



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119320708 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 17

(21) 申请号 202411308059.7
(22) 申请日 2021.04.23
(30) 优先权数据
10-2020-0061851 2020.05.22 KR
(62) 分案原申请数据
202180060898.X 2021.04.23
(83) 生物保藏信息
KCCM12698P 2020.04.17
KCCM12699P 2020.04.17
KCCM12700P 2020.04.17
(71) 申请人 绿十字生命健康有限公司
地址 韩国首尔
(72) 发明人 张珉廷 洪京恩 朴起德 金在永
金炫洙 黄龙必

(74) 专利代理机构 北京鸿元知识产权代理有限公司 11327
专利代理师 梁瑜 张云志
(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

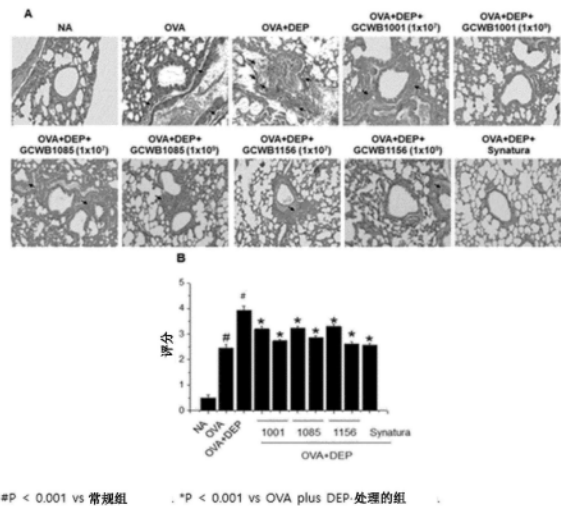
权利要求书2页 说明书20页
序列表（电子公布） 附图11页

(54) 发明名称

用于治疗由细粉尘刺激引起的呼吸道疾病
或炎症性疾病的包含乳酸菌的组合物

(57) 摘要

本公开提供以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001、以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085或以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156的新型菌株,它们具有优异的治疗或缓解呼吸道疾病的作用。此外,提供一种药物组合物、一种保健功能食品组合物和益生菌,它们均包含所述新型菌株中的任意一种并且具有治疗或缓解炎症性疾病或呼吸道疾病的作用。



1. 一种以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株。
2. 根据权利要求1所述的植物乳杆菌GCWB1001菌株,其中,所述菌株包含由SEQ ID NO: 1的核苷酸序列组成的16S rRNA。
3. 一种用于预防或缓解炎症性疾病或呼吸道疾病的保健功能食品组合物,包含:根据权利要求1至2中任一项所述的菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。
4. 根据权利要求3所述的保健功能食品组合物,还包含选自蛋白质、碳水化合物、脂肪、营养素、调味料、甜味剂和增香剂中的一种或多种。
5. 根据权利要求4所述的保健功能食品组合物,其中,所述保健功能食品组合物是选自颗粒、柠檬汁、粉末、糖浆、液体和溶液、浸膏剂、酏剂、流浸膏剂、混悬剂、煎剂、输液剂、片剂、酩剂、胶囊、锭剂、丸剂以及软或硬明胶胶囊中的任意一种。
6. 根据权利要求3所述的保健功能食品组合物,其中,所述呼吸道疾病由细粉尘、病毒感染和炎症中的任意一种或多种引起。
7. 一种用于治疗或预防炎症性疾病或呼吸道疾病的药物组合物,包含:根据权利要求1至2中任一项所述的菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,还包含药学上可接受的赋形剂或载体。
9. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中,所述呼吸道疾病由细粉尘、病毒感染和炎症中的任意一种或多种引起。
10. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中,所述呼吸道疾病是选自呼吸道炎症性肺病、哮喘、支气管扩张、特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、肺气肿、肺结核后遗症、过敏性鼻炎、下呼吸道感染、细支气管炎、急性上呼吸道感染、过敏性肺病、支气管扩张、肺炎、急性和慢性支气管炎、鼻窦炎、咽炎、扁桃体炎和喉炎中的任意一种或多种。
11. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中,所述病毒选自腺病毒、牛痘病毒、单纯疱疹病毒、副流感病毒、鼻病毒、水痘带状疱疹病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、登革热病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、冠状病毒、重症急性呼吸综合征相关病毒(SARS相关病毒)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。
12. 一种益生菌,包含以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株。
13. 根据权利要求12所述的益生菌,其中,所述益生菌的活细胞含量为 1×10^1 至 1×10^{13} CFU/g。
14. 根据权利要求13所述的益生菌,其中,所述益生菌用于预防或缓解炎症性疾病或呼吸道疾病。
15. 根据权利要求14所述的益生菌,其中,所述呼吸道疾病由细粉尘、病毒感染和肺炎中的任意一种引起。
16. 根据权利要求14所述的益生菌,其中,所述益生菌具有止咳祛痰作用或减少咳嗽作用。
17. 根据权利要求14所述的益生菌,其中,所述益生菌减少肺组织中的炎症反应。

18. 根据权利要求14所述的益生菌,其中,所述益生菌减少肺组织或全身过敏反应。
19. 根据权利要求14所述的益生菌,其中,所述益生菌抑制肺纤维化。

用于治疗由细粉尘刺激引起的呼吸道疾病或炎症性疾病的包含乳酸菌的组合物

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请号为“202180060898.X”,申请日为2021年04月23日,发明名称为“用于治疗由细粉尘刺激引起的呼吸道疾病或炎症性疾病的包含乳酸菌的组合物”。

技术领域

[0002] 本申请要求于2020年5月22日在韩国知识产权局提交的韩国专利申请No.10-2020-0061851的权益,该专利申请的公开内容通过引用全部并入本说明书中。

[0003] 本公开涉及具有治疗或预防呼吸道疾病或炎症性疾病的新型乳酸菌,以及包含所述乳酸菌的药物组合物、保健功能食品组合物和益生菌。

背景技术

[0004] 细粉尘是漂浮在空气中或被吹落的10 μ m以下的颗粒物,并且根据粉尘直径分类,PM10表示小于10/1,000mm的颗粒,PM2.5表示小于2.5/1,000mm的颗粒。

[0005] 细粉尘由通过人为来源如工作场所燃烧和汽车燃料燃烧的直接排放而引起,或者通过其中诸如硫氧化物(SO_x)、氮氧化物(NO_x)、氨气(NH₃)和挥发性有机化合物(VOC)的物质与空气中的水蒸气反应的二次生成过程而产生。

[0006] 已知细粉尘由于其细的颗粒而在吸入时能够直接渗入肺泡或脑中而不经鼻粘膜过滤,并且已知增加哮喘和肺病的发病率和过早死亡率。

[0007] 特别是,2013年,世界卫生组织(WHO)下属的国际癌症研究机构(IARC)将细粉尘归类为1类致癌物,其被证实与苯和石棉一样引起人类癌症。

[0008] 通过在包括人类在内的动物的胃肠道中改善宿主的肠道微生物环境而对宿主的健康产生有益影响的活微生物统称为益生菌。

[0009] 乳酸菌是益生菌的一种类型,其用于将纤维和复合蛋白分解为重要的营养物,同时共存于人体的消化系统中。乳酸菌分解碳水化合物并且利用碳水化合物产生乳酸,其是在氧少的地方良好增殖的厌氧细菌。乳酸菌主要分为链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、双歧杆菌属(*Bifidobacteria*)和片球菌属(*Pediococcus*)五个属。近来,已经证实了使用乳酸菌对各种疾病的治疗效果,并且已经尝试开发使用乳酸菌的治疗剂。

[0010] 与由常规细菌、暂时中毒或其它物质流入气道引起的呼吸道和肺损伤不同,细粉尘不能通过人体免疫力来根除,并且当细粉尘通过呼吸道进入时没有强制排出细粉尘的方法。此外,由于不能确切地知道由于这种损伤将在何时发生问题以及发生什么问题,因此,迫切需要新的治疗剂,其能够预防、缓解、治疗或改善由细粉尘引起的对气道和肺的损伤,从而治疗由细粉尘引起的呼吸道疾病。

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本公开的一个目的是提供新型的以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) GCWB1156菌株、以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) GCWB1085菌株,以及包含其的用于预防或治疗炎症性疾病或呼吸道疾病的组合物。

[0013] 技术方案

[0014] 为了实现上述目的,

[0015] 本公开提供一种以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株。

[0016] 本公开提供一种以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株。

[0017] 本公开提供一种以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株。

[0018] 另外,本公开提供一种用于预防或治疗炎症性疾病或呼吸道疾病的药物组合物,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。

[0019] 另外,本公开提供一种用于预防或缓解炎症性疾病或呼吸道疾病的保健功能食品组合物,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。

[0020] 另外,本公开提供益生菌,包含以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株。

[0021] 有益效果

[0022] 根据本公开的一个实施方案,植物乳杆菌GCWB1001菌株(KCCM12698P)、鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株(KCCM12700P)和乳酸片球菌GCWB1085菌株(KCCM12699P)具有抗炎作用,并且在实际动物模型中表现出止咳/祛痰作用和在慢性呼吸道疾病中改善肺功能的作用。

[0023] 根据本公开的一个实施方案,植物乳杆菌GCWB1001菌株(KCCM12698P)、鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株(KCCM12700P)和乳酸片球菌GCWB1085菌株(KCCM12699P)分别从泡菜、奶酪和婴儿粪便中分离,并且各个菌株在小鼠肺巨噬细胞(MH-S细胞系)中不表现出细胞毒性,并且具有减少作为细胞因子的TNF- α 和TGF- β 的分泌的作用。

[0024] 根据本公开的一个实施方案,本公开的所有菌株不仅减少由细粉尘而增加的炎症因子一氧化氮(NO)和活性氧(ROS)的产生,而且降低作为炎症转录因子的NF- κ B、iNOS和COX2的启动子活性。

[0025] 根据本公开的一个实施方案,本公开的所有菌株在实际动物模型中具有缓解咳嗽症状和止咳/祛痰作用的效果,并且还表现出缓解由细粉尘引起的慢性呼吸道疾病动物模

型的各种症状的效果。

[0026] 因此,本公开的植物乳杆菌GCWB1001菌株(KCCM12698P)、鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株(KCCM12700P)和乳酸片球菌GCWB1085菌株(KCCM12699P)表现出缓解、预防或治疗炎症性疾病或呼吸道疾病的作用。

附图说明

[0027] 图1是示出在小鼠肺巨噬细胞系(MH-S)中7种类型的菌株样品的TGF- β 产生量的测量的图(实验例1-2)。

[0028] 图2和图3是示出在小鼠肺巨噬细胞系(MH-S)中7种类型的菌株样品的NO和ROS产生量的测量的图(实验例1-3和实验例1-4)。

[0029] 图4至图6是示出在小鼠肺巨噬细胞系(MH-S)中7种类型的菌株样品的炎性转录调节剂活性(iNOS、COX2和NF- κ B的启动子活性)的测量的图(实验例1-5)。

[0030] 图7和图8是示出在小鼠咳嗽模型中GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株的止咳和祛痰作用的图(实验例2-2和实验例2-3)。

[0031] 图9是示出在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后的体重以及肝脏、脾脏和肺的重量的图(实验例3-3)。

[0032] 图10是示出在用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后由慢性呼吸道疾病的动物模型测量支气管肺泡灌洗液(BALF)中的各种免疫细胞的数量结果的图(实验例3-4)。

[0033] 图11是在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后,测量支气管肺泡灌洗液(BALF)中OVA特异性IgE的量的图(实验例3-5)。

[0034] 图12是在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后,测量支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13和MCP-1)的量的图(实验例3-6)。

[0035] 图13是在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后,通过对渗透进肺组织中的炎症细胞染色而得到的肺组织照片和图(实验例3-7)。

[0036] 图14是在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后,通过对粘蛋白染色而得到的肺组织照片和图(实验例3-8)。

[0037] 图15是示出在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后,肺组织中caspase 3活性和总胶原含量的图(实验例3-9)。

[0038] 图16是在慢性呼吸道疾病动物模型中用GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株处理之后分析肺组织中的MMP-9活性的照片(实验例3-10)。

具体实施方式

[0039] 下文中,将详细描述本公开。

[0040] 除非另外定义,否则本公开中使用的所有技术术语具有本公开领域技术人员通常理解的含义。此外,尽管本文中描述了优选的方法和样品,但是与其类似或等效的方法和样品也包括在本公开的范围內。

[0041] 本公开涉及一种以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株。

[0042] 植物乳杆菌GCWB1001是一种新型菌株,其如上所述命名并且于2020年4月17日保藏于韩国微生物培养中心。保藏号为KCCM12698P。

[0043] 该菌株可以从各个地区收集的泡菜中分离和鉴定。本公开的发明人已经从各个地区收集的泡菜中分离并鉴定了各种新型菌株,并且证实,通过与常规已知的乳酸菌比较,在分离和鉴定的菌株中植物乳杆菌GCWB1001菌株提供了显著优异的抗炎作用和对呼吸道疾病的预防或治疗作用,然后完成了本公开。

