



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106957811 B

(45)授权公告日 2019.11.26

(21)申请号 201710364793.9

C12R 1/225(2006.01)

(22)申请日 2017.05.22

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106957811 A

CN 104450590 A,2015.03.25,

CN 104450590 A,2015.03.25,

CN 102120975 A,2011.07.13,

(43)申请公布日 2017.07.18

CN 103911309 A,2014.07.09,

(83)生物保藏信息

CN 1233474 A,1999.11.03,

CCTCC NO: M 2017162 2017.03.31

CN 103911306 A,2014.07.09,

(73)专利权人 山东神农医院管理有限公司

CN 104688895 A,2015.06.10,

地址 271021 山东省泰安市泰山区东部新
区,创业大街以南山东宝来利来生物
工程股份有限公司实验楼

Maria Claudia Otero et al..Inhibition
of Staphylococcus aureus by H2O2-
producing Lactobacillus gasseri isolated
from the vaginal tract of cattle.《Animal
Reproduction Science》.2005,第96卷

(72)发明人 单宝龙 张建梅 程秀芳 陈甜甜
徐海燕 樊梅娜 房栋 刘红

Carola Parolin et al..Isolation of
Vaginal Lactobacilli and Characterization
of Anti-Candida Activity.《PLOS ONE》.2015,
第10卷(第6期),

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

武香玉等.健康妇女阴道乳杆菌的分离鉴
定.《药学研究》.2015,第34卷(第1期),

代理人 薛鹏喜

武香玉等.健康妇女阴道乳杆菌的分离鉴
定.《药学研究》.2015,第34卷(第1期),

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61K 35/747(2015.01)

A61K 36/756(2006.01)

A61P 15/02(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 31/10(2006.01)

审查员 梁韶

权利要求书1页 说明书19页

序列表1页 附图10页

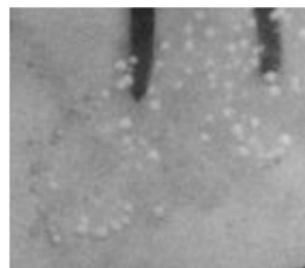
(54)发明名称

具有抑菌作用的格式乳杆菌与中药复方及
其治疗妇科炎症中的应用

养发酵,利用其代谢产物与优选的中草药提取物
进行复配,从而开发得到无毒、无副作用、安全高
效的治疗妇科炎症的产品。

(57)摘要

本发明公开了一株具有抑菌作用的格式乳
杆菌,其为格式乳杆菌(Lactobacillusgasseri)
DFNXC2-0121,已于2017年3月31日保藏于中国典
型培养物保藏中心,地址为:武汉市武昌珞珈山,
其保藏编号为CCTCC NO:M 2017162。本发明还公
开了由该格式乳杆菌和中药提取物制备的中药
益生菌组合物。本发明以微生态疗法作为指导,
从正常健康女性阴道中分离、纯化得到一株格式
乳杆菌,并与另一株植物乳杆菌一起进行扩大培



CN 106957811 B

1. 一株具有抑菌作用的格式乳杆菌, 其为格式乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) DFNXC2-0121, 已于2017年3月31日保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址为: 中国武汉, 武汉大学, 其保藏编号为CCTCC NO:M 2017162。

2. 一种菌剂, 其活性成分为权利要求1所述的格式乳杆菌的发酵产物;

所述的菌剂的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤: 发酵权利要求1所述的格式乳杆菌, 得到发酵产物, 发酵的条件为: 37℃, 静置培养18-24h。

3. 权利要求1所述的格式乳杆菌和/或权利要求2所述的菌剂在制备治疗妇科炎症的产品中的应用。

4. 一种益生菌代谢物组合物, 其特征在于, 所述的益生菌代谢物组合物包含: 权利要求1所述的格式乳杆菌的发酵培养物和保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物。

5. 如权利要求4所述的益生菌代谢物组合物, 其特征在于, 所述格式乳杆菌的发酵培养物中的活菌数为 $1.0 \times 10^8 - 10.0 \times 10^8$ cfu/mL; 所述保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物中的活菌数为 $8.0 \times 10^8 - 20.0 \times 10^8$ cfu/mL。

6. 权利要求4或5所述的益生菌代谢物组合物在制备治疗妇科炎症的产品中的应用。

7. 一种治疗妇科炎症的中药益生菌组合物, 其特征在于, 由以下重量份的组分制成: 益生菌代谢物组合物30-40份、中药提取物40-55份; 所述中药提取物是由以下重量份的原料药制成: 黄芩32-40份、苦参25-30份、黄柏6-10份、地肤子4-10份、桑叶4-10份;

所述的中药益生菌组合物的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

(1) 益生菌代谢物组合物的制备: 分别将权利要求1所述的格式乳杆菌和保藏编号为CCTCC M 2010150的植物乳杆菌进行活化, 将活化后的菌株接种于发酵培养基中进行培养, 至格式乳杆菌发酵培养物的菌体浓度达到 $1.0 \times 10^8 - 10.0 \times 10^8$ cfu/mL, 保藏编号为CCTCC NO:M2010150的植物乳杆菌发酵培养物的菌体浓度达到 $8.0 \times 10^8 - 20.0 \times 10^8$ cfu/mL, 将格式乳杆菌发酵培养物和保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌发酵培养物混合, 备用;

(2) 中药提取物的制备: 将黄芩、苦参、黄柏、地肤子和桑叶混合, 加水煎煮, 煎煮液浓缩至密度为1.10-1.20g/mL, 离心, 取上清液, 备用;

(3) 将益生菌代谢组合物和中药提取物混合均匀, 即制备得到中药益生菌组合物。

具有抑菌作用的格式乳杆菌与中药复方及其在治疗妇科炎症中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株具有抑菌作用的格式乳杆菌及其在治疗妇科炎症中的应用,特别是涉及该格式乳杆菌在制备治疗阴道炎的药物中的应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 妇科炎症是妇科门诊常见的疾病,各个年龄段皆有发生,世界卫生组织(WHO)发布的数据表明,发展中国家90%以上的妇女患有妇科炎症,中国女性有70%患有不同程度的生殖道感染,由于医疗资源、经济条件、文化知识的不平衡,使得农村已婚妇女妇科炎症发病率更高达95%以上;85%以上的妇女至少患有两种以上的生殖道疾病。据统计,2004年全国14家,2005年全国62家,2006年全国81家医院妇科和计划生育门诊5万多人的流调资料显示,女性所有疾病中妇科感染疾病(阴道炎、盆腔炎、宫颈炎)占到百分之五十五,由此产生的医疗费用每年高达200多亿元。据此估算,中国每年至少有2亿女性患生殖道感染及相关疾病,全球数以万计的妇女一直被这种阴道病困扰着。

[0003] 生殖道感染具有发病率高、复发率高、流行范围广的特点,严重影响女性的身心健康,表现出白带异常黄绿色,异味(鱼腥味、恶臭味)、瘙痒、灼烧感、下腹部疼痛、性交痛,如果得不到及时正确的治疗,会上行感染,引起宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎等,导致不孕不育、异位妊娠,孕妇导致流产、死胎、死产、先天感染及新生儿感染等,可使艾滋病(AIDS)和宫颈癌的发生风险增加,严重影响女性的身心健康,影响家庭的幸福以及社会的安定。

[0004] 目前,治疗阴道感染的措施主要是运用抗生素,抗生素是某些微生物通过酶促反应将初级代谢产物转变为结构性的次级代谢产物。抗生素不合理的大量使用、滥用,加上缺乏严格的监管,导致死亡、耐药微生物及超级耐药菌株的产生,抗生素的误用也置病人于不必要的抗药性风险中;北京大学第一医院妇产科廖秦平教授在中国女性阴道微生态研究进展一文中说,阴道内正常菌群是阴道微生态研究的核心内容,早在1892年,Dederlein首次发表了关于人类阴道微生态菌群的研究,Dederlein认为阴道微生物仅有革兰氏染色阳性杆菌构成,即乳杆菌。随着对阴道菌群研究的不断深入,发现正常状态下阴道内存在着多种微生物,其中,最重要、数量最多的是乳杆菌,在健康女性的阴道分泌物中分离率高达50%-80%,现在已确定定植于正常阴道内的微生物主要由细菌、真菌、原虫、病毒、支原体等,这些菌群的存在维持着生态的平衡并不发病。在维持阴道生态平衡中,以产生过氧化氢(H₂O₂)的乳杆菌为优势菌,它能够产生多种抑菌物质,如乳酸、硬脂酸、过氧化氢等酸化阴道环境,降低阴道pH、通过粘附占位保护、刺激免疫系统等方式抑制病原菌的大量繁殖,在维持阴道的生态平衡中起着非常重要的作用。阴道生态平衡一旦被打破或外源病原体侵入,即可导致炎症发生。

[0005] 在传统的抗生素治疗过程中,抗生素在杀死致病菌的同时也会把阴道中的优势菌杀死,使阴道处于少菌或无菌状态,又加上抗生素的使用导致免疫力下降,一旦遇到病原菌很容易引起感染,二重感染。现在,抗生素的副作用已被医、药界科学工作者认可,国家也

已逐步限制使用。

[0006] 治疗阴道感染除了口服抗生素全身用药外,还有中医中药的辩证施治,中医通过补气养血、疏肝理气、消毒逐瘀、祛湿热、通经络等来全身用药,但是效果缓慢,难以忍受的瘙痒使人坐卧不宁,很难坚持服用中药来止痒。目前市面上的外用药也琳琅满目,栓剂、胶囊、酸化洗剂、凝胶剂、中药熏洗、泡腾片等,据调查很多药物效果不佳,主要是用于抗菌药物的辅助治疗,不能根治,容易反复,特别是外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)、复发性念珠阴道病(recurrent vulvovaginal candidiasis,RVVC),治疗疗程长极易反复。

[0007] 综上,抗生素、中医中药及各种外用药治疗阴道感染的效果均不理想,其根源在于没有恢复阴道微生态的平衡,但由于阴道菌群是一个大的生态系统,若盲目的采用外源微生物制剂进行调节,很容易引起新发菌群的失调。因此,如何通过调节阴道菌群平衡来治疗阴道感染仍是目前的难点所在。

