[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00814779.5

[51] Int. Cl.
A61K 35/74 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281220C

[51] Int. Cl. (续)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/23 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

[22] 申请日 2000.10.13 [21] 申请号 00814779.5

[30] 优先权

[32] 1999.10.26 [33] EP [31] 99121356.2

[86] 国际申请 PCT/EP2000/010105 2000.10.13

[87] 国际公布 WO2001/030365 英 2001.5.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.24

[71] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 E·施夫林 P·佩雷茨

审查员 卢立明

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 10 页

[54] 发明名称

乳酸菌在制备治疗和/或预防贾第鞭毛虫病药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及能够防止肠贾第鞭毛虫小肠细胞定殖的乳酸菌或双歧杆菌上清液在制备用于治疗和/或预防与肠贾第鞭毛虫胃肠定殖相关的疾病的可吸收载体中的用途。本发明还涉及具有上述特征的双歧杆菌特异菌株和可吸收载体，如含有这样的上清液或微生物的食物或药物组合物。

1. 能够防止肠贾第鞭毛虫粘附小肠细胞的乳酸菌或双歧杆菌培养上清在制备用于治疗和/或预防与肠贾第鞭毛虫胃肠道定殖相关疾病的可吸收载体中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中可吸收载体是食物组合物或药物组合物。

3. 权利要求 2 的用途，其中食物组合物选自奶、酸奶、凝乳、奶酪、发酵奶、基于奶的发酵产品、冰淇淋、基于发酵谷物的产品、奶粉、婴儿配方或宠物食品。

4. 权利要求 2 的用途，其中药物组合物的形式是片剂、液体细菌悬液、干的口服添加剂、湿的口服添加剂、干的管饲制剂或湿的管饲制剂。

5. 选自 NCC 189（I-2333）和 NCC 200（I-2334）的双歧杆菌。

6. 食物或药物组合物，包括能够防止肠贾第鞭毛虫粘附小肠细胞的乳酸菌培养上清，用于治疗和/或预防与肠贾第鞭毛虫胃肠道定殖相关的疾病。

7. 权利要求 6 的组合物，是奶、酸奶、凝乳、奶酪、发酵奶、基于奶的发酵产品、冰淇淋、基于发酵谷物的产品、奶粉、婴儿配方或宠物食品，或者其形式是片剂、液体细菌悬液、干的口服添加剂、湿的口服添加剂、干的管饲制剂或湿的管饲制剂。

乳酸菌在制备治疗和/或预防贾第鞭毛虫病药物中的应用

本发明涉及能够防止肠贾第鞭毛虫小肠细胞定殖的乳酸菌，或其培养上清，分别用于治疗和/或预防与肠贾第鞭毛虫胃肠定殖相关的疾病。本发明还涉及具有上述特征的双歧杆菌菌株和应用乳酸菌制备可吸收载体，如食物或药物组合物，治疗和/或预防肠贾第鞭毛虫对小肠的感染的用途。

肠贾第鞭毛虫是有鞭毛的原生动物，它对个体胃肠道的感染可以导致疾病，如腹痛、稀软便甚或严重腹泻。它的生活周期有两个阶段，包囊期和滋养体期，这些不同的形式可以使微生物在不同的甚至恶劣的环境中存活。

包囊是处于静息状态的四核卵形细胞，是贾第鞭毛虫病传播的原因。个体摄入包囊后，通过接触胃酸和/或消化酶而激发脱囊反应。然后被称为滋养体的寄生虫出现了，它是双核半梨形细胞，大约 10um 大小，前端宽而后部窄。其腹侧大部分被腹盘覆盖，相信腹盘至少可以部分解释滋养体对小肠表面的粘附作用。

脱囊后，滋养体可能持续存在于感染个体的小肠中，甚至长达数年。如果滋养体在肠液的冲击下被带到下游，它们又开始形成包囊以适应新的环境。

包囊随粪便排出，可以忍受多种极端环境条件，包括不同的温度、pH 和张力条件。一个感染个体每天可能排出 9×10^8 个包囊，而已经证实，低达 10 个包囊就足以导致另一个个体的感染。肠贾第鞭毛虫的传播有多种不同途经，但主要传播途经为污染的水源和食物。人与人之间直接播散已经通过一些日护中心和医院爆发得到支持。此外，还发现野生动物也是肠贾第鞭毛虫的感染储存宿主，可能对病原体的播散起一定作用。

贾第鞭毛虫病与其他肠道疾病一样，在婴儿和儿童中更加严重。感染通常与腹泻和吸收不良有关，导致儿童生长发育迟缓，可能最终导致新生儿死亡。

但是，大约一半的感染者没有症状，并成为病原体播散的根源，因为缺乏任何可甄别的症状，没有得到相应的治疗。

尽管对肠贾第鞭毛虫的研究已经倾注了大量努力，但贾第鞭毛虫病的发病机理仍然不能仅用单一的毒力因素来解释，迄今为止，也没有分离到毒性化合物。

业已发现，贾第鞭毛虫定殖的胃肠道在光学显微镜下形态各异，从粘膜结构正常到几乎全部绒毛萎缩。电子显微镜研究结果发现存在超微结构改变，如微绒毛的缩短和断裂（Chavez et al., Experimental Parasitol. 80 (1995), 133-138）。

业已发现，这些结构异常通常伴随微绒毛膜内乳糖酶、蔗糖酶和麦芽糖酶活性的降低，以及小肠转运功能的损害（Buret et al., Gastroenterology 103 (1992), 506-513; Roberts-Thomson et al., Gastroenterology. 71(1976), 57-61）。

除了上述两种形式，肠贾第鞭毛虫还发生了表面结构的极端变化，并进化了保护性蛋白家族，所述蛋白覆盖所有暴露表面（Aley et al., Infect. Agents Dis. 4 (1995), 161-166; Muller, et al., Infect. Immun. 64 (1996), 1385-1390; Nash et al., J. Euk. Microbiol. 42 (1995), 604-609）。这些变异的表面蛋白（VSPs）可以保护滋养体避免免疫和环境因素的侵害，这样贾第鞭毛虫可以逃避宿主的防御系统攻击，并可在高度降解环境中存活，如在哺乳动物肠道中繁殖。VSPs 的修饰大约每 6－13 代发生一次，使宿主免疫系统很难或几乎不可能针对病原体产生特异性免疫应答。免疫和环境压力还可以选择不同的 VSP 表型。而且，还有报导，在脱囊后可以发生 VSPs 抗原转换（Gillin et al., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996), 679-705）。

人贾第鞭毛虫病与固有层和上皮内淋巴细胞数量的增加相关，提示 T 细胞激活可能是微绒毛损害的原因。但是，与没有没有抑制的动物相比，在小鼠中诱导免疫抑制却导致对微绒毛相关酶更加严重的影响，提示在肠贾第鞭毛虫感染过程中，上皮损伤似乎不仅仅依赖于免疫功能。

对贾第鞭毛虫病的常见治疗是给予抗生素，如属于硝基咪唑类的药物。但是，在流行地区对治疗的反应却非常不一致（Katelaris et al., Aliment. Pharmacol. Ther. 8 (1994), 187-192）。而且，由于小肠天然菌群的至少部分损伤，应用这些抗生素通常伴随严重的副反应，如长期腹泻甚或其他致病微生物，如酵母菌导致的胃肠道感染。

因此，在本领域存在这样一种需求，即为贾第鞭毛虫病寻找其他治

疗方法，或者预防病原体对个体的感染。

因此本发明将问题定为提供治疗或预防肠贾第鞭毛虫感染的其他方法。

这一问题可通过下述方法解决，即应用能够防止肠贾第鞭毛虫粘附小肠细胞的乳酸菌乳酸菌或双歧杆菌上清液制备可吸收载体，治疗和/或预防与肠贾第鞭毛虫胃肠定殖相关的疾病。

根据本发明一个优选实施方案，分别提供了新型乳酸菌和双歧杆菌，能够防止肠贾第鞭毛虫粘附小肠细胞，所述细菌选自 NCC533（I-1225），NCC 90 (I-2332), NCC 189 (I-2333)或 NCC 200 (I-2334)。根据布达佩斯条约，这些微生物业已于 1999 年 11 月 30 日保藏在巴斯德研究所，并获得上述保藏号。本发明还涉及含有这些微生物的食物和药物组合物。

载体中包括的微生物数量大约为 $10^6 - 10^{12}$ pfu（空斑形成单位）。包含的微生物可以就是这样的，也可任选在从培养基中基本纯化后。此外，载体还可以包括这些微生物的培养上清，在制备载体之前，优选通过本领域众所周知的方法进行浓缩。