[0044] 本公开涉及一种以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株。

[0045] 鼠李糖乳杆菌GCWB1156是一种新型菌株,其如上所述命名并且于2020年4月17日保藏于韩国微生物培养中心。保藏号为KCCM12700P。

[0046] 该菌株可以从各个地区收集的奶酪中分离和鉴定。本公开的发明人已经从各个地区收集的奶酪中分离并鉴定了各种新型菌株,并且证实,通过与常规已知的乳酸菌比较,在分离和鉴定的菌株中鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株提供了显著优异的抗炎作用和对呼吸道疾病的预防或治疗作用,然后完成了本公开。

[0047] 本公开涉及一种以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株。

[0048] 乳酸片球菌GCWB1085是一种新型菌株,其如上所述命名并且于2020年4月17日保藏于韩国微生物培养中心。保藏号为KCCM12699P。

[0049] 该菌株可以从婴儿粪便中分离和鉴定。本公开的发明人已经从婴儿粪便中分离并鉴定了各种新型菌株,并且证实,通过与常规已知的乳酸菌比较,在分离和鉴定的菌株中乳酸片球菌GCWB1085菌株提供了显著优异的抗炎作用和对呼吸道疾病的预防或治疗作用,然后完成了本公开。

[0050] 即,植物乳杆菌GCWB1001菌株、鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株和乳酸片球菌GCWB1085菌株抑制了MH-S细胞系中NO、ROS和炎症转录调节剂的活性(iNOS、COX2和NF- κ B的启动子活性),所述MH-S细胞系是用作为炎症诱导物质的LPS和细粉尘(DEP;柴油机废气颗粒)处理的小鼠肺巨噬细胞系。

[0051] 还可以确认,本公开的GCWB1001、GCWB1156和GCWB1085菌株通过在MH-S细胞系中减少由LPS和DEP诱导的细胞因子(TNF- α)分泌而具有抗炎作用。

[0052] 氧化应激是指体内的生物分子、细胞和组织中的活性氧或活性氮的产生和抗氧化防御机制失衡,以及活性氧和活性氮的产生变得相对过多的现象,该现象通常引起组织损伤。

[0053] 由于这些活性氧或活性氮在化学上非常不稳定且具有高度反应性,因此,它们在其周围引起炎症反应,并且通过在体内引起酶催化反应,线粒体、细胞信号系统和基因表达中的电子转移,转录因子的活化,和对生物分子、细胞、组织等的广泛氧化损伤,作为主要因子参与组织纤维化。这种氧化损伤在人体的所有组织中引起各种疾病。具体地,氧化损伤不仅已知与诸如皮肤、肾脏、心脏、关节、肺、脑、血管、肠道和眼睛的组织中癌症的发生和发生癌症的进展有关,而且已知在诸如心血管疾病、炎症、纤维化疾病和糖尿病的几乎所有疾病中起到重要作用。

[0054] 当用诸如LPS的炎症物质处理巨噬细胞时,产生诸如炎症细胞因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等)的炎症介质(氧化应激)和NO而引起炎症反应。通过诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)

产生NO,随着炎症反应发生而激活NF- κ B转录因子,同时通过产生参与环氧合酶-2(COX-2)的炎症反应的前列腺素(PGs)来加速炎症反应。

[0055] 因此,由于本公开的GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株抑制了作为由LPS和DEP、作为炎症细胞因子的TNF- α 以及炎症转录调节剂(iNOS、COX2和NF- κ B启动子)诱导的炎症物质NO和ROS的所有活性,因此,所述菌株具有抑制炎症的抗炎作用。

[0056] 本公开的GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株在柠檬酸诱导的咳嗽模型中抑制咳嗽和增加咳嗽。

[0057] 止咳药是一种与病因无关的缓解咳嗽的药物,并且根据作用机理可以分为中枢作用药物和外周作用药物,其中中枢作用药物可以分为麻醉药物、麻醉衍生物和非麻醉药物。代表性的麻醉药物是可待因、氢可酮、吗啡等,它们已被证明具有有限的咳嗽抑制作用,但是结果易变,在适当的剂量下,存在嗜睡、便秘、消化问题以及滥用或依赖的风险。在外周作用止咳药中,韩国最常用的药物是左羟丙哌嗪(Levodropropizine),其被认为是通过控制气道中的感觉神经肽的水平而起效。此外,可可碱(theobromine)与其相对应。

[0058] 痰液的主要成分包括粘液,并且支气管粘液由构成常规分布在支气管粘膜中的粘液腺和粘膜下层腺的粘液细胞和浆液腺细胞分泌。粘液由95%的水和剩余5%的糖蛋白、脂质、矿物质等组成,并且由于糖蛋白结构是具有线性聚合物的双重结构的凝胶形式而表现出粘性。用于去除痰液的祛痰药分为增加痰液的水含量的药物和通过打破痰液蛋白的S-S键而降低粘度的粘液溶解剂。作为这些祛痰药,使用诸如N-乙酰半胱氨酸和羧甲半胱氨酸的半胱氨酸衍生物,并且当长时间使用时,这些半胱氨酸衍生物会产生副作用,如支气管痉挛。因此,需要开发一种副作用和毒性小且祛痰效果优异的祛痰药。

[0059] 另外,作为由天然材料制成的止咳祛痰药,广泛使用的是常青藤叶提取物和Synatura, Synatura是常青藤叶和黄连提取物的组合。

[0060] 本公开的GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株在柠檬酸诱导的咳嗽模型中减少咳嗽的次数,并且表现出止咳/祛痰效果,从而改善呼吸道疾病的症状。

[0061] 另外,本公开的菌株不仅显著减少在使用卵清蛋白(OVA)和柴油机废气颗粒(DEP)的慢性呼吸道疾病模型中支气管肺泡灌洗液(BALF)中的免疫细胞,而且减少渗透进肺组织中的免疫细胞,减少OVA特异性IgE,减少BALF中作为炎症细胞因子的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、MCP-1和IL-13,并且显著增加抗炎细胞因子IFN- γ 。

[0062] 因此,本公开的GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株不仅本身起到止咳/祛痰作用,而且还抑制MMP9的活性以阻断肺组织中的BALF和炎症细胞,阻断炎症细胞因子的分泌,增加抗炎细胞因子的分泌,并减少在过敏症状中增加的IgE免疫球蛋白的量,从而减少呼吸道器官中的过敏和炎症反应。

[0063] 代表性的呼吸道疾病包括哮喘、肺炎、慢性阻塞性肺病、过敏性鼻炎、急慢性支气管炎、细支气管炎、咽炎、扁桃体炎、喉炎、支气管扩张、特发性肺纤维化、囊性纤维化、肺气肿、肺结核后遗症、下呼吸道感染、鼻窦炎、急性上呼吸道感染、过敏性肺病等。哮喘是气道尤其是支气管的慢性炎症。由哮喘引起的炎症会因多种因素而加剧,如煤烟、过敏原、寒风、运动和呼吸道感染,并且持续的炎症引起气道变形和气道高反应性。

[0064] 另外,呼吸道疾病可能由呼吸道感染性病毒引起。引起呼吸道疾病的病毒的类型包括腺病毒、牛痘病毒、单纯疱疹病毒、副流感病毒、鼻病毒、水痘带状疱疹病毒、麻疹病毒、

呼吸道合胞病毒、登革热病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、冠状病毒、重症急性呼吸综合征相关病毒(SARS相关病毒)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)等。

[0065] 呼吸道主要由粘膜和被称为支气管平滑肌的肌肉组成,并且粘膜有许多腺体以持续分泌必要的分泌物,当支气管平滑肌收缩时,呼吸道变窄。当由于诸如煤烟、过敏原、寒风、运动和呼吸道感染的多种因素产生炎症反应时,来自腺体的分泌物进一步增加。此时分泌的分泌物是由炎症引起的渗出反应引起,并且大多数分泌物是由炎症介质和粘蛋白的混合物组成的粘性粘液分泌物。

[0066] 粘蛋白通常起到保护活体的作用,但是在慢性炎性呼吸道疾病如哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)和慢性支气管炎中,观察到粘性分泌物的过度产生或过度分泌。分泌物的数量和质量异常充当病理学因素,由于分泌物积聚而引起气管内阻塞和空气流入气道受阻,因此,伴有喘息的阵发性咳嗽和呼吸困难严重,并且在发作期间,出现干咳并感觉到胸部压力。由病毒性呼吸道疾病引起的肺损伤也被认为是由这种粘蛋白引起的。

[0067] 在慢性呼吸道疾病动物模型中,本公开的GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株抑制粘蛋白在肺组织中的沉积,降低作为肺泡中的细胞凋亡因子的caspase 3的活性,减少胶原沉积,并降低MMP-9的活性。MMP-9的活性降低可以防止炎症细胞在肺组织中的沉积,从而最终防止肺纤维化。

[0068] 肺纤维化是呼吸道疾病的最后阶段,其病理和生理过程复杂。在早期,大量的炎症细胞基于肺部炎症而浸润,肺泡壁变得慢性增厚,在中/后期,由于成纤维细胞使得由细胞外基质成分如胶原的过度沉积引起肺组织的增生、肺泡变形、硬化和结疤,从而破坏正常的肺组织结构,导致功能丧失。

[0069] 成纤维细胞起到将免疫细胞聚集到炎症部位和组织损伤部位的作用。此外,成纤维细胞产生许多炎症细胞因子,并对其作出反应。因此,成纤维细胞会有助于慢性炎症,并且反过来,炎症细胞因子促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,从而促进纤维化。因此,肺组织的损伤或炎症会引起肺纤维化。

[0070] 据报道,在晚期肺纤维化患者的肺组织中,TGF- β 刺激诱导ROS产生的增加并且增加胶原和 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的表达,这对纤维化很重要,并且据报道,在特发性肺纤维化患者的肺组织中,ROS加重了肺纤维化。

[0071] 因此,本公开的菌株不仅在咳嗽模型小鼠中诱导止咳/祛痰作用,而且还抑制慢性呼吸道疾病动物模型中的氧化应激以抑制炎症细胞因子的表达,抑制MMP-9的表达以防止参与炎症反应的免疫细胞在肺组织和支气管肺泡灌洗液中的沉积,并且抑制粘蛋白和胶原的产生,从而最终表现出对肺纤维化的缓解作用。

[0072] 本公开涉及一种用于预防或治疗炎症性疾病或呼吸道疾病的药物组合物,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。

[0073] 所述炎症性疾病可以是慢性和急性鼻炎、慢性和急性胃炎、肠炎、溃疡性胃炎、急性和慢性肾炎、急性和急性肝炎、慢性阻塞性肺病、肺纤维化、肠道易激综合征、炎症性肠病、小肠结肠炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、肺炎、肝炎、肾小球肾炎、胃炎、血管炎、胰腺

炎、腹膜炎、支气管炎、心肌炎、脑炎、缺血再灌注损伤炎症、组织和器官移植后由免疫排斥引起的炎症、烧伤、银屑病、各种皮肤炎症如过敏性接触性皮炎、背痛、肌筋膜疾病、痛风、关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、霍奇金病、胰腺炎、结膜炎、虹膜炎、巩膜炎、葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、湿疹、糖尿病炎症、由病毒或细菌感染引起的感染性炎症,或自身免疫性疾病如狼疮、银屑病和动脉粥样硬化。

[0074] 呼吸道疾病由细粉尘、病毒感染和肺部感染中的任意一种引起。呼吸道疾病选自呼吸道炎症性肺病、哮喘、支气管扩张、特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、肺气肿、肺结核后遗症、慢性支气管炎、过敏性鼻炎、止咳和祛痰、下呼吸道感染、支气管炎、细支气管炎、急性上呼吸道感染、过敏性肺病、支气管扩张、肺炎、急慢性支气管炎、鼻窦炎、咽炎、扁桃体炎、喉炎和肺纤维化。

[0075] 病毒可以选自腺病毒、牛痘病毒、单纯疱疹病毒、副流感病毒、鼻病毒、水痘带状疱疹病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、登革热病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、冠状病毒、重症急性呼吸综合征相关病毒(SARS相关病毒)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0076] 本公开的菌株可以以 1×10^1 至 1×10^{13} CFU/g的活细胞含量使用,但是不限于此。

[0077] 另外,本公开涉及一种用于预防炎症性疾病或呼吸道疾病的食品组合物,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。

[0078] 另外,本公开涉及一种用于预防炎症性疾病或呼吸道疾病的保健功能食品组合物,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株;选自所述菌株的喷雾干燥产品、冷冻干燥产品、真空干燥产品、滚筒干燥产品或粉碎产品中的一种;或所述菌株的培养物以及所述培养物的浓缩物、糊状物和稀释物中的任意一种。

