

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2020/259564 A1

(43) 国际公布日

2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020)

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) A23L 19/20 (2016.01)

A23C 9/123 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/098036

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 24 日 (24.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910574811.5 2019年6月28日 (28.06.2019) CN

201910575996.1 2019年6月28日 (28.06.2019) CN

201910575089.7 2019年6月28日 (28.06.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 王刚(WANG, Gang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。陈卫(CHEN, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。梁席(LIANG, Xi); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。孔庆敏(KONG, Qingmin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。翟齐啸(ZHAI, Qixiao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。陆文伟(LU, Wenwei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

214122 (CN)。崔树茂(CUI, Shumao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。杨波(YANG, Bo); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。毛丙永(MAO, Bingyong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。赵建新(ZHAO, Jianxin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。张灏(ZHANG, Hao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL LACTOBACILLUS CAPABLE OF RELIEVING PFOA TOXIC EFFECTS AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 缓解PFOA毒害作用的多功能乳酸菌及其应用

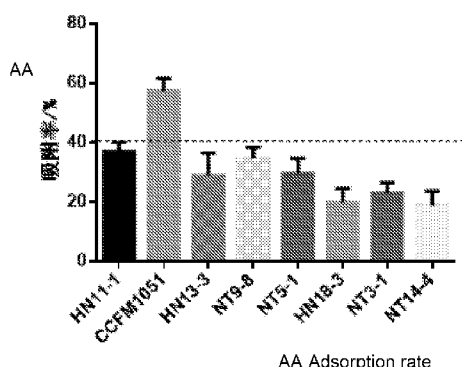


图 1

(57) Abstract: A multifunctional lactobacillus capable of relieving the toxic effects of PFOA and an application thereof, which belong to the technical field of microbiology. Lactobacillus fermentum CCFM1051, Lactobacillus casei CCFM1052 and Lactobacillus brucei CCFM1053 have a high adsorption effect on PFOA, and may: significantly relieve liver oxidative stress damage and serum biochemical indicators caused by PFOA; improve spleen atrophy caused by PFOA exposure; improve the imbalance of intestinal microbes caused by PFOA exposure; improve the metabolic disorder of intestinal flora caused by PFOA exposure; significantly increase the content of acetic acid and propionic acid in the intestines; increase the fecal water content and the time of first black stool in constipated mice; and increase the proliferation of INS-1 cells and expression of MafA gene under the action of high glucose. Lactobacillus fermentum CCFM1051, Lactobacillus casei CCFM1052 and Lactobacillus brucei CCFM1053 have the potential to alleviate PFOA-related diabetes, and reduce the occurrence of liver diseases, metabolic diseases and potential carcinogenicity.

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(57) 摘要: 一种缓解PFOA毒害作用的多功能乳杆菌及其应用, 属于微生物技术领域。发酵乳杆菌CCFM1051、干酪乳杆菌CCFM1052、布氏乳杆菌CCFM1053对PFOA具有高吸附作用, 能够显著缓解PFOA造成的肝脏氧化应激损伤和血清生化指标, 改善PFOA暴露造成的脾脏萎缩, 改善因PFOA暴露导致的肠道内微生物的失调, 改善因PFOA暴露造成的肠道菌群代谢紊乱, 显著提高了肠道中乙酸和丙酸的含量, 提高便秘小鼠的粪便含水量和首粒黑便时间, 提高高糖作用下INS-1细胞的增殖和MafA基因的表达, 具有缓解PFOA相关糖尿病的潜力, 减少肝病、代谢类疾病和潜在的致癌性的发生。

缓解 PFOA 毒害作用的多功能乳杆菌及其应用

技术领域

本发明涉及缓解 PFOA 毒害作用的多功能乳杆菌及其应用，具体涉及缓解 PFOA 毒害作用的多功能发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 及上述任一菌株或其组合物的应用，属于微生物技术领域。

背景技术

全氟化合物由于其疏水疏油特性，并且具有良好的热稳定性，化学稳定性和生物稳定性，在各行各业受到了广泛的应用。用于成衣（如防水，防污户外服饰）及家居纺织品（如地毯，家具布料等），外卖食品容器，个人护理产品（如牙线）以及灭火泡沫等等。而其中 PFOA（PFOA）作为是多种氟类化合物的最终转化产物之一，可以随着食物链富集。在全球各种环境介质，例如水，土壤，大气层，灰尘等，以及动物人体内中均检测到 PFOA 的存在，并且在人体内的半衰期为 2-3 年，因此受到了研究学者越来越多的重视。在 2013 年就作为持久，累积和毒性化学物质被《化学品注册、评估、授权和限制法规》（REACH 法规）纳入《高度关注物质候选名单》，在 2017 年正式列入 REACH 法规，在欧盟各国实施限制。然而，在部分国家 PFOA 仍在大量使用，且环境中残留的 PFOA 还会在未来很长一段时间对整个生态系统造成持久影响。

暴露人群血液中 PFOA 含量与可能的健康影响之间的关联研究发现，暴露于 PFOA 可能与血液中总胆固醇浓度的升高，肝酶 ALT 浓度上升与出生体重降低有较明显的关系。而且已经发现 PFOA 暴露与疫苗接种反应减少存在关联。这些迹象表明，PFOA 可能影响人体的肝脏功能，脂代谢与免疫功能。而在人体中出现的影响在哺乳动物体内已经被明确发现，PFOA 具有肝脏毒性，免疫毒性，生殖毒性，发育毒性，神经毒性等多种毒性作用。PFOA 可以导致肝肿大，同时可诱发小鼠肝组织氧化应激，使自由基异常增多，可能是造成肝脏损伤的主要原因。PFOA 暴露对水生动物和啮齿动物免疫系统的多个免疫器官均产生不同程度的损伤，造成免疫器官脾脏和胸腺的萎缩老化，明显干扰斑马鱼脾脏白介素的表达，淋巴细胞的凋亡与衰退。在对哮喘小鼠的暴露实验中，高剂量 PFOA 暴露相对哮喘模型组外周血炎症因子 IL-4 升高，IFN- γ 明显较低，即诱导 Th2 型免疫反应加剧肺部炎症。

目前缓解 PFOA 毒性的方法多是从具有高抗氧化活性的天然化学物质着手，研究中有缓解作用的如枸杞多糖、桑色素、三羟异黄酮、番茄红素等。但这些天然物质都存在价格昂贵且难以获得，此外由于人体的承受能力，大量的摄入对人体是否存在的潜在危害尚不得知。

因此，寻找一种能够有效缓解 PFOA 毒性，并且对人体不存在其他可能的有害作用的有效方法显然十分有必要。

发明内容

本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊，而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

本发明的第一个目的是提供如下任一乳杆菌：

(a) 发酵乳杆菌 CCFM1051，分类命名为 *Lactobacillus fermentum*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60649；

(b) 干酪乳杆菌 CCFM1052，分类命名为 *Lactobacillus casei*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60650；

(c) 布氏乳杆菌 CCFM1053，分类命名为 *Lactobacillus buchneri*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60651。

本发明的第二个目的是提供含有所述乳杆菌的组合物。

在一种实施方式中，所述组合物为食品、药物或保健品。

在一种实施方式中，所述食品为发酵食品，是使用所述发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 或其中多种乳杆菌的混合物发酵生产制得。

在一种实施方式中，所述发酵食品包括固态食品、液态食品或半固态食品。

在一种实施方式中，所述发酵食品包括乳制品、豆制品、果蔬制品。

在一种实施方式中，所述食品为功能性食品。

在一种实施方式中，所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪；所述果蔬制品包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜、圆白菜制品。

在一种实施方式中，所述组合物为发酵剂；所述发酵剂为液态发酵剂或固态发酵剂。

在一种实施方式中，所述发酵剂中的乳杆菌数量 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/mL。

在一种实施方式中，所述发酵剂中的乳杆菌数量 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g。

在一种实施方式中，所述药物含有药学上可接受的载体。

在一种实施方式中，所述药学上可接受的载体包括但不限于赋形剂、稀释剂；所述赋形剂包括但不限于乳糖，右旋糖，蔗糖，山梨糖醇，甘露醇，淀粉，阿拉伯树胶，磷酸钙，藻酸盐，黄耆胶，明胶，硅酸钙，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，水，糖浆和甲基纤维素；所述稀释剂包括但不限于：生理盐水或糖浆。

在一种实施方式中，所述药物具有如下至少一种用途：

- (a) 缓解 PFOA 的毒性作用；
- (b) 预防、治疗或缓解便秘；
- (c) 抗肝病或减少肝病的发生；
- (d) 抗高血压或降低血压；
- (e) 抗肥胖或改善肥胖引起的代谢类疾病；
- (f) 提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达，或缓解 PFOA 相关糖尿病。

本发明的第三个目的是提供所述发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 在单独或组合用于吸附 PFOA、改善因 PFOA 暴露造成的脾脏萎缩、降低 PFOA 暴露后血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的含量、改善 PFOA 暴露后的肠道菌群紊乱、降低肠道中 *Allobaculum* 属的丰度、升高 *Clostridiaceae* 科、*Adlercreutzia* 属、*Bacteroides* 属和 *Holdmania* 属微生物的丰度、减少肝病和代谢类疾病的发生、改善因 PFOA 暴露造成的肠道菌群代谢紊乱、升高肠道中乙酸和丁酸的含量、提高便秘患者的粪便含水量和首粒黑便时间，或预防/治疗便秘方面的应用。

有益效果：本发明筛选获得了 3 株具有 PFOA 吸附能力的乳杆菌，菌株对 PFOA 具有高吸附，具有缓解 PFOA 相关代谢疾病的潜力，可用于制备治疗或缓解肝病、代谢类疾病的药物或保健品。本发明的 3 株乳杆菌分别具有如下的生物学特性：

1、发酵乳杆菌 CCFM1051：

- (1) 菌体特征：革兰氏阳性，细胞球状，直径 0.8~1.0 μ m，无鞭毛，无芽孢；
- (2) 菌落特征：菌落乳白色，边缘整齐，球状，凸起，不透明，表面湿润光滑；
- (3) 生长特性：该菌株的最低生长温度为 15 $^{\circ}$ C，最高生长温度为 45 $^{\circ}$ C，在温度 35-37 $^{\circ}$ C 下生长最佳，最适生长 pH 为 6.5，培养 18h 后进入稳定期；
- (4) 体外具有良好的 PFOA 吸附能力；
- (5) 体外具有良好的清除二苯基三硝基苯肼自由基 (DPPH) 能力，清除羟自由基能力和还原能力；
- (6) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能显著改善 PFOA 暴露小鼠脾脏萎缩；
- (7) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 IL-4 的含量；
- (8) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的水平；
- (9) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中 S24-7 科和乳酸菌属

(*Lactobacillus*) 的丰度, 提高拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科丰度, 改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱, 减少肝病、高血压和肥胖的发生。

(10) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著提高便秘小鼠粪便含水量和首粒黑便排出时间, 明显改善小鼠的便秘情况。

(11) 发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著改善高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达, 缓解 PFOA 相关糖尿病。

2、干酪乳杆菌 CCFM1052:

(1) 菌体特征: 革兰氏阳性, 细胞球状, 直径 0.8~1.0 μ m, 无鞭毛, 无芽孢;

(2) 菌落特征: 菌落乳白色, 边缘整齐, 球状, 凸起, 不透明, 表面湿润光滑;

(3) 生长特性: 该菌株的最低生长温度为 15 $^{\circ}$ C, 最高生长温度为 45 $^{\circ}$ C, 在温度 35-37 $^{\circ}$ C 下生长最佳, 最适生长 pH 为 6.5, 培养 18h 后进入稳定期;

(4) 体外具有良好的 PFOA 吸附能力;