发明内容

[0008] 针对上述现有技术,本发明的目的是提供一种具有抑菌作用的格式乳杆菌及其在妇科炎症中的应用。

[0009] 本发明以微生态疗法作为指导,从正常健康女性阴道中分离、纯化得到一株格式乳杆菌,并与另一株植物乳杆菌一起进行扩大培养发酵,利用其代谢产物与优选的中草药提取物进行复配,从而开发得到无毒、无副作用、安全高效的治疗妇科炎症的产品。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0011] 本发明的第一方面,提供一种具有抑菌作用的格式乳杆菌,其为格式乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)DFNXC2-0121,已于2017年3月31日保藏于中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC),地址为:中国武汉,武汉大学,其保藏编号为CCTCC NO:M 2017162。

[0012] 该菌株是从正常健康女性阴道中分离得到的,菌株的生理生化特征为:菌落形态为乳白色、圆形、片形;革兰氏染色阳性,无芽孢,硝酸盐还原反应、 H_2O_2 酶试验阴性,不液化明胶,不产吲哚。

[0013] 本发明的第二方面,提供一种菌剂,其活性成分为上述格式乳杆菌的发酵产物。

[0014] 本发明还提供上述菌剂的制备方法,包括如下步骤:发酵上述的格式乳杆菌,得到发酵产物。

[0015] 上述制备方法中,发酵采用的发酵培养基为:MRS培养基。

[0016] 上述制备方法中,发酵的条件为:37℃,静置培养18-24h。

[0017] 本发明的第三方面,提供上述格式乳杆菌和/或菌剂在制备治疗妇科炎症的产品中的应用。

[0018] 本发明的第四方面,提供一种益生菌代谢物组合物,所述的益生菌代谢物组合物包含:上述的格式乳杆菌的发酵培养物和保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物。

[0019] 所述格式乳杆菌的发酵培养物中的活菌数为 $1.0 \times 10^8 - 10.0 \times 10^8$ cfu/mL;所述保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物中的活菌数为 $8.0 \times 10^8 - 20.0 \times 10^8$ cfu/mL。

[0020] 所述格式乳杆菌的发酵培养物和所述保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳

杆菌的发酵培养物可以以任意比混合；作为优选的方案，所述格式乳杆菌的发酵培养物和所述保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物以体积比1:1进行混合。

[0021] 进一步的，上述益生菌代谢物组合物中还可以包含：卡波姆、甘油和薄荷油等组分，并以常规方法制成凝胶剂等各种药物剂型。

[0022] 上述益生菌代谢物组合物在制备治疗妇科炎症的产品中的应用也是本发明的保护范围。经试验发现，本发明的益生菌代谢物组合物对于引起阴道炎的致病菌具有明显的抑制作用，特别是对于引起阴道炎的金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和大肠杆菌的抑菌效果更为显著。

[0023] 上述应用中，所述产品包括：功能性食品、保健品、消毒剂和药品等多种产品形式。

[0024] 本发明的第五方面，提供一种治疗妇科炎症的中药益生菌组合物。

[0025] 本发明的治疗妇科炎症的中药益生菌组合物，由以下重量份的组分制成：

[0026] 益生菌代谢物组合物30-40份、中药提取物40-55份；

[0027] 所述中药提取物是由以下重量份的原料药制成：

[0028] 黄芩32-40份、苦参25-30份、黄柏6-10份、地肤子4-10份、桑叶4-10份。

[0029] 本发明的第六方面，提供上述中药益生菌组合物的制备方法，步骤如下：

[0030] (1) 益生菌代谢物组合物的制备：分别将本发明的格式乳杆菌和保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌进行活化，将活化后的菌株接种于发酵培养基中进行培养，至格式乳杆菌发酵培养物的菌体浓度达到 1.0×10^8 - 10.0×10^8 cfu/mL，保藏编号为CCTCC NO:M 2010150的植物乳杆菌发酵培养物的菌体浓度达到 8.0×10^8 - 20.0×10^8 cfu/mL，将格式乳杆菌发酵培养物和保藏编号为CCTCC M 2010150的植物乳杆菌发酵培养物混合，备用；

[0031] (2) 中药提取物的制备：将黄芩、苦参、黄柏、地肤子和桑叶混合，加水煎煮，煎煮液浓缩至密度为1.10-1.20g/mL，离心，取上清液，备用；

[0032] (3) 将益生菌代谢组合物和中药提取物混合均匀，即制备得到中药益生菌组合物。

[0033] 步骤(1)中，所述发酵培养基为：MRS培养基；培养条件为：37℃，静置培养。

[0034] 步骤(2)中，加水煎煮的具体方法为：将黄芩、苦参、黄柏、地肤子和桑叶混合，置于10倍水中浸泡40-60min，煎煮，水开后继续煎煮50-60min，过滤得到第一滤液；药渣用8倍水进行二次煎煮，水开后继续煎煮30-40min，过滤得到第二滤液与第一滤液混合均匀，通过真空减压浓缩中药液，至药液的密度为1.10-1.20g/mL，3000转/min离心10min，取上清备用。

[0035] 进一步的，本发明的中药益生菌组合物还可以结合药学上接受的辅料制备成各种类型的产品，包括：功能性食品、保健品、消毒剂和药品（如：洗剂、凝胶剂和栓剂等）。

[0036] 本发明的有益效果：

[0037] (1) 本发明首次从健康女性的阴道中分离、纯化得到一株格式乳杆菌，该菌株具有产酸高，产抑菌活性物质、抑菌能力强的特点。菌株发酵后能够产生酸性物质如乳酸、甲酸及硬脂酸等，这些酸性物质能够降低生殖道的pH值，抑制病原菌的生长；还能产生过氧化氢，进一步的抑制其他菌和致病微生物的生长。

[0038] (2) 本发明的益生菌代谢物组合物是由本发明的格式乳杆菌和保藏编号为CCTCC M 2010150的植物乳杆菌的发酵培养物复配而成，其中，保藏编号为CCTCC M 2010150的植物乳杆菌记载在专利“一株可用于生物防腐保鲜的乳酸菌及其应用”（CN101914475A）中，该乳酸菌原有的作用是防治果皮褐变，降低果实发病率。本发明将该乳酸菌与格式乳杆菌联

合,发现这两株菌配合使用具有显著的协同增效作用,对于引起阴道炎的致病菌具有明显的抑制作用,特别是对于引起阴道炎的金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和大肠杆菌的抑菌效果更为显著。

[0039] (3) 本发明的中药益生菌制剂是由益生菌代谢物组合物和中药提取物经科学配伍而成,实现了益生菌和中药提取物的完美结合,经过体外抑菌实验验证,本发明的中药益生菌制剂安全有效,较目前市场现有的产品单纯的益生菌产品或单纯的中药产品具有抑菌谱广、止痒排毒效果更加明显。其中:中药提取物具有明显的抑制金黄色葡萄球菌、白色念珠菌作用,及清热燥湿、消肿止痒的作用;益生菌能够抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的作用,并能够酸化阴道的pH,有利于乳杆菌的增值和阴道黏膜修复,中药和益生菌的结合,即具有中药的治疗作用又具有益生菌的调节阴道微生态平衡的作用,并扩大了抑菌谱,二者具有协同作用。经试验验证,效果优于任何一种单一的原料。

附图说明

[0040] 图1:氨基脱羧酶活性检测结果;其中,图1A为组氨酸脱羧酶活性检测结果,图1B为酪氨酸脱羧酶活性检测结果,图1C为鸟氨酸脱羧酶活性检测结果,图1D为赖氨酸脱羧酶活性检测结果。

[0041] 图2:优势乳杆菌的筛选结果。

[0042] 图3:菌株C2-0121的系统发育树。

[0043] 图4:菌株C2-0121发酵生长曲线。

[0044] 图5:试验组阴道组织图片及HE染色切片图;其中,图5a为阴性对照组,图5b为染毒组,图5c为阳性对照组。

[0045] 图6:造模期间家兔阴道分泌物菌群变化。

[0046] 图7:阴道分泌物镜检图片;其中,图7a为正常组阴道分泌物镜检图片,图7b为灌注抗生素后阴道分泌物镜检图片,图7c为攻毒之后的镜检图片。

[0047] 图8:治疗7天后家兔的饮食变化趋势。

[0048] 图9:治疗期间家兔阴道分泌物菌群变化。

[0049] 图10:家兔各试验组阴道分泌物镜检涂片;其中,图10a为自然恢复组,图10b为混合治疗组,图10c为阳性对照组,图10d为中药组,图10e为益生菌组。

[0050] 图11:造模期间阴道组织切片;其中,图11a为正常对照组,图11b为模型组,图11c为混合治疗组,图11d为中药组,图11e为益生菌组,图11f为阳性对照组。

具体实施方式

[0051] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0052] 正如背景技术所介绍的,如何通过调节阴道菌群平衡来治疗阴道感染仍是目前的难点所在,基于此,本申请提出了一株具有抑菌作用的格式乳杆菌及其在治疗阴道感染中的应用。

[0053] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具

体的实施例与对比例详细说明本申请的技术方案。

[0054] 实施例1:菌株的筛选与鉴定

[0055] 1. 试验材料

[0056] 1.1分离源:健康妇女阴道分泌物

[0057] 1.2培养基:

[0058] 改良MRS培养基(菌株分离时MRS培养基中添加1%的碳酸钙),明胶液化培养基(常规的市售产品)。

[0059] H_2O_2 鉴定MRS培养基:MRS琼脂培养基中包含0.25mg/mL的四甲基联苯胺、0.1mg/mL的辣根过氧化物酶。

[0060] 乳杆菌鉴定试验的培养基:杭州天和微生物试剂有限公司生产的细菌微量生化反应管。

[0061] 1.3实验菌株:

[0062] 金黄色葡萄球菌ATCC6538、大肠杆菌8099购于中国医学细菌包藏管理中心,变形杆菌及沙门氏菌购于中国农业大学。

[0063] 1.4其他

[0064] 细菌基因组提取试剂盒,药敏纸片,16S rRNA引物。

[0065] 2. 试验方法

[0066] 2.1阴道分泌物的采集:泰安市88医院妇科体检处医生协助取样,用无菌棉拭于阴道后1/3处一次性顺时针刮抹,须避免接触到外阴部和阴道口以防污染。取出后立即放至MRS液体培养基中,并编号记录。

[0067] 2.2菌株的分离纯化及鉴定

[0068] 将各分离源置于无菌水(带玻璃珠)中震荡,将样品充分打散混匀,取振荡液依次稀释至 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ,各稀释度取0.1mL涂平板(MRS+CaCO₃),2个重复,于37℃培养箱培养。挑取培养基上具有明显钙溶圈的菌落于斜面,革兰氏染色、镜检,直至确定为纯菌,将纯化后的乳杆菌菌株接种到MRS培养基培养后,置4℃冰箱中保存备用。