[0079] 在本公开中,除了所述活性成分之外,上述食品组合物或保健功能食品组合物可以包含在食品生产过程中通常添加的成分,并且可以包含,例如,蛋白质、碳水化合物、脂肪、营养素、调味料、甜味剂和增香剂,但是不限于此。碳水化合物的实例可以包括单糖,例如,葡萄糖、果糖等;二糖,例如,麦芽糖、蔗糖、寡糖等;和多糖,例如,常规糖,如糊精、环糊精等;和糖醇,如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。作为甜味剂,可以使用天然甜味剂(索马甜(taumatococcus)、甜菊提取物、莱鲍迪甙A、甘草甜素等)和合成甜味剂(糖精、阿斯巴甜等)。此外,可以包括来自植物的低聚糖,如果聚糖、半乳聚糖、抗性淀粉、果胶、 β -葡聚糖和低聚木糖(会是所述菌株的饲料)作为益生菌。

[0080] 然而,本公开不限于此,并且可以使用作为本领域已知成分的不损害本公开的效果的任意成分。

[0081] 所述食品组合物或保健功能食品组合物的实例可以包括患者营养食品、肉、谷物、含咖啡因饮料、常规饮料、乳制品、巧克力、面包、零食、糖果、披萨、果冻、面条、口香糖、冰淇淋、酒精饮料、酒、维生素复合物和其它健康补充剂,但是不限于此。当以如上所述的食品组合物或保健功能食品组合物的形式制备时,优选之处在于,所述组合物可以容易且方便地

施用。

[0082] 在本公开中,所述保健功能食品组合物和所述药物组合物可以以颗粒、柠檬汁、粉末、糖浆、液体和溶液、浸膏剂(extracts)、酏剂(elixirs)、流浸膏剂、混悬剂、煎剂、输液剂、片剂、酹剂、胶囊、锭剂、丸剂以及软或硬明胶胶囊的形式制备,但是不限于此。

[0083] 所述药物组合物还可以包含药学上可接受的载体。本公开的药物组合物中包含的药学上可接受的载体是在制剂中通常使用的,并且包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等,但是不限于此。

[0084] 除了上述成分之外,本公开的药物组合物还可以包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0085] 本公开的药物组合物可以口服给药或肠道外给药。

[0086] 本公开的药物组合物可以通过使用药学上可接受的载体和/或赋形剂根据本领域技术人员可以容易实施的方法来配制,以便以单位剂型制备或通过引入到多剂量容器中制备。

[0087] 另外,本公开涉及一种益生菌,包含:以保藏号KCCM12698P保藏的植物乳杆菌GCWB1001菌株、以保藏号KCCM12700P保藏的鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株或以保藏号KCCM12699P保藏的乳酸片球菌GCWB1085菌株。

[0088] 所述益生菌可以包含选自本公开的三种类型的保藏菌株中的一种或多种,还可以包含选自在实施例中分离的七种类型的乳酸菌中的一种或多种,并且还可以包含可用于本公开目的的已知菌株。

[0089] 所述益生菌可以以 1×10^1 至 1×10^{13} CFU/g的活细胞含量使用,并且所述益生菌可以有效地用于抗炎或者预防或缓解呼吸道疾病。

[0090] 在本公开中,优选考虑给药方法、服用者的年龄、性别和体重以及疾病的严重程度来确定GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株的剂量。

[0091] 例如,GCWB1001菌株、GCWB1156菌株和GCWB1085菌株可以以每天一次或分开的两次或更多次,每次以 1×10^1 至 1×10^{13} CFU/g的活细胞含量给药。

[0092] 另外,基于活性成分,包含所述成分的药物组合物、食品组合物、保健功能食品组合物和益生菌可以以每天一次或分开的两次或更多次,每次 1×10^1 至 1×10^{13} CFU/g的活细胞含量给药。

[0093] 然而,上述剂量只是一个实例,并且可以根据服用者的状况由医生处方来改变。

[0094] 下文中,将参照下面的实施例更详细地描述本公开。然而,下面的实施例仅是本公开的例示,并且本公开的范围不限于此。

[0095] 实施例1:植物乳杆菌GCWB1001菌株的分离和鉴定

[0096] (1) 菌株的分离

[0097] 将从各个地区收集的泡菜放入等于泡菜的10倍的量的无菌生理盐水中,并均质化。将均质化的样品在无菌生理盐水中稀释10步,并且通过稀释平板法分离菌株。将稀释的菌株样品涂抹在MRS培养基(MRS肉汤琼脂;BD Difco)上,然后在37°C下厌氧培养72小时。将MRS琼脂平板上出现的菌落第二次接种在包含0.005%的溴甲酚紫(BCP)作为pH指示剂的

PCA培养基(MBcell1,韩国)中,并将其中紫色培养基变为黄色的菌落第三次接种到MRS琼脂平板上,以纯分离益生菌。

[0098] (2) 植物乳杆菌GCWB1001菌株的鉴定

[0099] 对在上述(1)中完全分离的菌株进行DNA提取和纯化。使用两个通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行16s rRNA基因扩增之后,对扩增的16s rRNA基因进行序列分析。使用分析的16s rRNA序列数据和EzTaxon服务器(<http://www.ezbiocloud.net>),选择与公认安全(GRAS)对应的仅两种类型的菌株,并示于下面表1中。

[0100] [表1]

[0101]	鉴定的菌株
	植物乳杆菌GCWB1001
	肠膜明串珠菌GCWB1031

[0102] 植物乳杆菌GCWB1001的16S rRNA序列结果如下。

[0103] <植物乳杆菌GCWB1001的16S rRNA序列>

[0104] SEQ ID NO:1

[0105] GGTCGTACGA ACTCTGTGTA TTGATTGGTG CTTGCATCAT GATTTACATT TGCAGTGAGT
 [0106] GGCGAACTGG TGAGTAACAC GTGGGAAACC TGCCGAGAAG CGGGGGATAACACCTGGAAA
 [0107] CAGATGCTAA TACCGCATAA CAACTTGGAC CGCATGGTCC GAGTTTGAAA GATGGCTTCG
 [0108] GCTATCACTT TTGGATGGTC CCGCGGCGTA TTAGCTAGAT GGTGGGGTAA CGGCTCACCA
 [0109] TGGCAATGAT ACGTAGCCGA CCTGAGAGGG TAATCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC
 [0110] CCAAACCTCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA
 [0111] GCAACGCCGC GTGAGTGAAG AAGGGTTTCG GCTCGTAAAA CTCTGTTGTT GAAGAAGAAC
 [0112] ATATCTGAGA GTAACGTGTT AGGTATTGAC GGTATTTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA
 [0113] CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTG GCAAGCGTTG TCCGGATTTA TTGGGCGTAA
 [0114] AGCGAGCGCA GCGGTTTTTT TAAGTCTGAT GTGAAAGCCT TCGGCTCAAC CGAAGAAGTG
 [0115] CATCGGAAAC TGGGAACTT GAGTGCAGAA GAGGACAGTG GAACTCCATG TGTAGCGGTG
 [0116] AAATGCGTAG ATATATGGAA GAACACCAGT GGCGAAGGCG GCTGTCTGGT CTGTAACCTA
 [0117] CGCTGAGGCT CGAAAGTATG GGTAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCATACCGT
 [0118] AAACGATGAA TGCTAAGTGT TGGAGGGTTT CCGCCCTTCA GTGCTGCAGC TAACGCATTA
 [0119] AGCATTCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GCTGAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC
 [0120] GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCTACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT
 [0121] GACATACTAT GCAAATCTAA GAGATTAGAC GTTCCCTTCG GGGACATGGA TACAGGTGGT
 [0122] GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC
 [0123] CCTTATTATC AGTTGCCAGC ATTAAGTTGG GCACTCTGGT GAGACTGCCG GTGACAAACC
 [0124] GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG
 [0125] CTACAATGGA TGGTACAACG AGTTGCGAAC TCGCGAGAGT AAGCTAATCT CTTAAAGCCA
 [0126] TTCTCAGTTC GGATTGTAGG CTGCAACTCG CCTACATGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG
 [0127] CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA
 [0128] TGAGAGTTTG TAACACCCAA AGTCGGTGGG GTAACCTTTT AGGAACCAGC CGCT

[0129] 实施例2:乳酸片球菌GCWB1085菌株的分离和鉴定

[0130] (1) 菌株的分离

[0131] 将从各个地区收集的奶酪放入等于奶酪的10倍的量的无菌生理盐水中,并均质化。将均质化的样品在无菌生理盐水中稀释10步,并且通过稀释平板法分离菌株。将稀释的菌株样品涂抹在MRS培养基(MRS肉汤琼脂;BD Difco)上,然后在37°C下厌氧培养72小时。将MRS琼脂平板上出现的菌落第二次接种在包含0.005%的溴甲酚紫(BCP)作为pH指示剂的PCA培养基(MBcell1,韩国)中,并将其中紫色培养基变为黄色的菌落第三次接种到MRS琼脂平板上,以纯分离益生菌。

[0132] (2) 乳酸片球菌GCWB1085菌株的鉴定

[0133] 对在上述(1)中完全分离的菌株进行染色体DNA提取和纯化。使用两个通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行16S rRNA基因扩增后,对扩增的16S rRNA基因进行序列分析。使用分析的16S rRNA序列数据和EzTaxon服务器(<http://www.ezbiocloud.net>),选择与公认安全(GRAS)对应的仅四种类型的菌株,并示于下面表2中。

[0134] [表2]

[0135]	鉴定的菌株
	乳酸片球菌GCWB1085
	副干酪乳杆菌GCWB1084
	长双歧杆菌GCWB1136

[0136] 乳酸片球菌GCWB1085的16S rRNA序列结果如下。

[0137] <乳酸片球菌GCWB1085的16S rRNA序列>

[0138] SEQ ID NO:2

[0139] CTCAGGATGA ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGAACT TCCGTTAATT
 [0140] GATCAGGACG TGCTTGCACT GAATGAGATT TTAACACGAA GTGAGTGGCG GACGGGTGAG
 [0141] TAACACGTGG GTAACCTGCC CAGAAGCAGG GGATAACACC TGGAAACAGATGCTAATACC
 [0142] GTATAACAGA GAAAACCGCC TGGTTTTCTT TTAAGATG GCTCTGCTAT CACTTCTGGA
 [0143] TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCG ATGATGCGTA
 [0144] GCCGACCTGA GAGGGTAATC GGCCACATTG GGAAGTACGAC ACGGCCGAGA CTCCTACGGG
 [0145] AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCACAATGGA CGCAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG
 [0146] TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG TAAAGCTCTG TTGTTAAAGA AGAACGTGGG TGAGAGTAAC
 [0147] TGTTACCCA GTGACGGTAT TTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC
 [0148] GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTATCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCGG
 [0149] TCTTTTAAGT CTAATGTGAA AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATTG GAAACTGGGA
 [0150] GACTTGAGTG CAGAAGAGGA CAGTGGAAT CCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA
 [0151] TGGAAGAACA CCAGTGGCGA AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA
 [0152] GCATGGGTAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAT GCCGTAAACG ATGATTACTA
 [0153] AGTGTGGAG GGTTCGCC CTTCAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGTAA TCCGCTGGG
 [0154] GAGTACGACC GCAAGGTTGA AACTCAAAAG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG
 [0155] CATGTGGTTT AATTCGAAGC TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CTTCTGCCAA

[0156] CCTAAGAGAT TAGGCGTTCC CTTCGGGGAC AGAATGACAG GTGGTGCATG GTTGTCGTCA
 [0157] GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCCTTA TTACTAGTTG
 [0158] CCAGCATTCA GTTGGGCACT CTAGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA
 [0159] CGACGTCAAA TCATCATGCC CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA
 [0160] CAACGAGTTG CGAAACCGCG AGGTTTAGCT AATCTCTTAA AACCATTCTC AGTTCGGACT
 [0161] GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC ACGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG
 [0162] CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA
 [0163] CCCAAAGCCG GTGGGGTAAC CTTTTAGGAG CTAGCCGTCT AAGGTGGGAC AGATGATTA

[0164] 实施例3:鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株的分离和鉴定

[0165] (1) 菌株的分离

[0166] 将通过自然分娩出生的健康婴儿的粪便在无菌生理盐水中稀释10步,并且通过稀释平板法分离菌株。将稀释的粪便样品涂抹在BSM琼脂培养基(双歧杆菌选择性培养基琼脂;Sigma,USA)上,然后在37℃下厌氧培养72小时。将BSM琼脂平板上出现的菌落第二次接种在包含0.005%的溴甲酚紫(BCP)作为pH指示剂的PCA培养基(MBcell,韩国)中,并将其中紫色培养基变为黄色的菌落第三次接种到BL琼脂培养基(MBcell,韩国)上,以纯分离益生菌。

[0167] (2) 鼠李糖乳杆菌GCWB1156菌株的鉴定

[0168] 对在上述(1)中完全分离的菌株进行染色体DNA提取和纯化。使用两个通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')进行16s rRNA基因扩增后,对扩增的16s rRNA基因进行序列分析。使用分析的16s rRNA序列数据和EzTaxon服务器(<http://www.ezbiocloud.net>),选择与公认安全(GRAS)对应的仅一种类型的菌株,并示于下面表3中。