可吸收载体可以是食物，也可以是药物组合物，如奶、酸奶、凝乳、奶酪、发酵奶、基于奶的发酵产品、冰淇淋、基于发酵谷物的产品、奶粉、婴儿配方或其他类型的宠物食品。这些载体可以，例如通过应用具有相应特征的微生物发酵起始物质来容易地生产。此外，微生物或其任选浓缩培养上清可以分别以液体或固体的形式加入载体。药物组合物可以通过标准技术进行制备，包括将微生物和/或其任选浓缩培养上清加入载体，所述药物组合物如片剂、液体细菌悬液、干的或湿的口服添加剂、干的或湿的管饲制剂。根据给药方式，经验丰富的技术人员可以选择相信是适宜的剂型。

附图中，

图 1 显示了添加 10^5 滋养体/cm^2 后，Portland-1 菌株对 Caco-2 细胞的粘附作用；

图 2 显示了应用未分化 HT-29 细胞进行粘附试验的结果；

图 3 显示了 UNO 菌株粘附于分化 Caco-2 细胞的扫描电镜图；

图 4 显示了肠贾第鞭毛虫在上皮细胞刷状缘导致的微绒毛损害；

图 5A 显示了贾第鞭毛虫、乳酸菌和 Caco-2 细胞共同孵育的结果；

图 5B 显示了 Caco-2 单层细胞与乳酸菌预孵育的结果；

图 6A 显示了一个粘附实验的结果，其中 Portland-1 和 WB 与本发明乳酸菌中和上清接触；

图 6B 显示了一个粘附实验的结果，其中 WB 和 CIDCA 与本发明乳酸菌中和上清接触；

图 7A 显示了 WB 菌株在酸性上清（pH 4）（DMEM:上清 = 1:1）中孵育 1 个小时获得的结果；

图 7B 显示，上清的中和（pH 7）消除了抑制效果；

图 8A 显示了 WB 菌株在不同 pH La10 菌株上清中孵育获得的结果；

图 8B 显示了应用 MRS 稀释酸性上清的结果；

图 9 显示应用流式细胞仪分析菌株 WB 1 在 37℃ 酸化处理的 MRS pH 5（DMEM: MRS = 1:1）中孵育 1 小时的上清。

图 10 显示了寄生虫在内含 100 uCi ^{3}H 腺嘌呤 pH 4 或 7 的 TYI-S-33 培养基中预孵育后的孵育结果。

在导致本发明的研究过程中，发明者假定，治疗和/或预防贾第鞭毛虫病的病因学方法可能是，应用可能拮抗寄生虫的细菌在小肠定殖。

相信肠贾第鞭毛虫滋养体对上皮细胞的粘附是在人类和动物中感染的关键步骤。尽管贾第鞭毛虫的粘附机制还没有彻底阐明，有证据支持腹盘、滋养体能收缩的元件、水力和机械力、以及血凝素涉及介导连接。

考虑到乳酸是贾第鞭毛虫生活周期的重要因素，因此应用培养的消化道细胞样细胞研究了肠贾第鞭毛虫与乳酸菌的相互作用。

为了这一目的，应用了下述微生物寄生虫菌株和培养基：

微生物菌株：

细菌菌株 La1（约氏乳杆菌）（I-1225）和 La10（嗜酸乳杆菌）（I-2332）来自 Nestec 的收藏（洛桑，瑞士）。菌株 CIDCA 536（两岐双岐杆菌）和 CIDCA 538（婴儿双歧杆菌）来自 Centro de Investigacion y Desarrollo en Criotecnologia de Alimentos 的收藏（Universidad Nacional de La Plata, 阿根廷），并根据布达佩斯条约保藏，分别获得保藏号 I2333 和 I-2334。

肠贾第鞭毛虫菌株 Portland-1（ATCC 30888），UNO/04/87/1（ATCC 50184），New Orleans-1（ATCC 50137）和 WB（ATCC 30957）从美国类型培养收藏处（Rockville, USA）购得。

细菌在添加了 0.05％半胱氨酸盐酸（Sigma）的 MRS 肉汤中 37℃生长 24 小时。孵育在无氧条件下进行（BBL GasPak Plus）。

原生动物在Keister改良TYI-S-33培养基中生长，所述培养基包括（每升）：胰酶消化物（Difco），20 g；酵母提取物（BBL），10 g；葡萄糖（Merck），10 g；牛胆盐（Difco），0.75 g；NaCl（Difco），2 g；L-半胱氨酸盐酸（Sigma），2 g；抗坏血酸钠盐（Fluka），0.2 g；K_2HPO_4（Merck），1 g；KH_2PO_4（Merck），0.6 g；柠檬酸铵铁（Sigma），22.8 mg；成熟牛血清（Sigma），100 ml；青霉素/壮观霉素（Gibco，1000 IU/ml，1000 ug/ml），15 ml。还测试了用马血清（Gibco）取代牛血清的结果。在滤器灭菌（滤孔0.22 um）前应用1 N NaOH将pH调整到6.9。添加了10％马血清的Keister改良培养基不支持Portland-1菌株的生长，尽管孵育时间延长到11天，也不论曾经出现过滋养体开始粘附到试管壁上的事实。在孵育的前5天，观察到高比例的能动寄生虫。但之后，观察到滋养体的胶着和能动细胞的显著减少。向这些损伤细胞中添加牛血清（10％）在24小时后又有生长。为了增加贾第鞭毛虫的可粘附面积，应用25cm^2的组织培养瓶（塑料瓶）。培养基一直加到瓶颈部位，以保持无氧条件。该过程导致在2－3天孵育后，可以收获大约10^7滋养体/瓶，并且寄生虫在瓶壁形成汇合的单层。

亚培养通过下述步骤进行，在冰浴中冷却培养物（5－10分钟），分离粘附的滋养体，然后在新鲜培养基中孵育0.2 ml如此获得的悬液。孵育在37℃进行72小时，并使用不同的容器（玻璃或塑料）。

肠贾第鞭毛虫菌株的保存：

如上所述分离滋养体，并悬浮于TYI-S-33培养基中。将在TYI-S-33培养基中制备的两倍浓缩防冻液（DMSO，蔗糖）分成三等分，以2分钟的间隔添加到悬液中。防冻液的终浓度为DMSO 12％（v/v），蔗糖4％（w/v）。在开始冷冻循环前，将悬液（大约1×10^6滋养体/ml）在室温平衡20分钟。

用聚苯乙烯（壁厚4 cm）隔热分装小瓶，置于-80℃。

冷冻滋养体的再激活：

在37℃水浴中解冻分装小瓶，并以寄生虫悬液/新鲜培养基＝0.5/7的比率在TYI-S-33培养基中立即孵育。培养物在37℃暗室孵育。

本发明还通过实施例的方式进行说明。

作为小肠细胞模型，应用了Caco-2和HT29细胞系。对这些消化道细胞样细胞的粘附作用通过下述方法进行检测：

实施例 1: 滋养体的放射标记

寄生虫在 YTI-S-33 培养基中孵育，并加入 2.6-7.1 uCi/ml 的 2-^{3}H 腺嘌呤（2 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Amersham Life Science），或甲基-^{3}H 胸腺嘧啶（2 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Amersham Life Science）。在 37℃孵育 48－72 小时。

滋养体在含有 7.1 uCi/ml 的 ^{3}H 腺嘌呤或 ^{3}H 胸腺嘧啶的培养基中生长，DPM/寄生虫比率差异非常大（表 1）。尽管胸腺嘧啶的浓度比腺嘌呤高 10 倍，但整合却非常低，结果分别为 0.08 和 2.8 DPM/寄生虫。

表 1

加入 7.1 uCi/ml 放射标记碱基后贾第鞭毛虫 Portland-1 菌株对 ^{3}H 的整合

放射标记底物	mmols/ml	DPM/寄生虫
2-^{3}H 腺嘌呤	3×10^{-7}	2.8±0.10
甲基-^{3}H 胸腺嘧啶	35×10^{-7}	0.08±0.00

表 2 显示了肠贾第鞭毛虫整合腺嘌呤的结果。通过应用浓度低达 2.5 uCi/ml 的腺嘌呤，可以获得适宜的放射标记。在这些条件中，DPM/寄生虫范围从 Portland-1 菌株的 0.3 到 UNO 菌株的 1.6。