[0069] 2.2.1产酸性能的测定及传代稳定性

[0070] 将分离的菌种以2%接种量接种于改良的MRS培养基中,37℃静置培养,测定发酵液的pH值。

[0071] 菌株连续转接10天看其稳定性及发酵液的pH值。

[0072] 2.2.2乳杆菌的初步鉴定

[0073] 凡是革兰氏染色阳性, H_2O_2 酶试验阴性的菌株可初步确定为乳杆菌。

[0074] 2.2.3乳杆菌属的鉴定

[0075] 通过生长温度试验(15℃,45℃)、运动性试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验、吲哚试验、硫化氢试验对疑似菌株进行属的鉴定。

[0076] 2.2.4乳杆菌种的鉴定

[0077] 通过碳水化合物发酵产酸试验进行种的鉴定。各种碳水化合物发酵试验的培养基均采用细菌微量生化反应管。

[0078] 2.3菌株的生物学性能研究及优势乳杆菌筛选

[0079] 2.3.1耐酸试验

[0080] 盐酸调节MRS培养基使其pH值分别为1.5、2.5、3.5,分别接种培养好的发酵液,1%的接种量,37℃培养。取培养0h及4h的菌液平板计数。计算存活率(%)。

[0081] 2.3.2耐胆盐试验

[0082] 在MRS培养基中加入猪胆酸盐,使其质量分数分别为0.1%、0.2%、0.3%,菌液按2%的接种量接种,37℃培养。取培养0h及4h的菌液平板计数,计算存活率(%)。

[0083] 2.3.3体外抑菌试验牛津杯法

[0084] 2.3.4抗生素的敏感试验纸片扩散法

[0085] 2.3.5氨基脱羧酶活性检测

[0086] 将供试菌种活化后,接种于液体脱羧酶培养基中检测,空白培养基对照试验。37℃,培养4d后,观察颜色变化。

[0087] 2.3.6优势乳杆菌的筛选

[0088] 应用H₂O₂鉴定MRS培养基筛选产H₂O₂的乳杆菌。接种后厌氧37℃,培养72h,之后将培养基暴露于空气中,产过氧化氢的菌落会于20min内变为蓝色。

[0089] 2.4 16S rDNA分子鉴定

[0090] PCR扩增引物:1492r 5'-ggttaccttgttacgactt-3';27f 5'-agagttgatcctggctcag-3'。

[0091] 菌落PCR反应条件:94℃预变性5min,94℃变性1min,52℃退火1min,72℃延伸2min,25个循环,72℃延伸10min。

[0092] PCR产物经salt-free纯化后,PCR产物测序由博尚生物技术有限公司完成,要求双向测通。将拼接后的序列结果输入www.NCBI.nlm.nih.gov/blast,与GenBank数据库中的序列进行同源性比对。

[0093] 2.5生长曲线的测定

[0094] 以2%接种量将菌株接种于改良的MRS培养基中,37℃静置培养,于0h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h、20h、24h、28h、30h、32h、34h、36h、40h、44h、48h、50h取样测定OD值及pH值,以培养时间为横坐标,相应的OD值与pH值为纵坐标,绘制生长曲线,找出最佳培养时间。

[0095] 3.结果与分析

[0096] 3.1分离纯化各菌株的形态学特征

[0097] 将多次挑取单菌落、分离纯化的菌株进行革兰氏染色,各株菌的菌落形态皆为乳白色、圆形、片形,通过革兰氏染色挑选革兰氏阳性的、菌体形态均为杆状的菌株,分别标记为,E-1、G5-7、C2-0109、C2-0121、L-7-3、G5-5、G5-3、H5-2、G5-4、G5-3、H5-3。

[0098] 3.2产酸性能、传代稳定性及发酵液PH值(10代)

[0099] 表1 产酸性能的测定结果(测定20h发酵液的pH值)

[0100]

菌种	pH	菌种	pH	菌种	pH
E-1	4.83	L-7-3	5.53	G-5-4	4.57
G5-7	4.11	G5-5	4.08	G5-3	4.31
C2-0121	3.72	G5-3	3.95	H5-3	4.36
C2-0109	3.92	H5-2	4.33	CK	6.55

[0101] 由表1看出:C2-0109及C2-0121与其它菌株比较,其发酵液的pH较低,都小于4,说

明其产酸能力较其它菌株强。

[0102] 表2 传代稳定性及发酵液PH值(10代)

[0103]

菌种	pH	菌种	pH	菌种	pH
E-1	4.80	L-7-3	5.54	L-7-2	4.56
G5-7	4.11	G5-5	4.10	E-5	4.31
C2-0121	3.90	G5-3	3.94	H5-1	4.40
C2-0109	3.78	H5-2	4.32	CK	6.58

[0104] 经连续培养传代和对比试验,该菌株的分类学形状、形态特征等理化形状未发现可见变化,说明该菌株的形状稳定遗传,两菌株的产酸能力比较稳定。

[0105] 3.2乳杆菌属的鉴定

[0106] 所分株菌均为革兰氏染色阳性,无芽孢,硝酸盐还原反应、H₂O₂酶试验阴性,不液化明胶,不产吲哚,其他见表3

[0107] 表3 硫化氢实验结果

[0108]

菌种	结果	菌种	结果	菌种	结果
E-1	—	L-7-3	—	L-7-2	—
G5-7	—	G5-5	—	G-4	—
C2-0121	—	G5-3	—	H5-1	—
C2-0109	—	H5-2	—		

[0109] 由表3可以看出:各株菌都不产生硫化氢,综合各个指标,菌株C2-0121及其他菌株皆为乳杆菌属。

[0110] 3.3氨基脱羧酶活性检测

[0111] 在氨基脱羧酶检测试验中使用的四种氨基酸为酪氨酸、组氨酸、鸟氨酸和赖氨酸。经脱氨后分别形成酪胺、组胺、腐胺和尸胺,均是引起中毒症状的主要生物胺类物质。根据氨基脱羧酶培养基初步检测结果可知:所测菌株均不产生鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸和酪氨酸脱羧酶活性,即不产生生物胺。即不会引起中毒症状。组氨酸脱羧酶活性检测结果如图1A所示(图1A中,从左到右分别为:空白、C2-0109、FNG5-5、FNG5-4、C2-0121、FNG5-3、H5-2),酪氨酸脱羧酶活性检测结果如图1B所示(图1B中,从左到右:空白、FNG5-3、FNG5-5、C2-0121、C2-0109、H5-2、FNG5-4),鸟氨酸脱羧酶活性检测结果如图1C所示(图1C中从左到右分别为空白、FNG5-5、C2-0109、FNG5-3、C2-0109/C2-0121、H5-2、FNG5-4),赖氨酸脱羧酶活性检测结果如图1D所示(图1D中,从左到右分别为空白、C2-0109、C2-0121、FNG5-4、FNG5-5、C2-0109、FNG5-3)。

[0112] 3.4菌株的生物学性能研究及优势乳杆菌的筛选

[0113] 3.4.1耐酸试验结果

[0114] 盐酸调节MRS培养基使其pH值分别为1.5、2.5、3.5,分别接种培养好的发酵液,1%的接种量,37℃培养。取培养0h及4h的菌液平板计数,计算存活率(%)见表4。

[0115] 表4 在不同pH条件放置4h的存活率(%)

[0116]

菌株/pH度	1.5	2.5	3.5
C2-0109	—	—	108%
C2-0121	—	2.1%	93.5%
C2-0071	—	1.0%	90.5%
G5-7	—	0.8%	88.2%
G5-5	—	—	91.2%
G5-4	—	—	90.5%
G5-3	—	1.05%	90.5%
H5-2	—	1.32%	91.8%
H5-3	—	—	88.6%
L-3-2	—	—	78%

[0117] 由表4看出:各菌株在PH 1.5环境中都不耐受,菌株C2-0121在pH3.5环境中耐受,存活率为93.5%,除了低于菌株C2-0109外,高于其他菌株。

[0118] 3.4.2耐胆盐试验

[0119] 在MRS培养基中加入猪胆酸盐,使其质量分数分别为0.1%、0.2%、0.3%,菌液按2%的接种量接种,37℃培养0h及4h的菌液平板计数,计算存活率(%),其结果见表5。

[0120] 表5 在不同浓度胆盐条件放置4h的存活率(%)

[0121]

菌株/胆盐浓度	0.1%	0.2%	0.3%
---------	------	------	------

[0122]

C2-0109	102.4%	—	—
C2-0121	96%	—	—
C2-0071	87%	—	—
G5-7	65%	—	—
G5-5	—	—	—
G5-4	—	—	—
G5-3	85%	—	—
H5-2	78%	—	—
H5-3	58%	—	—
L-3-2	35%	—	—

[0123] 由表5看出:菌株C2-0109、C2-0121、C2-0071FNG-3在胆盐浓度为0.1%的溶液中4h后能够存活85%以上,其中C2-0109、C2-0121耐胆盐的能力较强,在0.1%的胆盐溶液中37℃培养4h其存活率大于95%,而其他各菌株存活率皆小于90%。

[0124] 3.4.3体外抑菌试验

[0125] 用牛津杯法分别对大肠杆菌8099、金黄色葡萄球菌ATCC6538、沙门氏菌及变形杆菌的抑菌性能检测,并且与实验室中保存的格式乳杆菌C2-0071抑菌比较好的菌株进行比

较,结果见表6。

[0126] 表6 各株乳杆菌的抑菌性结果(单位:mm)

[0127]

	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	大肠杆菌 8099	沙门氏菌	变形杆菌
C2-0109	16.5/16.0	16/16	17.5/18	12.0/11.5
C2-0121	20/20	20/21.5	18/18.5	14/15
G5-3	14.5/14.5	10.5/12.0	12.8/12.6	10.5/10.5
G5-7	10.5/10.5	11.5/11.5	12.0/11.8	9.5/9.0
G5-5	16.5/16.5	13.5/13.5	15.0/15.0	12.0/12.5
G5-4	12.8/12.8	9.8/9.8	9.5/9.5	10.0/10.0
C2-0071	17.5/17.5	13.0/13.0	15.0/15.0	13.5/13.5
H5-2	15.5/15.5	12.5/12.5	10.8/10.8	11.0/11.0
H5-3	9.5/9.5	8.0/8.0	—	—
L-3-2	15.8/15.8	11.5/11.8	10.2/11.2	12.5/12.5