[0169] [表3]

[0170]	鉴定的菌株
	鼠李糖乳杆菌GCWB1156
	短双歧杆菌GCWB1144

[0171] 鼠李糖乳杆菌GCWB1156的16S rRNA序列结果如下。

[0172] <鼠李糖乳杆菌GCWB1156的16S rRNA序列>

[0173] SEQ ID NO:3

[0174] GTTGATCGGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAATC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG
 [0175] GAATCTTCCA CAATGGACGC AAGTCTGATG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA AGAAGGCTTT
 [0176] CGGGTCGTAA AACTCTGTTG TTGGAGAAGA ATGGTCGGCA GAGTAACTGT TGTCGGCGTG
 [0177] ACGGTATCCA ACCAGAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG
 [0178] TGGCAAGCGT TATCCGATT TATTGGGCGT AAAGCGAGCG CAGGCGGTTT TTAAAGTCTG
 [0179] ATGTGAAAGC CCTCGGCTTA ACCGAGGAAG TGCATCGGAA ACTGGGAAAC TTGAGTGCAG
 [0180] AAGAGGACAG TGGAATCCA TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA
 [0181] GTGGCGAAGG CGGCTGTCTG GTCTGTAAC TACGCTGAGG CTCGAAAGCA TGGGTAGCGA
 [0182] ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCATGCC GTAAACGATG AATGCTAGGT GTTGGAGGGT
 [0183] TTCCGCCCTT CAGTGCCGCA GCTAACGCAT TAAGCATTCC GCCTGGGGAG TACGACCGCA

[0184] AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT
[0185] TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATCTT TTGATCACCT GAGAGATCAG
[0186] GTTTCCCCTT CGGGGGCAAA ATGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA
[0187] GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTATGA CTAGTTGCCA GCATTTAGTT
[0188] GGGCACTCTA GTAAGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA
[0189] TCATGCCCCCT TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GATGGTACAA CGAGTTGCGA
[0190] GACCGCGAGG TCAAGCTAAT CTCTTAAAGC CATTCTCAGT TCGGACTGTA GGCTGCAACT
[0191] CGCCTACACG AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGCGGATCAG CACGCCGCGG TGAATACGTT
[0192] CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CATGAGAGTT TGTAACACCC GAAGCCGGTG
[0193] GCGTAACCCT TTTAGGGAGC GAGCCGTCTA AGGTGGGACA AATGATTA

[0194] 实验例1:小鼠肺巨噬细胞中的抗炎作用的分析

[0195] 1-1) 菌株的细胞毒性的评价 (LDH泄漏和CCK-8检测)

[0196] 从美国菌种保藏中心 (ATCC, Manassas, VA, USA) 得到小鼠肺泡巨噬细胞细胞系MH-S细胞系, 将其悬浮以使细胞浓度为 5×10^5 个细胞/ml, 以100 μ l分散到96孔板中, 用各个浓度的各个样品处理, 然后培养48小时。使用MTT分析试剂盒和细胞毒性LDH分析试剂盒测量细胞毒性, 结果示于下面表4中。

[0197] [表4]

类别	剂量($\mu\text{g/ml}$)	LDH (对照的倍数) (24小时)	MTT (对照的%) (24小时)
常规组(未处理)	0	1.00 ± 0.04	100.0 ± 2.12
赋形剂(100%的麦芽糖糊精)	1000	0.99 ± 0.02	99.6 ± 3.13
植物乳杆菌 GCWB1001	10	0.99 ± 0.03	101.7 ± 3.4
	100	1.01 ± 0.03	102.3 ± 4.17
	1000	$0.60 \pm 0.02^*$	101.5 ± 3.2
GCWB1031	10	1.00 ± 0.02	104.8 ± 8.9
	100	1.03 ± 0.06	100.9 ± 2.88
	1000	$0.85 \pm 0.02^*$	98.2 ± 3.8
GCWB1084	10	1.01 ± 0.03	96.4 ± 1.94
	100	1.18 ± 0.26	100.0 ± 1.57
	1000	1.20 ± 0.03	93.4 ± 0.4
乳酸片球菌 GCWB1085	10	0.98 ± 0.02	108.95 ± 5.31
	100	0.95 ± 0.03	$113.06 \pm 4.63^{**}$
	1000	$0.58 \pm 0.03^*$	102.03 ± 1.39
鼠李糖乳杆菌 GCWB1156	10	0.87 ± 0.03	99.9 ± 1.26
	100	$0.82 \pm 0.02^*$	98.3 ± 0.63
	1000	0.90 ± 0.01	93.5 ± 4.8
GCWB1136	10	1.01 ± 0.00	101.4 ± 3.08
	100	0.87 ± 0.02	99.1 ± 3.14
	1000	$0.81 \pm 0.02^*$	97.1 ± 3.92
GCWB1144	10	0.87 ± 0.04	102.3 ± 4.03
[0199]	100	$0.82 \pm 0.02^{**}$	96.4 ± 1.56
	1000	$0.79 \pm 0.02^*$	95.7 ± 2.88

[0200] * $P < 0.001$ vs. 常规组。 ** $P < 0.01$ vs. 常规组。

[0201] (1) LDH检测结果

[0202] 将上面表4的7种类型的乳酸菌以1至1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度在小鼠MH-S肺巨噬细胞中处理24小时,然后进行LDH检测,结果,对所有7种类型均未观察到细胞毒性。然而,可以确认,在浓度为1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的GCWB1001菌株、GCWB1085菌株、GCWB1176菌株和GCWB1156菌株的情况下,LDH值显著降低,因此,所有菌株都没有细胞毒性。

[0203] (2) MTT检测结果

[0204] 将上面表4的7种类型的乳酸菌以1至1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度在小鼠MH-S肺巨噬细胞中处理24小时,然后进行MTT检测,结果,在100 $\mu\text{g/ml}$ 以下的浓度下对所有7种类型均未观察到细胞毒性。然而,在浓度为100 $\mu\text{g/ml}$ 的GCWB1085菌株的情况下确认有细胞毒性。

[0205] 1-2) 细胞因子(TNF- α 、TGF- β)分泌的测量

[0206] 用样品预处理MH-S细胞系1小时,然后用LPS(10ng/ml)或ConA(10 $\mu\text{g/ml}$)和DEP(200 $\mu\text{g/ml}$)分别处理3小时和26小时,并且使用ELISA试剂盒(R&D system, USA)测量分泌到

培养基中的细胞因子 (TNF- α 和TGF- β) 的量,结果示于下面表5和图1中。

[0207] [表5]

类别		剂量($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α 抑制率(%)
常规组(未处理)	-	-	52.4
对照组(LPS10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$)	-	-	100 ##
[0208] LPS10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$	植物乳杆菌 GCWB1001	10	58.1*
		100	74.2*
		1000	89.7**
	GCWB1031	10	86.8**
		100	130.0
		1000	157.4
	乳酸片球菌	10	90.2***
[0209]	GCWB1085	100	60.0*
		1000	54.8*
	鼠李糖乳杆菌 GCWB1156	10	66.7*
		100	66.9**
		1000	105.6
	GCWB1136	10	304.7
		100	370.4
		1000	1270.8
	GCWB1144	10	449.1
		100	1573.7
		1000	3401.6

[0210] ## $P < 0.01$ vs. 常规组。* $P < 0.001$ vs LPS10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$, ** $P < 0.01$ vs. LPS10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$ 。*** $P < 0.05$ vs. LPS10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0211] (1) TNF- α 测量结果

[0212] 如表5中所示,在GCWB1001菌株、GCWB1084菌株和GCWB1156菌株所有菌株的大多数处理浓度下,通过在MH-S细胞中进行LPS和DEP处理,细胞因子TNF- α 分泌减少。因此,本公开的菌株以浓度依赖的方式减少由细粉尘引起的促炎细胞因子TNF- α 的分泌。

[0213] (2) TGF- β 测量结果

[0214] 如图1中所示,当GCWB1001、GCWB1085和GCWB1156菌株以1 $\mu\text{g/ml}$ 和10 $\mu\text{g/ml}$ 处理时,由细粉尘引起的TGF- β 的分泌降低。

[0215] 1-3) 一氧化氮(NO)的测量

[0216] 将小鼠肺巨噬细胞系NH-S细胞系悬浮,使得细胞浓度为 5×10^5 个细胞/ml,并以100 μl 分散到96孔板中。将表6中的7种类型的菌株作为样品,分别以1 $\mu\text{g/ml}$ 和10 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度预处理1小时,然后用100 ng/ml的LPS处理24小时。然后,将50 μl 的培养液转移到96孔板中,以等量与Griess试剂I (NED溶液)和Griess试剂II (磺胺溶液)混合,在暗室中反应10分

钟,然后在30分钟内使用微板读数器在540nm处测量。

[0217] [表6]

[0218]	类别	剂量($\mu\text{g/ml}$)	NO (μM)
	常规组(未处理)	-	0.42 ± 0.00
	对照组(LPS 10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$)	-	$4.88 \pm 0.32\#$
[0219]	LPS 10 ng/ml + DEP 200 $\mu\text{g/ml}$	植物乳杆菌	
		GCWB1001	
		1	4.26 ± 0.44
		10	4.47 ± 0.60
		GCWB1031	
		1	$3.91 \pm 0.24^{**}$
		10	5.16 ± 0.74
		GCWB1084	
		1	$2.90 \pm 0.36^*$
		10	$8.30 \pm 0.12^*$
		乳酸片球菌	
		GCWB1085	
		1	$3.20 \pm 0.32^*$
		10	5.51 ± 1.058
		鼠李糖乳杆菌	
		GCWB1156	
		1	$4.19 \pm 0.21^{***}$
		10	4.47 ± 0.12
		GCWB1136	
		1	5.37 ± 0.99
		10	7.74 ± 0.21
		GCWB1144	
		1	5.09 ± 0.48
		10	$8.44 \pm 0.53^*$

[0220] # $P < 0.001$ vs. 常规组。* $P < 0.001$ vs. LPS10ng/ml+DEP 200 $\mu\text{g/ml}$ 处理的组。** $P < 0.01$ vs. LPS10ng/ml+DEP 200 $\mu\text{g/ml}$ 处理的组。*** $P < 0.05$ vs. LPS 10ng/ml+DEP 200 $\mu\text{g/ml}$ 处理的组。

[0221] 实验结果以图表示于图2中。由表6和图2可以看出,可以确认,本公开的GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株全部在1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下显著降低通过细粉尘的NO产生量。然而,在10 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下,所述菌株没有显著降低通过细粉尘的NO产生量。

[0222] 1-4) 活性氧(ROS)的测量

[0223] 将小鼠肺巨噬细胞系MH-S细胞系悬浮,使得细胞浓度为 5×10^5 个细胞/ml,并以100 μl 分散到96孔板中。将上面表6中的7种类型的菌株作为样品,分别以1 $\mu\text{g/ml}$ 和10 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度预处理1小时,然后用100ng/ml的LPS处理6小时,并用HBSS洗涤,用DCF-DA(2',7'-二氯荧光素二乙酸酯)/HBSS以每孔25 μM 处理培养液30分钟,然后在485nm的激发波长和530nm的发射波长下测量荧光值。

[0224] 实验结果以图表示于图3中。可以确认,与NO分析相似,本公开的GCWB1001菌株、GCWB1085菌株和GCWB1156菌株全部在1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下显著降低由细粉尘引起的ROS的产生量。

[0225] 1-5) 炎性转录调节因子活性的测量(iNOS-Luc、COX2-Luc、NF-kB-Luc;荧光素酶启动子活性分析)

[0226] 将MH-S细胞以 1×10^6 个细胞/ml分配之后,使用LipofectAMINE 2000试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)将插入有iNOS-Luc、COX2-Luc和NF-kB-Luc的质粒载体引入到

细胞中。将样品按浓度处理24小时后,收集细胞并测量荧光素酶活性。

[0227] 根据图4至图6,当GCWB1001、1085和1156菌株以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理时,由细粉尘引起的炎性转录因子iNOS、COX2和NF- κB 的启动子活性降低。总的来说,本公开的菌株可以通过抑制诱导炎症相关基因以及已知作为炎症基因的iNOS和COX基因的表达的NF- κB 转录因子的启动子活性来抑制炎症相关基因的表达。

[0228] 实验例2:动物模型中止咳/祛痰作用的研究(体内试验)

[0229] 2-1) 实验条件和饲养条件

[0230] 实验动物由来自Samtako Co.,Ltd.的6周龄雄性BALB/c小鼠(体重: $20\pm 2\text{g}$)提供,并且在温度为 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $55\pm 15\%$ 且照度为300至500Lux并以12小时的间隔调节亮度的动物饲养室中适应7天以上。之后,观察视觉上的症状,仅使用正常动物进行实验,并且自由地喂养实验动物用固体饲料(Samtako Co.,Ltd.)和水。所有动物实验均在韩国国际大学实验动物伦理委员会的批准下进行,并且根据美国国立卫生研究院的指南(NIH出版号86-23,1985年修订)进行。