表 2

不同贾第鞭毛虫菌株对 2-^{3}H 腺嘌呤的整合

结果是至少两次测定的平均值

菌株	DPM/寄生虫		
	7 μCi/ml	5 μCi/ml	2.5 μCi/ml
Portland-1	2.8±0.1	0.9±0.1	0.3±0.0
UNO	ND	1.2±0.2	1.6±0.1
WB	ND	1.0±0.2	1.4±0.1
New Orleans-1	ND	2.3±.08	0.6±0.1

实施例 2: 细胞培养

Caco-2 细胞在 DMEM 培养基中生长，所述培养基添加了非必需氨基酸，青霉素（12 IU/ml），壮观霉素（12 ug/ml），庆大霉素（47 ug/ml）

和未激活胎牛血清（20% v/v）。通过每孔接种 2×10^5 个细胞，在 6 孔组织培养板上制备单层细胞。孵育在 37℃，10% CO_2/90%空气的条件下进行。在每个培养双日更新培养基。应用 49－51 代细胞进行粘附试验，只应用汇合后晚期的单层细胞（至少培养 2 周）。

未分化 HT-29 细胞（美国类型培养收藏处，Rockville, MD）在 DMEM 培养基中生长，所述培养基包括 4.5 g/l 葡萄糖（Seromed, Biochrom KG, 柏林，德国），并添加了 Glutamax 1（0.01% v/v; L-丙氨酰-谷氨酰胺 200mM，GIBCO，巴塞尔，瑞士），庆大霉素（0.57 mg/ml，GIBCO，巴塞尔，瑞士）和胎牛血清（10% v/v，GIBCO，巴塞尔，瑞士）。细胞在 52 代时应用。

实施例 3：粘附试验

在获得汇合的单层滋养体后，弃去培养基，这样可以清除没有粘附到表面的寄生虫。如述收获寄生虫，并用含有 11.4 mM 半胱氨酸 HCl 的 DMEM（Gibco）洗涤 3 次。应用 1%聚甲醛稀释寄生虫（1:2），然后应用血球计数器计数。

将悬浮于 DMEM-CYS（DMEM + 11.4 mM 半胱氨酸盐酸）中的放射标记滋养体加入 Caco-2 细胞单层中，在 37℃，5% CO_2/95%空气的条件下孵育 1 小时。然后应用 DMEM-CYS 在 37℃洗涤 3 遍，分离未结合的滋养体。

洗涤后，每孔加入 1 ml 1N NaOH，室温孵育平板 1 小时。将细胞裂解液置于闪烁瓶中，再用 PBS 洗板。用β计数器（RackBeta Spectral, LKB, Wallac）测定放射活性。

实施例 4：预孵育试验

细菌培养物用 PBS 洗涤 3 次。将在 DMEM 中调整至 1×10^8 CFU/ml 的悬液加入 Caco-2 细胞单层中，在 37℃孵育平板 1 小时。在细菌悬液粘附后，加入调整至 1×10^5 寄生虫/ml 的放射标记滋养体。

实施例 5：共同孵育试验

在含有 Caco-2 单层细胞的 6 孔组织培养平板中，将含有 1×10^5 放射标记贾第鞭毛虫/ml 的 1 ml 寄生虫悬液等分与 1 ml 细菌悬液（1×10^8 CFU/ml）混合。如上所述进行粘附试验。

实施例 6：乳酸菌上清对肠贾第鞭毛虫粘附的作用

乳酸菌培养物以 900 g 离心 15 分钟，并用 4 N NaOH 中和上清（pH

6.9-7.4）。在含有 Caco-2 单层细胞的 6 孔组织培养平板中，将溶于 DMEM-CYS 的含有 1×10^5 放射标记滋养体/ml 的 1 ml 悬液与 1 ml 中和上清混合。如上所述进行粘附试验。试验还包括适宜的对照，对照是 MRS，或用乳酸将 MRS 酸化至 pH 4.5，然后再中和到 pH 7。

将寄生虫悬液（DMEM-cys）与等体积上清在 37℃孵育 1 小时，进行预孵育试验。在另一系列实验中，寄生虫在纯上清或 MRS 稀释的上清中悬浮。孵育后，将贾第鞭毛虫悬浮于 DMEM 中，并加入 Caco-2 细胞。

在 40ml 培养物中，通过在含有 100 uCi ^{3}H 腺嘌呤的 TYI-S-33 培养基中孵育寄生虫，进行生长评价。应用篮绿激发光进行流式细胞仪分析（FACScan™）。

实施例 7: 扫描电镜检查

在 24 孔组织培养板内，Caco-2 细胞生长于圆形玻璃片（直径 10mm）上，然后如示进行滋养体粘附。通过在 4℃添加溶于 PBS 的 2.5% 戊二醛进行标本固定 16 小时。室温应用 2% 四氧化锇进行后固定 2 小时，然后涂片在系列梯度乙醇溶液中（乙醇水溶液 30，50，70，90，100%）脱水。最后，在临界点应用 CO_2 干燥样本，金封片，然后应用 Philips SEM 505 在加速电压 30 KV 进行检查。

实施例 8: 肠贾第鞭毛虫滋养体对 Caco-2 细胞的粘附作用

将总计 10^5 滋养体加入如实施例 2 所述的 caco-2 培养物中。粘附试验结果如图 1 所示。无论单层细胞的生长时间，大约 5% 获得粘附。对塑料表面的粘附非常高（21.8±2.4%）。

应用未分化 HT-29 细胞进行的粘附试验结果如图 2 所示。获得的菌株 Portland-1 和 WB 的值分别为 7.0±1.2% 和 5.5±0.6%。

菌株 UNO 对分化 Caco-2 细胞的粘附扫描电镜图如图 3 所示。绝大多数贾第鞭毛虫滋养体以腹侧粘附于单层细胞。还见到一些寄生虫以背侧面向 Caco-2 细胞（箭头）。也许图 4 可以更清晰地显示，滋养体粘附使肠细胞样细胞刷状缘产生了损伤痕迹。

贾第鞭毛虫、乳酸菌和 Caco-2 细胞的共同孵育并未改变粘附（图 5A）。而且，Caco-2 单层细胞与乳酸菌的预孵育也没有干扰寄生虫的粘附（图 5B）。

实施例 9: 乳酸菌培养物上清对肠贾第鞭毛虫粘附 Caco-2 细胞的影响

根据本发明，菌株 Portland-1 和 WB 与中和的乳酸菌上清共同孵育，

可以使 Portland-1 菌株对 Caco-2 细胞的粘附降低 19％（La1 菌株）－40％（La10 菌株）（图 6A）。对于菌株 WB，数值范围为 20％（菌株 CIDCA 536）－40％（菌株 La10）（图 6B）。尽管菌株之间的差异尚不能建立，但菌株 La10 与对照 MRS 相比，无论对 Portland-1（P = 0.06）还是 WB（P = 0.04）菌株均显示了显著差异。

考虑到应用 Caco-2 细胞进行共同孵育实验的兼容 pH 范围非常狭窄，试验通过下述步骤进行，包括应用上清预孵育寄生虫，然后在进行粘附试验前，再把它们悬浮于 DMEM-半胱氨酸中。菌株 WB 与酸性上清（pH 4）（DMEM:上清=1:1）孵育 1 小时，可以使粘附降低 15％（MRS）－大约 3％（研究的所有菌株）（图 7A）。上清的中和（pH 7）可以消除这种抑制作用，并发现粘附增加（图 7B）。

WB 菌株与不同 pH La10 菌株上清孵育获得的结果如图 8A 所示。在 pH 4 和 5，没有发现与对照 MRS 相比存在任何差异，但在 pH 6 和 7，发现粘附更高。

应用 MRS 稀释酸性上清可以导致 pH 的上升，上清稀释 1/8 时粘附下降（相对浓度 0.125，pH 4.07，图 8B）。

应用流式细胞仪分析菌株 WB 1 悬液发现存在大小（FSC）和胞浆复杂性（SSC）差异，所述菌株 WB 1 悬液在酸化到 pH 5 的 MRS（DMEM:MRS=1:1）中 37℃孵育 1 小时（图 9）。将预孵育寄生虫在 pH 4 或 7 含有 100 uCi ^{3}H 腺嘌呤的 TYI-S-33 培养基中进行孵育，显示了整合差异（图 10）。无论在 MRS 还是上清样本中孵育 28 小时，pH 4 时检测的腺嘌呤整合率都很低。尽管有些寄生虫粘附到瓶壁上，但它们都不活动。酸化到 pH 4.05 然后又中和的 MRS 肉汤显示的 DPM 值比对照值低 20％。菌株 La10 中和上清的值大约是对照值的 80％，在 0.09 水平差异显著。在 pH 7 的 MRS 和上清中，均发现大量聚合的寄生虫。