(5) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著改善 PFOA 暴露小鼠脾脏萎缩;

(6) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的含量;

(7) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肝匀浆中超氧化物歧化酶 SOD 的活性和丙二醛 MDA 的含量;

(8) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中 *Allobaculum* 属的丰度, 升高 Clostridiaceae 科、*Adlercreutzia* 属、*Bacteroides* 属和 *Holdmania* 属的丰度, 改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱, 减少肝病和代谢类疾病的发生;

(9) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著升高 PFOA 暴露小鼠肠道中乙酸和丁酸的含量, 改善 PFOA 暴露造成的肠道菌群代谢紊乱;

(10) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著提高便秘小鼠粪便含水量以及首粒排黑便的时间;

(11) 干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著改善高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达, 能够缓解 PFOA 相关糖尿病。

3、布氏乳杆菌 CCFM1053 具有以下生物学特性:

(1) 菌体特征: 革兰氏阳性, 细胞球状, 直径 0.8~1.0 μ m, 无鞭毛, 无芽孢;

(2) 菌落特征: 菌落乳白色, 边缘整齐, 球状, 凸起, 不透明, 表面湿润光滑;

(3) 生长特性: 该菌株的最低生长温度为 15 $^{\circ}$ C, 最高生长温度为 45 $^{\circ}$ C, 在温度 35-37 $^{\circ}$ C 下生长最佳, 最适生长 pH 为 6.5, 培养 18h 后进入稳定期;

- (4) 体外具有良好的 PFOA 吸附能力;
- (5) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著改善 PFOA 暴露小鼠脾脏萎缩;
- (6) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT 的水平;
- (7) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肝脏中 MDA 和 GSH 的水平;
- (8) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 TNF- α 的含量;
- (9) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中的丰度 *Allobaculum* 属的丰度, 提高拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和优杆菌科 (*Eubacteriaceae*) 丰度, 改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱, 减少肝病的发生;
- (10) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著提高便秘小鼠的粪便含水量和首粒黑便排出时间, 缓解小鼠的便秘情况;
- (11) 布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著改善高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达, 缓解 PFOA 相关糖尿病。

生物材料保藏

发酵乳杆菌 CCFM1051, 分类命名为 *Lactobacillus fermentum*, 已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No: 60649。

干酪乳杆菌 CCFM1052, 分类命名为 *Lactobacillus casei*, 已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No: 60650。

布氏乳杆菌 CCFM1053, 分类命名为 *Lactobacillus buchneri*, 已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No: 60651。

附图说明

图 1 为不同乳酸菌在体外重悬于浓度为 10mg/L PFOA 中经过 37°C, 150 rpm 摇床 6 h 后, 过 0.22 μ m 水系滤膜进入超高效液相色谱质谱联用仪中, 吸附前后 PFOA 浓度变化示意图。

图 2 为不同乳酸菌在体外清除二苯基三硝基苯肼自由基 (DPPH) 能力, 清除羟自由基能力、还原能力。

图 3 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠脾脏比的变化图。其中 * $P < 0.05$ (vs 模型组)。

图 4 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠血清中白介素 4 示意图。其中 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs 模型组)。

图 5 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT 水平示

意图。其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ (vs 模型组)。

图 6 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肠道菌群 α 多样性变化示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 7 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肠道中 S24-7 科、乳酸菌属 (*Lactobacillus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科丰度的变化示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$ (vs 模型组)。

图 8 为不同物质干预后便秘小鼠粪便含水量的改善情况; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 9 为不同物质干预后便秘小鼠首粒黑便排出时间的降低情况; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 10 是不同菌株对高糖作用下 INS-1 细胞增值情况的影响。

图 11 是不同菌株对高糖作用下 INS-1 细胞 MafA 基因表达的影响。

图 12 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠脾脏系数的变化图。其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$ (vs 模型组)。

图 13 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 水平示意图。其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$ (vs 模型组)。

图 14 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肝匀浆中超氧化物歧化酶 SOD 活性和 MDA 含量的变化; 其中 $*P<0.05$ (vs 模型组)。

图 15 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA 后, 小鼠肠道菌株 α 多样性分析, 及菌群中 Clostridiaceae 科、Adlercreutzia 属、Allobaculum 属、Bacteroides 属和 Holdmania 属丰度的变化示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 16 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肠道中乙酸和丁酸含量的变化; 其中 $*P<0.05$ (vs 模型组)。

图 17 为本发明菌株干预后, 便秘小鼠粪便含水量的改善情况; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 18 为本发明菌株干预后, 便秘小鼠首粒排黑便时间的降低情况; 其中 $*P<0.05$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 19 是本发明菌株对高糖作用下 INS-1 细胞增值情况的影响。

图 20 是本发明菌株对高糖作用下 INS-1 细胞 MafA 基因表达的影响。

图 21 为不同菌株在体外重悬于浓度为 10mg/L PFOA 中经过 37°C, 150rpm 摇床 6h 后,

过 0.22 μ m 水系滤膜进入超高效液相色谱质谱联用仪中, 吸附前后 PFOA 浓度变化示意图。

图 22 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA 的脾脏比变化图; 其中 $*P<0.05$ (vs 模型组)。

图 23 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT 水平示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ (vs 模型组)。

图 24 为不同物质干预 10 天后暴露于 PFOA, 小鼠肝脏中 GSH 活性和 MDA 含量的变化示意图。

图 25 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肠道菌群 α 多样性变化示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 26 为不同物质干预 10 天后小鼠暴露于 PFOA, 小鼠肠道中 Eubacteriaceae 科、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 *Allobaculum* 属丰度的变化示意图; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$ (vs 模型组)。

图 27 为不同物质干预后便秘小鼠粪便含水量的改善情况; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 28 为不同物质干预后便秘小鼠首粒黑便排出时间的降低情况; 其中 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (vs 模型组)。

图 29 是不同物质对高糖作用下 INS-1 细胞增值情况的影响。

图 30 是不同物质对高糖作用下 INS-1 细胞 MafA 基因表达的影响。

具体实施方式

实施例 1 发酵乳杆菌 CCFM1051 的筛选与鉴定

(一) 乳酸菌的分离筛选:

- (1) 取 1g 健康成年人的新鲜粪便。将样品在含有山梨醇 MRS 培养基中 35 $^{\circ}$ C 富集 12h;
- (2) 将富集样品进行梯度稀释后涂布于添加了 0.02% 嗅甲酚紫的 MRS 固体平板上, 培养 24-48h;
- (3) 选取变色圈明显, 并且符合乳酸菌基本形态的单菌落进行平板划线纯化, 筛选分离出乳酸菌;
- (4) 将上述单菌落培养于液体 MRS 培养液中培养 24h 后进行革兰氏染色, 选取革兰氏阳性菌进行后续试验。

(二) 乳杆菌的初步鉴定: 溶钙圈测定法

- (1) 将步骤 (一) 所筛选得到的乳酸菌在液体山梨醇 MRS 培养液中培养 24 h, 然后取 1 mL 培养物 8000 rpm 离心 2 min;

(2) 用 0.05M KH_2PO_4 溶液洗涤两次;

(3) 将所得菌泥重悬, 划线在山梨醇 MRS-0.75% CaCO_3 的固体培养基上, 培养 24 h;

(4) 选取溶钙圈明显, 且呈凸面圆形、细密色白、无菌丝体的菌落, 革兰氏染色后显微镜观察菌体为杆状即初步判定为乳杆菌。

(三) 发酵乳杆菌的分子生物学鉴定:

(1) 单菌基因组抽提:

A. 将步骤(二)所筛选得到的乳酸菌培养过夜, 取培养过夜的菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管, 10000 rpm 离心 2min, 弃上清得菌体;

B. 用 1 mL 无菌水吹洗菌体后, 10000 rpm 离心 2min, 弃上清得菌体;

C. 加入 200 μL SDS 裂解液, 80°C 水浴 30min;

D. 加入酚-氯仿溶液 200 μL 于菌体裂解液中, 其中酚-氯仿溶液的组成成分及体积比为 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 颠倒混匀后, 12000rpm 离心 5-10min, 取上清 200 μL ;

E. 加入 400 μL 冰乙醇或冰异丙醇于 200 μL 上清中, -20°C 静置 1h, 12000rpm 离心 5-10min, 弃上清;

F. 加入 500 μL 70% (体积百分数) 冰乙醇重悬沉淀, 12000rpm 离心 1-3min, 弃上清;

G. 60°C 烘箱烘干, 或者自然晾干;

H. 50 μL ddH₂O 重溶沉淀以备 PCR;

(2) 16S rDNA PCR

A. 细菌 16S rDNA 50 μL PCR 反应体系:

10 × Taq buffer, 5 μL ; dNTP, 5 μL ; 27F, 0.5 μL ; 1492R, 0.5 μL ; Taq 酶, 0.5 μL ; 模板, 0.5 μL ; ddH₂O, 38 μL 。

B. PCR 条件:

95°C 5min; 95°C 10s; 55°C 30s; 72°C 30s; step2-4 30×; 72°C 5min; 12°C 2min;

(3) 制备 1% 琼脂糖凝胶, 之后将 PCR 产物与 10×loading buffer 混合, 上样量 5 μL , 120V 跑 30min, 然后进行凝胶成像;

(4) 将 16S rDNA 的 PCR 产物进行测序分析, 将得到的序列结果使用 BLAST 在 GeneBank 中进行搜索和相似性比对, 选取测序结果鉴定为属于发酵乳杆菌的一种新发现的菌株, -80°C 保藏备用。

实施例 2 不同乳酸菌体外吸附 PFOA 的能力

对发酵乳杆菌 CCFM1051 及对照菌株进行纯化和活化培养, 按 1% (v/v) 接种量接种于

MRS 液体培养基中，37°C培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体，取沉淀用生理盐水清理后继续在 8000r/min 离心 5min，去沉淀得到活菌体细胞，即湿菌体。将湿菌体重悬于 10mg/L PFOA 溶液中，并使最终菌体浓度达到 1g 干菌体/L（将湿菌体重悬于不含 PFOA 的超纯水中作为空白对照）。使用 0.1M 的 NaOH 或 HCl 溶液将含菌液的 PFOA 溶液的 pH 迅速调整至 3.0，添加少量的 NaOH 或 HCl（少于 0.5ml）其离子强度对 PFOA 吸附的影响可以忽略。随后将装有 100ml 样液的 250ml 锥形瓶置于 37°C、150rpm 摇床培养，6h 后取样测定，2 次平行试验取平均值。

PFOA 吸附量的测定：吸附实验后，样液在 8000r/min 离心 5min，并用 0.22μm 的水膜过滤，PFOA 浓度用具有 Waters SYNAPT MS 系统的 UPLC-MS 测定，采用 Acquity UPLC BEH c18 柱（2.1×100mm，1.7μm，Waters Co.），柱温 35°C，进样量 1μL。用 100%（v/v）的乙腈溶液（溶液 A）和 0.1%（v/v）甲酸水溶液（溶液 B）作为洗脱液，进行梯度清洗，流速是 0.3mL/min。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	0-0.5	0.5-5.0	5.0-7.0	7.0-7.5
溶剂 A 比例	70%	70-100%	100%	100-70%

质谱条件：电离源为 ESI 源；MRM 检测；MS+检测；Capillary（毛细管）；3.0kV；Conc（椎体）：40.00V；Source Temperature（放射源温度）：120°C；Desolvation（去溶剂化）温度：400°C；Conc Gas Flow：50L/h；Desolvation Gas Flow：700L/h.气体流速为 0.1ml/min；质子比扫描范围：100-2000；扫面时间 1s，间隔 0.061s。结果用 MassLynxV4.1（Waters 公司）分析；根据吸附前后 PFOA 的浓度差异计算乳酸菌对 PFOA 的吸附量。测定结果列于图 1，CCFM1051 对 10mg/L 的 PFOA 的吸附量为 57.5%±1.5%，其余发酵乳杆菌对 PFOA 的吸附量不及 40%。