[0231] 2-2) 止咳作用的研究

[0232] 实验组由4组组成:单独给予1M的柠檬酸的组(对照)、柠檬酸+Synatura200mg/kg(阳性对照)、柠檬酸+样品处理的组(1×10^7)和柠檬酸+样品处理的组(10×10^9),每个实验组的动物数目为8只($n=8$)(表7)。

[0233] [表7]

[0234]	No	实验组($n=8$)	浓度
	1	柠檬酸(对照)	1 M
	2	柠檬酸+ Synatura	200 mg/kg
[0235]	3	柠檬酸+样品处理的组	1×10^7 cfu
	4	柠檬酸+样品处理的组	1×10^9 cfu

[0236] 在口服给予样品1小时后,鼻内给予1M的咳嗽诱导剂柠檬酸,然后将各个实验组放置在室中,并经10分钟测量咳嗽次数。结果,如图7中所示,GCWB1001菌株和GCWB1085菌株在给予 1×10^9 cfu后均显著减少由柠檬酸引起的咳嗽的次数。

[0237] 2-3) 祛痰作用的研究

[0238] 实验组由4组组成:给予1M的苯酚红的组(对照)、苯酚红+Synatura 200mg/kg(阳性对照)、苯酚红+样品处理的组(1×10^7)和苯酚红+样品处理的组(1×10^9),每个实验组的动物数目为8只($n=8$)(表8)。

[0239] [表8]

[0240]	No	实验组	浓度
	1	苯酚红+生理盐水	10mg/kg
	2	苯酚红+Synatura	200mg/kg
	3	苯酚红+样品处理的组	1×10^7 cfu
	4	苯酚红+样品处理的组	1×10^9 cfu

[0241] 口服给予样品之后,1小时后腹腔注射0.2ml的苯酚红(10mg/ml),并且30分钟后处

死实验动物,然后取出气管。

[0242] 测量取出的器官的重量后,加入0.5ml的0.9%生理盐水(w/v)并且涡旋。加入100 μ l的1M的NaOH作为显色底物之后,测量550nm处的吸光度。

[0243] 如图8中所示,GCWB1001菌株和GCWB1085菌株在给药 1×10^9 cfu之后均显著增加苯酚红的分泌量。

[0244] 总的来说,本公开的菌株减少咳嗽的次数并且提高祛痰作用,从而改善呼吸道疾病的症状。

[0245] 实验例3:慢性呼吸道疾病动物模型中肺功能缓解作用的分析(体内试验)

[0246] 3-1) 实验条件和饲养条件

[0247] 实验动物由来自Samtako Co.,Ltd.的6周龄雄性BALB/c小鼠(体重:20 $\pm$ 2g)提供,并且在温度为23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、相对湿度为55 $\pm$ 15%且照度为300至500Lux并以12小时的间隔调节亮度的动物饲养室中适应7天以上。之后,观察视觉上的症状,仅使用正常动物进行实验,并且自由地喂养实验动物用固体饲料(Samtako Co.,Ltd.)和水。所有动物实验均在韩国国际大学实验动物伦理委员会的批准下进行,并且根据美国国立卫生研究院的指南(NIH出版号86-23,1985年修订)进行。

[0248] 3-2) 慢性呼吸道疾病动物模型的建立和实验物质的给予

[0249] 雄性6周龄BALB/c小鼠分别在第1天和第12天(敏化)腹腔内给予一次200 μ l的氢氧化铝(Al(OH)₃)与生理盐水的1:1混合物中的100 μ g的卵清蛋白(OVA)。在实验开始的第19天和第20天,鼻内给予一次50 μ g的OVA(Challenge)。最后,在鼻内给予OVA(第20天)之后,将400 μ g的柴油机废气颗粒(DEP)以3小时的间隔鼻内给予三次,并在第21天终止实验。

[0250] 最后一次样品给予后24小时之后,腹腔内给予氨基甲酸酯(Sigma Aldrich,UK,USA)(0.020ml/g重量)以进行麻醉,然后得到支气管肺泡灌洗液(BALF)。将本公开的菌株在第0天至第20天每天口服给予一次。GCWB1001、GCWB1085和GCWB1156样品分别以每只动物 1×10^7 cfu和 1×10^9 cfu口服给予。使用Synatura(200mg/kg)作为阳性对照,并且每个实验组中的动物数目为8只(n=8)(表9)。

[0251] [表9]

[0252]

No.	实验组 (n=8)	浓度
1	NA (对照)	-
2	OVA (卵清蛋白)	100 μ g
3	OVA+DEP (柴油机废气颗粒)	400 μ g
4	OVA+DEP+GCWB1001	1×10^7 cfu
5	OVA+DEP+GCWB1001	1×10^9 cfu
6	OVA+DEP+GCWB1085	1×10^7 cfu
7	OVA+DEP+GCWB1085	1×10^9 cfu
8	OVA+DEP+GCWB1156	1×10^7 cfu
9	OVA+DEP+GCWB1156	1×10^9 cfu
10	OVA+DEP+Synatura	200mg/kg

[0253] 3-3) 测量体重和器官重量

[0254] 最后一次样品给予24小时之后,腹腔内给予氨基甲酸酯(Sigma Aldrich,UK,USA)

(0.020ml/g重量)以进行麻醉,得到支气管肺泡灌洗液(BALF),然后取出肺并且称重。此外,另外测量了体重以及肝脏和脾脏的重量。

[0255] 所有组的体重均无变化,并且与未处理的组相比,在OVA和OVA+DEP处理的组中肺重量增加,而在GCWB1001 (1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^9 cfu)和Synatura处理的组中,通过OVA+DEP处理而增加的肺组织的重量显著减少。即使在脾脏中,在GCWB1001 (1×10^7 cfu)、GCWB1085 (1×10^9 cfu)和GCWB1156 (1×10^9 cfu)的情况下,用OVA+DEP处理而增加的脾脏和肺组织的重量也显著减少。

[0256] 3-4) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-支气管肺泡细胞液的分析

[0257] 最后一次样品给予24小时之后,腹腔内给予氨基甲酸酯(Sigma Aldrich,UK,USA)(0.020ml/g重量)以进行麻醉,得到支气管肺泡灌洗液(BALF),然后在BALF中测量免疫细胞谱(总细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞)。

[0258] 根据图10,与常规组相比,在OVA处理的组中测量的所有免疫细胞的数目显著增加,并且与OVA处理的组相比,即使在OVA+DEP处理的组中,包括细胞总数的免疫细胞的数目也显著增加。然而,在用GCWB1001、GCWB1085、GCWB1156和Synatura处理的组的样品中,用OVA+DEP处理而增加的免疫细胞的数目显著减少。

[0259] 具体地,当各个菌株以 1×10^9 cfu处理时,与阳性对照相比,所有免疫细胞的细胞数都表现出减少,并且即使当进行 1×10^7 cfu处理时,除了淋巴细胞之外的细胞的数目(总细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞)有效减少。

[0260] 因此,由于本公开的菌株减少免疫细胞向肺组织的浸润,因此,这些菌株可以防止呼吸道疾病的发展。

[0261] 3-5) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-OVA特异性IgE(BALF,血清)的测量

[0262] 最后一次样品给予24小时之后,腹腔内给予氨基甲酸酯(Sigma Aldrich,UK,USA)(0.020ml/g重量)以进行麻醉,得到支气管肺泡灌洗液(BALF)和血清,然后测量OVA特异性IgE的量,其是作为炎症反应的一个类型的过敏反应的指标。

[0263] 如图11中所示,与常规组相比,OVA处理的组中BALF(图11A)和血清(图11B)中的OVA特异性IgE显著增加,并且与OVA处理的组相比,OVA+DEP处理的组中OVA特异性IgE显著增加。用OVA+DEP处理而增加的OVA特异性IgE在样品GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)以及Synatura处理的组中显著降低。因此,本公开的菌株可以减少作为炎症反应的指标的肺部和全身过敏反应。

[0264] 3-6) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-BALF中细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13、MCP-1和IFN- γ)的测量

[0265] 最后一次样品给予24小时之后,腹腔内给予氨基甲酸酯(Sigma Aldrich,UK,USA)(0.020ml/g重量)以进行麻醉,然后使用ELISA试剂盒(R&D system USA)测量BALF中的细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13、MCP-1和IFN- γ)。

[0266] 与常规组相比,OVA处理的组中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13和MCP-1显著增加,并且与OVA处理的组相比,OVA+DEP处理的组中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-13和MCP-1显著增加。在本公开的菌株GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)和Synatura处理的组中,用OVA+DEP处理而增加的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13和MCP-1显著减少。

$\times 10^7$ 、 1×10^9 cfu) 以及Synatura处理的组中,用OVA+DEP处理而增加的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13和MCP-1显著降低(图12A至图12D)。

[0267] 另外,在OVA+DEP处理的组中IFN- γ 的量减少,但是在GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu) 和Synatura处理的组中显著增加(图12G)。

[0268] 因此,由于本公开的菌株减少肺中的促炎细胞因子并且增加抗炎细胞因子,因此,可以减少肺组织中的炎症反应,这可以防止呼吸道疾病的发展。

[0269] 3-7) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-组织学检查(H&E染色)

[0270] 将左叶肺组织在10%的福尔马林中固定24小时,然后制备石蜡块,切割成厚度为4 μ m,然后进行H&E染色。用光学显微镜得到图像后,测量炎症程度。

[0271] 与常规组相比,在OVA处理的组中炎症细胞的浸润显著增加,并且与OVA处理的组相比,在OVA+DEP处理的组中炎症细胞的浸润显著增加。

[0272] 在本公开的菌株GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu) 以及Synatura处理的组中,用OVA+DEP处理而增加的炎症细胞的浸润显著减少(图13)。

[0273] 因此,由于本公开的菌株阻断炎症细胞向肺组织中的浸润并由此减少肺组织中的炎症反应,因此,这些菌株可以防止呼吸道疾病的发展。

[0274] 3-8) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-组织学检查(阿尔新蓝-PAS染色)

[0275] 为了确认本公开的菌株是否实际上抑制肺组织中的粘蛋白的产生,通过阿尔新蓝-PAS染色法对肺组织进行染色来染色糖原和粘蛋白。

[0276] 图14是实际染色的组织的照片,其中与常规组相比,在OVA处理的组中肺泡中的粘蛋白的产生显著增加,并且与OVA处理的组相比,在OVA+DEP处理的组中粘蛋白的产生显著增加。在样品GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu) 以及Synatura处理的组中,用OVA+DEP处理而增加的粘蛋白的产生显著减少(图14)。

[0277] 因此,由于本公开的菌株减少肺泡中的粘液,因此,其可以防止呼吸道疾病的晚期恶化为肺纤维化等。

[0278] 3-9) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-caspase 3活性和总胶原含量

[0279] 为了确认本公开的菌株是否实际上减少肺组织中的细胞凋亡并改善肺损伤,测量肺组织中的caspase 3活性和总胶原含量。

[0280] 根据图15,与常规组相比,在OVA处理的组中caspase-3活性和胶原含量显著增加,并且与OVA处理的组相比,在OVA+DEP处理的组中caspase-3活性和胶原蛋白含量显著增加。在本公开的菌株GCWB1001 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^7 、 1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^7 、 1×10^9 cfu) 以及Synatura处理的组中,用OVA+DEP处理而增加的caspase-3活性和胶原含量显著降低(图15)。

[0281] 因此,本公开的菌株可以通过不仅减少凋亡因子而且减少胶原含量来防止呼吸道

疾病的晚期的恶化--肺纤维化。

[0282] 3-10) 本公开的菌株在慢性呼吸道疾病动物模型中缓解肺功能的评价-MMP9活性的分析

[0283] 用0.25%的考马斯亮蓝G250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 染色在支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中用包含0.2%的明胶的10%的SDS-PAGE电泳分离的蛋白质, 然后测量MMP-9酶活性。

[0284] 根据图16, 与常规组相比, 在OVA处理的组中MMP-9活性显著增加, 并且与OVA处理的组相比, 在OVA+DEP处理组中MMP-9活性显著增加。在本公开的菌株GCWB1001 (1×10^9 cfu)、GCWB1085 (1×10^9 cfu)、GCWB1156 (1×10^9 cfu) 以及Synatura处理的组中, 用OVA+DEP处理而增加的MMP-9活性显著降低。