贾第鞭毛虫对不同细胞系的粘附结果（图 1 和 2）提示，非特异性粘附似乎是该系统的一个重要特征，因为在分化细胞（培养不同时间的 Caco-2）和未分化细胞（HT-29）间未发现显著差异。而且，对塑料表面的粘附也非常高。滋养体对 Caco-2 单层细胞的粘附显然导致了微绒毛损伤（图 4）。

在细菌粘附后，通过洗涤步骤去除寄生虫的实验导致单层细胞损伤，使排除值似乎并不可信。损伤的程度有赖于洗涤溶液，从 DMEM-cys

对微绒毛的抹除（扫描电镜图）到 PBS 对细胞的分离。考虑到上述发现，试验如下进行，其中单层细胞与悬浮于 DMEM-cys 的细菌预孵育，但在加入寄生虫前不进行洗涤步骤。通过将寄生虫、细菌和 Caco-2 细胞共同孵育，进行另一序列实验。获得的结果（图 5）与鞭毛运动和可收缩元件介导的滋养体“活性”粘附一致。不能运动的乳酸菌不能与寄生虫竞争粘附。

关于乳酸菌培养物上清的作用，业已显示，它们能够抑制贾第鞭毛虫粘附。没有任何理论支持，目前认为这种抑制作用可能主要是由于乳酸菌分泌的特定有机酸。

应用乳酸酸化的 MRS 预孵育寄生虫显示了细胞大小和胞浆复杂性的显著变化，而且无论上清还是 MRS 对照，对 Caco-2 细胞的粘附均下降。在这些条件下，寄生虫的活力受到高度影响，与下述实验所示一样，所示实验中经处理寄生虫在新鲜 TYI-S-33 培养基中孵育。

在 pH 4 与乳酸接触后，寄生虫的生长基本停止，尽管一些寄生虫仍能粘附到瓶壁上。在这些条件下，乳酸对于贾第鞭毛虫似乎是致死性的。在 pH 7，乳酸的抑制作用仍然存在，酸化 MRS 和 La10 菌株上清之间的差异可以这样解释，即假定由于新鲜 MRS 和失去效能的上清间缓冲能力的差异导致乳酸浓度不同。

在应用上清预孵育寄生虫过程中，形成贾第鞭毛虫聚合，这可能是在 pH 6 和 7 粘附值非常高的原因（图 8）。如前所述，贾第鞭毛虫粘附的主要机制悬液寄生虫活力，尽管在应用 pH 4 的上清处理滋养体后显示，死的原生动物也可以粘附。但这些寄生虫不能繁殖，因此不能有效导致寄生虫病。而且，中和的乳酸菌培养上清减缓了贾第鞭毛虫的生长，并导致聚合，不能粘附。