实施例 3 体外具有良好的清除二苯基三硝基苯肼自由基（DPPH）能力，清除羟自由基能力和还原能力

将 1mL 乳酸菌完整细胞悬液与 1mL 新鲜配制的 DPPH 无水乙醇溶液（0.2mmol/L）充分混匀后，37°C 条件下避光反应 30min。将 DPPH 与 PBS（pH7.2）混合作为对照样品，同样条件培养。7000×g 离心 10 min 后，在 517 nm 测定吸光度，并按照以下公式计算乳酸菌清除 DPPH 自由基的能力：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = [1 - A_{517}(\text{样品}) / A_{517}(\text{对照})] \times 100\%。$$

将 1mL1,10-邻二氮菲 1mLPBS（pH7.2），1mL 乳酸菌完整细胞悬液或以及 1mLFeSO₄

混合均匀(称为“混合物 1”)。向“混合物 1”中加入 1mLH₂O₂, 37°C条件下水浴 1.5h, 在 536nm 测定吸光度, 表示为 A₅₃₆(样品)。将“混合物 1”中的完整细胞悬液换成同体积的蒸馏水, 以同样条件培养并检测, 表示为 A₅₃₆(空白)。将向“混合物 1”加入的 H₂O₂ 换成同体积的蒸馏水, 以同样条件培养并检测, 表示为 A₅₃₆(对照)。按照以下公式计算乳酸菌清除羟自由基的能力:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [A_{536}(\text{样品}) - A_{536}(\text{空白})] / [A_{536}(\text{对照}) - A_{536}(\text{空白})] \times 100\%$$

将 0.5mL 乳酸菌完整细胞悬液与同体积的铁氰化钾(1%)及 PBS 缓冲液(pH6.6)混合, 振荡使体系均匀。将蒸馏水与铁氰化钾及 PBS 混合作为空白对照。混合体系在 50°C条件下培养 20min, 快速冷却, 并加入 0.5mL10%的三氯乙酸。在 2000×g 离心 5min 后, 取 1mL 上清与 1mL0.1%的氯化铁混合并反应 10min。随后在 700nm 波长下测定吸光度, 并使用半胱氨酸(Cysteine)作为表征还原力的标准。结果见图 2, CCFM1051 的 DPPH 清除能力为 57±4.2%, 其他乳酸菌的 DPPH 的清除能力不及 50%, 羟自由基清除能力为 32±4.5%, 而其他乳酸菌的羟自由基清除能力不及 30%, 还原能力为 14±1.8%, 其他乳酸菌的还原能力不及 13%。

实施例 4 发酵乳杆菌 CCFM1051 显著改善 PFOA 暴露小鼠脾脏萎缩

6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, 适应环境一周后, 根据体重随机分为五组: 对照组、模型组、槲皮素干预组、发酵乳杆菌 CCFM1051 干预组、LGG 干预组, 每组含 10 只小鼠, 动物分组及处理方法见表 2。

表 2 动物实验分组及处理方法

组别	处理方法	实验周期
对照组	连续灌胃 200μL3%蔗糖溶液 11 天	11 天
模型组	连续灌胃 200μL3%蔗糖溶液 10 天, 第 11 天灌胃 3gPFOA/kgBW/200μL/只	11 天
槲皮素干预组	连续灌胃 200μL3g/L 槲皮素溶液 10 天, 第 11 天灌胃 3gPFOA/kgBW/200ul/只	11 天
发酵乳杆菌 CCFM1051 干预组	连续灌胃菌株 CCFM1051(1×10 ⁹ cfu/200μL/只/天)10 天, 第 11 天灌胃 3gPFOA/kgBW/200ul/只	11 天
LGG 干预组	连续灌胃菌株 LGG(1×10 ⁹ cfu/200μL/只/天)10 天, 第 11 天灌胃 3gPFOA/kgBW/200ul/只	11 天

将小鼠于第 13 天称体重，随后安乐处死，取出脾脏称湿重以计算脏器系数，按以下公式计算小鼠脾脏的脏器系数：

脾脏脏器系数=脾脏湿重/安乐死前小鼠体重。

结果如图 3 所示，服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著逆转由于 PFOA 染毒造成的小鼠脾脏萎缩，效果优于柚皮素。

实施例 5 发酵乳杆菌 CCFM1051 显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 IL-4 的含量

实施例 4 中的小鼠于第 13 天安乐处死。收集血清，3000g 离心 15min 获得血清，用 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-4 的含量。结果表明服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能显著改善 PFOA 染毒造成的小鼠免疫损伤（图 4），使血清 IL-4 含量恢复至正常水平，效果优于柚皮素。

实施例 6 发酵乳杆菌 CCFM1051 显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）和 γ -谷氨酰转肽酶（ γ -GT）的水平

取实施例 5 中的血清，采用全自动生化分析仪检测血清中谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）和 γ -谷氨酰转肽酶（ γ -GT）的含量。ALT 主要存在于肝细胞原浆的可溶部分，ALT 活性升高提示肝细胞遭到破坏，细胞膜通透性增强。AST 主要存在于肝细胞线粒体中，AST 活性提高提示线粒体损伤。结果表明（图 5），服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）和 γ -谷氨酰转肽酶（ γ -GT）的含量。表明服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著缓解 PFOA 造成的小鼠肝细胞膜结构和功能的损伤，使 ALT 由 PFOA 模型组的 $68.8 \pm 15.2 \text{ U/L}$ 降低至 $44.5 \pm 12.4 \text{ U/L}$ ，使 AST 由 PFOA 模型组的 $240.7 \pm 48.2 \text{ U/L}$ 降低至 208.6 ± 13.4 ，使 γ -GT 由 PFOA 模型组的 $310.5 \pm 80.3 \text{ U/L}$ 降低至 $215 \pm 15.4 \text{ U/L}$ 。

实施例 7 发酵乳杆菌 CCFM1051 显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中 S24-7 和 Lactobacillus 的丰度，提高 Bacteroides、Eubacteriaceae 和 Eubacteriaceae 丰度，改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱，减少肝病、高血压和肥胖的发生

取实施例 4 中小鼠第 12 天的新鲜粪便，采用 MP 的粪便试剂盒提取小鼠粪便样品中总 DNA。具体操作步骤如下主要参照试剂盒说明书进行。以小鼠粪便基因组为模板，以上游引物 520F（5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3'，SEQ ID NO.1）、下游引物 802R（5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'，SEQ ID NO.2）为引物扩增 16S rDNA 的 V3-V4 区片段，目的片段长度为 247bp 左右。PCR 反应结束，将观察到目的条带的所有 PCR 样品再次进行电泳，配制 2.0% 琼脂糖凝胶，于 120V 条件下电泳 40min，跑胶结束后，在紫外灯下快速进行目的条带的切割。按照 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒说明书进行目的条带胶回收。

根据 Qubit DNA3.0 试剂盒检测样品 DNA 浓度，随后根据 TurSeq DNA LT Sample Preparation Kit 及其说明构建文库，最后根据 MiSeq Regent Kit 及其说明经过 Illumina Miseq 测序仪上机测定。测序完成后，剔除掉序列长度 <200 bp、引物序列、不能拼接的单序列，按照重叠碱基 >10 bp 且无错配的标准拼接序列。将相似度大于 97%序列定义为一个分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)，通过 Ribosomal Database Project (RDP) Naïve Bayesclassifier 来确定物种。计算样品的 α -多样性、 β -多样性，用来评估样品的菌群多样性。其中 α -多样性用 chao1 和 observed species 指数来表征，结果（图 6）显示 PFOA 模型组小鼠的肠道菌群 α 多样性升高，说明 PFOA 暴露会伴随着一定程度的肠道紊乱。服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能明显降低肠道菌群的 α 多样性，改善肠道紊乱情况。

此外，S24-7 科和乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 丰度在 PFOA 染毒小鼠中显著提高，而服用发酵乳杆菌 CCFM1051 能够显著的逆转这一情况；S24-7 高度定位于恒温动物的胃肠道，革兰氏阴性非运动型厌氧型微生物，能够发酵多种碳水化合物，和非酒精性脂肪肝和高血压的发生发展有关。乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 是正常胃肠道和泌尿生殖器的一部分，是常见的益生菌，在乳酸菌预防实验中 PFOA 模型组和染毒模型出现丰度上升的情况，乳酸菌可能在 PFOA 暴露后出现了反馈调节的现象。服用发酵乳杆菌 CCFM1051 还能显著提高 PFOA 染毒小鼠中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科的丰度（图 7）。拟杆菌属 (*Bacteroides*) 又称类杆菌属，是拟杆菌科的一属，为革兰氏染色阴性、无芽孢、专性厌氧的小杆菌。拟杆菌属正常寄居于人和动物的肠道、口腔、上呼吸道和生殖道。拟杆菌是人和动物体内大量存在的正常菌群，约占成年个体肠道菌群的 1/4 以上。是肠道细菌的营养来源；能够调节多种宿主基因的表达，包括那些涉及营养吸收，黏膜屏障强化和血管因子生成的基因；激活 T 细胞依赖性免疫应答；影响潘氏细胞蛋白的表达；限制病原体在胃肠道的定植。而 Eubacteriaceae 与肝性脑病，即肝硬化中功能失调的肠-肝-脑轴的恢复有关，在严重肥胖患者的胆肠道旁路术后其丰度显著减少。以上结果表明发酵乳杆菌 CCFM1051 在缓解 PFOA 毒性的基础上，还同时具备调节肠道菌群、调节免疫及肠道屏障、减少肝病、高血压和肥胖的发生。

实施例 8 发酵乳杆菌 CCFM1051 对小鼠便秘的缓解作用

将 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只 (20-25g)，随机分为 5 组：空白对照组、便秘模型对照组、发酵乳杆菌 CCFM1051 干预组、植物乳杆菌对照组和酚酞治疗组，每组含小鼠 10 只。

将发酵乳杆菌 CCFM1051 冻干菌粉重悬于脱脂乳粉中，制成浓度为 4.0×10^9 CFU/mL 的菌悬液。实验前 14 天每天给干预组小鼠灌喂 0.25mL 的发酵乳杆菌 CCFM1051 脱脂乳悬液 (4.0×10^9 CFU/mL)，植物乳杆菌组灌胃等量的 *L. plantarum* ST-III，其余 3 组灌喂等量的不含菌的脱脂乳。试验第 15-17 天，阴性对照组灌胃 0.25mL 生理盐水，其余四组灌胃 0.25mL，

1mg/mL 的洛哌丁胺溶液，确保小鼠洛哌丁胺的灌胃量为 10 mg/kgBW。

灌胃结束 1h 后，阴性对照组和便秘模型对照组灌胃脱脂乳，发酵乳杆菌 CCFM1051 干预组小鼠灌喂 0.25mL 的发酵乳杆菌 CCFM1051 (4.0×10^9 CFU/mL)，酚酞治疗对照组灌胃 0.25mL 的 7mg/ mL 的酚酞溶液，确保小鼠酚酞灌胃量为 70 mg/kgBW。植物乳杆菌组灌胃 0.25mL 的 *L. plantarum* ST-III (4.0×10^9 CFU/mL)。