[0128] 由表6可以看出:各菌株对致病菌金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、变形杆菌都有一定的抑菌性,而菌株C2-0109、C2-0121、C2-0071对致病菌的抑菌性较好,其中以菌株C2-0121最好,比其他几株菌的抑菌性都好,比实验室保存的格式乳杆菌C2-0071的抑菌圈都大,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、变形杆菌的抑菌性分别大14.3%、59.6%、21.7%、7.4%。在下面的实验中挑选性能较好的两株菌C2-0109、C2-0121进行进一步的实验。

[0129] 3.4.4 抗生素的敏感试验

[0130] 将性能较好的菌株C2-0109、C2-0121进行抗生素的敏感实验,结果见表7。

[0131] 表7 两菌株对9种抗生素的敏感试验(抑菌圈直径:mm)

[0132]

	头孢唑林	头孢曲松	新霉素	阿米卡星	林可霉素	强力霉素	氧氟沙星	头孢氨苄	磺胺异恶唑
C2-0121	22	—	17	9	17	20	10	—	—
C2-0109	20	17	8.0	—	14	21.5	12	16.5	—

[0133] 由表7可以看出:菌株C2-0121对头孢曲松、头孢氨苄及磺胺异恶唑不敏感,对其他多种抗生素敏感。

[0134] 3.4.5 生化鉴定试验结果

[0135] 通过碳水化合物发酵产酸试验进行种的鉴定。各种碳水化合物发酵试验的培养基均采用细菌微量生化反应管,发酵结果见表8。

[0136] 表8 糖发酵实验结果

[0137]

菌株	乳糖	半乳糖	纤维糖	水杨酸	麦芽糖	甘露糖	棉籽糖	七叶苷
C2-0121	+	+	+	+	+	+	-	+
C2-0109	+	+	+	+	+	+	+	+

[0138] 试验结果表明,C2-0121与格式乳杆菌的生化特性相一致,依据伯杰氏手册,初步鉴定为格式乳杆菌。

[0139] 3.4.6优势乳杆菌的筛选

[0140] 通过优势乳杆菌的筛选,其中C2-0121菌落变为蓝色,结果见图2,说明能够产过氧化氢。

[0141] 在正常阴道菌群中,乳杆菌占优势,乳杆菌对维持阴道内的正常的菌群起着重要的作用,一方面,乳杆菌能够利用糖原产生乳酸,降低生殖道的pH值,抑制病原菌的生长;另外,乳杆菌还能够产生过氧化氢,细菌素及类细菌素和生物表面活性剂等抑制其他菌和致病微生物的生长,从而维持阴道微生态的平衡;通过以上实验看出:菌株C2-0121产过氧化氢、产酸能力强而且抑菌性比其他菌株都好,因此,这株菌用于女性的生殖道的感染有非常好的作用,对维护阴道微生态平衡有促进作用。

[0142] 3.5分子鉴定结果

[0143] 为确定C2-0121是乳酸菌的种类,进一步做了分子生物学鉴定,将菌株C2-0121进行液体发酵,提取DNA,PCR扩增,16S rDNA的序列测定如SEQ ID NO.1所示,然后同源性比对,构建系统发育树,见图3。

[0144] 通过对菌株C2-0121的16S rDNA的序列测定和同源性比对,发现它与Lactobacillus hominis CRBIP 24.179FR68 1902菌种的16S rDNA有高达99%的同源性,结合形态,将其鉴定为格式乳杆菌(Lactobacillusgasseri),命名为格式乳杆菌(Lactobacillusgasseri)DFNXC2-0121,并于2017年3月31日保藏于中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC),地址为:中国武汉,武汉大学,其保藏编号为CCTCC NO:M 2017162。

[0145] 3.6菌株发酵生长曲线的绘制

[0146] 菌株接种后在不同时间段分别取样,检测在波长600nm处测定其OD值及pH,以培养时间为横坐标,相应的OD值与pH值为纵坐标,绘制生长曲线见图4。

[0147] 由图4看出:菌株C2-0121在8h左右进入对数生长期,此时菌株生长最快,此时pH下降也最快由6.5下降到5.3,至16h时,OD₆₀₀达到最大,此时pH为3.99,通过平板计数得知此时活菌数达 13.5×10^8 cfu/mL,16h后进入稳定期。

[0148] 实施例2:益生菌代谢物组合物的制备

[0149] (1) 乳酸菌种子液的制备:取出菌种保藏管,用乳酸菌斜面固体培养基分别划线进行复苏,37℃培养24-36h。挑取斜面培养基上的菌落结晶紫染色镜检,为短杆菌或长杆菌。挑取菌落接种100mL乳酸菌培养基中,在37℃培养箱中培养24h。种子采用2%-5%的接种量,接种至3L大三角瓶中,37℃培养24h-36h,检测其菌液浓度,植物乳杆菌(保藏编号为CCTCC M 2010150)的菌含量超过10亿/毫升和菌株C2-0121的菌含量超过2亿/毫升,即可作为乳杆菌液体菌种接种。

[0150] (2) 将活化后的菌株接种于MRS培养基中进行培养,发酵培养至格式乳杆菌发酵培

养物的菌体浓度达到 1.0×10^8 – 10.0×10^8 cfu/mL,保藏编号为CCTCC M 2010150的植物乳杆菌发酵培养物的菌体浓度达到 8.0×10^8 – 20.0×10^8 cfu/mL。

[0151] 所述的MRS培养基:葡萄糖2.0%、柠檬酸铵0.2%、乙酸钠0.5%、磷酸氢二钾0.5%、硫酸锰0.02%、硫酸镁0.05%、蛋白胨1.0%、牛肉膏1.0%、酵母膏0.5%、吐温80 0.1%,调节pH至6.0;固体培养基加1.5%琼脂粉。培养基灭菌条件为:0.10–0.15MPa,121℃灭菌20min。

[0152] (3) 分别计数,将步骤(2)的发酵培养物用生理盐水稀释至其活菌数皆为 1×10^7 cfu/mL;取同体积的菌液混合备用。

[0153] 实施例3:中药提取物的制备

[0154] 将黄芩35份、苦参30份、黄柏8份、地肤子6份、桑叶8份混合,将混合物置于10倍水中浸泡40–60min,煎煮,水开后继续煎煮50–60min,过滤得到第一滤液;药渣用8倍水进行二次煎煮,水开后继续煎煮30–40min,过滤得到第二滤液与第一滤液混合均匀,通过真空减压旋转蒸发仪浓缩中药液,至中药液的密度为1.1g/mL–1.2g/mL,静止过夜,3000转离心10min,收集上清液,备用。

[0155] 实施例4:中药益生菌制剂的制备

[0156] 将实施例2制备的益生菌代谢物组合物40份和实施例3制备的中药提取物45份混合均匀,即制备得到中药益生菌制剂。

[0157] 实施例5:治疗阴道炎的凝胶剂的制备

[0158] 称取卡波姆942 2.5g,量取实施例4制备的中药益生菌制剂850mL,加入到盛有卡波姆的容器中,过夜,搅匀,直至细腻均匀无颗粒,用质量浓度为10%的氢氧化钠调节pH值至5.0,加入甘油5g及薄荷油0.2g,加水至1000g搅匀,即得。

[0159] 应用例1:益生菌的体外抑菌实验

[0160] 1. 试验材料:

[0161] 1.1 供试菌株:植物乳杆菌BLCC2-0001(保藏编号为CCTCC M 2010150)、格式乳杆菌DFNXC2-0121(实施例1筛选得到)。

[0162] 1.2 指示菌:白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、卷曲乳杆菌BLCC2-0109,嗜酸乳杆菌1.2467、干酪乳杆菌1.0062,各指示菌均为市售产品。

[0163] 2. 方法与结果:

[0164] 牛津杯法

[0165] 取菌株植物乳杆菌BLCC2-0001、格式乳杆菌DFNXC2-0121的发酵液10000rpm离心10min,取上清液,进行抑菌性试验;选取的指示菌分别为白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、卷曲乳杆菌BLCC2-0109,嗜酸乳杆菌1.2467、干酪乳杆菌1.0062。试验结果见表9。

[0166] 表9 菌株对各指示菌的抑菌圈的直径(单位:mm)

[0167]

菌株 Strains	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	白色念珠菌	BLCC2-0109	1.2467 (嗜酸)	1.0062 (干酪)
BLCC2-0001	18.6±0.5	16.5±0.3	18.2±0.3	—	—	—	—
DFNXC2-0121	20.5±1.6	19.5±0.6	17.5±0.6	—	—	—	—

[0168] 注:—表示没有明显的抑菌圈。

[0169] 试验结果表明:菌株BLCC2-0001、DFNXC2-0121对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌都有较强的抑菌性,对干酪乳杆菌1.0062、嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌BLCC2-0109无抑菌性。因此,此菌株是选择性抑制致病菌大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌较强的菌株。

[0170] 应用例2:中药提取物的体外抑菌实验

[0171] 1. 试验材料:

[0172] 1.1 供试中药:实施例3制备的中药提取物

[0173] 1.2 指示菌:白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、卷曲乳杆菌BLCC2-0109,嗜酸乳杆菌1.2467、干酪乳杆菌1.0062,各指示菌均为市售产品。

[0174] 2. 方法与结果

[0175] 2.1 方法:牛津杯法

[0176] 2.2 结果:中药提取物对各指示菌的抑菌性结果,见表10。

[0177] 表10:中药提取物对各指示菌的抑菌性结果

[0178]

指示菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	白色念珠菌	BLCC2-0109	1.2467 (嗜酸)	1.0062 (干酪)
中药	—	26.5±0.3	—	29.5±1.5	—	—	—

[0179] 由实验结果看出:中药对金黄色葡萄球菌及白色念珠菌具有很强的抑菌性,而对大肠杆菌及沙门杀菌则无抑菌性,对乳酸菌同样也没有抑菌性。

[0180] 应用例3:中药益生菌制剂的体外抑菌实验

[0181] 1. 试验材料:

[0182] 1.1 供试中药:实施例4制备的中药益生菌制剂

[0183] 1.2 指示菌:白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、卷曲乳杆菌BLCC2-0109,嗜酸乳杆菌1.2467、干酪乳杆菌1.0062,各指示菌均为市售产品。

[0184] 2. 方法与结果

[0185] 2.1 方法:牛津杯法

[0186] 2.2 结果:中药益生菌制剂对各指示菌的抑菌性结果,见表11。

[0187] 表11 中药益生菌制剂对各株菌的抑菌结果

[0188]

大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	白色念珠菌	1.2467 (嗜酸)	1.0062 (干酪)	BLCC2 -0109
12.6±0.5	23.5±0.3	14.2±0.3	26.8±0.8	—	—	—