考虑到上述实验结果，已经很清楚，根据本发明应用的乳酸菌可能成功用于治疗或预防贾第鞭毛虫病。

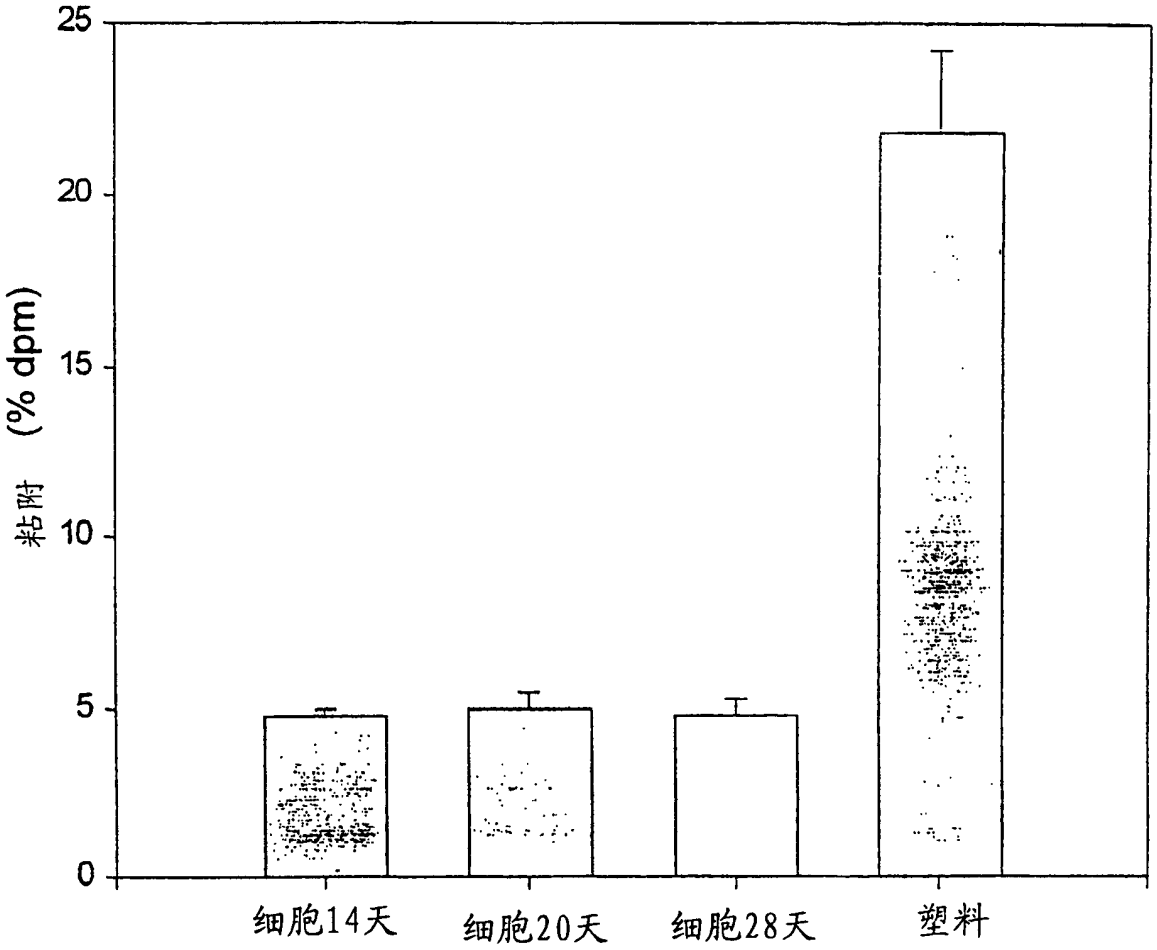


图 1

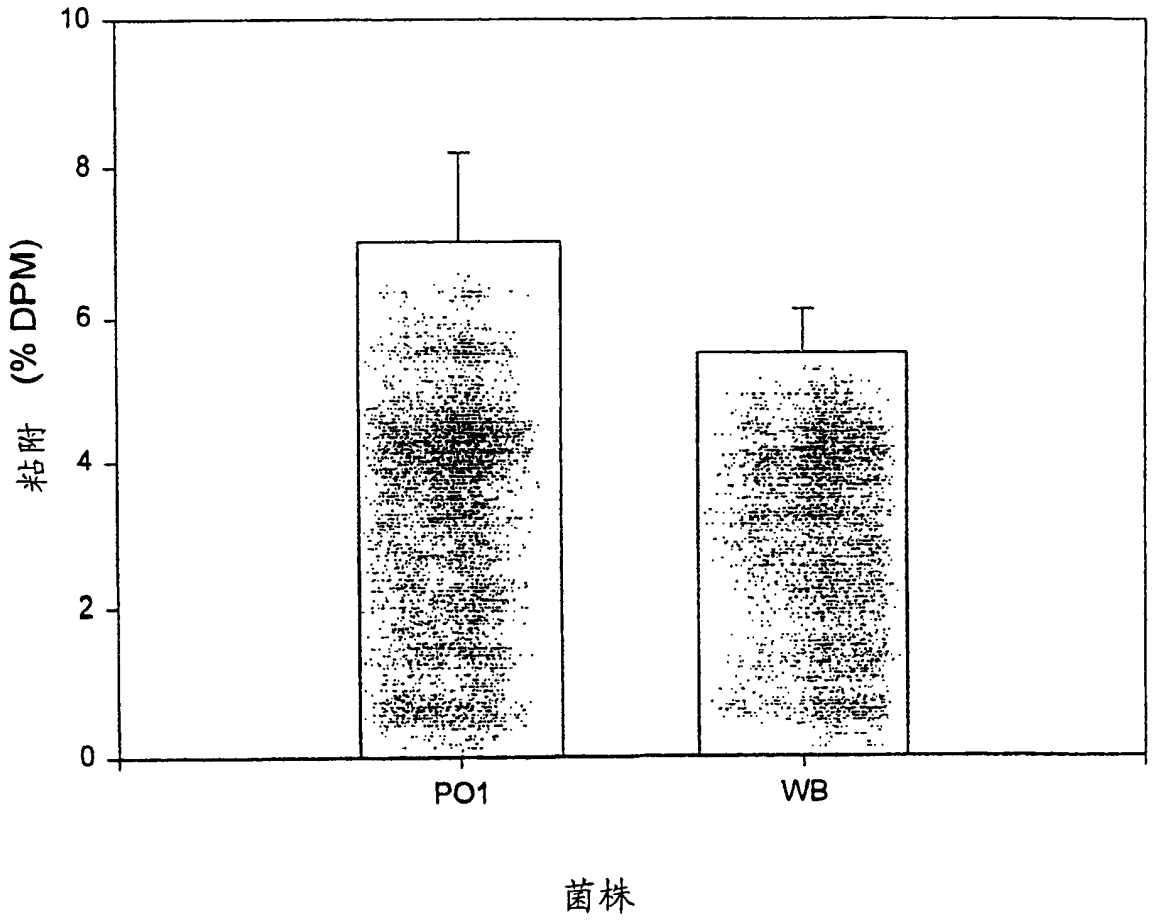


图 2

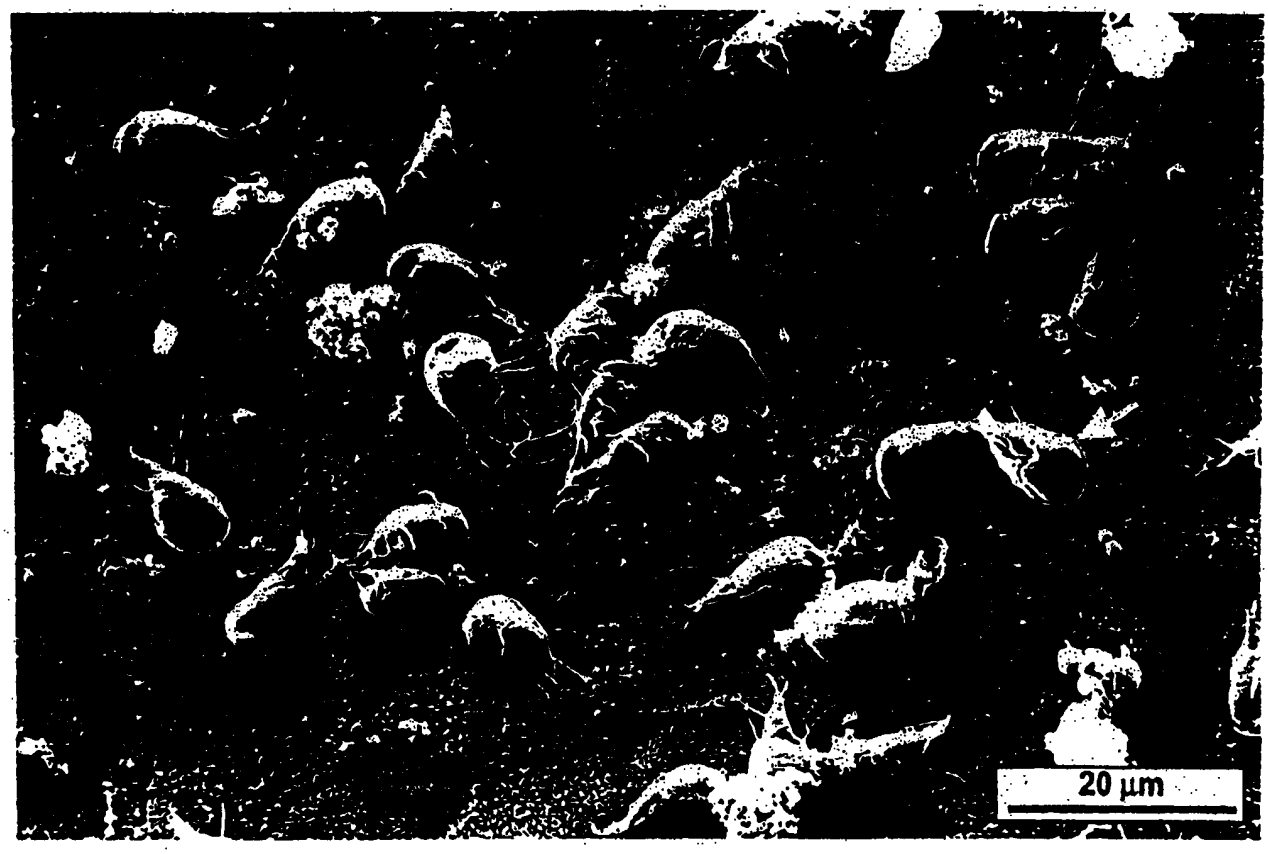


图 3

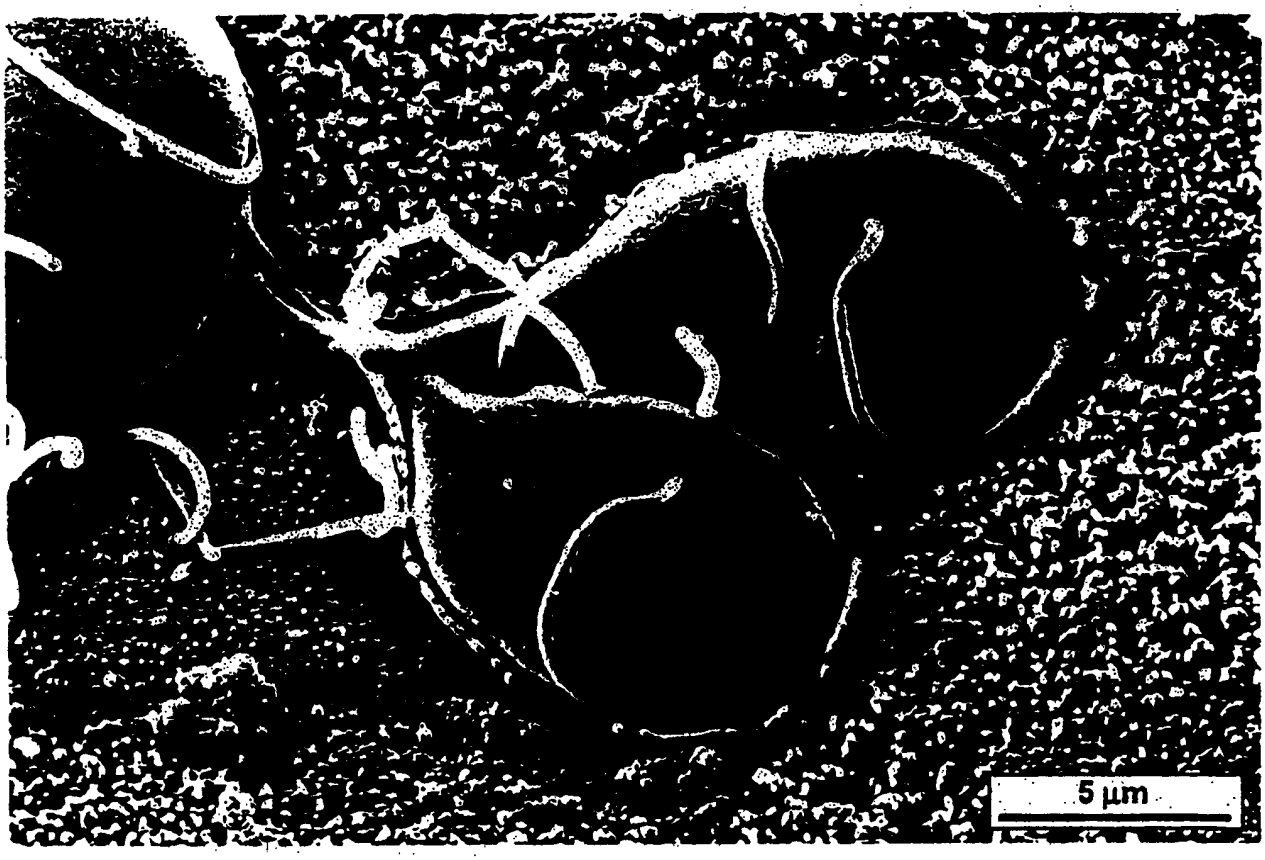
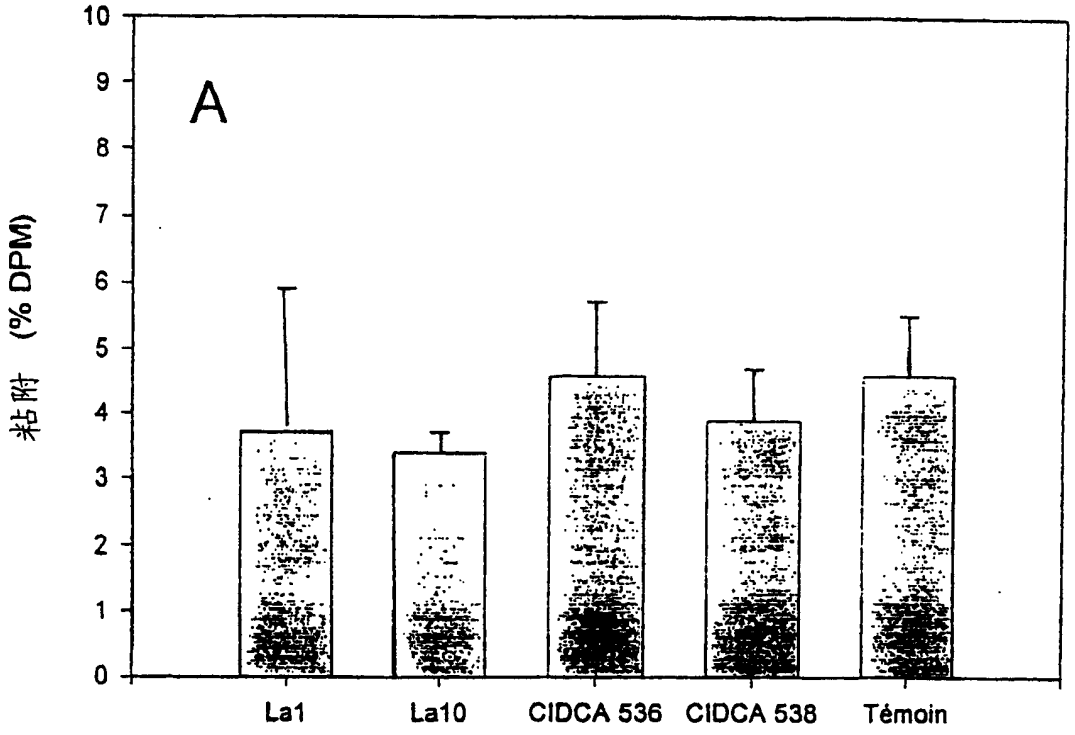