期间的每天收集小鼠粪便，用于小鼠粪便含水量的计算，按下式计算粪便含水量：

粪便含水量 (%) = (粪便湿重-粪便干重) / 粪便湿重 $\times$ 100。

第 17 天上午除空白对照组灌胃生理盐水，其余组均灌胃洛哌丁胺，灌胃 1h 后，对所有小鼠灌胃活性炭阿拉伯树胶水溶液 0.25mL，然后将每只小鼠单独放置在一个干净的铺有吸水纸的不锈钢笼中，记录从灌胃活性炭开始到第一粒黑便排出的时间 (min)，作为首粒排黑便时间，用于评价发酵乳杆菌 CCFM1051 对小鼠便秘的缓解作用，期间小鼠自由进食和饮水。结果见图 8 和图 9。如图 8 所示，发酵乳杆菌 CCFM1051 能够缓解便秘，提高粪便的含水量，并缩短首粒黑便的排出时间，其效果优于植物乳杆菌 ST-III。

实施例 9 发酵乳杆菌 CCFM1051 可促进高糖诱导的 INS-1 细胞的增殖及 Maf A mRNA 表达

实验分成 5 组：正常组(含 11.1 mmol/L 葡萄糖的普通培养液)，高糖组(含 22.2 mmol/L 葡萄糖的高糖培养液)，罗格列酮组(高糖培养液+80 μ mol/L 的罗格列酮)，CCFM1051 组(高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL CCFM1051 菌液) LGG 组(高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL LGG 菌液)。

将 INS-1 细胞(编号：BH-AC0530)接种于 RPMI-1640 (含 11.1 mmol/L 葡萄糖，10%FBS，50 μ mol/L 2-巯基乙醇，1 mmol/L 丙酮酸，10 mmol/L HEPES)培养液中，并在 37°C，5%CO₂ 的培养箱中培养。

CCK-8 法检测细胞增殖：将状态良好的细胞消化离心并接种于 96 孔板上，各孔约 5×10^3 个细胞，板的周边孔不接种细胞，为防止边缘效应同时向其中加入 PBS 溶液。待细胞贴壁，各孔中加入含 0.5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，同步化处理 24h。同步化结束，依据分组向各孔加入相应培养基培养 48h，每组设三个复孔，同时设置调零孔。药物干预结束，吸去旧培养基，PBS 清洗 2 次，加入 180 μ L 无血清培养基和 20 μ L CCK-8 溶液，孵育 3-4h。孵育结束，使用酶标仪于 450nm 下测定各孔吸光度值。

Maf A mRNA 表达的测定：Trizol 法提取 RNA，吸弃 6 孔板中原培养液，同时用预冷的 PBS 清洗 2 次，各孔中分别加入 1.0mL Trizol 裂解细胞并将含细胞的裂解液转至无酶 EP 管，移液枪吹打至无明显沉淀静置 5min。向各 EP 管加入 0.2mL 三氯甲烷，剧烈震荡 15s，室温放置 2-3min。4 °C，12000 rpm 离心 15 min，吸取上清 0.4m L 左右，转入到另一无

酶 EP 管中,加入 0.5mL 的异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10min。4 °C, 12000 rpm 离心 10 min, 小心弃去上清,加入 1.0mL 75%乙醇并颠倒混匀。4 °C, 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 室温干燥 2-5 分钟。加入 20μL DEPC 处理水溶解,保存于 80°C待用。测定 RNA 的浓度和质量,并按照反转录试剂盒说明书进行反转录。反转录得到的 cDNA 进行 q RT-PCR 检测, 其中 MafA 特异性引物: F:5'-atcactctgccaccatcac-3' (SEQ ID NO.3), R:5'-atgacctcctccttgctgaa-3' (SEQ ID NO.4)。PCR 体系为: F (10 μM), 0.50μL; R (10 μM), 0.50μL; cDNA 模板, 1.00μL; dd H₂O, 3.00μL; mix, 5.00μL。PCR 程序: 95°C, 2min; (95°C, 30sec; 60°C, 30sec; 72°C, 20sec)×35; 72°C, 5min; 目的基因经过 Real-time PCR 检测后,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对基因表达分析。先用 CFX Manager 软件分析各组大鼠 INS-1 细胞目标基因的表达量,再以正常组表达量为 1,其他各组与之相比较,计算各组基因表达水平。

CCK-8 法检测结果如图 10 所示,与正常组相比,高糖作用组细胞生长明显降低($P<0.05$), 罗格列酮对照组细胞增殖较高糖组有明显增加 ($P<0.05$), CCFM1051 组与高糖组相比细胞增殖状况也明显增加 ($P<0.05$)。

Maf A mRNA 表达情况如图 11 显示,高糖作用组细胞的 MafA mRNA 的表达量明显低于正常组 ($P<0.05$),而罗格列酮阳性对照组和 CCFM1051 组的 Maf A mRNA 表达量较高糖作用组明显上升 ($P<0.05$)。

实施例10 利用发酵乳杆菌CCFM1051制备发酵食品

(1) 制备果蔬饮料

选用新鲜蔬菜洗净后榨汁,接着进行高温瞬间灭菌,在温度140°C下高温热杀菌2秒后,立即降温至37°C,再接入本发明制备的发酵乳杆菌CCFM1051菌剂发酵剂,使其浓度达到 10^6 CFU/mL以上,在温度4°C下冷藏保存,于是得到含有本发明短双歧杆菌CCFM1051活菌的果蔬饮料。所述果蔬包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜或圆白菜制品。

(2) 制备发酵乳制品

将发酵乳杆菌 CCFM1051 接种至乳制品或豆制品的原料中,制备发酵乳制品或发酵豆制品;所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪。

(3) 将发酵乳杆菌 CCFM1051 接种至固态、半固态或液态原料中发酵,制备固态发酵食品、液态发酵食品、半固态发酵食品。

与发酵乳杆菌 CCFM1051 菌体的应用效果类似,服用 CCFM1051 制备的发酵食品能够显著改善因 PFOA 暴露造成的小鼠脾脏萎缩;显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中白介素 4(IL-4)

含量；显著升高 PFOA 暴露小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT 的含量；改善 PFOA 暴露小鼠的肠道菌群紊乱，降低肠道中 S24-7 和 Lactobacillus 的丰度，升高 Bacteroides 和 Eubacteriaceae 丰度，并使肠道菌群趋于正常化，减少肝病、高血压和肥胖的发生。服用含发酵乳杆菌 CCFM1051 的发酵食品能够显著提高便秘小鼠粪便含水量和首粒黑便排出时间，明显改善小鼠的便秘情况。细胞实验表明，含发酵乳杆菌 CCFM1051 的发酵食品能够显著提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖情况和 MafA 基因的表达，缓解 PFOA 相关糖尿病。体外实验表明，发酵乳杆菌 CCFM1051 能够良好的吸附 PFOA，能够有效地清除二苯基三硝基苯肼自由基 (DPPH)、清除羟自由基、表现出良好的还原能力。

本发明筛选出对 PFOA 具有高吸附能力且不在人体中定植并且具有高抗氧化能力的益生菌，不仅能够抑制 PFOA 造成的氧化应激，而且能够从根本上清除人体内的 PFOA。发酵乳杆菌 CCFM1051 可用于制备具有缓解 PFOA 毒性的食品、保健品和药品，具有非常广泛的应用前景。

实施例 11 干酪乳杆菌 CCFM1052 的筛选和鉴定

(一) 乳酸菌的分离筛选：

- (1) 取 1g 健康成年人的新鲜粪便。将样品在含有山梨醇 MRS 培养基中 35°C 富集 12h；
- (2) 将富集样品进行梯度稀释后涂布于添加了 0.02% 嗅甲酚紫的 MRS 固体平板上，培养 24-48h；
- (3) 选取变色圈明显，并且符合乳酸菌基本形态的单菌落进行平板划线纯化，筛选分离出乳酸菌；
- (4) 将上述单菌落培养于液体 MRS 培养液中培养 24h 后进行革兰氏染色，选取革兰氏阳性菌进行后续试验。

(二) 乳杆菌的初步鉴定：溶钙圈测定法

- (1) 将步骤 (一) 所筛选得到的乳酸菌在液体山梨醇 MRS 培养液中培养 24 h，然后取 1 mL 培养物 8000 rpm 离心 2 min；
- (2) 用 0.05M KH₂PO₄ 溶液洗涤两次；
- (3) 将所得菌泥重悬，划线在山梨醇 MRS-0.75%CaCO₃ 的固体培养基上，培养 24 h；
- (4) 选取溶钙圈明显，且呈凸面圆形、细密色白、无菌丝体的菌落，革兰氏染色后显微镜观察菌体为杆状即初步判定为乳杆菌。

(三) 干酪乳杆菌的分子生物学鉴定：

(1) 单菌基因组抽提:

- A. 将步骤(二)所筛选得到的乳酸菌培养过夜, 取培养过夜的菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管, 10000 rpm 离心 2min, 弃上清得菌体;
- B. 用 1 mL 无菌水吹洗菌体后, 10000 rpm 离心 2min, 弃上清得菌体;
- C. 加入 200 μ L SDS 裂解液, 80°C 水浴 30min;
- D. 加入酚-氯仿溶液 200 μ L 于菌体裂解液中, 其中酚-氯仿溶液的组成成分及体积比为 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 颠倒混匀后, 12000rpm 离心 5-10min, 取上清 200 μ L;
- E. 加入 400 μ L 冰乙醇或冰异丙醇于 200 μ L 上清中, -20°C 静置 1h, 12000rpm 离心 5-10min, 弃上清;
- F. 加入 500 μ L 70% (体积百分数) 冰乙醇重悬沉淀, 12000rpm 离心 1-3min, 弃上清;
- G. 60°C 烘箱烘干, 或者自然晾干;
- H. 50 μ L ddH₂O 重溶沉淀以备 PCR;

(2) 16S rDNA PCR

- A. 细菌 16S rDNA 50 μ L PCR 反应体系:
10 $\times$ Taq buffer, 5 μ L; dNTP, 5 μ L; 27F, 0.5 μ L; 1492R, 0.5 μ L; Taq 酶, 0.5 μ L; 模板, 0.5 μ L; ddH₂O, 38 μ L。

B. PCR 条件:

95°C 5min; 95°C 10s; 55°C 30s; 72°C 30s; step2-4 30 $\times$; 72°C 5min; 12°C 2min;

(3) 制备 1% 琼脂糖凝胶, 之后将 PCR 产物与 10 $\times$ loading buffer 混合, 上样量 5 μ L, 120V 跑 30min, 然后进行凝胶成像;

(4) 将 16S rDNA 的 PCR 产物进行测序分析, 将得到的序列结果使用 BLAST 在 GeneBank 中进行搜索和相似性比对, 选取测序结果鉴定为属于干酪乳杆菌的一种新发现的菌株, -80°C 保藏备用。

实施例 12 不同乳酸菌体外吸附 PFOA 的能力

对于酪乳杆菌 CCFM1052 和作为对照的其它乳酸菌进行纯化和活化培养, 按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37°C 培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体, 取沉淀用生理盐水清理后继续在 8000r/min 离心 5min, 去沉淀得到活菌体细胞, 即湿菌体。将湿菌体重悬于 10mg/L PFOA 溶液中, 并使最终菌体浓度达到 1g 干菌体/L (将湿菌体重悬于不含 PFOA 的超纯水中作为空白对照)。使用 0.1M 的 NaOH 或 HCl 溶液将含菌液的 PFOA 溶液的 pH 迅速调整至 3.0, 添加少量的 NaOH 或 HCl (少于 0.5ml) 其离子强度对 PFOA 吸附

的影响可以忽略。随后将装有 100ml 样液的 250ml 锥形瓶置于 37°C、150rpm 摇床培养，6h 后取样测定，2 次平行试验取平均值。测定方法同实施例 2 所示，结果如表 3 所示，CCFM1052 对 10mg/L 的 PFOA 的吸附量为 60%±3.2%，其余发酵乳杆菌对 PFOA 的吸附量不及 45%。