[0189] 由表11可以看出:中药和乳杆菌发酵液混合后对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及白色念珠菌、沙门氏菌都有很强的抑菌性,但是对乳杆菌仍然没有抑菌性,说明混合后扩大了抑菌谱,二者具有协同性,抑菌效果更加广谱。

[0190] 应用例4:家兔阴道刺激试验(依据2002消毒产品检验技术规范-阴道黏膜刺激试验)

[0191] 1. 试验动物:选用健康、初成年的非动情期的雌性白色家兔,比利时兔,体重2.5kg。试验前检查动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其它损伤情况。如有炎症或(和)损伤,应弃用。

[0192] 2. 试验分组:分为染毒组、阴性对照组和阳性对照组,每组3只。其中,染毒组采用本发明实施例5制备的凝胶剂,阴性对照组灌入生理盐水,阳性对照组灌入市售产品吉林一正药业集团生物科技有限公司的抑菌凝胶

[0193] 3. 试验操作方法

[0194] 3.1将长度为8cm左右的钝头软管与5mL的注射器连接。注射器和导管注满受试液备用。每只动物各准备一套。

[0195] 3.2黏膜刺激试验的染毒方法:将动物仰面固定,将导管用受试液或对照液湿润后轻柔地插入阴道(4cm-5cm),并用注射器缓慢注入2mL受试液,抽出导管,完成染毒。阴性对照组动物用生理盐水作同样处理。

[0196] 3.3多次阴道黏膜刺激试验的染毒方法:按上述3.2染毒方法,每隔24h重复染毒一次,连续5d。阴性对照组动物用生理盐水作同样处理,阳性对照用市售产品吉林一正药业集团生物科技有限公司的抑菌凝胶

[0197] 3.4受试液注入后可能有溢出,可用消毒棉或软纸拭去。

[0198] 3.5末次染毒后24h,采用气栓法处死动物,剖腹取出完整的阴道,纵向切开,肉眼观察是否有充血、水肿等表现,供病理取材时参考。然后将阴道放入10%福尔马林溶液中固定24h以上,选取阴道的两端和中央3个部位的组织制片,HE染色后,进行组织病理学检查。

[0199] 4结果评价

[0200] 组织病理学检查结果,按表12定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。将试验组3只动物3个部位的刺激反应积分相加后,再除以观察总数(动物数×3),得出试验组阴道黏膜刺激反应的平均积分,最大记分为16(见表12)。对照组评分方法同上。将试验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数后,按表13进行刺激强度分级。

[0201] 4.1阴道黏膜刺激反应评分标准见表12。

[0202] 表12 阴道黏膜刺激反应评分标准

	阴道组织反应	反应评分
[0203]	A. 上皮组织	
	正常, 完好无损	0
	细胞变性或变扁平	1
	组织变形	2
	局部糜烂	3
	广泛糜烂	4
	B. 白细胞浸润 (每个高倍视野)	
	无	0
	极少 <25 个	1
	轻度 26-50 个	2
	中度 51-100 个	3
	重度 >100 个	4
[0204]	C. 血管充血	
	无	0
	极少	1
	轻度	2
	中度	3
	重度伴血管破裂	4
	D. 水肿	
	无	0
	极少	1
	轻度	2
	中度	3
	重度	4

[0205] 刺激反应积分 = A+B+C+D.

[0206] 表13 阴道黏膜刺激强度分级

	阴道黏膜刺激指数	阴道黏膜刺激反应强度
	<1	无
[0207]	1~<5	极轻
	5~<9	轻度
	9~<12	中度
	≥12	重度

[0208] 4.2各试验组阴道组织图片及HE染色切片图

[0209] 阴性对照组阴道上皮完整,无细胞坏死、脱落及炎症细胞浸润,染毒组及阳性对照组也是同样的,结果见图5a-图5c。

[0210] 4.3各试验组阴道黏膜刺激得分 结果见表14。

[0211] 表14 各试验组阴道黏膜刺激指数

[0212]

	阴性对照组	染毒组	阳性对照组（一正凝胶）
上皮组织	0	0	0
白细胞浸润	0	0	0
血管充血	4	3	4
水肿	0	0	0

[0213]

平均得分	1.2	1.0	1.7
阴道黏膜刺激指数		<1	<1

[0214] 试验结果表明：试验干预组的阴道黏膜刺激指数<1，根据阴道黏膜刺激强度分级标准可知，试验组对家兔阴道黏膜无刺激性，由阴道组织图片及HE染色切片也可以看出，阴道无充血、水肿及炎性细胞，阴道黏膜完整、无细胞坏死、脱落现象。

[0215] 应用例5：益生菌和中药组合物对家兔阴道炎的抑制作用研究

[0216] 1. 材料与方法

[0217] 1.1 实验材料

[0218] 1.1.1 试验动物 健康雌性家兔，体重为3.0kg，以生产2次以上，由道朗镇鱼池村庞性养殖户提供，共30只。

[0219] 1.1.2 药物及试剂 盐酸林可霉素（购于泰安市同仁堂大药房），白色念珠菌CMCC (F) 98001（购于中国药品生物制品鉴定所），一正抑菌凝胶（购于泰安市万宁大药房）武汉新生态生物工程有限公司生产

[0220] 1.1.3 培养基 选择性培养基：EMB, LBS, TSA, CQ, MRS, 均购于青岛海波生物技术有限公司。

[0221] 1.2 实验方法

[0222] 将家兔先分为两组，A组正常对照组5只，B组模型组25只，预饲3天后，随机取阴道分泌物镜检并计数大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、乳酸菌数。A组外阴部消毒后用18号大鼠灌胃器注入生理盐水1mL，灌注11天后，气栓法杀死家兔，取阴道组织10%甲醛固定制片，HE染色后，进行病理学检查评分、分级。B组灌注盐酸林可霉素注射液1mL，每天1次，灌注5天，恢复1天，然后用白色念珠菌活菌数 1.5×10^7 cfu/mL灌注0.5mL，每天1次，4天后，随机取阴道分泌物镜检并计数大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、白色念珠菌和乳酸菌数，确定造模成功后，模型组家兔气栓法杀死家兔5只，取阴道组织10%甲醛固定制片，HE染色后，进行病理学检查并参照表评分。然后家兔重新分组，分为5组，B1组为自然恢复组，B2组为混合（中药和益生菌）治疗组，B3组为中药组，B4组为益生菌组、B5组阳性对照组，每组5只，开始治疗。B1组灌注不含任何药物的空白凝胶1.5g/只，B2组灌注实施例5的凝胶剂1.5g/只，B3组为实施例3的中药液1.5mL，B4实施例2的益生菌液1.5mL，B5组一正抑菌凝胶1.5g/只，治疗期间每天称取饲料重量，治疗6天后，全部取阴道分泌物镜检并计数大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、白色念珠菌和乳酸菌数，7天后气栓法杀死家兔，取阴道组织10%甲醛固定制片，HE染色后，进行病理学检查并参照表4、表5评分、分级。

[0223] 2 结果与分析

[0224] 2.1 试验期间各试验组家兔的体征变化

[0225] 2.1.1 造模期间家兔的体征变化

[0226] 预饲5天后,模型组家兔被毛洁白光滑,饮食正常,精神良好。用抗生素之后,精神沉郁,食量下降,匍匐状,轻微拉稀,3只死亡,白色念珠菌攻毒后,精神沉郁,不思饮食,匍匐状,拉稀,有1只死亡。

[0227] 2.1.2 造模期间家兔阴道分泌物菌群变化 结果见图6。由图6可以看出:家兔正常情况下,阴道中有大量的菌株,其中以乳酸杆菌为主要优,数量较多;在使用抗生素之后,各种菌都大量减少,而攻毒之后,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及白色念珠菌等致病菌繁殖增多,为主要菌株,而乳酸杆菌相应的减少,这说明家兔阴道炎的模型的建立成功。

[0228] 图7a为正常组阴道分泌物镜检图片,可见有大量的杆菌,图7b为灌注抗生素后阴道分泌物镜检图片,菌群数量很少;图7c为攻毒之后的镜检图片,有大量的白色念珠菌、滴虫、球菌等致病菌,这也说明模型建立成功。

[0229] 2.2 治疗后各项指标

[0230] 2.2.1 造模后治疗期间各组家兔的体征变化:结果见表15。

[0231] 表15 造模后治疗期间各组家兔的体征变化

[0232]

时间 (天)	自然恢复组	混合治疗组	阳性对照组	中药组	益生菌组
第1天	不饮食,精神沉郁	饮食饮水,精神沉郁	饮食饮水,精神沉郁	饮食饮水,精神沉郁	饮食饮水,精神沉郁
第2天	不饮食,精神沉郁	饮食饮水增多	饮水增多,食量少,	饮食饮水增多	饮食饮水增多
第3天	饮食饮水,精神沉郁	被毛光滑,正常饮食,	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑,正常饮食,	被毛光滑,正常饮食,
第4天	饮水饮食,精神好转	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑正常饮食	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑,正常饮食
第5~7天	正常饮食,精神正常	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑,正常饮食	被毛光滑,正常饮食

[0233] 2.2.2 治疗7天后家兔的饮食变化趋势 结果见图8。

[0234] 试验结果表明:第一天治疗组饮食量最多、自然恢复组最少,但是,随着时间的延长自然恢复组饮食量是逐渐增多的,混合治疗组、中药组、益生菌组及对照组饮食量一直处于较高水平,混合治疗组最高,说明混合治疗组对家兔的肠胃刺激最小。

[0235] 2.2.3 治疗期间家兔阴道分泌物菌群变化 结果见图9,由图9看出:正常组的乳酸菌最高,为优势菌;混合治疗组治疗后乳酸菌大幅度的升高为优势菌,跟正常组的相比无显著性差异,益生菌组、中药组、阳性对照组与自然恢复组比较其乳杆菌数量有所增多,但是与混合组比较都少于混合组的乳杆菌数量,而自然恢复组乳酸菌数量最少,仍处于弱势,因此,炎症未消失,由此看出,混合治疗组(中药与益生菌)治疗后,乳酸菌数量大幅度的提高,处于优势地位,恢复至正常水平,说明组合物对患有阴道炎的实验家兔具有非常显著的治疗作用。