图 4



注:结果是三次测定的平均值

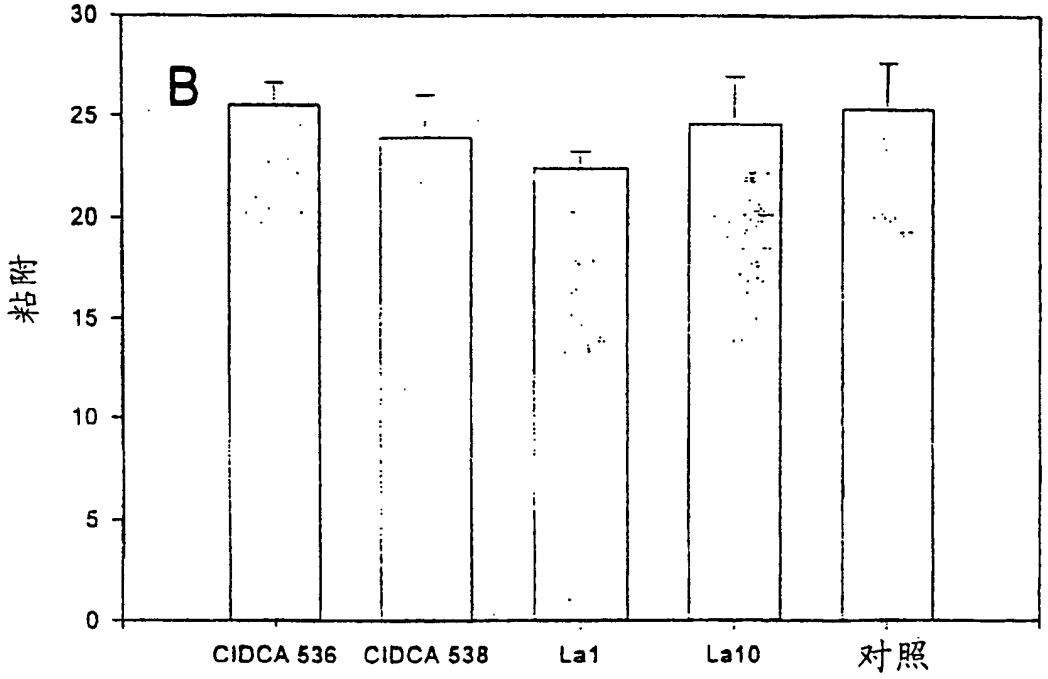
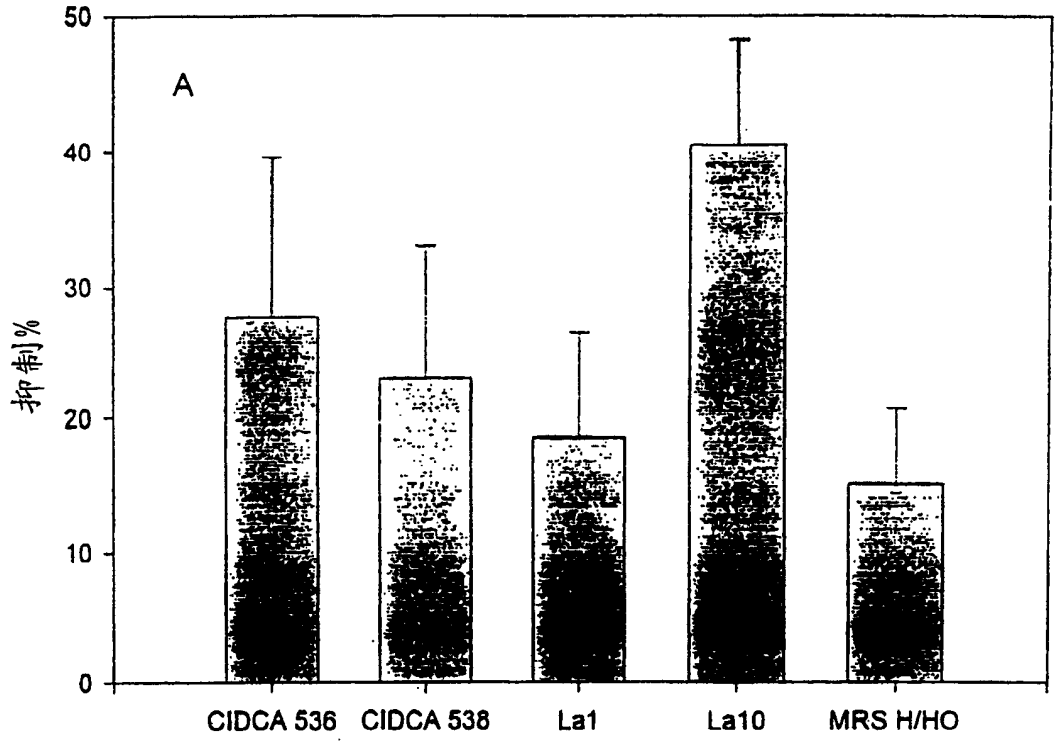


