



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116004475 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 25

(21) 申请号 202310119349.6

A61P 1/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.02.15

A61P 29/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61P 31/00 (2006.01)

CGMCC NO.25571 2022.08.22

A23L 33/135 (2016.01)

(71) 申请人 生合生物科技(扬州)有限公司

A23C 9/133 (2006.01)

地址 225100 江苏省扬州市邗江区健康一路8号

A23C 9/13 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

(72) 发明人 许慈雪 杨锁华 林金生 李幸芬
徐添根 姜益军

(74) 专利代理机构 长沙睿翔专利代理事务所
(普通合伙) 43237

专利代理师 周松华

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

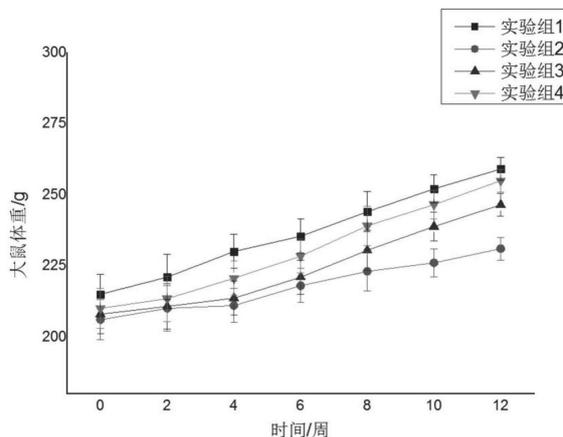
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌及其应用,具体采用植物乳杆菌LP23(Lactobacillus plantarum),制备了具有预防、辅助治疗胃部虚寒产品,通过外源性摄入维持胃肠道菌群平衡,抑制致病菌定植,降低炎症反应,促进肠道与胃部健康,是一种自然、安全适合各种不同体质服用的产品,本发明大大拓展了益生菌的应用领域。



1. 一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) LP23, 其特征在于, 该菌株已于2022年8月22日在中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 保藏编号为CGMCC NO.25571。

2. 根据权利要求1所述的植物乳杆菌, 其特征在于, 所述植物乳杆菌的16S rDNA序列如下:

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGC
ATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACA
CCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCAC
TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG
AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCACA
ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAA
GAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGA
CGCTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAA
GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCTACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCT
TAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTC
GGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
AGGAGAACCTGC, 如SEQ ID NO.1所示。

3. 权利要求1或2所述植物乳杆菌在制备预防、辅助治疗胃部虚寒的保健食品或药物中的应用。

4. 一种预防、辅助治疗胃部虚寒的保健食品或药物, 其特征在于, 包含权利要求1或2所述的植物乳杆菌。

5. 一种果粒风味发酵乳, 其特征在于, 包含权利要求1或2所述的植物乳杆菌。

6. 根据权利要求5所述的一种果粒风味发酵乳, 其特征在于, 以重量份计, 所述果粒风味发酵乳是由以下组分混合制成的: 纯牛奶70~75份, 木瓜浆5~10份, 燕麦片5~10份, 白砂糖6~8份, 乳清蛋白粉1~2份, 酵母抽提物1~2份, 植物乳杆菌LP231~2份, 海藻酸丙二醇酯0.2~0.4份, 果胶0.05~0.15份, 其中, 植物乳杆菌LP23的活菌数为 1.0×10^8 CFU/ml。

7. 权利要求5或6所述一种果粒风味发酵乳的制备方法, 其特征在于, 具体步骤如下:

S1: 先将配方量的纯牛奶升温至40℃, 接着将配方量的白砂糖、乳清蛋白粉、酵母抽提物、海藻酸丙二醇酯及果胶混匀后加入, 高速搅拌并升温至75℃, 搅拌5分钟, 得到预混牛奶;

- S2:将S1中预混牛奶冷却至60℃左右时,20MPa均质10分钟,得到均质牛奶;
- S3:将S2中均质牛奶于88~92℃杀菌10分钟,冷却至38~42℃时接入植物乳杆菌LP23,随后35℃发酵12小时,得到发酵乳;
- S4:发酵完成后,将配方量的木瓜浆及燕麦片与发酵乳混匀,灌装并冷藏即可。

