糖（100mg/ml）和干扰素（100u/ml）刺激大鼠小脑抽提物和大鼠腹膜巨噬细胞，作为组成型和诱导型一氧化氮合成酶的阳性对照。

表 3
组成型和诱导型一氧化氮合成酶
以及精氨酸脱亚氨酶的活性

样品	瓜氨酸 (pmol/5 μ l)
小脑	0.24
小脑+L-NAME	0.01
小脑+钙螯合剂 (EGTA)	0.01
小脑+钙调蛋白抑制剂 (W13)	0.01
小脑+短乳杆菌 CD2 (5 μ g)	0.72
小脑+短乳杆菌 CD2+L-NAME	0.8
小脑+短乳杆菌 CD2+EGTA	0.74
小脑+短乳杆菌 CD2+W13	0.76
小脑+发酵乳杆菌 (30 μ g)	0.38
小脑+发酵乳杆菌 +L-NAME	0.4
小脑+发酵乳杆菌+EGTA	0.4
小脑+发酵乳杆菌+W13	0.39
没有处理的巨噬细胞	0
巨噬细胞+LPS+IFN	0.32
巨噬细胞+LPS+IFN+L-NAME	0
巨噬细胞+短乳杆菌 CD2 (5 μ g)	0.76
巨噬细胞+短乳杆菌 CD2+L-NAME	0.78
巨噬细胞+LPS+IFN+短乳杆菌 CD2	0.81
巨噬细胞+LPS+IFN+短乳杆菌 CD2 +L-NAME	0.82
巨噬细胞+发酵乳杆菌 (30 μ g)	0.4
巨噬细胞+发酵乳杆菌+L-NAME	0.41
巨噬细胞+LPS+IFN+发酵乳杆菌	0.42
巨噬细胞+LPS+IFN+发酵乳杆菌+L-NAME	0.4

结果似乎表明并不是所有的细菌都有足够的精氨酸脱亚氨酶活性而可用于本发明目的 (表 2), 并且正如即使存在组成型和诱导型一氧



化氮合成酶的特异性抑制剂时瓜氨酸的量仍然居高不下所证实的那样，所有产精氨酸脱亚氨酶的菌株都抑制这两种一氧化氮合成酶（表3）。

实施例 3

治疗 4 个身患囊炎的病人。囊炎是一种非特异性的回肠区炎症，因长期溃疡性的结肠炎诱发 ileo-ano-anastomosis 的最常见的并发症。近来的证据表明囊炎是一氧化氮介导的发炎损伤的结果。使用浓度为 5×10^{10} CFU/gr、经冷冻干燥的短乳杆菌 CD2 制剂治疗所有志愿的受试者 2 个月，经口服用药，剂量是 6g/天。在治疗前后从囊的粘膜取活组织标本，进行匀浆化，并通过分析放射性标记的精氨酸转变为瓜氨酸的情况来测定瓜氨酸的量。

表 4

囊炎患者中 CD2 治疗对肠活组织标本中
诱导型一氧化氮合成酶的活性的影响

患者	瓜氨酸 (pmol/mg 蛋白/分钟)	
	TO	TI
1	2.95	0.89
2	1.15	0.56
3	0.56	0.5
4	0.47	0.28
5	0.7	0.5

用 CD2 进行的治疗显著地降低了诱导型一氧化氮合成酶的活性水平。