[0236] 2.3 家兔各试验组阴道分泌物镜检涂片 结果见图10a-图10e。

[0237] 自然恢复组(图10a)可见有极少量杆菌,而混合治疗组(图10b)有大量的杆菌,阳性对照组(图10c)有大量的杆菌但也有白色念珠菌,中药组(图10d)菌群数量较少,益生菌组(图10e)虽有乳杆菌但是致病菌也较多,特别是白色念珠菌,各组比较,说明实施例4制备的中药益生菌制剂对混合感染引起阴道炎治疗具有很好的抑制病原菌作用的。

[0238] 2.4造模期间阴道组织切片,见图11a至图11f。

[0239] 由图11a可以看出,正常对照组阴道皱褶清晰完整,粘膜的上皮细胞无病变及坏死现象;模型组(图11b)阴道皱褶浅,粘膜上层组织不完整,肌层溃烂,萎缩,细胞脱落、坏死;混合治疗组(图11c)阴道皱褶深而多,粘膜的上层黏膜细胞比较完整清晰,无脱落、坏死现象。中药组(图11d)、益生菌组(图11e)、阳性对照组(图11f)都有清晰可见的阴道皱褶、黏膜上层完整,无溃疡面、上皮脱落现象,说明混合治疗组、中药组、益生菌组及阳性对照组对阴道炎的实验家兔都有治疗作用,而混合治疗组与中药组、益生菌组比较,阴道壁皱褶多而深,黏膜上层完整,说明益生菌与中药组合物比单一的中药或者益生菌对阴道炎的实验家兔治疗效果显著。混合治疗组既包括中药的清热解毒、抑菌,对金黄色葡萄球菌及白色念珠菌的进行抑制,添加益生菌,既能补充乳杆菌定值于阴道产生抑菌素、有机酸及过氧化氢等抑制病原菌的生长,能够促进阴道微生态的平衡,快速修复阴道的黏膜,因此,中药与益生菌组合物对阴道炎的实验家兔有很好的治疗作用。

[0240] 3结论

[0241] 3.1用盐酸林可霉素注射液1mL,每天灌注1次,共5天,恢复1天,然后用白色念珠菌活菌数 1.5×10^7 cfu/mL灌注0.5mL,每天1次,灌注4天,通过镜检阴道分泌物、阴道黏膜刺激指数可以看出模型成立。

[0242] 3.2用实施例4制备的中药益生菌制剂灌注,1.5g/只,治疗6天后,通过镜检阴道分泌物中的菌群、查看阴道病变情况、以及阴道组织切片都可以看出:模型组阴道严重充血,上皮细胞不完整,黏膜层出现病变、脱落等现象,而用实施例4制备的中药益生菌制剂灌注的治疗组、阳性对照组与正常组的阴道上皮组织完整,黏膜光滑,无病变等现象;总结以上实验说明:益生菌代谢物与中药组合物安全无刺激,不影响其饮食;对引起阴道炎的致病菌有很好的抑制作用,促进患有阴道炎的实验家兔阴道中的菌群恢复,并且能够快速的修复受损的阴道黏膜。

[0243] 应用例6:临床实验

[0244] (一)阴道炎及宫颈炎

[0245] 1材料

[0246] 1.1受试样品:将实施例5制备的凝胶剂,为棕褐色或深褐色的凝胶。推荐用量3g/人、天,推注,6天为一个疗程。

[0247] 1.2受试人群

[0248] 受试者纳入标准:阴道炎(细菌性阴道炎、霉菌性阴道炎及滴虫性阴道炎)160例,宫颈炎160例,年龄18岁~65岁,均有性生活史。非月经期;临床症状符合临床上细菌性阴道炎的诊断标准,患者排除有重大精神疾病的患者,1W内禁性生活;试验前1W内未使用其药及阴道清洁剂,或使用其他药物无效。

[0249] 1.3治疗方法

[0250] 对照组80例患者采取甲硝唑400mg,每天2次,口服7天,观察组80例患者采用实施

例的凝胶剂,每天1次,每次3g,患者清洗外阴后,每天晚上推入3g凝胶,两组患者连续用药1周后观察临床效果。

[0251] 1.4观察指标

[0252] 疗效分为三个指标,A治愈:患者的临床症状消失,检测结果为阴性;B有效:患者的临床症状基本得到改善,检测结果为阴性;C无效:患者的临床症状没有改善或者病情加重,在治疗3个月后有复发的现象。总有效率=(治愈+有效)/总病例×100%

[0253] 1.5统计学方法

[0254] 统计软件用SPSS16.0处理数据, $p<0.05$ 说明具有显著性差异。

[0255] 2结果

[0256] 2.1两组患者治疗效果综合比较

[0257] 观察80例患者在治疗后,治疗总有效率明显高于对照组,对比两组患者的治疗总有效率,具有显著性差异, $P<0.05$ 有统计学意义,细菌性阴道炎详见下表16,宫颈炎见表17

[0258] 表16 阴道炎两组患者药物治疗效果比较分析(%)

[0259]

组别	例数	治愈	有效	无效	总有效率
----	----	----	----	----	------

[0260]

观察组	80	68(85%)	8 (10%)	4 (5%)	95%
对照组	80	56 (70%)	12 (15%)	12 (15%)	85%
P	-	-	<0.05	<0.05	

[0261] 两组有效率(治愈+好转)经统计学比较。 $P<0.05$,差异有统计学意义

[0262] 表17 宫颈炎两组患者药物治疗效果比较分析(%)

[0263]

组别	例数	治愈	有效	无效	总有效率
观察组	80	60 (75%)	14 (17.5%)	6 (7.5%)	92.5%
对照组	80	52 (65%)	16 (20%)	12 (15%)	88%
P	-	-	<0.05	<0.05	

[0264] 2.2两组患者的复发率比较

[0265] 观察组80例患者经过治疗后,临床复发率显著低于对照组,两组患者复发率差异显著 $P<0.05$,有统计学意义。

[0266] 表18 两组阴道炎患者复发率比较(%)

[0267]

组别	例数	复发人数	复发率
观察组	80	2	2.5%
对照组	80	12	15%
P	-	<0.05	<0.05

[0268] 表19 两组宫颈炎患者复发率比较(%)

[0269]

组别	例数	复发人数	复发率
观察组	80	4	5%
对照组	80	15	18.8%
P	-	<0.05	<0.05

[0270] 由表18、表19可以看出：益生菌与中药组合物在治疗不同病原菌引起的阴道炎及宫颈炎方面与甲硝唑比较，治愈率高，复发率低。

[0271] (二)附件炎、盆腔炎及盆腔积液

[0272] 附件炎8例：小腹坠胀疼痛，左侧按压痛，伴有白带增多异味、腰疼、月经失调等症状。使用实施例5制成的凝胶一个疗程后，排除很多的灰白色及脓性分泌物，疼痛减轻，异味消失；使用发明的产品2周后，排出带有黑褐色血块，疼痛消失。复检6例痊愈。

[0273] 盆腔炎并带有盆腔积液12例：医院检查患有盆腔炎并伴有盆腔积液，下腹部疼痛并发烧、腹部按压痛，腰骶部酸痛，使用实施例5制成的凝胶2天后，开始排出脓性分泌物及水样物，6天后，分泌物增加，不再发烧，使用12天后，腰痛减轻，次月再次使用12天后，疼痛消失，确诊痊愈9例。

[0274] 3. 结论

[0275] 在本次实验中，用中药来清热排毒，消炎祛湿，止痒祛除异味等作用，而用益生菌在抑制致病菌的同时，并能够定植于生殖道中繁殖生长，其代谢产物乳酸和过氧化氢等物质能保持生殖道正常酸性环境，抑制并消除致病菌的生长。从而调节并恢复生殖道的微生态平衡。因此，对妇科炎症方面的疾病有很好的治疗效果，并且复发率低。

[0276] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已，并不用于限制本申请，对于本领域的技术人员来说，本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本申请的保护范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 泰安大凡神农制药有限公司	
[0003]	<120> 具有抑菌作用的格式乳杆菌与中药复方及其在治疗妇科炎症中的应用	
[0004]	<130> 2017	
[0005]	<160> 1	
[0006]	<170> PatentIn version 3.5	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 1442	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 菌株C2-0121	
[0011]	<400> 1	
[0012]	gcaagtcgag cgagcttgcc tagatgaatt tgggtgcttgc accaaatgaa actagataca	60
[0013]	agcgagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc ccaagagact gggataacac	120
[0014]	ctggaaacag atgctaatac cggataacaa cactagacgc atgtctagag tttaaaagat	180
[0015]	ggtttctgcta tcaactcttg atggacctgc ggtgcattag ctagttaggta aggtaacggc	240
[0016]	ttaccaaggc aatgatgcat agccgagttg agagactgat cggccacatt gggactgaga	300
[0017]	cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgcaagtct	360
[0018]	gatggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc gtaaagctct gttggtagtg	420
[0019]	aagaaagata gaggtagtaa ctggccttta tttgacggta attacttaga aagtcacggc	480
[0020]	taactacgtg ccagcagccg cggtataacg taggtggcaa gcgttgctccg gatttattgg	540
[0021]	gcgtaaagcg agtgcaggcg gttcaataag tctgatgtga aagccttcgg ctcaaccgga	600
[0022]	gaattgcatc agaaactggt gaacttgagt gcagaagagg agagtggaaac tccatgtgta	660
[0023]	gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg aaggcggctc tctggtctgc	720
[0024]	aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca	780
[0025]	tgccgtaaac gatgagtgt aagtgttggg aggtttccgc ctctcagtgc tgcagctaac	840
[0026]	gcattaagca ctccgcctgg ggagtacgac cgcaaggttg aaactcaaag gaattgacgg	900
[0027]	gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca	960
[0028]	ggtcttgaca tccagtgcaa acctaagaga ttaggtgttc ccttcgggga cgctgagaca	1020
[0029]	ggtggtgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag	1080
[0030]	cgcaaccctt gtcattagtt gccatcatta agttgggac tctaatagaga ctgccggtga	1140
[0031]	caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcatcatgc cccttatgac ctgggctaca	1200
[0032]	cacgtgctac aatggacggt acaacgagaa gcgaacctgc gaaggcaagc ggatctctga	1260
[0033]	aagcgttct cagtccggac tgtaggctgc aactcgctta cacgaagctg gaatcgctag	1320
[0034]	taatcgcgga tcagcacgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtaac accgcccgtc	1380
[0035]	acacatgag agtctgtaac acccaaagcc ggtgggataa cctttatagg agtcagccgt	1440
[0036]	ct	1442