[0285] 因此, 由于本公开的菌株可以防止炎症细胞在肺组织中的沉积, 因此, 其可以防止肺组织中的炎症和由炎症引起的各种并发症。

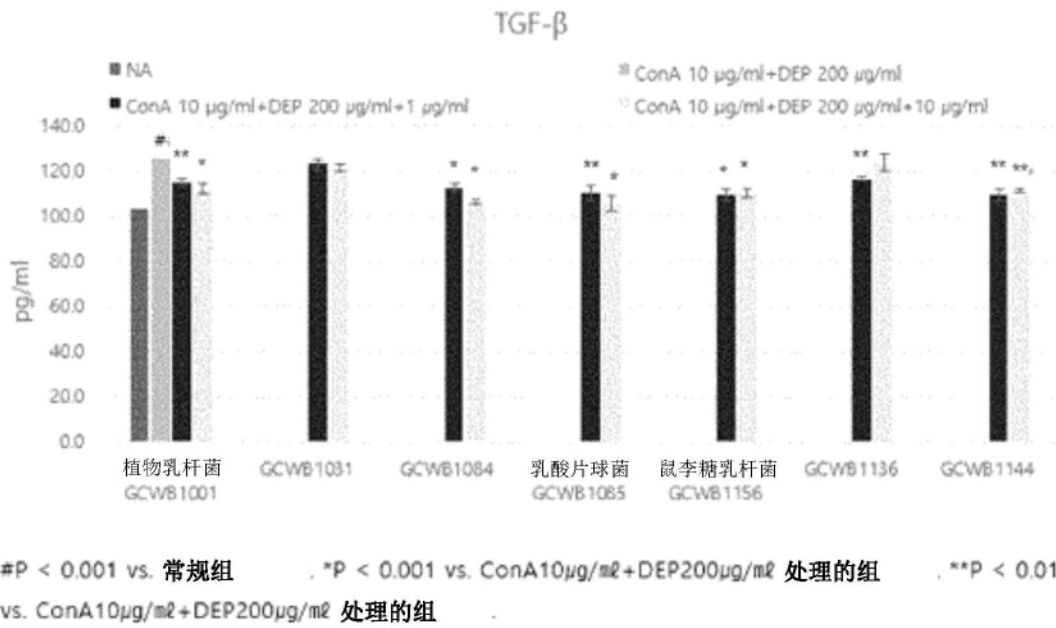


图1

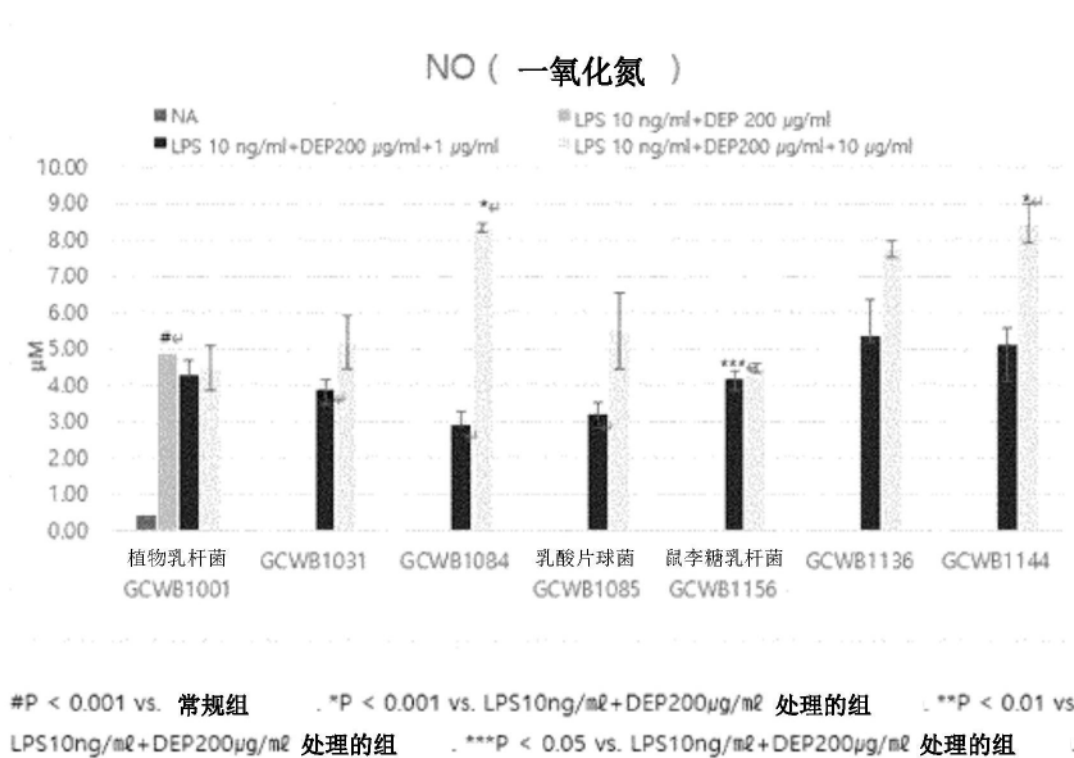


图2

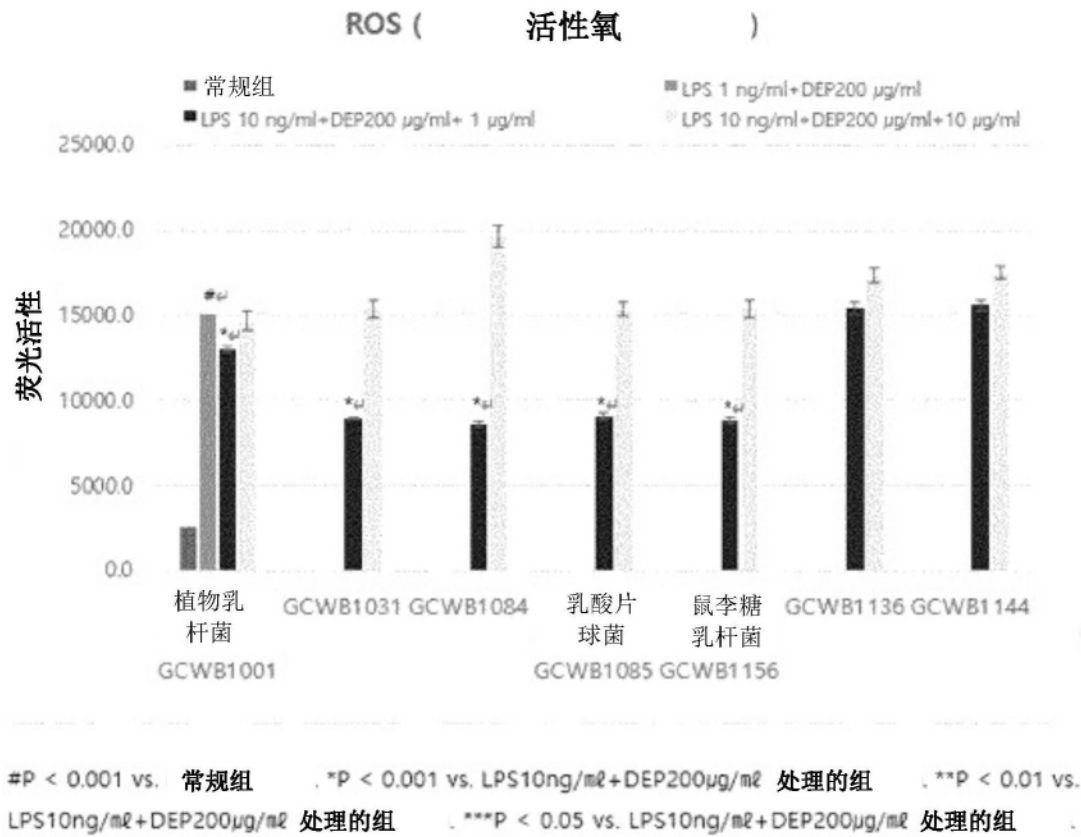


图3

转录调节剂活性的测量 (iNOS-Luc)