一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物乳杆菌,具体涉及一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌及其应用。属于生物医药加工技术领域。

背景技术

[0002] 胃部虚寒是现代生活中常见的消化道疾病之一,与急性胃炎有所区别,胃部虚寒是指以淋巴细胞和浆细胞浸润为主的胃粘膜炎症病变或萎缩性病变,具有反复发作、病程较长的特点。胃部虚寒的病因与幽门螺杆菌感染、自身免疫系统、饮食习惯及年龄等因素有关。经临床验证,胃部虚寒的发病途径一般从浅表性胃炎——萎缩性胃炎——肠上皮化生或不典型增生——胃癌,发病率高居各种胃病首位,且年龄越大,胃部虚寒的发病率越高。

[0003] 临床上对于胃部虚寒的治疗方式主要是四联疗法:质子泵抑制剂抑制胃酸分泌从而减轻对胃黏膜的刺激;甲硝唑及阿莫西林用于清除炎症和幽门螺旋杆菌;通过铋剂保护胃黏膜。但四联疗法是抗生素治疗,后期可能会造成胃肠道菌群紊乱、病情反复及症状加重的情况发生。相关研究表明,在胃部虚寒患者的治疗中联合益生菌疗法,可以维持胃肠道菌群平衡,稳定疗效并加速清除炎症反应。

[0004] 益生菌是指对宿主肠道微生态平衡及生理健康有益的活菌,广泛使用的有乳酸菌及双歧杆菌。动物实验表明,益生菌的免疫调节作用主要是通过影响促炎症因子和抑炎症因子的平衡,从而降低胃部虚寒的炎症反应。虽然和肠道微生物相比,胃部微生物数量不多,但可以参与胃黏膜保护,对相关胃部病变起到重要作用。因此,通过外源性摄入乳酸菌,可以通过维持胃肠道菌群平衡,抑制致病菌定植,降低炎症反应,从而达到预防、辅助治疗胃部虚寒的作用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服上述现有技术的不足,提供一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌及其应用。采用所述植物乳杆菌能够通过外源性摄入维持胃肠道菌群平衡,抑制致病菌定植,降低炎症反应,促进肠道与胃部健康,是一种自然、安全、适合各种不同体质服用的产品。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0007] 1、一株用于预防、辅助治疗胃部虚寒的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) LP23 (又称植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) LP23*), 该菌株已于2022年8月22日在中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为CGMCCN0.25571。

[0008] (注:“*”按照卫健委公告“关于《可用于食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿食品的菌种名单》更新的公告(2022年第4号)”的要求进行调整)

[0009] 所述植物乳杆菌的16SrDNA序列如下:

[0010] GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCT

[0011] GGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAG
 [0012] TAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
 [0013] TACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCA
 [0014] CTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGC
 [0015] AATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
 [0016] CCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA
 [0017] TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTAA
 [0018] AGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAAGC
 [0019] CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
 [0020] GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTT
 [0021] CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC
 [0022] AGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGG
 [0023] CGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
 [0024] ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGA
 [0025] GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTAC
 [0026] GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
 [0027] ATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCA
 [0028] AATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGT
 [0029] CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
 [0030] ATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAAGTGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 [0031] GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 [0032] GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAA
 [0033] AGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCT
 [0034] AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
 [0035] CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAAC
 [0036] CAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAG
 [0037] GAGAACCTGC,如SEQ ID NO.1所示。

[0038] 2、前述植物乳杆菌在制备预防、辅助治疗胃部虚寒的保健食品或药物中的应用。

[0039] 3、一种预防、辅助治疗胃部虚寒的保健食品或药物,包含前述的植物乳杆菌。

[0040] 4、一种果粒风味发酵乳,包含前述的植物乳杆菌。

[0041] 优选的,以重量份计,所述果粒风味发酵乳是由以下组分混合制成的:纯牛奶70~75份,木瓜浆5~10份,燕麦片5~10份,白砂糖6~8份,乳清蛋白粉1~2份,酵母抽提物1~2份,植物乳杆菌LP231~2份,海藻酸丙二醇酯0.2~0.4份,果胶0.05~0.15份,其中,植物乳杆菌LP23的活菌数为 1.0×10^8 CFU/ml。

[0042] 5、前述一种果粒风味发酵乳的制备方法,具体步骤如下:

[0043] S1:先将配方量的纯牛奶升温至40℃,接着将配方量的白砂糖、乳清蛋白粉、酵母抽提物、海藻酸丙二醇酯及果胶混匀后加入,高速搅拌并升温至75℃,搅拌5分钟,得到预混牛奶;

[0044] S2:将S1中预混牛奶冷却至60℃左右时,20MPa均质10分钟,得到均质牛奶;

- [0045] S3:将S2中均质牛奶于88~92℃杀菌10分钟,冷却至38~42℃时接入植物乳杆菌LP23,随后35℃发酵12小时,得到发酵乳;
- [0046] S4:发酵完成后,将配方量的木瓜浆及燕麦片与发酵乳混匀,灌装并冷藏即可。
- [0047] 优选的,步骤S1中,高速搅拌的搅拌速率为6000~10000r/min。
- [0048] 本发明的有益效果:
- [0049] 本发明采用植物乳杆菌LP23 (*Lactobacillus plantarum*),制备了具有预防、辅助治疗胃部虚寒产品,通过外源性摄入维持胃肠道菌群平衡,抑制致病菌定植,降低炎症反应,促进肠道与胃部健康,是一种自然、安全适合各种不同体质服用的产品,本发明大大拓展了益生菌的应用领域。
- [0050] 本发明还以纯牛奶、木瓜浆、燕麦片、白砂糖、乳清蛋白粉、酵母抽提物、植物乳杆菌LP23、海藻酸丙二醇酯、果胶等为原料制成了果粒风味发酵乳。
- [0051] 其中,木瓜,是一种热带水果同时也有药用价值,木瓜味甘性微寒,具有健脾消积、消食健胃等功效,主治胃痛、消化不良等症状。
- [0052] 燕麦,可促进肠胃蠕动,具有养胃健脾的作用,同时燕麦中含有丰富维生素、脂肪、蛋白质和多种人体所需矿物质。
- [0053] 本发明通过植物乳杆菌LP23与木瓜、燕麦等协同作用,可用于预防和辅助治疗胃部虚寒。

附图说明

- [0054] 图1不同组别大鼠体重动态变化;
- [0055] 图2不同组别大鼠胃黏膜组织炎症因子变化,其中A为IL-1 β ,B为IL-17。
- [0056] 保藏信息
- [0057] 分类命名:植物乳杆菌LP23
- [0058] 拉丁文学名:*Lactobacillus plantarum*
- [0059] 保藏单位名称:中国普通微生物菌种保藏管理中心
- [0060] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号
- [0061] 保藏日期:2022年8月22日
- [0062] 保藏编号:CGMCCN0.25571

具体实施方式

- [0063] 下面结合实施例对本发明进行进一步的阐述,应该说明的是,下述说明仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。
- [0064] MRS培养基制备
- [0065] MRS培养基的具体成分如下:

	蛋白胨	10.0 g
	牛肉膏	10.0 g
	酵母粉	5.0 g
	葡萄糖	20.0 g
	吐温80	1.0 mL
[0066]	K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.0 g
	醋酸钠·3H ₂ O	5.0 g
	柠檬酸三铵	2.0 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25 g
	琼脂粉	15.0 g

[0067] 将上述成分加入到1000mL蒸馏水中加热溶解,调节pH为6.2,分装后121℃高压灭菌18分钟,备用。

[0068] 从台湾泡菜中分离提取植物乳杆菌LP23

[0069] 分离方法如下:取台湾泡菜汁用十倍稀释法制备 10^{-4} ~ 10^{-6} 样品梯度,取1mL稀释液用混菌法制备平板,30℃培养箱中培养48h。挑取具有典型乳酸菌特征的单菌落在平板上划线分离,反复纯化,将其转移到MRS斜面上,做好标记,4℃保存备用。

[0070] 上述方法得到的植物乳杆菌LP23的特性如下:革兰氏阳性、无芽孢、能运动的兼性厌氧细菌,具有多种形态特征,包括单个、成对或短链状。

[0071] 植物乳杆菌LP23耐胃酸实验

[0072] 配制pH=7.4的PBS缓冲溶液为基础,用盐酸将pH调至3.0,121℃灭菌15min后按4%的体积接种量接入植物乳杆菌LP23,30℃厌氧条件下分别于0、1h、2h后取样测定活菌数。测定结果见表1。