图 5


A
抑制%
50
40
30
20
10
0
CIDCA 536
CIDCA 538
La1
La10
MRS H/HO

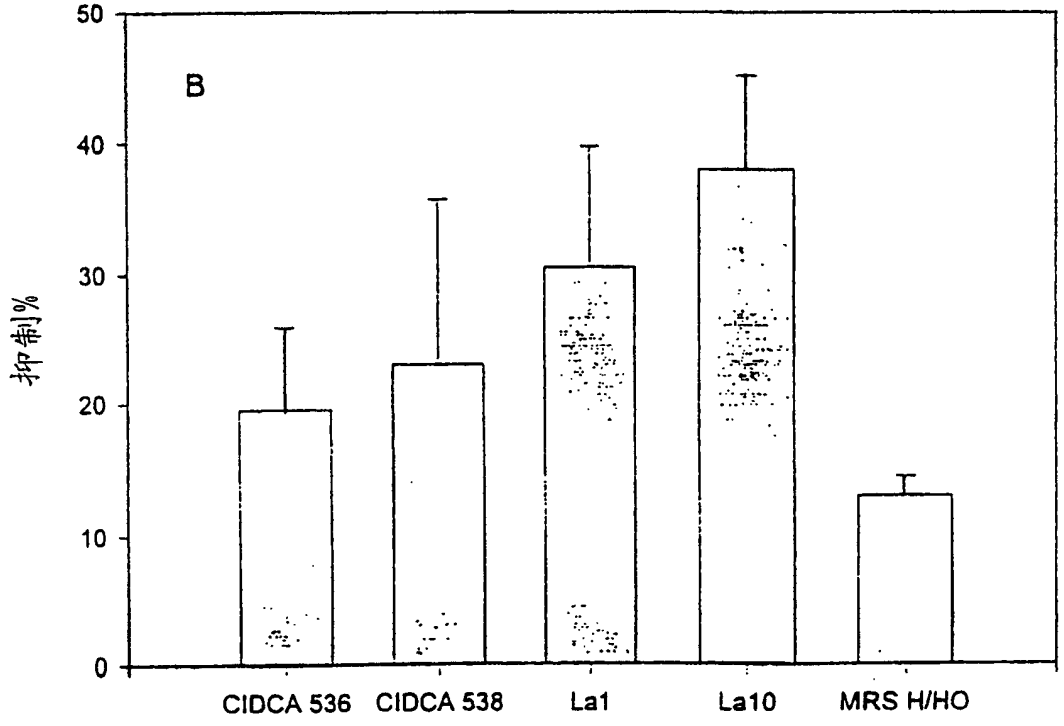

B
抑制%
50
40
30
20
10
0
CIDCA 536
CIDCA 538
La1
La10
MRS H/HO

图 6

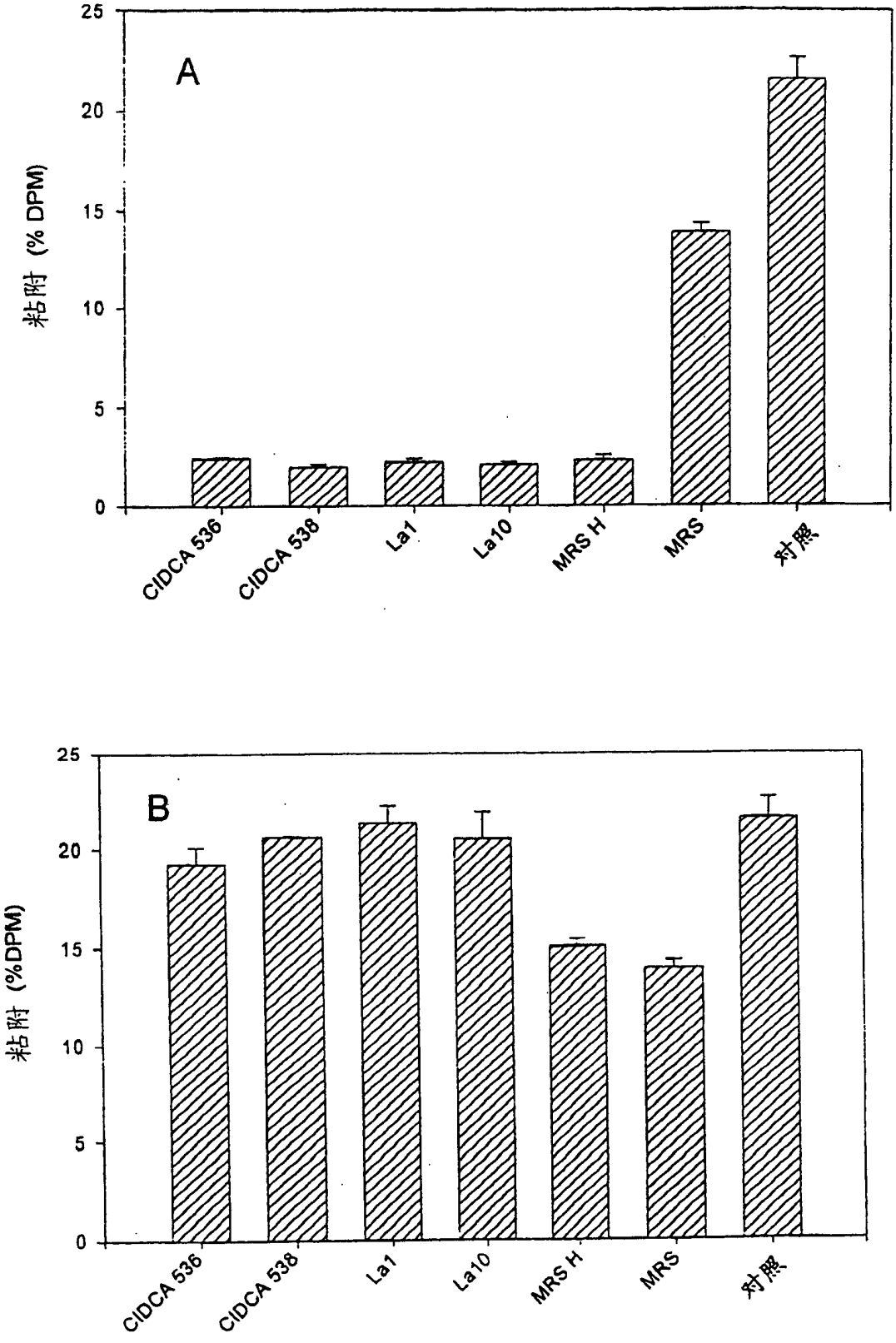

A
粘附 (% DPM)
25
20
15
10
5
0
CIDCA 536
CIDCA 538
La1
La10
MRS H
MRS
对照
B
粘附 (%DPM)
25
20
15
10
5
0
CIDCA 536
CIDCA 538
La1
La10
MRS H
MRS
对照