表 3 不同菌株对 PFOA 的吸附率

菌株	HN11-1	CCFM1052	HN13-3	NT9-8	NT5-1	NH18-3
PFOA 吸附率	38%±1.5%	60%±3.2%	30%±2%	41%±2%	32%±1.8%	28%±1.5%

6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只，适应环境一周后，根据体重随机分为五组：对照组、模型组、槲皮素干预组、干酪乳杆菌 15-7 干预组、LGG 干预组，每组含 10 只小鼠，动物分组及处理方法同实施例 4。

结果如图 12 所示，结果表明服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著逆转由于 PFOA 染毒造成的小鼠脾脏萎缩。

实施例 13 干酪乳杆菌 CCFM1052 显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的水平；

将实施例 12 中的小鼠于第 13 天称体重，随后安乐处死，眼眶取血后 3000rpm/min 离心 15min 得到血清，采用全自动生化分析仪检测血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的含量。ALT 主要存在于肝细胞原浆的可溶部分，ALT 活性升高提示肝细胞遭到破坏，细胞膜通透性增强。结果表明 (图 13)，服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的含量。表明服用干酪乳杆菌 8-9 能够显著缓解 PFOA 造成的小鼠肝细胞膜结构和功能的损伤。使 ALT 由 PFOA 模型组的 68.8±15.2U/L 降低至 55.2±11.8U/L，使 γ -GT 由 PFOA 模型组的 310.5±80.3U/L 降低至 180.3±18.9U/L。

实施例 14 干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肝匀浆中超氧化物歧化酶 SOD 的活性和丙二醛 MDA 的含量

将实施例 12 中的小鼠于第 13 天称体重，随后安乐处死，取肝脏。在冰上称取一定重量的肝脏组织，按 1:9 的比例加入预冷的生理盐水，组织匀浆后制得 10% 肝脏匀浆液，4000 ×g 离心 15 分钟取上清液。按说明书要求测定肝脏匀浆液的蛋白浓度含量。并根据如下公式计算

MDA 含量: $\text{MDA 含量 (nmol/mgprot)} = [(\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}) / (\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值})] \times \text{标准品浓度 (nmol/mL)} \div \text{待测样本蛋白浓度 (mgprot/mL)}$

在冰上称取一定重量的肝脏组织, 按 1:9 的比例加入预冷的生理盐水, 组织匀浆后制得 10% 肝脏匀浆液, 4000 ×g 离心 15 分钟取上清液。按说明书要求测定肝脏匀浆液的蛋白浓度含量。并根据如下公式计算 SOD 含量:

$\text{SOD 抑制率 (\%)} = [(\text{A 对照} - \text{A 对照空白}) - (\text{A 测定} - \text{A 测定空白})] / (\text{A 对照} - \text{A 对照空白})$

$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \text{SOD 抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \times \text{样本测试前稀释倍数}$

结果表明(图 14), 服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠肝匀浆中超氧化物歧化酶 SOD 的活性和丙二醛 MDA 的含量。正常情况下, 细胞中活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 生成和消除都受到机体有效的控制, 处于动态平衡状态, 如果细胞发生氧化应激失衡, ROS 累积能够损伤 DNA、蛋白质及脂质等, SOD 是体内重要的抗氧化酶。丙二醛 MDA 是脂质过氧化物降解的主要产物, 其含量高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠受到的自由基攻击, 显著缓解肝组织的氧化应激水平, 降低 PFOA 暴露小鼠的肝脏损伤。

实施例 15 干酪乳杆菌 CCFM1052 显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中 *Allobaculum* 属的丰度, 升高 *Clostridiaceae* 科、*Adlercreutzia* 属和 *Bacteroides* 属的丰度, 改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱, 减少肝病和代谢类疾病的发生

取实施例 12 中小鼠第 12 天的新鲜粪便, 采用 MP 的粪便试剂盒提取小鼠粪便样品中总 DNA。具体操作步骤如下主要参照试剂盒说明书进行。以小鼠粪便基因组为模板, 以上游引物 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3', SEQ ID NO.1)、下游引物 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3', SEQ ID NO.2) 为引物扩增 16S rDNA 的 V3-V4 区片段, 目的片段长度为 247bp 左右。PCR 反应结束, 将观察到目的条带的所有 PCR 样品再次进行电泳, 配制 2.0% 琼脂糖凝胶, 于 120V 条件下电泳 40min, 跑胶结束后, 在紫外灯下快速进行目的条带的切割。按照 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒说明书进行目的条带胶回收。根据 Qubit DNA3.0 试剂盒检测样品 DNA 浓度, 随后根据 TurSeq DNA LT Sample Preparation Kit 及其说明构建文库, 最后根据 MiSeq Reagent Kit 及其说明经过 Illumina MiSeq 测序仪上机测定。测序完成后, 剔除掉序列长度 < 200 bp、引物序列、不能拼接的单序列, 按照重叠碱基 > 10 bp 且无错配的标准拼接序列。将相似度大于 97% 序列定义为一个分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU), 通过 Ribosomal Database Project (RDP) Naïve Bayes classifier 来确定

物种。计算样品的 α -多样性、 β -多样性，用来评估样品的菌群多样性。其中 α -多样性用 chao1 指数来表征，图 15 结果显示模型组小鼠的肠道菌群 α 多样性升高，说明 PFOA 暴露会伴随着一定程度的肠道紊乱。服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能明显降低肠道菌群的 α 多样性，改善肠道紊乱情况。确定主要肠道微生物组成在各种疾病做的关键作用对于预防或逆转生态失调从而预防或控制疾病具有重要意义。

图 15 显示，*Allobaculum* 属的丰度在 PFOA 模型组小鼠肠道升高，而服用干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著的逆转这一情况，*Allobaculum* 属的丰度在海湾战争疾病中同样出现上升，并与肠道漏肠和全身内毒素血症诱导的 TLR4 活化进一步诱导了海湾战争疾病的神经炎症和胃肠道紊乱。以往研究 *Allobaculum* 属丰度增加有可能作为雌性肝细胞癌风险指标之一，并且是致癌物暴露引起的宿主癌症发生前的关键变量之一。梭菌属是厚壁菌门中最大的一类，代表了人体微生物群中最多样化的细菌，梭菌是一类厌氧、革兰氏阳性、孢子形成的棒状细菌。在监管胃肠道免疫平衡中发挥作用。在非酒精性脂肪性肝病中发现了 Clostridiaceae 科丰度的下降，在慢性功能性便秘患者与健康对照组肠道菌群对比发现，Clostridiaceae 科在健康对照组肠道中丰度明显增多。因此服用干酪乳杆菌 CCFM1052 降低了非酒精性脂肪性肝病和便秘的发生发展。拟杆菌属（*Bacteroides*）又称类杆菌属，是拟杆菌科的一属，为革兰氏染色阴性、无芽孢、专性厌氧的小杆菌。拟杆菌属正常寄居于人和动物的肠道、口腔、上呼吸道和生殖道。拟杆菌是人和动物体内大量存在的正常菌群，约占成年个体肠道菌群的 1/4 以上。是肠道细菌的营养来源；能够调节多种宿主基因的表达，包括那些涉及营养吸收，黏膜屏障强化和血管因子生成的基因；激活 T 细胞依赖性免疫应答；影响潘氏细胞蛋白的表达；限制病原体在胃肠道的定植。在代谢疾病临床研究中与肥胖和相关的代谢疾病参数呈反向关系，高糖饮食的动物实验中，高糖饮食组小鼠中拟杆菌属的丰度明显低于正常组。*Adlercreutzia* 属最初在人类粪便中发现，能够产生短链脂肪酸，是一类抗炎菌的微生物，在原发性硬化性胆管炎患者和多发性硬化症的肠道微生物群中减少，在用传统中药对二型糖尿病大鼠的过程中，其高血糖、脂质代谢功能障碍和炎症得到了明显的改善，而 *Adlercreutzia* 属的丰度出现显著性升高，并显示 *Adlercreutzia* 属与二型糖尿病的相关指标密切相关。

实施例16 干酪乳杆菌CCFM1052能升高PFOA暴露小鼠肠道中乙酸和丁酸的含量

取实施例 12 中小鼠第 12 天的新鲜粪便，称取粪便 100mg 至 2mLEP 管；加入 500uL 饱和 NaCl，震荡均匀（浸泡 30min 后，组织研磨仪 70Hz/30s，震荡破碎 3 次）；加入 40uL 10% 硫酸，漩涡震荡均匀 30s；加入 1mL 乙醚，漩涡震荡均匀，随后 18000×g 离心 15min，4℃离心；离心结束取上清，转移至新的 2mLEP 管，加入 0.25g 无水硫酸钠；18000×g 离心 15min，

4°C离心；取 500uL 上清至气相小瓶，上机。

SCFA 为肠粘膜细胞提供能量，可以维持肠屏障的完整性，调节炎症反应，抑制病原菌增值。乙酸可以使 Caco-2 细胞在背出血性大肠杆菌侵袭时维持上皮得完整性，此外还可以增加宿主抗菌肽的分泌从而发挥抗菌作用。而丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源，不仅能够为肠上皮细胞氧化供能，维持水电解质平衡、调节肠道菌群平衡、调节肠道屏障功能等重要作用。而且在毫摩尔浓度下就能发挥抑制肿瘤细胞增值、分化和诱导凋亡的作用，能够激活钠离子/葡萄糖联合载体基因（SLC5A8）的表达，使其发挥诱导细胞凋亡的作用。此外，口服丁酸盐有利于糖尿病的进程。短链脂肪酸能通过 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)激活途径和组蛋白脱乙酰基酶(histone deacetylases, HDACs)抑制途径两条信号通路发挥抗炎作用，对炎症性肠病（Inflammatory bowel disease, IBD）具有显著的改善作用。图 16 为粪便中短链脂肪酸的测定显示，干酪乳杆菌 CCFM1052 能显著升高 PFOA 暴露小鼠肠道中乙酸的含量（ $P<0.05$ ），使乙酸含量恢复至正常含量，并对丁酸的含量具有较好的提高趋势，有助于维护肠道中的微生物平衡。

实施例 17 干酪乳杆菌 CCFM1052 对小鼠便秘的缓解作用

取 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只（20-25g），随机分为 5 组：空白对照组、便秘模型对照组、干酪乳杆菌 CCFM1052 干预组、植物乳杆菌对照组和酚酞治疗对照组，每组含小鼠 10 只。

将干酪乳杆菌 CCFM1052 冻干菌粉重悬于脱脂乳粉中，制成浓度为 4.0×10^9 CFU/mL 的菌悬液。实验前 14 天每天给干预组小鼠灌喂制备的浓度为 4.0×10^9 CFU/mL 的干酪乳杆菌 CCFM1052 脱脂乳悬液 0.25mL，植物乳杆菌组灌胃等量的 *L. plantarum* ST-III，其余 3 组灌喂等量的不含菌的脱脂乳。试验第 15-17 天，阴性对照组灌胃 0.25mL 生理盐水，其余四组灌胃 0.25mL，1mg/mL 的洛哌丁胺溶液，确保小鼠洛哌丁胺的灌胃量为 10 mg/kgBW。

灌胃结束 1h 后，阴性对照组和便秘模型对照组灌胃脱脂乳，干酪乳杆菌 CCFM1052 干预组小鼠灌喂制备的浓度 4.0×10^9 CFU/mL 的干酪乳杆菌 CCFM1052 0.25mL，酚酞治疗对照组灌胃 0.25mL，7mg/ mL 的酚酞溶液，确保小鼠酚酞灌胃量为 70 mg/kgBW。植物乳杆菌组灌胃 0.25mL， 4.0×10^9 CFU/mL 的 *L. plantarum* ST-III。