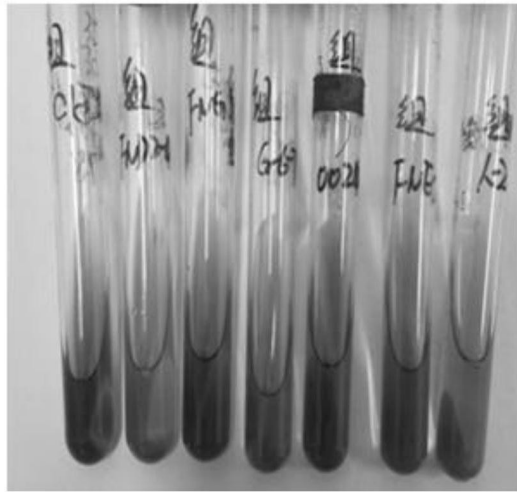


图1A

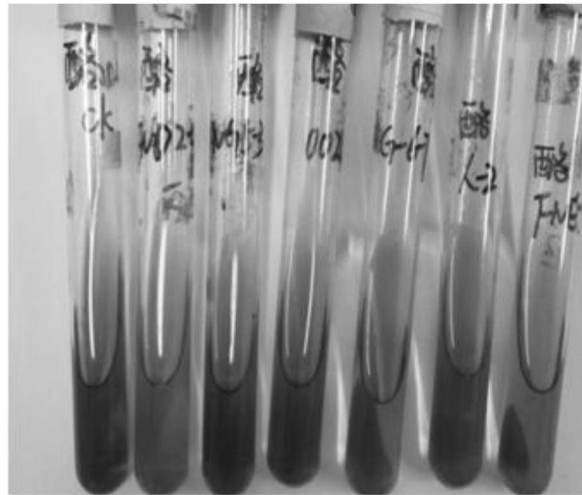


图1B

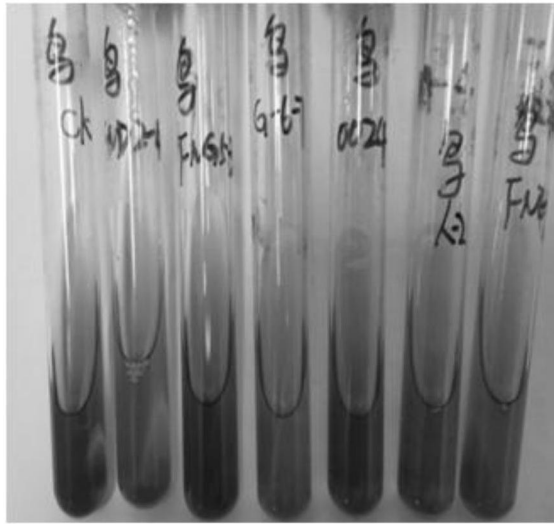


图1C

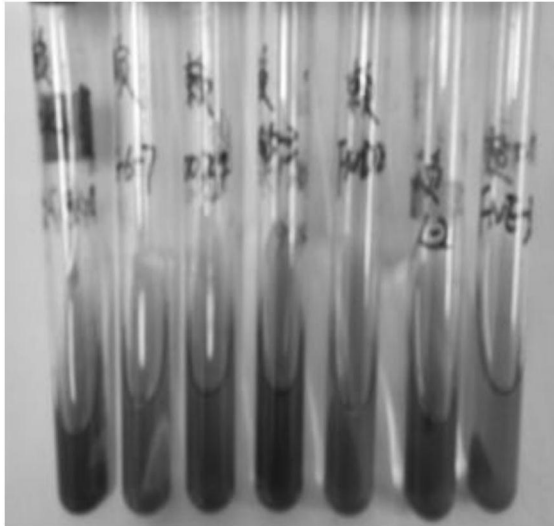


图1D

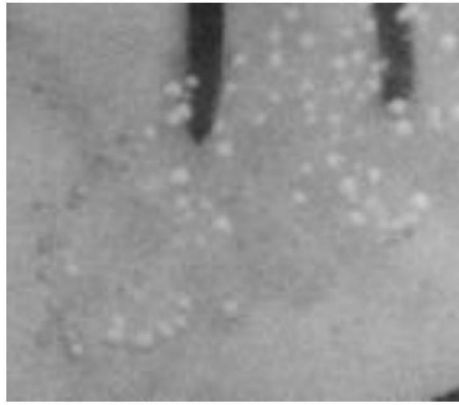


图2

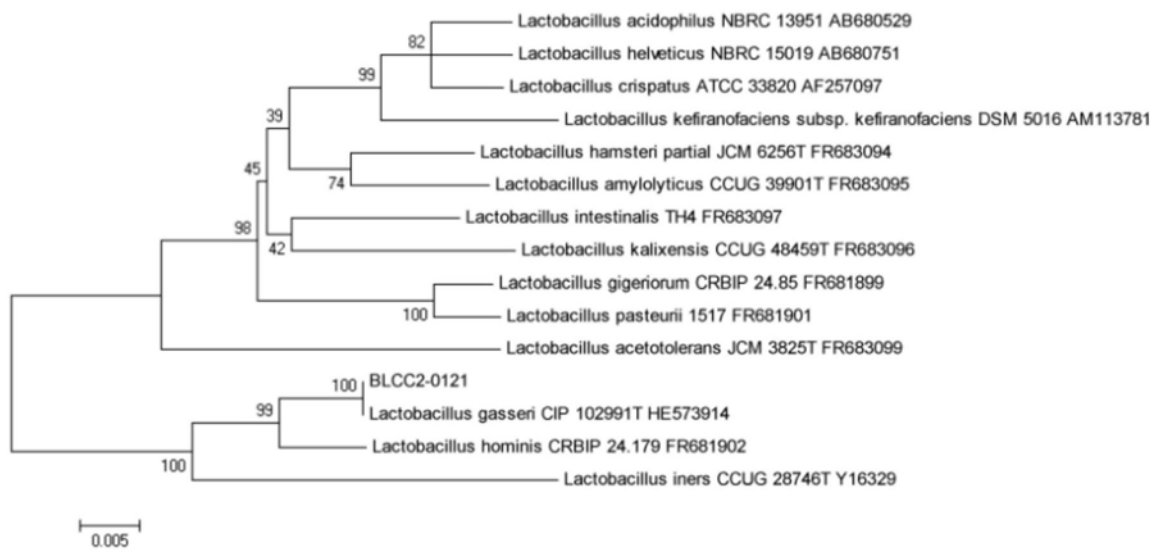


图3

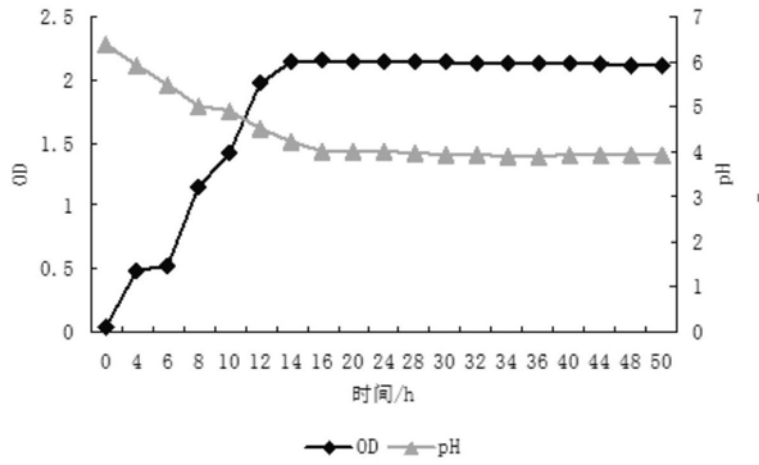


图4

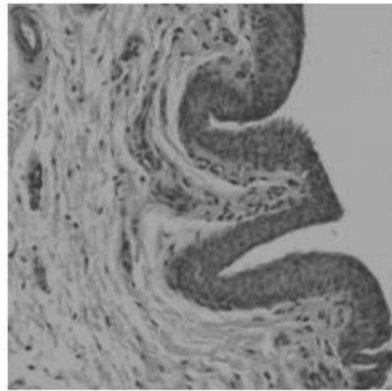


图5a

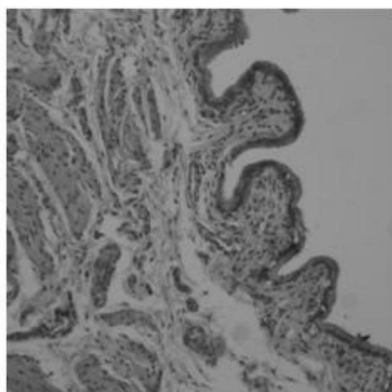


图5b

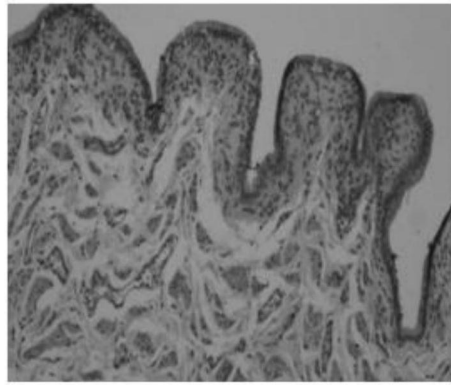


图5c

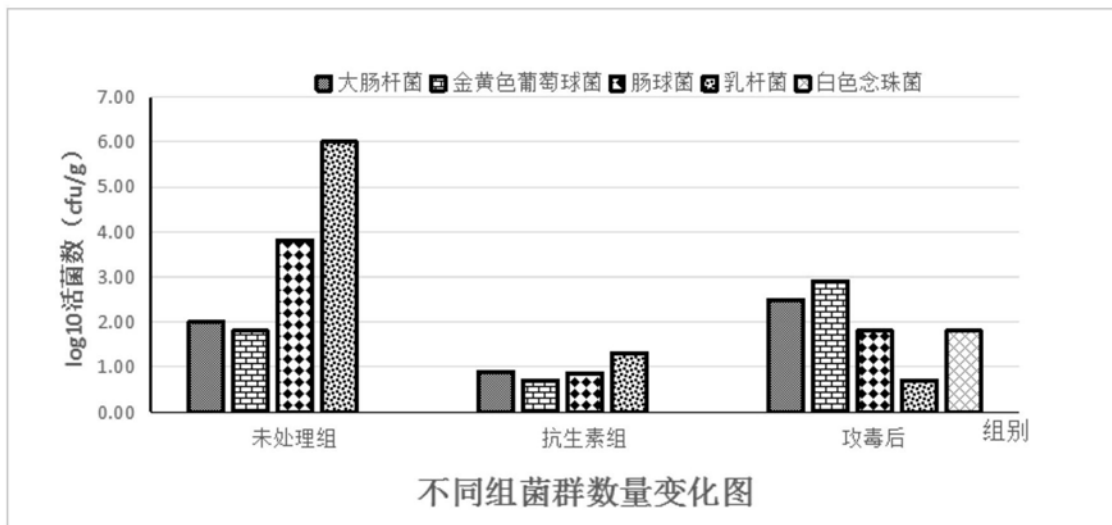


图6

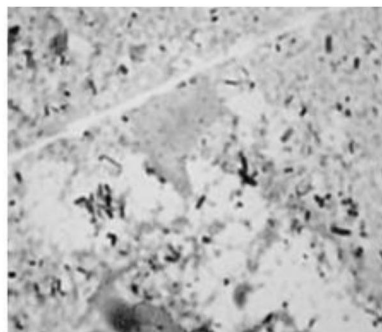


图7a

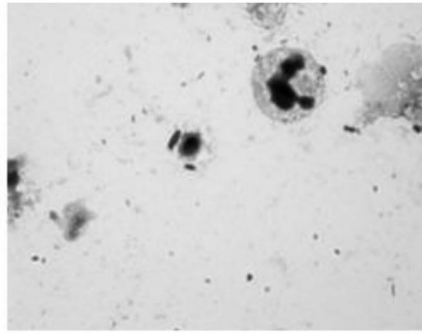


图7b