[0073] 表1耐胃酸实验

[0074]	作用时间/(h)	0	1	2
	活菌数/(LogCFU/mL)	9.15	8.81	8.72

[0075] 由表1可见,植物乳杆菌LP23经处理2h后,残留活菌数的对数值为8.72,存活率可以达到90%,说明该菌株具有较强的耐胃酸能力,可顺利通过胃酸环境而达到肠内。

[0076] 植物乳杆菌LP23耐胆盐实验

[0077] 于MRS培养基中分别添加质量浓度0.1%、0.2%、0.3%的胆盐,将植物乳杆菌LP23按4%的体积接种量接入上述MRS培养基,以未添加胆盐的MRS培养基为空白对照组。30℃恒温条件下培养24h后取样测定活菌数,测定结果见表2。

[0078] 表2耐胆盐实验

[0079]	组别	对照组	0.1%	0.2%	0.3%
	活菌数/(LogCFU/mL)	9.86	9.26	8.85	8.23

[0080] 表2显示了植物乳杆菌LP23对3种不同浓度胆盐的耐受性,与空白对照组相比,当

胆盐质量浓度到达0.3%时,菌株的生长受到抑制,但抑制作用不明显,说明植物乳杆菌LP23具有较强的胆盐耐受性。

[0081] 实施例1:

[0082] 配方为:纯牛奶72.65kg,木瓜浆10kg,燕麦片5kg,白砂糖8kg,乳清蛋白粉1kg,酵母抽提物1.5kg,植物乳杆菌LP231.5kg,海藻酸丙二醇酯0.3kg,果胶0.05kg。

[0083] 具体制作过程包括如下步骤:

[0084] S1:将纯牛奶升温至40℃,将称量好的白砂糖,乳清蛋白粉,酵母抽提物,海藻酸丙二醇酯及果胶混匀后加入,高速搅拌(搅拌速率为6000r/min)并升温至75℃,搅拌5min,得到预混牛奶;

[0085] S2:将S1中预混牛奶冷却至60℃左右时,20MPa均质10min,得到均质牛奶;

[0086] S3:将S2中均质牛奶88℃杀菌10min,冷却至38℃时接菌植物乳杆菌LP23,随后35℃发酵12h;

[0087] S4:发酵完成后,将处理好的木瓜浆及燕麦片与发酵乳混匀,灌装并冷藏。

[0088] 实施例2:

[0089] 配方为:纯牛奶75kg,木瓜浆5kg,燕麦片8.2kg,白砂糖6kg,乳清蛋白粉1.5kg,酵母抽提物2kg,植物乳杆菌LP232kg,海藻酸丙二醇酯0.2kg,果胶0.1kg。

[0090] 具体制作过程包括如下步骤:

[0091] S1:将纯牛奶升温至40℃,将称量好的白砂糖,乳清蛋白粉,酵母抽提物,海藻酸丙二醇酯及果胶混匀后加入,高速搅拌(搅拌速率为10000r/min)并升温至75℃,搅拌5min,得到预混牛奶;

[0092] S2:将S1中预混牛奶冷却至60℃左右时,20MPa均质10min,得到均质牛奶;

[0093] S3:将S2中均质牛奶92℃杀菌10min,冷却至42℃时接菌植物乳杆菌LP23,随后35℃发酵12h;

[0094] S4:发酵完成后,将处理好的木瓜浆及燕麦片与发酵乳混匀,灌装并冷藏。

[0095] 实施例3:

[0096] 配方为:纯牛奶70kg,木瓜浆9kg,燕麦片10kg,白砂糖6.45kg,乳清蛋白粉2kg,酵母抽提物1kg,植物乳杆菌LP231kg,海藻酸丙二醇酯0.4kg,果胶0.15kg。

[0097] 具体制作过程包括如下步骤:

[0098] S1:将纯牛奶升温至40℃,将称量好的白砂糖,乳清蛋白粉,酵母抽提物,海藻酸丙二醇酯及果胶混匀后加入,高速搅拌(搅拌速率为8000r/min)并升温至75℃,搅拌5min,得到预混牛奶;