实验期间的每天收集小鼠粪便，用于小鼠粪便含水量的计算，按下式计算粪便含水量。粪便含水量（%）=（粪便湿重-粪便干重）/ 粪便湿重 $\times 100$ 。第 17 天上午除空白对照组灌胃生理盐水，其余组均灌胃洛哌丁胺，灌胃 1h 后，对所有小鼠灌胃活性炭阿拉伯树胶水溶液 0.25mL，然后将每只小鼠单独放置在一个干净的铺有吸水纸的不锈钢笼中，记录从灌胃活性炭开始到第一粒黑便排出的时间（min），作为首粒排黑便时间，用于评价干酪乳杆菌

CCFM1052 对小鼠便秘的缓解作用，期间小鼠自由进食和饮水。

图 17 为小鼠粪便含水量的测定结果，显示便秘模型组中的粪便含水量显著降低，而酚酞治疗组能够极显著的提高便秘小鼠粪便中的含水量 ($P<0.001$)，干酪乳杆菌 CCFM1052 对便秘小鼠粪便中含水量的提高效果 ($P<0.01$) 优于对照菌株植物乳杆菌 ST-III ($P<0.05$)。小鼠首粒排黑便结果表明 (图 18)，便秘模型组小鼠首粒黑便时间显著推迟，酚酞治疗组显著缩短了便秘小鼠的排便时间 ($P<0.001$)，干酪乳杆菌 CCFM1052 具有和酚酞一样优秀的缩短首粒黑便排出时间的效果 ($P<0.001$)，植物乳杆菌 ST-III 同样显著缩短了首粒黑便排出时间 ($P<0.05$)，但效果明显不如干酪乳杆菌 CCFM1052。

实施例 18 干酪乳杆菌 CCFM1052 促进高糖诱导的 INS-1 细胞的增殖及 Maf A mRNA 表达

实验分成 5 组：正常组 (含 11.1 mmol/L 葡萄糖的普通培养液)，高糖组 (含 22.2 mmol/L 葡萄糖的高糖培养液)，罗格列酮组 (高糖培养液+80 μ mol/L

的罗格列酮)，CCFM1052 组 (高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL CCFM1052 菌液) LGG 组 (高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL LGG 菌液)。

将 INS-1 细胞 (编号：BH-AC0530) 培养于 RPMI-1640 培养液 (含 11.1 mmol/L 葡萄糖，10%FBS，50 μ mol/L 2-巯基乙醇，1 mmol/L 丙酮酸，10 mmol/L HEPES) 中，并放入 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱中。

CCK-8 法检测细胞增殖：将状态良好的细胞消化离心并接种于 96 孔板上，各孔约 5×10^3 个细胞，板的周边孔不接种细胞，为防止边缘效应同时向其中加入 PBS 溶液。待细胞贴壁，各孔中加入含 0.5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，同步化处理 24h。同步化结束，依据分组向各孔加入相应培养基培养 48h，每组设三个复孔，同时设置调零孔。药物干预结束，吸去旧培养基，PBS 清洗 2 次，加入 180 μ L 无血清培养基和 20 μ L CCK-8 溶液，孵育 3-4h。孵育结束，使用酶标仪于 450nm 下测定各孔吸光度值。

Maf A mRNA 表达的测定：Trizol 法提取 RNA，吸弃 6 孔板中原培养液，同时用预冷的 PBS 清洗 2 次，各孔中分别加入 1.0mL Trizol 裂解细胞并将含细胞的裂解液转至无酶 EP 管，移液枪吹打至无明显沉淀静置 5min。向各 EP 管加入 0.2mL 三氯甲烷，剧烈震荡 15s，室温放置 2-3min。4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min，吸取上清 0.4mL 左右，转入到另一无酶 EP 管中，加入 0.5mL 的异丙醇，颠倒混匀，室温静置 10min。4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，小心弃去上清，加入 1.0mL 75%乙醇并颠倒混匀。4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 5 min，弃上清，室温干燥 2-5 分钟。加入 20 μ L DEPC 处理水溶解，保存于 80 $^{\circ}$ C待用。测定 RNA 的浓度和质量，并按照反转录试剂盒说明书进行反转录。反转录得到的 cDNA 进行 q RT-PCR 检测，其中 MafA 特异性引物：F:5'-atcactctgccaccatcac-3' (SEQ ID NO.3)，

R:5'-atgacctctctcttgctgaa-3'(SEQ ID NO.4)。PCR 体系为: F(10 μ M), 0.50 μ L; R(10 μ M), 0.50 μ L; c DNA 模板, 1.00 μ L; dd H₂O, 3.00 μ L; mix, 5.00 μ L。PCR 程序: 95°C, 2min;

(95°C, 30sec; 60°C, 30sec; 72°C, 20sec) *35; 72°C, 5min; 目的基因经过 Real-time PCR 检测后, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对基因表达分析。先用 CFX Manager 软件分析各组大鼠 INS-1 细胞目标基因的表达量, 再以正常组表达量为 1, 其他各组与之相比较, 计算各组基因表达水平。

CCK-8 法检测结果如图 19 所示, 与正常组相比, 高糖作用组细胞生长明显降低($P<0.05$), 罗格列酮对照组细胞增殖较高糖组有明显增加($P<0.05$), CCFM1052 组与高糖组相比细胞增殖状况也明显增加($P<0.05$)。

Maf A mRNA 表达情况如图 20 显示, 高糖作用组细胞的 MafA mRNA 的表达量明显低于正常组($P<0.05$), 而罗格列酮阳性对照组和 CCFM1052 组的 Maf A mRNA 表达量较高糖作用组明显上升($P<0.05$)。

实施例19 利用本发明干酪乳杆菌CCFM1052制造含该菌的发酵食品

(1) 制备果蔬饮料

选用新鲜蔬菜洗净后榨汁, 接着进行高温瞬间灭菌, 在温度140°C下高温热杀菌2秒后, 立即降温至37°C, 再接种本发明制备的干酪乳杆菌CCFM1052, 使其浓度达到 10^6 CFU/mL以上, 在温度4°C下冷藏保存, 于是得到含有本发明干酪乳杆菌CCFM1052活菌的果蔬饮料。所述果蔬包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜或圆白菜制品。

(2) 制备发酵乳制品

将干酪乳杆菌 CCFM1052 接种至乳制品或豆制品的原料中, 制备发酵乳制品或发酵豆制品; 所述发酵食品包括发酵乳制品或发酵豆制品; 所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪。

(3) 将干酪乳杆菌 CCFM1052 接种至固态、半固态或液态原料中发酵, 制备固态发酵食品、液态发酵食品、半固态发酵食品。

与干酪乳杆菌 CCFM1052 的应用效果类似, 干酪乳杆菌 CCFM1052 能够显著缓解全氟辛酸 (PFOA) 暴露造成的肝脏毒性和肠道菌群失调, 并能够显著缓解便秘的干酪乳杆菌 CCFM1052 及其用途; 含干酪乳杆菌 CCFM1052 的发酵食品能够在体外对 PFOA 具有高吸附作用, 不在肠道内定植, 显著缓解 PFOA 造成的肝脏氧化应激损伤和血清生化指标, 显著改善 PFOA 暴露造成的脾脏萎缩, 显著改善因 PFOA 暴露导致的肠道内 Clostridiaceae 科、Adlercreutzia 属、Allobaculum 属和 Bacteroides 属等肠道微生物的失调。显著改善因 PFOA 暴露造成的肠道菌群代谢紊乱, 显著提高肠道中乙酸和丙酸的含量。并能显著提高便秘小鼠的

粪便含水量和首粒黑便时间。此外，含干酪乳杆菌 CCFM1052 的发酵食品可显著提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达，具有缓解 PFOA 相关糖尿病的潜力。

本发明的干酪乳杆菌 CCFM1052 用于制备缓解 PFOA 毒性及便秘的药物组合及发酵食品，减少肝病、代谢类疾病和潜在的致癌性的发生，具有广泛的应用前景。

实施例 20 布氏乳杆菌 CCFM1053 的筛选和鉴定

（一）乳酸菌的分离筛选：

（1）取 100 μ L 泡菜水。将样品在含有山梨醇 MRS 培养基中 35 $^{\circ}$ C 富集 12h；

（2）将富集样品进行梯度稀释后涂布于添加了 0.02% 嗅甲酚紫的 MRS 固体平板上，培养 24-48h；

（3）选取变色圈明显，并且符合乳酸菌基本形态的单菌落进行平板划线纯化，筛选分离出乳酸菌；

（4）将上述单菌落培养于液体 MRS 培养液中培养 24h 后进行革兰氏染色，选取革兰氏阳性菌进行后续试验。

（二）乳杆菌的初步鉴定：溶钙圈测定法

（1）将步骤（一）所筛选得到的乳酸菌在液体山梨醇 MRS 培养液中培养 24 h，然后取 1 mL 培养物 8000 rpm 离心 2 min；

（2）用 0.05M KH_2PO_4 溶液洗涤两次；

（3）将所得菌泥重悬，划线在山梨醇 MRS-0.75% CaCO_3 的固体培养基上，培养 24 h；

（4）选取溶钙圈明显，且呈凸面圆形、细密色白、无菌丝体的菌落，革兰氏染色后显微镜观察菌体为杆状即初步判定为乳杆菌。

（三）布氏乳杆菌的分子生物学鉴定：

（1）单菌基因组抽提：

A. 将步骤（二）所筛选得到的乳酸菌培养过夜，取培养过夜的菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管，10000 rpm 离心 2min，弃上清得菌体；

B. 用 1 mL 无菌水吹洗菌体后，10000 rpm 离心 2min，弃上清得菌体；

C. 加入 200 μ L SDS 裂解液，80 $^{\circ}$ C 水浴 30min；

D. 加入酚-氯仿溶液 200 μ L 于菌体裂解液中，其中酚-氯仿溶液的组成成分及体积比为 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1，颠倒混匀后，12000rpm 离心 5-10min，取上清 200 μ L；

E. 加入 400 μ L 冰乙醇或冰异丙醇于 200 μ L 上清中，-20 $^{\circ}$ C 静置 1h，12000rpm 离心 5-10min，弃上清；

F. 加入 500 μ L70%（体积百分数）冰乙醇重悬沉淀，12000rpm 离心 1-3min，弃上清；

G. 60°C烘箱烘干，或者自然晾干；

H. 50 μ LddH₂O 重溶沉淀以备 PCR；

（2）16S rDNA PCR

A. 细菌 16S rDNA 50 μ LPCR 反应体系：

10 $\times$ Taq buffer, 5 μ L; dNTP, 5 μ L; 27F, 0.5 μ L; 1492R, 0.5 μ L; Taq 酶, 0.5 μ L; 模板, 0.5 μ L; ddH₂O, 38 μ L。

B. PCR 条件：

95°C 5min; 95°C10s; 55°C 30s; 72°C 30s; step2-4 30 $\times$; 72°C 5min; 12°C 2min;

（3）制备 1%琼脂糖凝胶，之后将 PCR 产物与 10 $\times$ loading buffer 混合，上样量 5 μ L，120V 跑 30min，然后进行凝胶成像；

（4）将 16S rDNA 的 PCR 产物进行测序分析，将得到的序列结果使用 BLAST 在 GeneBank 中进行搜索和相似性比对，选取测序结果鉴定为属于布氏乳杆菌的一种新发现的菌株，-80°C保藏备用。