图 7

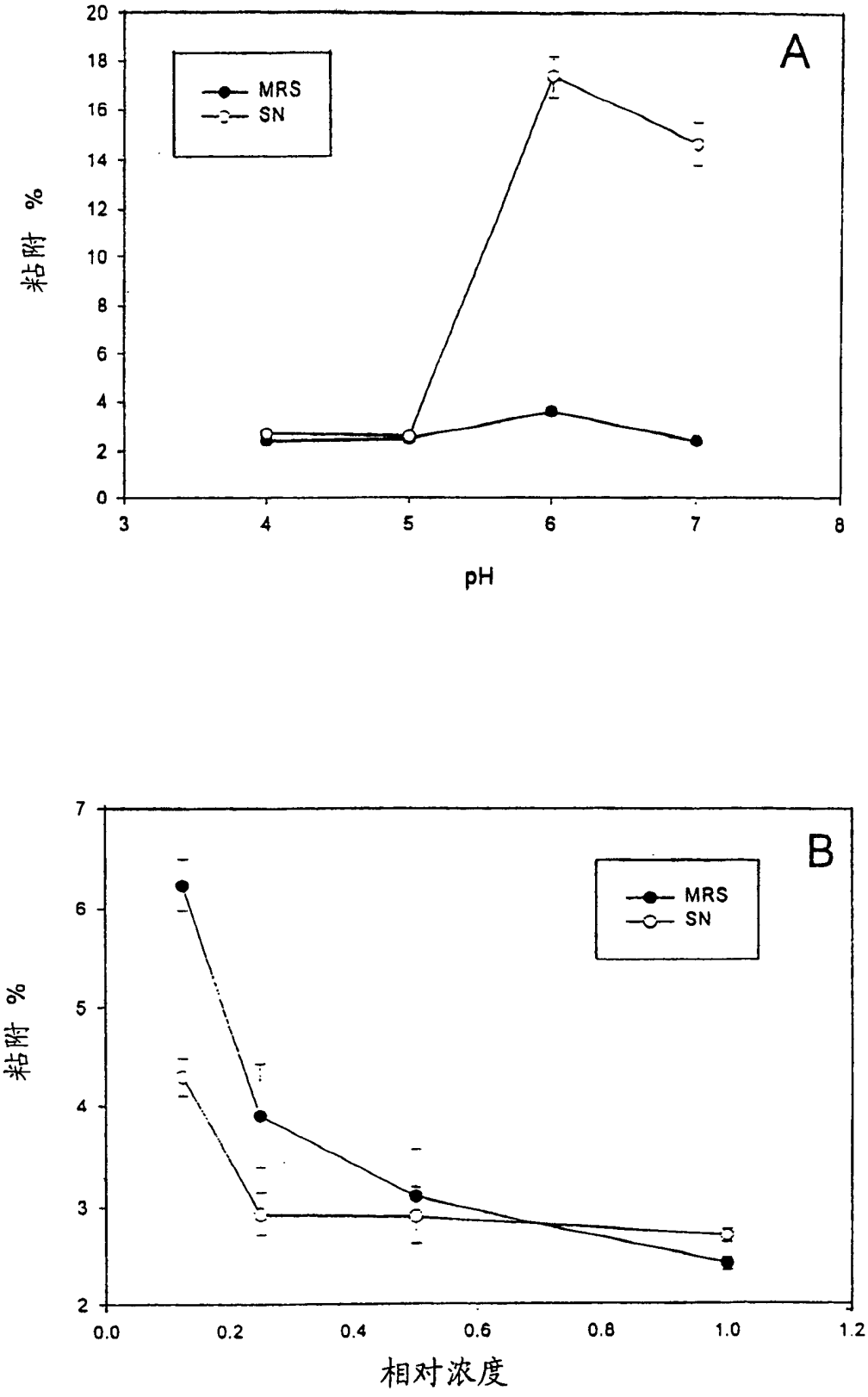


图 8

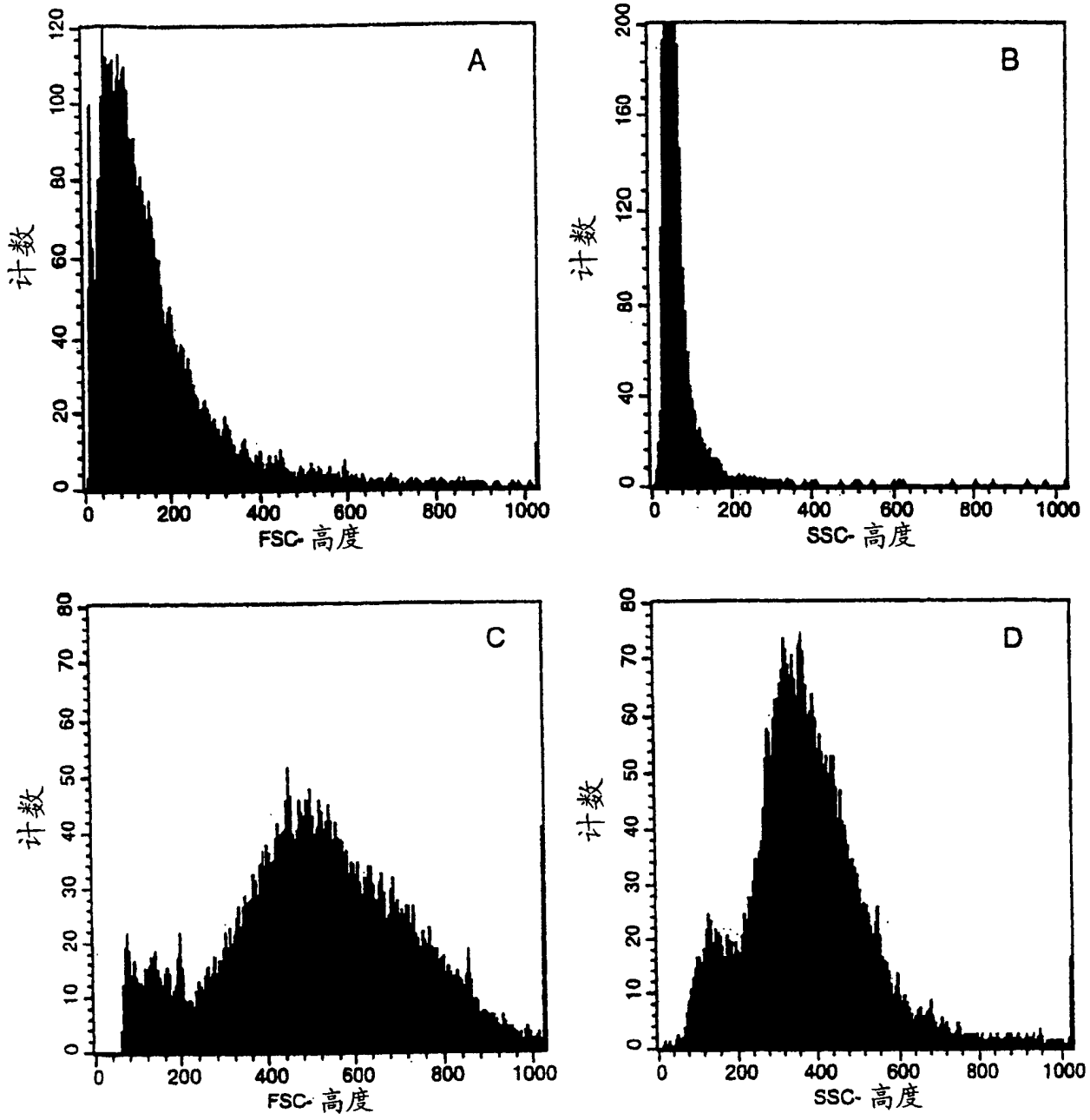


图 9

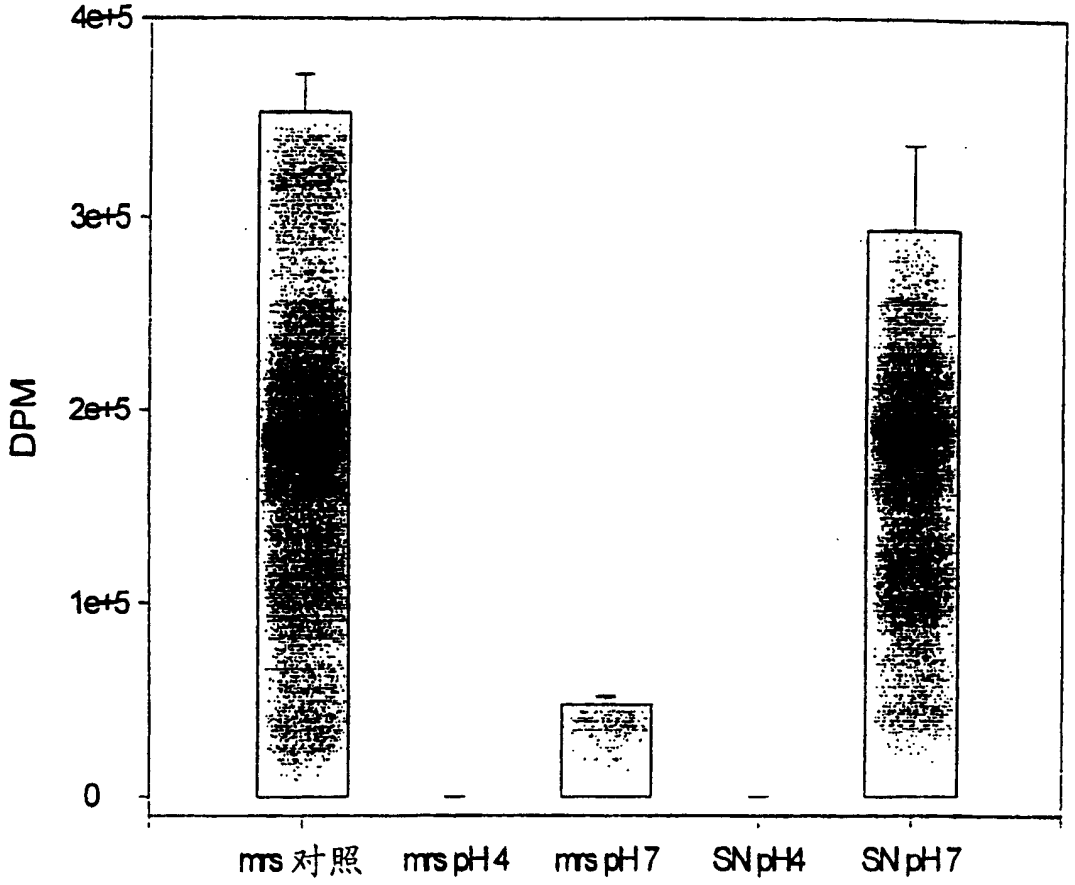


图 10