[0099] S2:将S1中预混牛奶冷却至60℃左右时,20MPa均质10min,得到均质牛奶;

[0100] S3:将S2中均质牛奶90℃杀菌10min,冷却至40℃时接菌植物乳杆菌LP23,随后35℃发酵12h;

[0101] S4:发酵完成后,将处理好的木瓜浆及燕麦片与发酵乳混匀,灌装并冷藏。

[0102] 动物实验:

[0103] 实验设计

[0104] 选择40只十周龄SD雌性大鼠进行实验,实验鼠体重在200-250g左右。实验前所有大鼠自由获得食物和水,并分别饲养在干净、通风良好的笼子中,在室温25℃下进行光/黑

暗循环(12h)以模拟自然条件。适应喂养一周后,将大鼠随机分为四组,每组10只。

[0105] 实验组1为空白对照组,该组大鼠未经疾病建模;实验组2、3、4的所有大鼠均接受复合法疾病建模4周:通过夹尾法使大鼠保持愤怒战斗状态1h/天,将大鼠日常饮用水替换为第一天质量浓度0.1%氨水溶液,第二天20mmol/L脱氧胆酸钠溶液,每隔一天饮用处理后的溶液,同时采用饥饿和饱腹法(过度进食2天后禁食1天)直至疾病模型建立。

[0106] 将实验所需的乳酸菌采用LP23和行业内较高水平的植物乳杆菌86066(大连医科大学实验室)分别在MRS固体培养基上划线接种,经两次传代活化后转接MRS液体培养基,过夜培养菌液离心后用灭菌PBS重悬,配制 10^9 cfu/mL菌液。植物乳杆菌86066菌液(10^9 cfu/mL菌悬液)用于实验组3的干预治疗实验,LP23菌液(10^9 cfu/mL菌悬液)用于试验组4的干预治疗实验,具体分组见表3。

[0107] 表3动物实验分组

[0108]

组别	数量/只	分组情况
实验组1	10	阴性对照组(无疾病建模+PBS)
实验组2	10	阳性对照组(疾病建模+PBS)
实验组3	10	疾病建模+植物乳杆菌86066(10^9 cfu/mL)
实验组4	10	疾病建模+LP23(10^9 cfu/mL)

[0109] 疾病模型建立成功后,共进行为期10周的分别不同的菌悬液进行干预治疗实验,实验组3、4的大鼠上午、下午各一次菌悬液灌胃,0.5mL/次,其他组别灌胃等量PBS。每2周对大鼠称重一次观察其生长情况,10周实验结束后处死大鼠,并对胃黏膜进行组织病理学分析。大鼠胃黏膜组织提取采用TakaraRNA试剂盒(购自TakaraBioInc.),具体操作步骤如下:

[0110] (1) 将冻存的胃黏膜组织去除后于液氮预冷的研钵中研成粉末;

[0111] (2) 将研好的粉末聚集后加入700 μ L试剂盒中RL缓冲液;

[0112] (3) 待RL解冻后,用移液枪将上述粉末反复吹打至无明显颗粒,呈透明粘稠状后转移至1.5mL无RNA酶EP管;

[0113] (4) 4°C ,12000rpm,离心2min后取上清液于新的1.5mL无RNA酶EP管中,加入等体积浓度70%乙醇水溶液后混匀;

[0114] (5) 将上述混合物移至RNA收集柱中, 4°C ,12000rpm,离心2min,去滤液;

[0115] (6) 加入500 μ L试剂盒中RWA缓冲液, 4°C ,12000rpm,离心30s,去滤液;

[0116] (7) 加入600 μ L试剂盒中RWB缓冲液, 4°C ,12000rpm,离心30s,去滤液,并重复1次;

[0117] (8) 将沉淀物收集于新的2mL离心管中, 4°C ,12000rpm,离心2min,加入100 μ L无RNA酶水,室温放置5min后,12000rpm,离心2min洗脱RNA;

[0118] (9) 将洗脱后的RNA样品贮存于 -80°C ,用于荧光定量PCR检测。

[0119] 实验结果:

[0120] 1、大鼠体重动态变化

[0121] 在10周的干预治疗实验中,各实验组大鼠体重的动态变化如图1所示。未干预治疗阶段,实验组2、3、4的大鼠在经过疾病模型处理后相比较实验组1体重偏低,分析大鼠经疾病建模后对体重增长有所影响,会导致生长缓慢。经过益生菌干预治疗后,实验组3、4增长趋势与实验组1类似,实验组4增长更优,结果说明植物乳杆菌LP23可能会促进大鼠饮食,且高剂量组别效果更好。

[0122] 2、大鼠胃黏膜炎症因子变化

[0123] 不同组别大鼠胃黏膜炎症因子变化情况如图2所示,由图2可见,实验组2中的大鼠胃黏膜炎症因子IL-1 β (图2中A) 及IL-17 (图2中B) 在疾病模型处理且未治疗的情况下明显增加 ($P>0.01$), 而实验组3、4分别在两种益生菌干预治疗下与实验组2相比显著降低 ($P>0.01$), 特别是实验组4与实验组1相比基本保持在正常水平。实验结果表明, 经过植物乳杆菌LP23干预治疗后大鼠因胃部虚寒引起的炎症反应有良好的预防及治疗作用, 且效果高于业内较高水平。

[0124] 人群实验

[0125] 1、研究对象及方法

[0126] 受试志愿者选择年龄在40-75岁之间, 通过胃镜检查明确诊断为胃部虚寒, 合并非慢性胃炎的消化系统疾病患者, 如消化性溃疡、胰腺炎、肝炎、肝硬化等患者除外, 过敏体质及妊娠期或哺乳期妇女除外。

[0127] 选择符合要求的受试志愿者共100名, 其中72名女性, 28名男性, 将志愿者随机分为2组, 每组各50名, 其中对照组维持正常饮食, 实验组连续8周早晚各服用一次含有植物乳杆菌LP23的果粒风味发酵乳 (实施例1) 150mL, 菌数为 1.0×10^9 CFU/mL。在实验前对志愿者进行基本信息统计, 在实验第0周及第8周时对各组志愿者的三酸甘油酯 (TG)、白细胞介素 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平进行检测统计分析。

[0128] 2、实验结果

[0129] 志愿者基本信息统计见表4, 统计结果可知, 两组患者的基线资料基本相似, 具有可比较性。

[0130] 表4志愿者基本信息

项目		对照组	实验组
性别	男性	16	12
	女性	34	38
症状	上腹部不适	23	21
	食欲减退	18	24
	反酸恶心	12	17
	腹胀便秘	14	13
年龄/ (岁)		59.14 \pm 3.12	60.54 \pm 2.78
病程/ (年)		4.17 \pm 0.57	3.89 \pm 0.62

[0132] 两组志愿者随着实验时间的增加, 从数据可以看出实验组的TG、IL-6及TNF- α 含量显著降低, 服用含植物乳杆菌LP23发酵乳的组别TG、IL-6及TNF- α 含量明显低于对照组, 说明服用含植物乳杆菌LP23发酵乳对三酸甘油酯有益影响, 同时调节胃黏膜的免疫作用, 抑制炎症反复, 从而提高慢性胃炎的治疗效果。差异均有统计学意义与对照组相比 $P<0.05$, 详见表5。

[0133] 表5实验前后生化指标结果

组别	TG (mg/dL)		IL-6 (ng/L)		TNF- α (mg/L)	
	第 0 周	第 8 周	第 0 周	第 8 周	第 0 周	第 8 周
[0134] 对照组	183.62 \pm 10.68	153.44 \pm 6.65	69.15 \pm 5.23	59.65 \pm 2.37	2.39 \pm 0.53	1.98 \pm 0.34
实验组	179.54 \pm 9.87	105.64 \pm 8.23	71.01 \pm 5.14	36.89 \pm 3.17	2.54 \pm 0.62	1.23 \pm 0.27
P 值	0.74	0.001	0.15	0.002	0.22	0.017