实施例 21 布氏乳杆菌 CCFM1053 具有良好的 PFOA 吸附能力

对布氏乳杆菌 CCFM1053 和作为对照的其它乳酸菌进行纯化和活化培养，按 1%（v/v）接种量接种于 MRS 液体培养基中，37°C培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体，取沉淀用生理盐水清理后继续在 8000r/min 离心 5min，去沉淀得到活菌体细胞，即湿菌体。将湿菌体重悬于 10mg/LPFOA 溶液中，并使最终菌体浓度达到 1g 干菌体/L（将湿菌体重悬于不含 PFOA 的超纯水中作为空白对照）。使用 0.1M 的 NaOH 或 HCl 溶液将含菌液的 PFOA 溶液的 pH 迅速调整至 3.0，添加少量的 NaOH 或 HCl（少于 0.5ml）其离子强度对 PFOA 吸附的影响可以忽略。随后将装有 100ml 样液的 250ml 锥形瓶置于 37°C、150rpm 摇床培养，6h 后取样测定，2 次平行试验取平均值。

按照实施例 2 公开的方法进行测定，根据吸附前后 PFOA 的浓度差异计算乳酸菌对 PFOA 的吸附量。测定结果列于图 21，CCFM1053 对 10mg/L 的 PFOA 的吸附率为 67.5% $\pm$ 1.2%，其余乳酸菌的 PFOA 吸附率不及 40%。

实施例 22 布氏乳杆菌 CCFM1053 显著改善 PFOA 暴露小鼠脾脏萎缩

将 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只，适应环境一周后，根据体重随机分为五组：对照组、模型组、槲皮素干预组、布氏乳杆菌 CCFM1053 干预组、LGG 干预组，每组含 10 只小鼠，动物分组及处理方法同实施例 4。

结果如图 22 所示, 结果表明服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著逆转由于 PFOA 染毒造成的小鼠脾脏萎缩。

实施例 23 布氏乳杆菌 CCFM1053 显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 ALT、AST 和 γ -GT 的水平

取实施例 22 中的血清, 采用全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST 和 γ -GT 的含量。ALT 主要存在于肝细胞原浆的可溶部分, ALT 活性升高提示肝细胞遭到破坏, 细胞膜通透性增强。AST 主要存在于肝细胞线粒体中, AST 活性提高提示线粒体损伤。结果表明(图 23), 服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠血清中 ALT、AST 和 γ -GT 的含量。表明服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著缓解 PFOA 造成的小鼠肝细胞膜结构和功能的损伤。使 ALT 由 PFOA 模型组的 $68.8 \pm 15.2 \text{ U/L}$ 降低至 $38.3 \pm 8.9 \text{ U/L}$, 使 AST 由 PFOA 模型组的 $240.7 \pm 48.2 \text{ U/L}$ 降低至 $170.5 \pm 9.8 \text{ U/L}$, 使 γ -GT 由 PFOA 模型组的 $310.5 \pm 80.3 \text{ U/L}$ 降低至 $160.3 \pm 20.4 \text{ U/L}$ 。

实施例 24 布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肝脏中 MDA 和 GSH 的水平

取实施例 22 中的小鼠肝脏制成 10% 匀浆, 采用购买自南京建成研究所的试剂盒检测肝脏中 MDA 和 GSH 的水平。GSH 是体内重要的抗氧化酶, 对 ROS 具有重要的清除作用。MDA 是脂质过氧化过程中 ROS 的终产物, 可直接反应脂质过氧化水平。结果表明(图 24), 服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能够显著降低 PFOA 暴露小鼠肝脏中 MDA 和 GSH 的含量。说明布氏乳杆菌 CCFM1053 对 PFOA 造成的肝脏氧化应激损伤能起到有效的改善效果。

实施例 25 布氏乳杆菌 CCFM1053 显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中的丰度 *Allobaculum* 属的丰度, 提高拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科丰度, 改善 PFOA 暴露造成的肠道紊乱, 减少肝病的发生

取实施例 22 中小鼠第 12 天的新鲜粪便, 采用 MP 的粪便试剂盒提取小鼠粪便样品中总 DNA。具体操作步骤如下主要参照试剂盒说明书进行。以小鼠粪便基因组为模板, 上游引物 520F (5'-AYTG GGYDTAAAGNG-3', SEQ ID NO.1)、下游引物 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3', SEQ ID NO.2) 为引物扩增 16S rDNA 的 V3-V4 区片段, 目的片段长度为 247bp 左右。PCR 反应结束, 将观察到目的条带的所有 PCR 样品再次进行电泳, 配制 2.0% 琼脂糖凝胶, 于 120V 条件下电泳 40min, 跑胶结束后, 在紫外灯下快速进行目的条带的切割。按照 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒说明书进行目的条带胶回收。根据 Qubit DNA3.0 试剂盒检测样品 DNA 浓度, 随后根据 TurSeq DNA LT Sample Preparation Kit 及其说明构建文库, 最后根据 MiSeq Reagent Kit 及其说明经过 Illumina MiSeq 测序仪上机

测定。测序完成后，剔除掉序列长度 <200 bp、引物序列、不能拼接的单序列，按照重叠碱基 >10 bp 且无错配的标准拼接序列。将相似度大于 97%序列定义为一个分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)，通过 Ribosomal Database Project (RDP) Naïve Bayes classifier 来确定物种。计算样品的 α -多样性、 β -多样性，用来评估样品的菌群多样性。其中 α -多样性用 chao1 和 shannon 指数来表征，图 25 结果显示模型组小鼠的肠道菌群 α 多样性升高，说明 PFOA 暴露会伴随着一定程度的肠道紊乱。服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能明显降低肠道菌群的 α 多样性，改善肠道紊乱情况。

此外，图 26 结果显示，服用布氏乳杆菌 CCFM1053 还能显著提高 PFOA 染毒小鼠中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科的丰度。拟杆菌属 (*Bacteroides*) 又称类杆菌属，是拟杆菌科的一属，为革兰氏染色阴性、无芽孢、专性厌氧的小杆菌。拟杆菌属正常寄居于人和动物的肠道、口腔、上呼吸道和生殖道。拟杆菌是人和动物体内大量存在的正常菌群，约占成年个体肠道菌群的 1/4 以上。是肠道细菌的营养来源；能够调节多种宿主基因的表达，包括那些涉及营养吸收，黏膜屏障强化和血管因子生成的基因；激活 T 细胞依赖性免疫应答；影响潘氏细胞蛋白的表达；限制病原体在胃肠道的定植。而 Eubacteriaceae 与肝性脑病，即肝硬化中功能失调的肠-肝-脑轴的恢复有关，在严重肥胖患者的胆肠道旁路术后其丰度显著减少。服用布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著降低 PFOA 暴露小鼠肠道中 *Allobaculum* 属的丰度，*Allobaculum* 属丰度增加有可能作为雌性肝细胞癌风险指标之一，并且是致癌物暴露引起的宿主癌症发生前的关键变量之一。以上结果表明布氏乳杆菌 CCFM1053 在缓解 PFOA 毒性的基础上，还同时具备调节肠道菌群、调节免疫及肠道屏障、减少肝病的发生。

实施例 26 布氏乳杆菌 CCFM1053 对小鼠便秘的缓解作用

取 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只 (20-25g)，随机分为 5 组：空白对照组、便秘模型对照组、布氏乳杆菌 CCFM1053 干预组、植物乳杆菌对照组和酚酞治疗对照组，每组含小鼠 10 只。

将布氏乳杆菌 CCFM1053 冻干菌粉重悬于脱脂乳粉中，制成浓度为 4.0×10^9 CFU/mL 的菌悬液。实验前 14 天每天给干预组小鼠灌喂制备的浓度为 4.0×10^9 CFU/mL 的布氏乳杆菌 CCFM1053 脱脂乳悬液 0.25mL，植物乳杆菌组灌胃等量的 *L. plantarum* ST-III，其余 3 组灌喂等量的不含菌的脱脂乳。试验第 15-17 天，阴性对照组灌胃 0.25mL 生理盐水，其余四组灌胃 0.25mL，1mg/mL 的洛哌丁胺溶液，确保小鼠洛哌丁胺的灌胃量为 10 mg/kgBW。

灌胃结束 1h 后，阴性对照组和便秘模型对照组灌胃脱脂乳，布氏乳杆菌 CCFM1053 干预组小鼠灌喂制备的浓度 4.0×10^9 CFU/mL 的布氏乳杆菌 CCFM1053 0.25mL，酚酞治疗对照组灌胃 0.25mL，7mg/mL 的酚酞溶液，确保小鼠酚酞灌胃量为 70 mg/kgBW。植物乳杆菌组

灌胃 0.25mL, 4.0×10^9 CFU/mL 的 *L. plantarum* ST-III。

实验期间的每天收集小鼠粪便，用于小鼠粪便含水量的计算，按下式计算粪便含水量：

粪便含水量 (%) = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重 $\times 100$ 。

结果见图 27，布氏乳杆菌 CCFM1053 能够缓解便秘，提高粪便的含水量，并使粪便含水量略高于对照组。

第 17 天上午除空白对照组灌胃生理盐水，其余组均灌胃洛哌丁胺，灌胃 1h 后，对所有小鼠灌胃活性炭阿拉伯树胶水溶液 0.25mL，然后将每只小鼠单独放置在一个干净的铺有吸水纸的不锈钢笼中，记录从灌胃活性炭开始到第一粒黑便排出的时间 (min)，作为首粒排黑便时间，用于评价布氏乳杆菌 CCFM1053 对小鼠便秘的缓解作用，期间小鼠自由进食和饮水。结果如图 28，布氏乳杆菌 CCFM1053 能够缩短首粒黑便的排出时间，其效果优于植物乳杆菌 ST-III。

实施例 27 布氏乳杆菌 CCFM1053 可促进高糖诱导的 INS-1 细胞的增殖及 Maf A mRNA 表达

实验分成 5 组：正常组(含 11.1 mmol/L 葡萄糖的普通培养液)，高糖组(含 22.2 mmol/L 葡萄糖的高糖培养液)，罗格列酮组(高糖培养液+80 μ mol/L 的罗格列酮)，CCFM1053 组(高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL CCFM1053 菌液) LGG 组(高糖培养液+含 1×10^9 CFU/mL LGG 菌液)。

将 INS-1 细胞(编号：BH-AC0530)培养于 RPMI-1640 培养液(含 11.1 mmol/L 葡萄糖，10%FBS，50 μ mol/L 2-巯基乙醇，1 mmol/L 丙酮酸，10 mmol/L HEPES)中，并放入 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱中。

CCK-8 法检测细胞增殖：将状态良好的细胞消化离心并接种于 96 孔板上，各孔约 5×10^3 个细胞，板的周边孔不接种细胞，为防止边缘效应同时向其中加入 PBS 溶液。待细胞贴壁，各孔中加入含 0.5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，同步化处理 24h。同步化结束，依据分组向各孔加入相应培养基培养 48h，每组设三个复孔，同时设置调零孔。药物干预结束，吸去旧培养基，PBS 清洗 2 次，加入 180 μ L 无血清培养基和 20 μ L CCK-8 溶液，孵育 3-4h。孵育结束，使用酶标仪于 450nm 下测定各孔吸光度值。

Maf A mRNA 表达的测定：Trizol 法提取 RNA，吸弃 6 孔板中原培养液，同时用预冷的 PBS 清洗 2 次，各孔中分别加入 1.0mL Trizol 裂解细胞并将含细胞的裂解液转至无酶 EP 管，移液枪吹打至无明显沉淀静置 5min。向各 EP 管加入 0.2mL 三氯甲烷，剧烈震荡 15s，室温放置 2-3min。4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min，吸取上清 0.4mL 左右，转入到另一无酶 EP 管中，加入 0.5mL 的异丙醇，颠倒混匀，室温静置 10min。4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，