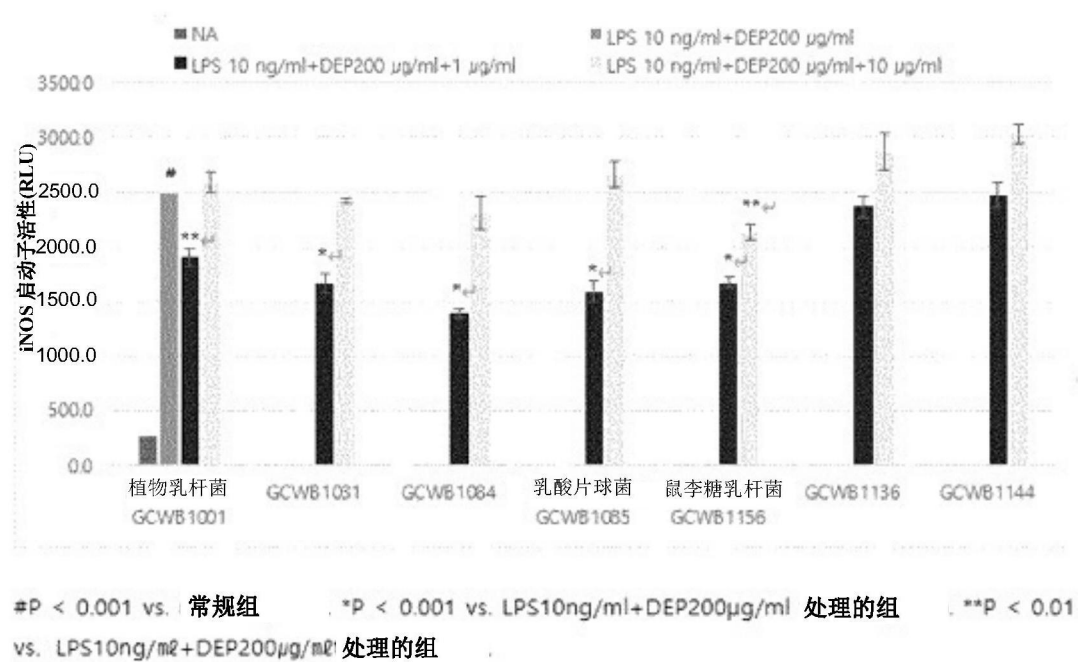


图4

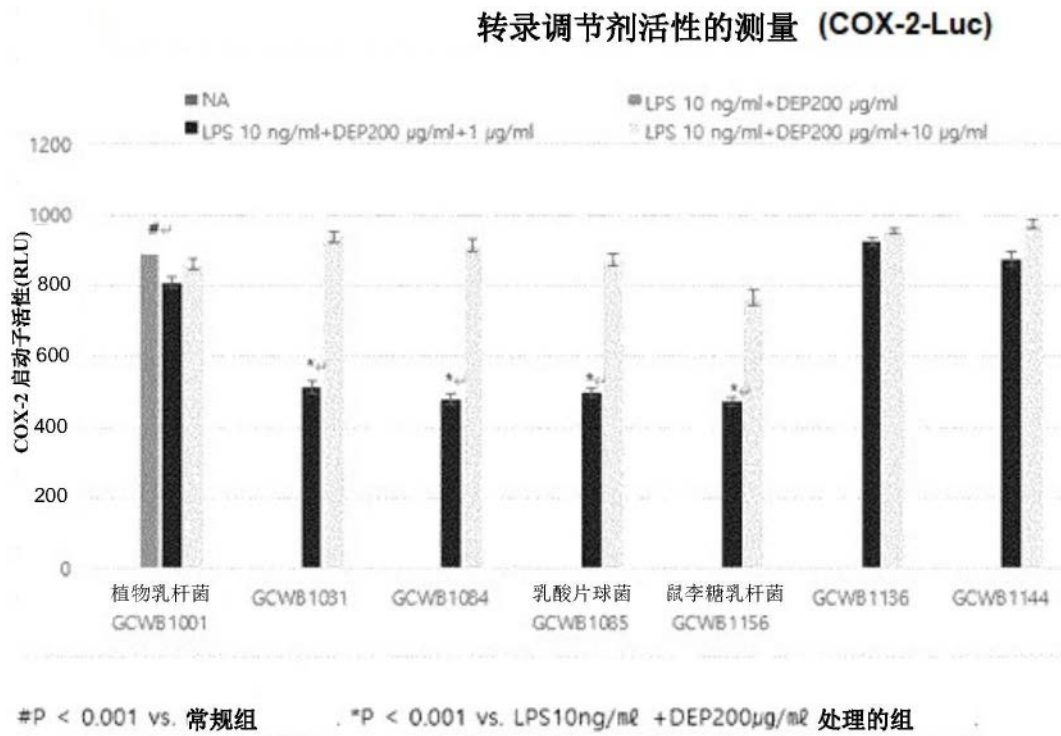


图5

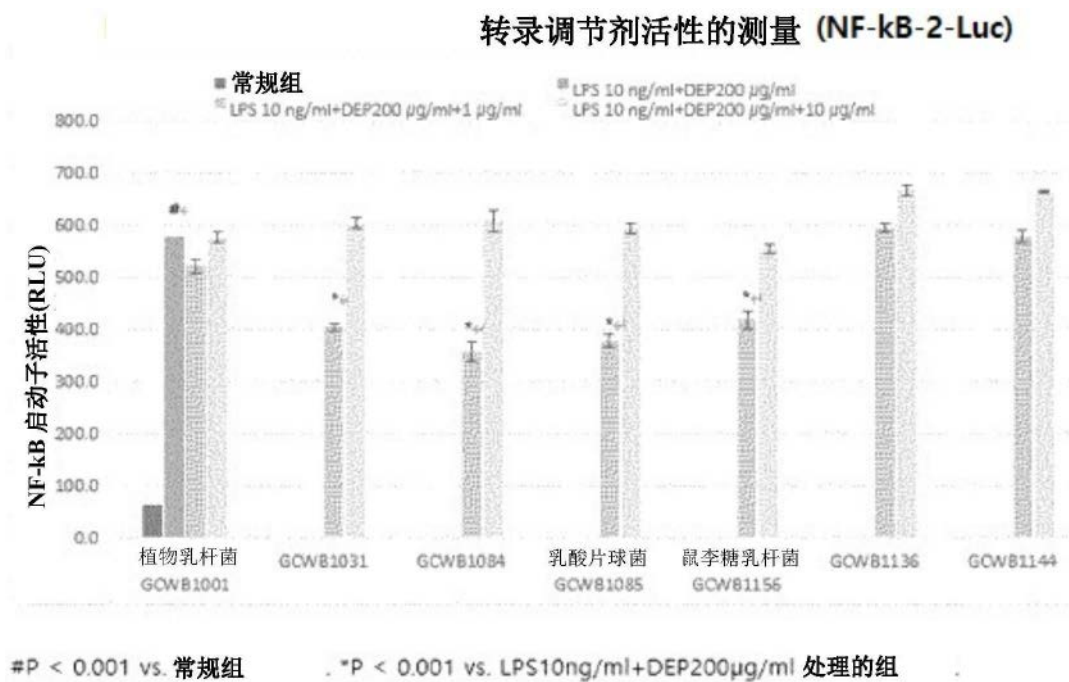
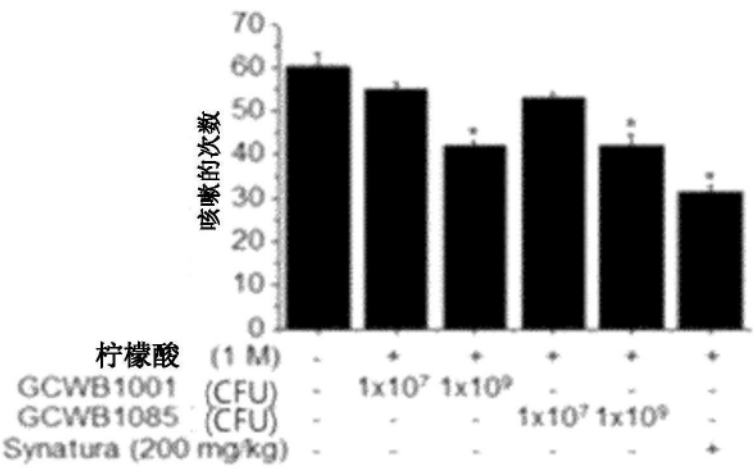
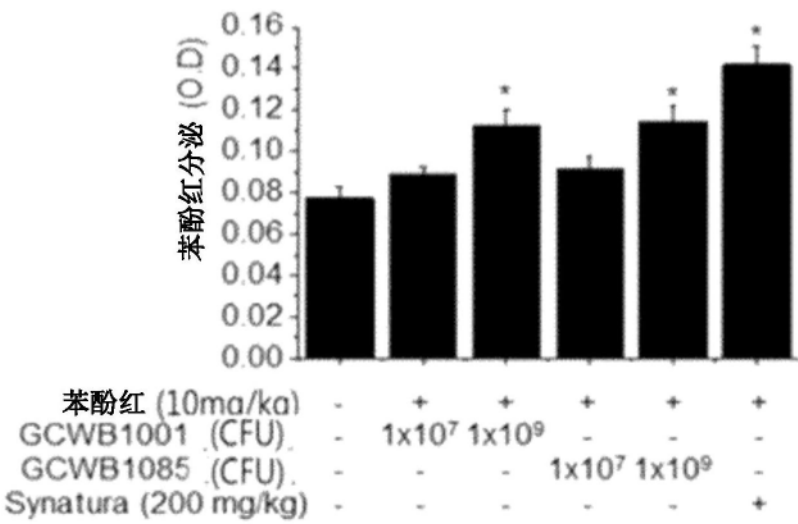


图6



*P < 0.001 vs.柠檬酸处理的组

图7



*P < 0.001 vs.苯酚红处理的组

图8

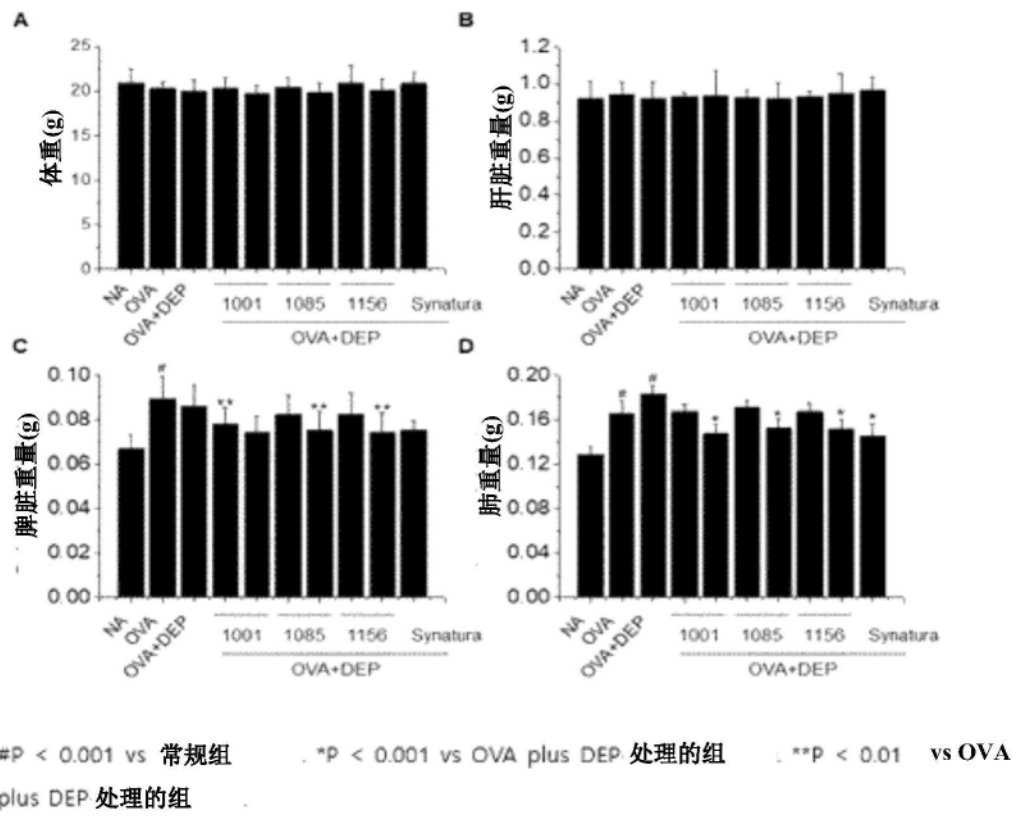
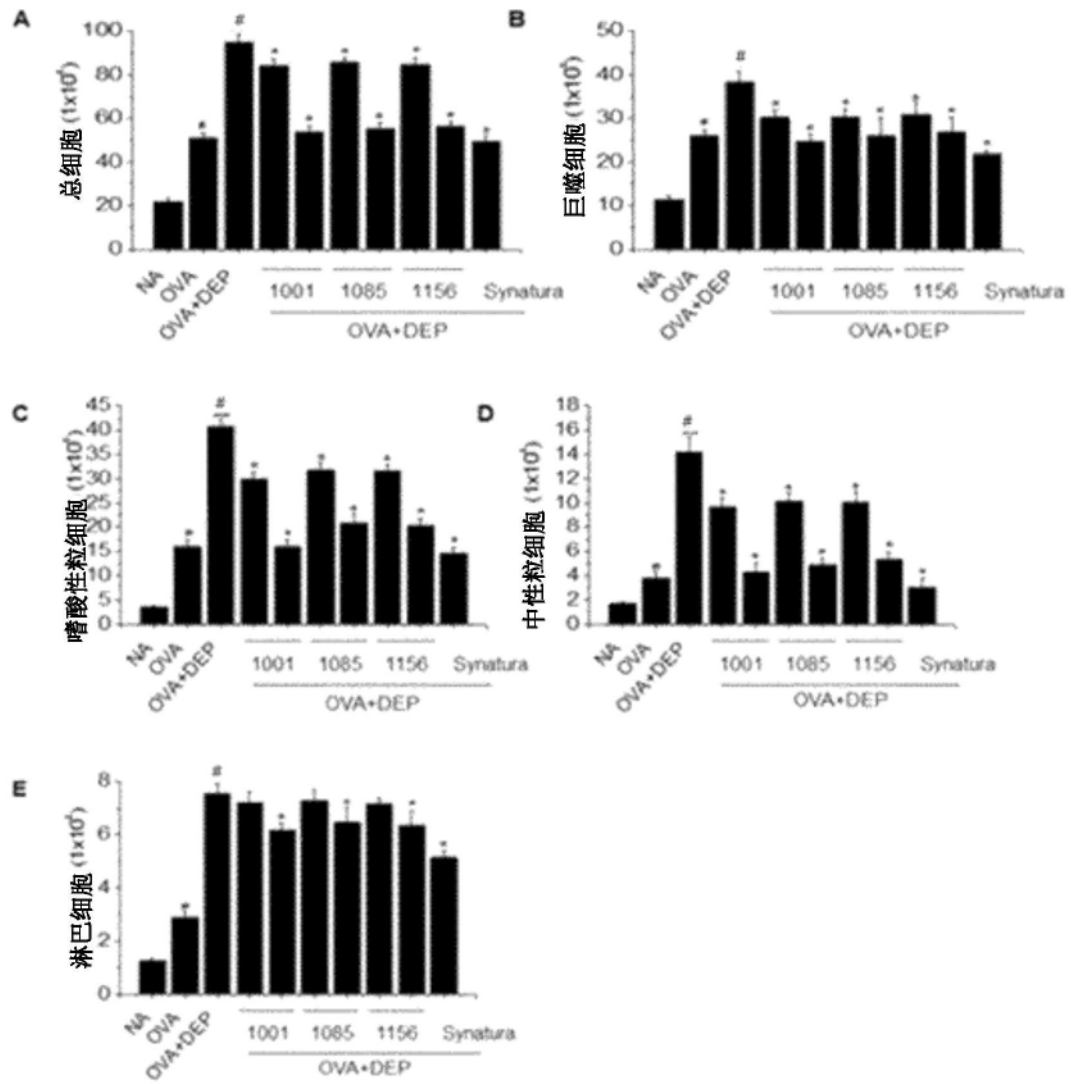