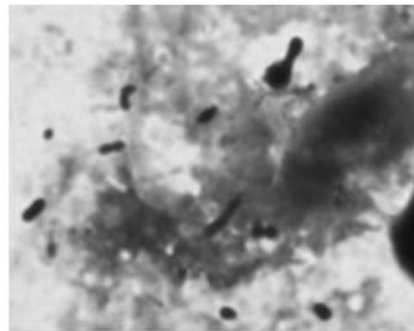


图7c

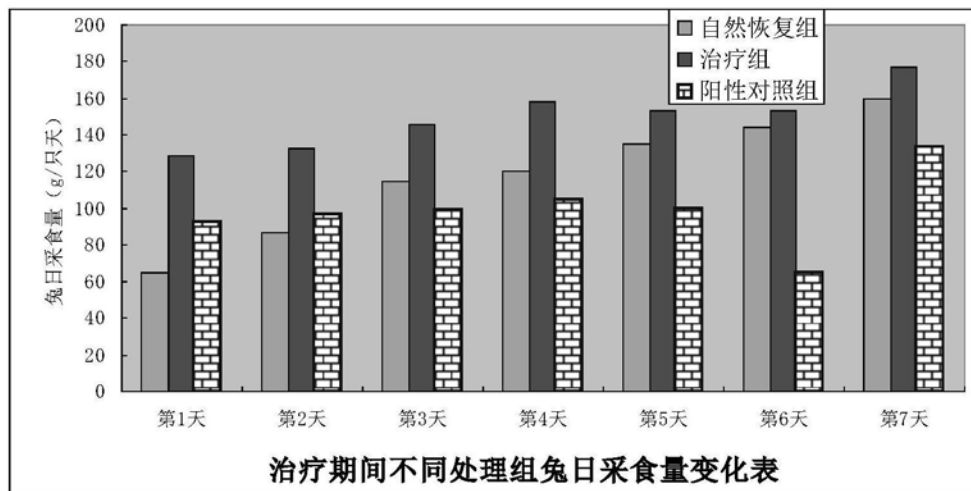


图8

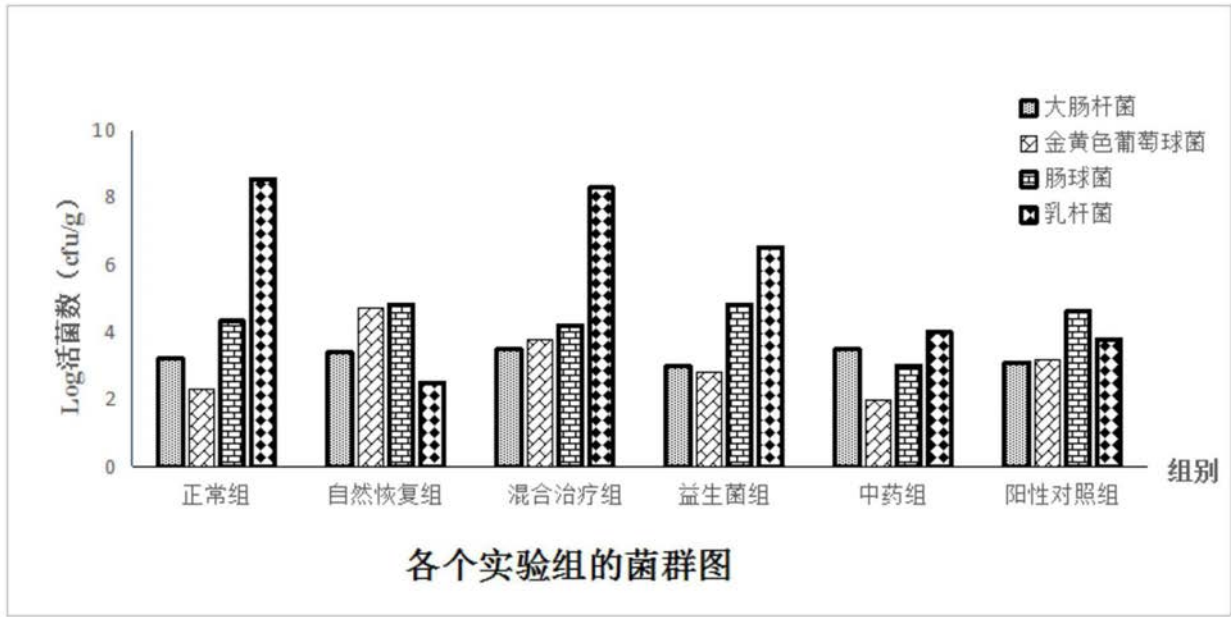


图9

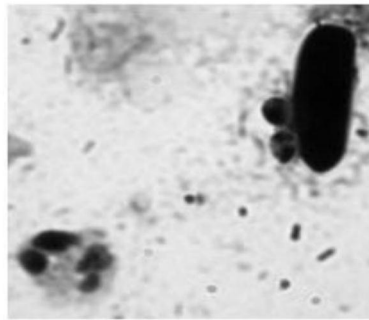


图10a

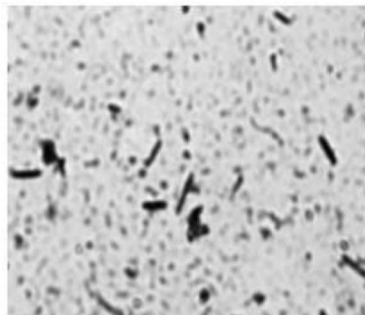


图10b

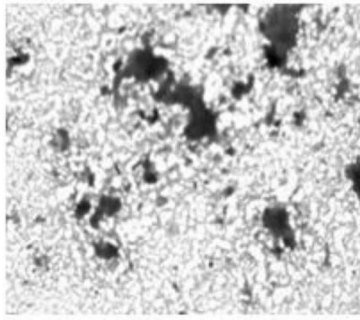


图10c



图10d

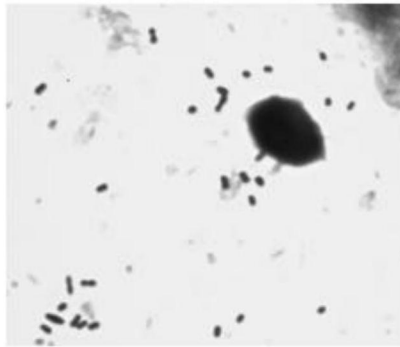


图10e

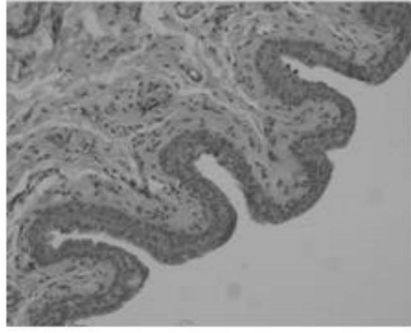


图11a

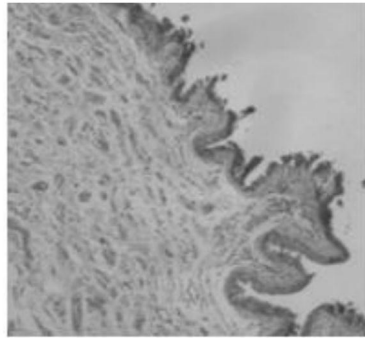


图11b

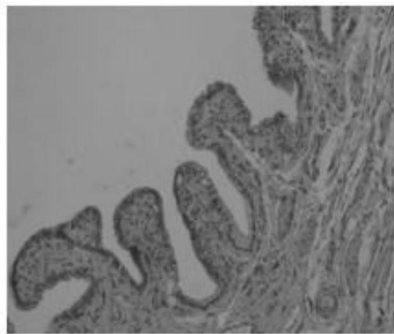


图11c

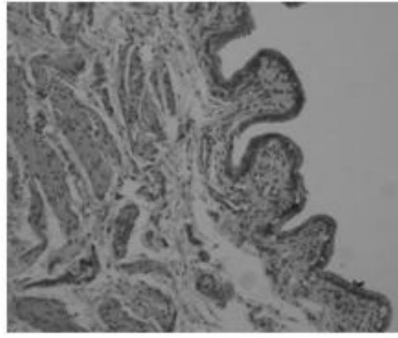


图11d

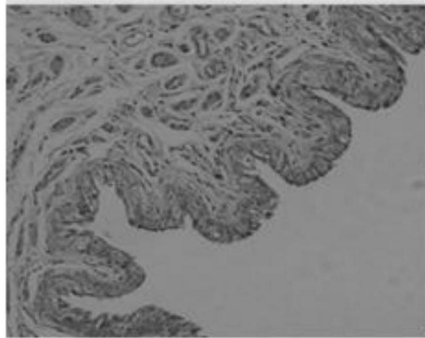


图11e

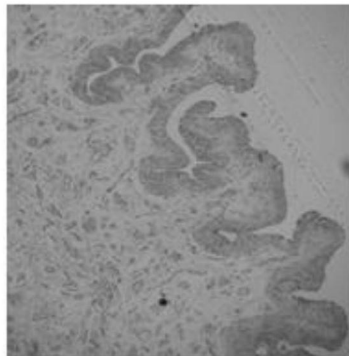


图11f