[0135] 上述虽然对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

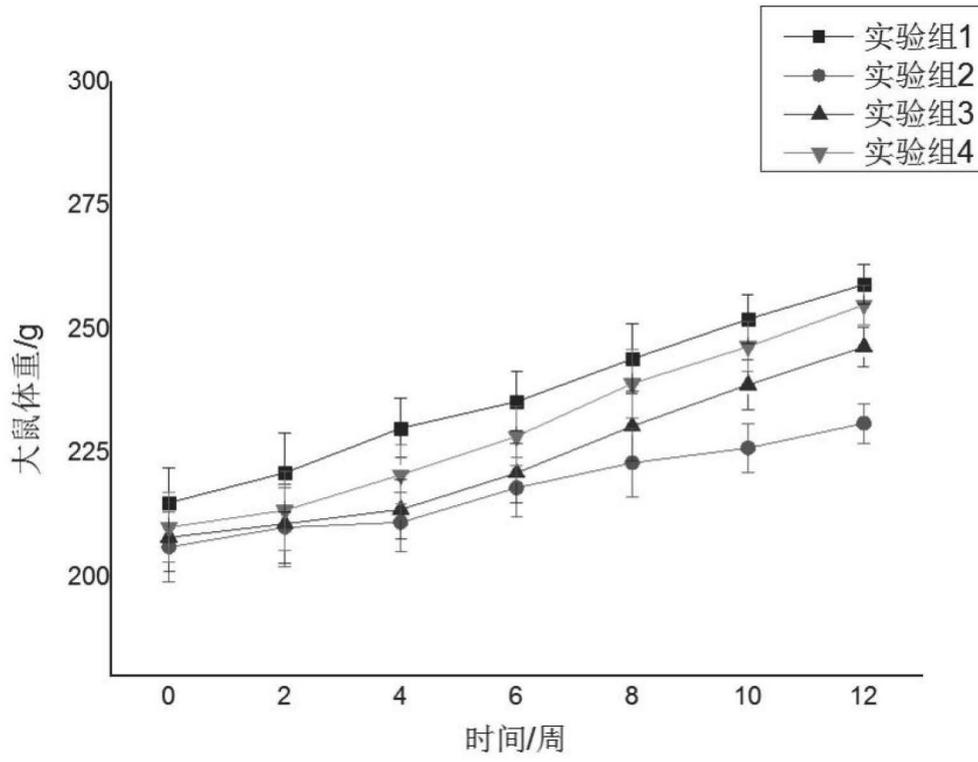


图1

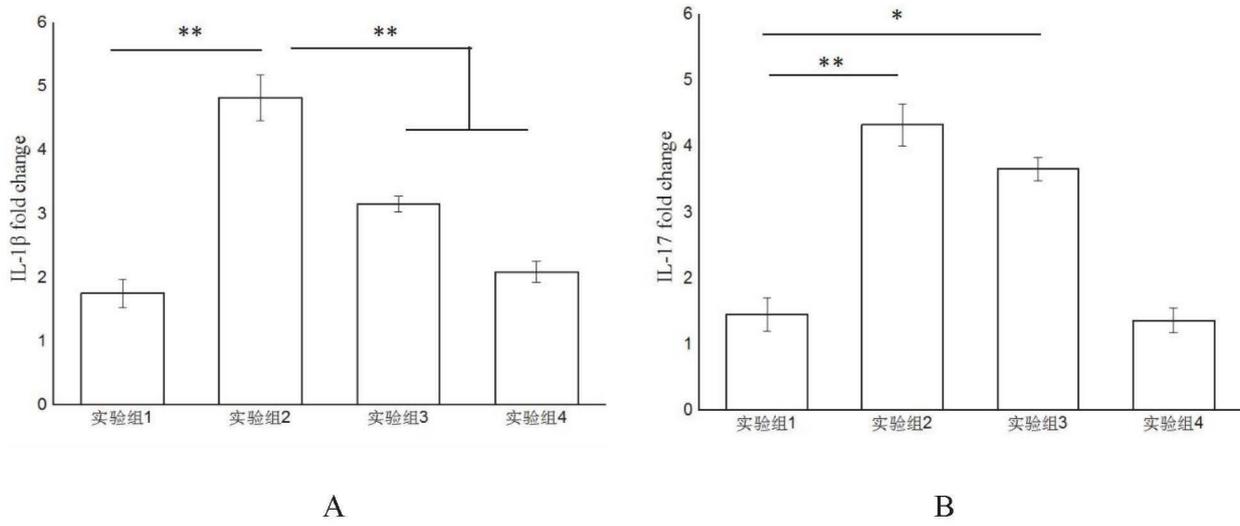


图2