图9



#P < 0.001 vs 常规组

*P < 0.001 vs OVA plus DEP 处理的组

图10

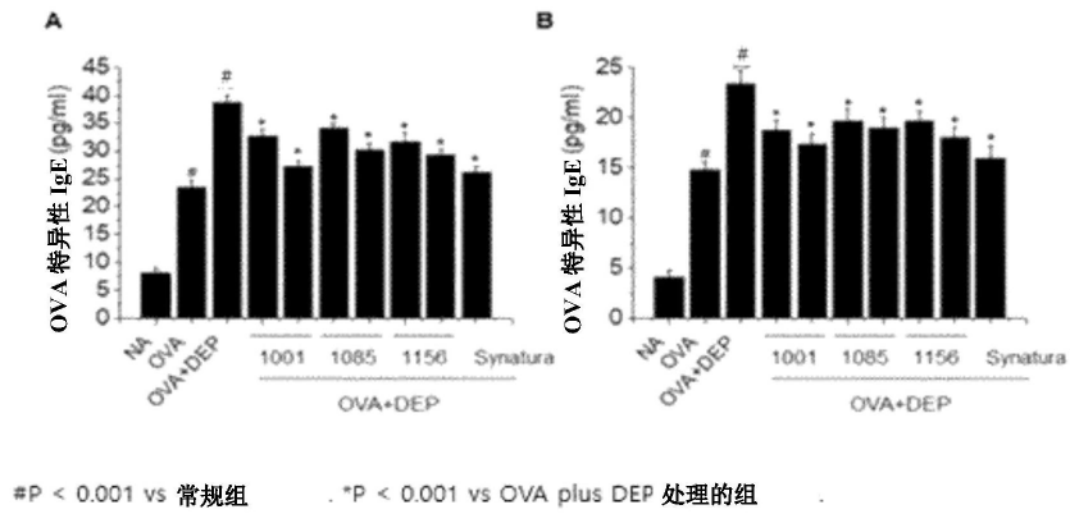
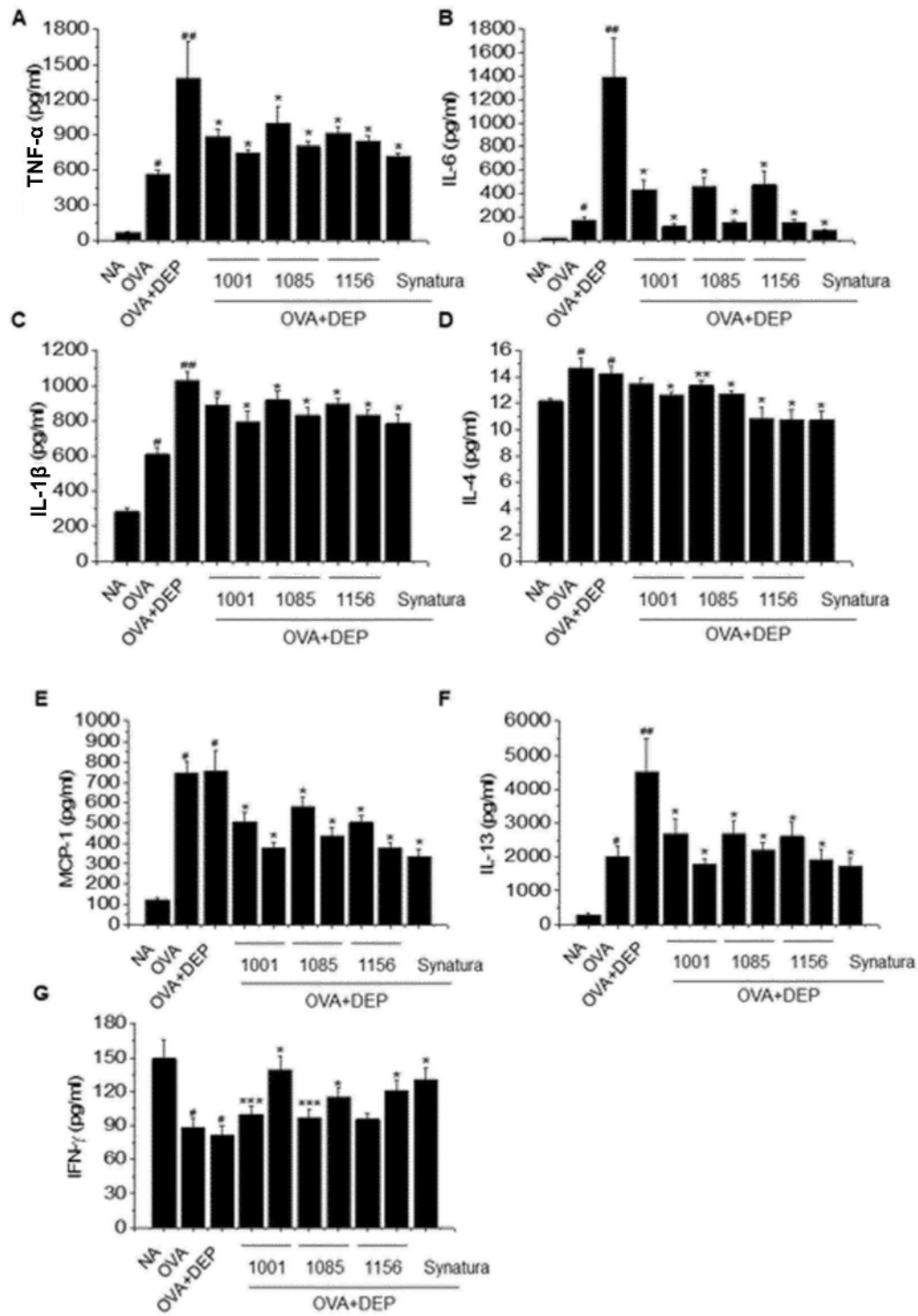
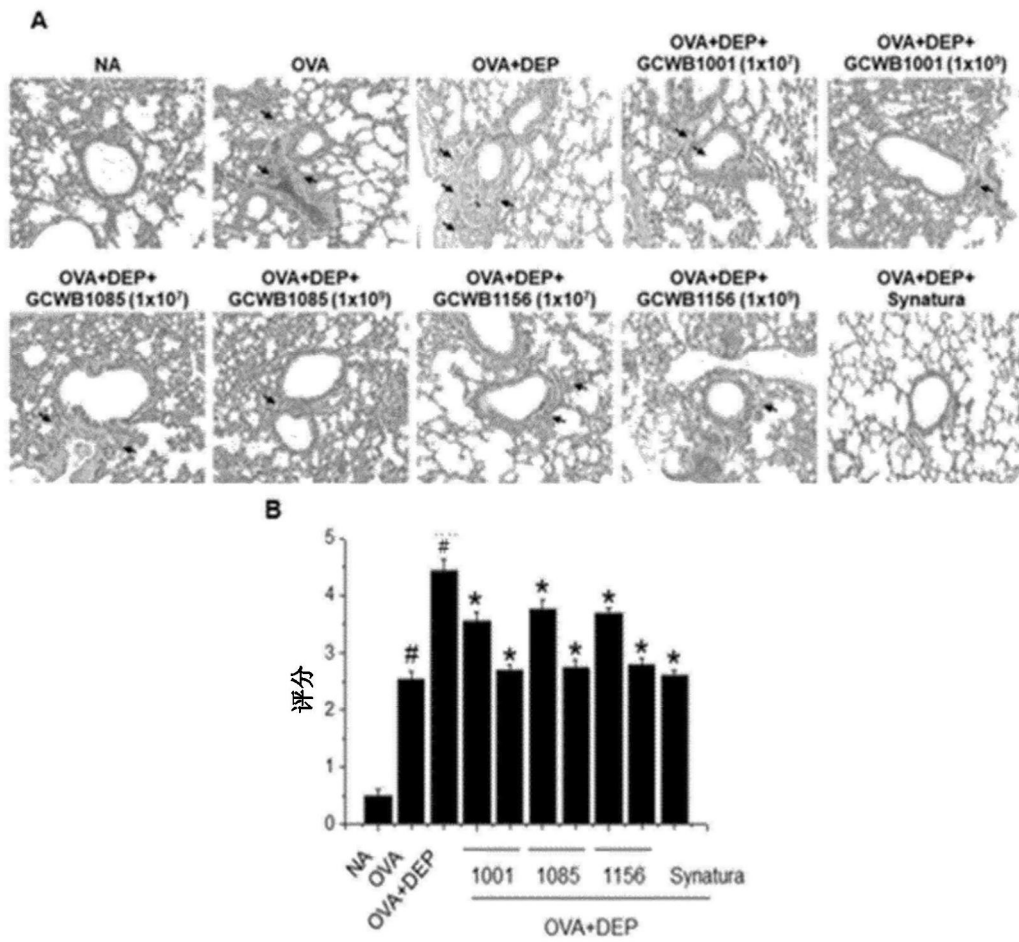


图11



#P < 0.001 vs 常规组 *P < 0.001 vs OVA plus DEP 处理的组 **P < 0.01 vs OVA plus DEP 处理的组 ***P < 0.05 vs OVA plus DEP 处理的组

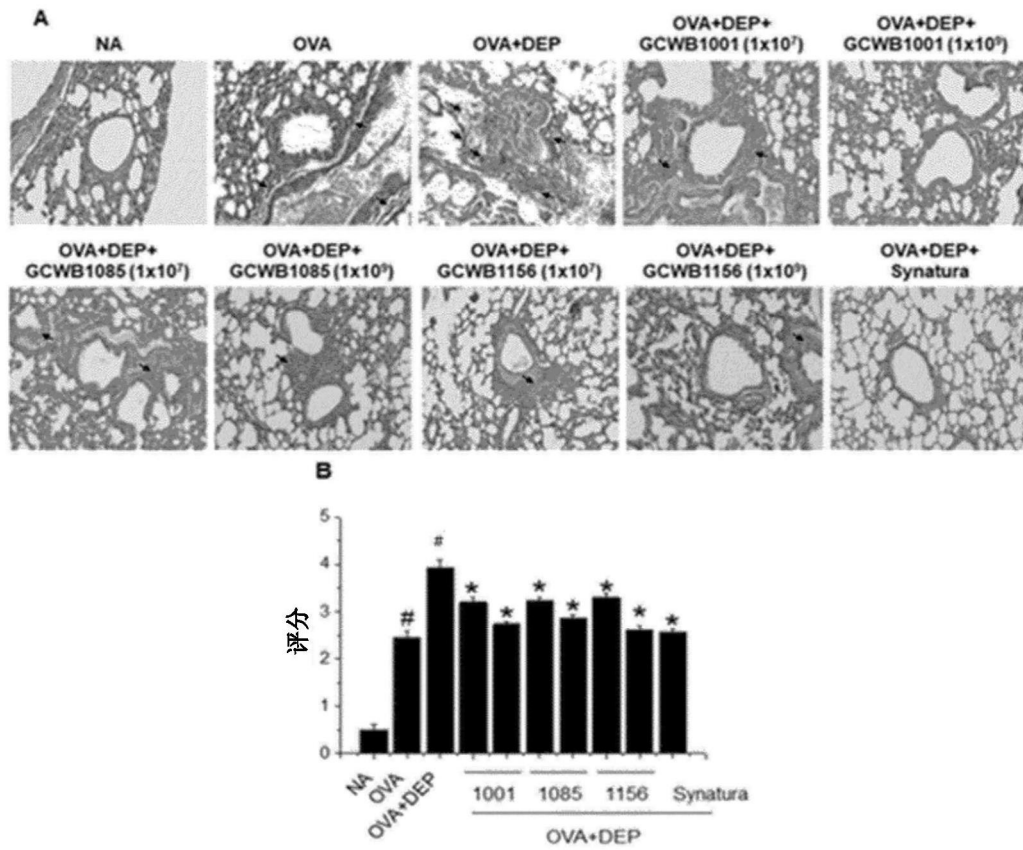
图12



#P < 0.001 vs 常规组

*P < 0.001 vs OVA plus DEP处理的组

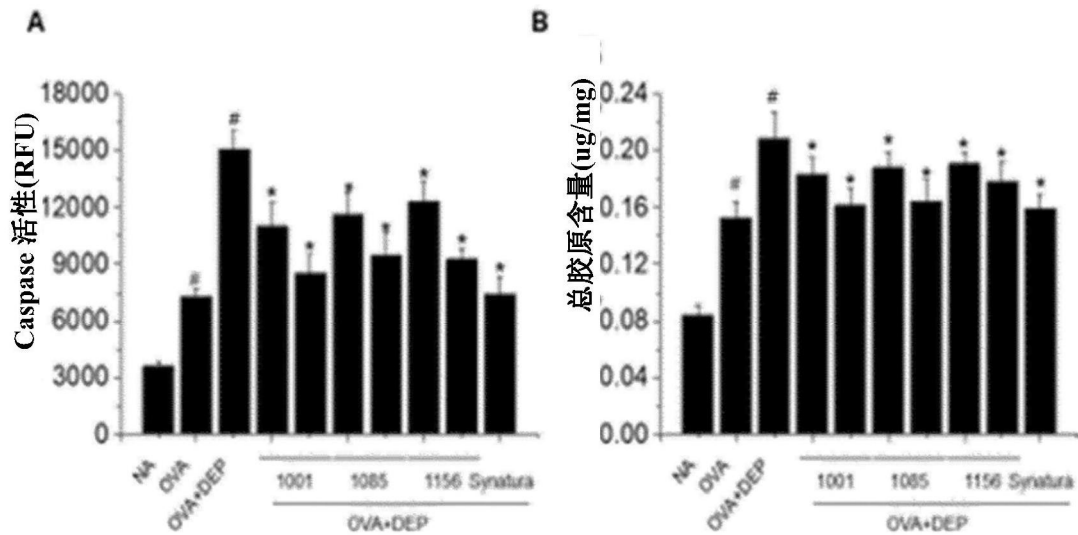
图13



#P < 0.001 vs 常规组

*P < 0.001 vs OVA plus DEP 处理的组

图14



#P < 0.001 vs 常规组

*P < 0.001 vs OVA plus DEP 处理的组

图15

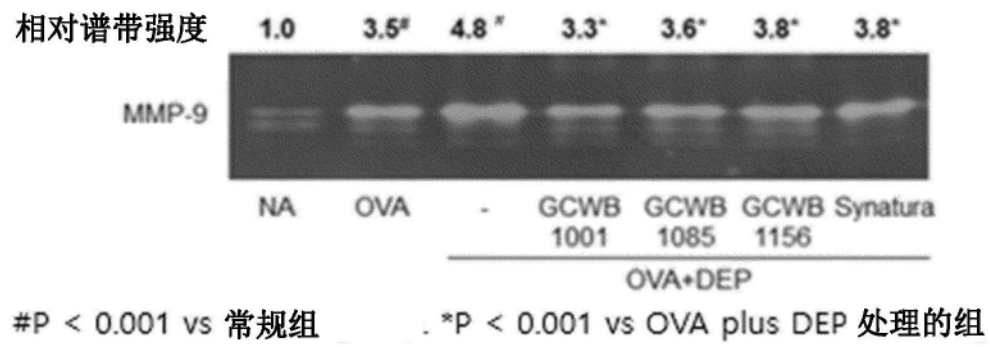


图16