小心弃去上清, 加入 1.0mL 75%乙醇并颠倒混匀。4℃, 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 室温干燥 2-5 分钟。加入 20μL DEPC 处理水溶解, 保存于 80℃待用。测定 RNA 的浓度和质量, 并按照反转录试剂盒说明书进行反转录。反转录得到的 cDNA 进行 q RT-PCR 检测, 其中 MafA 特异性引物: F:5'-atcactctgccaccatcac-3'(SEQ ID NO.3), R:5'-atgacctcctccttgctgaa-3'(SEQ ID NO.4)。PCR 体系为: F(10 μM), 0.50μL; R(10 μM), 0.50μL; cDNA 模板, 1.00μL; dd H₂O, 3.00μL; mix, 5.00μL。PCR 程序: 95℃, 2min; (95℃, 30sec; 60℃, 30sec; 72℃, 20sec)*35; 72℃, 5min; 目的基因经过 Real-time PCR 检测后, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对基因表达分析。先用 CFX Manager 软件分析各组大鼠 INS-1 细胞目标基因的表达量, 再以正常组表达量为 1, 其他各组与之相比较, 计算各组基因表达水平。

CCK-8 法检测结果如图 29 所示, 与正常组相比, 高糖作用组细胞生长明显降低($P<0.05$), 罗格列酮对照组细胞增殖较高糖组有明显增加 ($P<0.05$), CCFM1053 组与高糖组相比细胞增殖状况也明显增加 ($P<0.05$)。

Maf A mRNA 表达情况如图 30 显示, 高糖作用组细胞的 MafA mRNA 的表达量明显低于正常组 ($P<0.05$), 而罗格列酮阳性对照组和 CCFM1053 组的 Maf A mRNA 表达量较高糖作用组明显上升 ($P<0.05$)。

实施例28 利用布氏乳杆菌CCFM1053制造发酵食品

(1) 制备果蔬饮料

选用新鲜蔬菜洗净后榨汁, 接着进行高温瞬间灭菌, 在温度140℃下高温热杀菌2秒后, 立即降温至37℃, 再接入本发明制备的布氏乳杆菌CCFM1053菌剂发酵剂, 使其浓度达到 10^6 CFU/mL以上, 在温度4℃下冷藏保存, 于是得到含有本发明布氏乳杆菌CCFM1053活菌的果蔬饮料。所述果蔬包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜或圆白菜制品。

(2) 制备发酵乳制品

将布氏乳杆菌 CCFM1053 接种至乳制品或豆制品的原料中, 制备发酵乳制品或发酵豆制品; 所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪。

(3) 将布氏乳杆菌 CCFM1053 接种至固态、半固态或液态原料中发酵, 制备固态发酵食品、液态发酵食品、半固态发酵食品。

与布氏乳杆菌 CCFM1053 菌体的应用效果类似, 服用布氏乳杆菌 CCFM1053 制备的发酵食品能够显著改善因 PFOA 暴露造成的小鼠脾脏萎缩; 显著升高 PFOA 暴露小鼠血清中 TNF- α 含量; 所述布氏乳杆菌 CCFM1053 显著升高 PFOA 暴露小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT 的含

量;所述布氏乳杆菌 CCFM1053 能够将 PFOA 暴露小鼠肝脏中 MDA 的含量降低到正常水平,并降低了 GSH 活性。明显改善肠道菌群紊乱,降低肠道中 *Allobaculum* 属的丰度,升高拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和 Eubacteriaceae 科的丰度,减少肝病的发生。所述布氏乳杆菌 CCFM1053 能显著提高便秘小鼠的粪便含水量和首粒黑便排出时间,缓解小鼠的便秘情况。布氏乳杆菌 CCFM1053 还能够提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达、缓解 PFOA 相关糖尿病。

实施例29 含发酵乳杆菌CCFM1051的药物的制备

将发酵乳杆菌 CCFM1051 进行纯化和活化培养,按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中,37°C培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体。

将发酵乳杆菌 CCFM1051 菌体细胞与药学上可接受的载体混合,制备药物。

所述药学上可接受的载体包括但不限于赋形剂,赋形剂包括但不限于乳糖,右旋糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,淀粉,阿拉伯树胶,磷酸钙,藻酸盐,黄蓍胶,明胶,硅酸钙,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,纤维素,水,糖浆和甲基纤维素。

所述药学上可接受的载体包括但不限于益生元;所述益生元选自低聚果糖、低聚半乳糖和乳糖醇中的一种或几种。

实施例30 含干酪乳杆菌CCFM1052的药物的制备

将干酪乳杆菌 CCFM1052 进行纯化和活化培养,按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中,37°C培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体。

将干酪乳杆菌 CCFM1052 菌体细胞与药学上可接受的载体混合,制备药物。

所述药学上可接受的载体包括但不限于赋形剂,赋形剂包括但不限于乳糖,右旋糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,淀粉,阿拉伯树胶,磷酸钙,藻酸盐,黄蓍胶,明胶,硅酸钙,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,纤维素,水,糖浆和甲基纤维素。

所述药学上可接受的载体包括但不限于益生元;所述益生元选自低聚果糖、低聚半乳糖和乳糖醇中的一种或几种。

实施例31 含布氏乳杆菌CCFM1053的药物的制备

将布氏乳杆菌 CCFM1053 进行纯化和活化培养,按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中,37°C培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体。

将布氏乳杆菌 CCFM1053 菌体细胞与药学上可接受的载体混合,制备药物。

所述药学上可接受的载体包括但不限于赋形剂,赋形剂包括但不限于乳糖,右旋糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,淀粉,阿拉伯树胶,磷酸钙,藻酸盐,黄蓍胶,明胶,硅酸钙,微

晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，水，糖浆和甲基纤维素。

所述药学上可接受的载体包括但不限于益生元；所述益生元选自低聚果糖、低聚半乳糖和乳糖醇中的一种或几种。

实施例 32 含益生菌的药物的制备

将发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 分别按照如下方法制备菌体细胞。将单菌落在液体培养基中活化后，按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中，37°C 培养 18h。然后在 8000r/min 离心 5min 收集菌体。

将发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 中的一种或多种乳杆菌与其它药学或食品上允许的益生菌组合，制备药物。

所述药物还可含有药学上可接受的载体，包括但不限于赋形剂、稀释剂。

所述赋形剂包括但不限于乳糖，右旋糖，蔗糖，山梨糖醇，甘露醇，淀粉，阿拉伯树胶，磷酸钙，藻酸盐，黄耆胶，明胶，硅酸钙，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，水，糖浆和甲基纤维素。

所述稀释剂包括但不限于：生理盐水或糖浆。

实施例 33 含益生菌的发酵剂的制备

将发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052、布氏乳杆菌 CCFM1053 分别按照如下方法制备菌体细胞。将单菌落在液体培养基中活化后，按 1% (v/v) 接种量接种于 MRS 液体培养基中，37°C 培养 18h，制得发酵剂。

或将上述细胞培养液离心，收集乳杆菌细胞，加入细胞保护剂，使益生菌的浓度 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/mL。

可选地，对加入细胞保护剂的细胞悬液进行真空冷冻干燥，制备获得粉末状发酵剂，使益生菌的浓度 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g。

所述细胞保护剂包括但不限于：甘油、DMSO、乙二醇、丙二醇、乙酰胺、甲醇、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、蔗糖、聚乙二醇、葡聚糖、白蛋白、羟乙基淀粉中的一种或多种的混合。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1. 乳杆菌，其特征在于，为 (a) 或 (b) 或 (c)：

(a) 发酵乳杆菌 CCFM1051，分类命名为 *Lactobacillus fermentum*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60649；

(b) 干酪乳杆菌 CCFM1052，分类命名为 *Lactobacillus casei*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60650；

(c) 布氏乳杆菌 CCFM1053，分类命名为 *Lactobacillus buchneri*，已于 2019 年 4 月 29 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No: 60651。

2. 含有权利要求 1 所述乳杆菌的组合物。

3. 一种发酵食品，其特征在于，所述发酵食品为使用发酵乳杆菌 CCFM1051 发酵生产制得。

4. 根据权利要求 3 所述的发酵食品，其特征在于，所述发酵食品为固态食品、液态食品或半固态食品。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的发酵食品，其特征在于：所述发酵食品包括乳制品、豆制品、果蔬制品。

6. 根据权利要求 5 所述的发酵食品，其特征在于，所述乳制品包括牛奶、酸奶油、干酪；所述果蔬制品包括黄瓜、胡萝卜、甜菜、芹菜、圆白菜制品。

7. 权利要求 1 所述的发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052 或布氏乳杆菌 CCFM1053 在制备体内非定植益生菌中的应用。

8. 含有权利要求 1 所述乳杆菌的发酵剂，其特征在于，所述发酵剂中的乳杆菌数量 $\geq 1 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ 或 $\geq 1 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 。

9. 一种药物，其特征在于，含有权利要求 1 所述的发酵乳杆菌 CCFM1051、干酪乳杆菌 CCFM1052 或布氏乳杆菌 CCFM1053 中的至少一种乳杆菌。

10. 根据权利要求 9 所述的药物，其特征在于，还含有药学上可接受的载体。

11. 根据权利要求 10 所述的药物，其特征在于，所述药学上可接受的载体包括但不限于赋形剂、稀释剂；

所述赋形剂包括但不限于乳糖，右旋糖，蔗糖，山梨糖醇，甘露醇，淀粉，阿拉伯树胶，磷酸钙，藻酸盐，黄蓍胶，明胶，硅酸钙，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，水，糖浆和甲基纤维素；

所述稀释剂包括但不限于：生理盐水或糖浆。

12. 根据权利要求 9~11 任一所述的药物，其特征在于，所述药物具有如下至少一种用途：

(a) 缓解 PFOA 的毒性作用；

- (b) 预防、治疗或缓解便秘；
- (c) 抗肝病或减少肝病的发生；
- (d) 抗高血压或降低血压；
- (e) 抗肥胖或改善肥胖引起的代谢类疾病；
- (f) 提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达，或缓解 PFOA 相关糖尿病。

13. 权利要求 1 所述的乳杆菌在制备缓解 PFOA 的毒性作用、预防和治疗便秘、抗肝病、抗高血压、抗肥胖的药物和保健品中的应用。

14. 根据权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述药物和保健品能够吸附 PFOA、清除二苯基三硝基苯肼自由基、清除羟自由基、抗氧化、改善因 PFOA 暴露造成的脾脏萎缩、降低 PFOA 暴露后血清中 IL-4 含量、升高 PFOA 暴露后血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转肽酶的含量、改善 PFOA 暴露后的肠道菌群紊乱、降低肠道中 S24-7 科、乳酸菌属的丰度、升高拟杆菌属和 Eubacteriaceae 科的丰度，减少肝病、高血压和肥胖的发生、提高便秘患者粪便含水量和首粒黑便排出时间、改善便秘情况。

15. 根据权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述药物和保健品具有提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达、缓解 PFOA 相关糖尿病的功能。

16. 权利要求 2~6 任一所述的发酵食品在制备缓解 PFOA 毒性、抗肝病、抗高血压、抗肥胖的功能性食品中的应用。

17. 根据权利要求 16 所述的应用，其特征在于，所述功能性食品用于吸附 PFOA、清除二苯基三硝基苯肼自由基、清除羟自由基、抗氧化、改善因 PFOA 暴露造成的脾脏萎缩、降低 PFOA 暴露后血清中 IL-4 含量、升高 PFOA 暴露后血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转肽酶的含量、改善 PFOA 暴露后的肠道菌群紊乱、降低肠道中 S24-7 科、乳酸菌属的丰度、升高拟杆菌属和 Eubacteriaceae 科的丰度，减少肝病、高血压和肥胖的发生、提高便秘患者粪便含水量和首粒黑便排出时间、改善便秘情况。

18. 根据权利要求 16 所述的应用，其特征在于，所述功能性食品能够提高高糖作用下 INS-1 细胞的增殖和 MafA 基因的表达、缓解 PFOA 相关糖尿病。

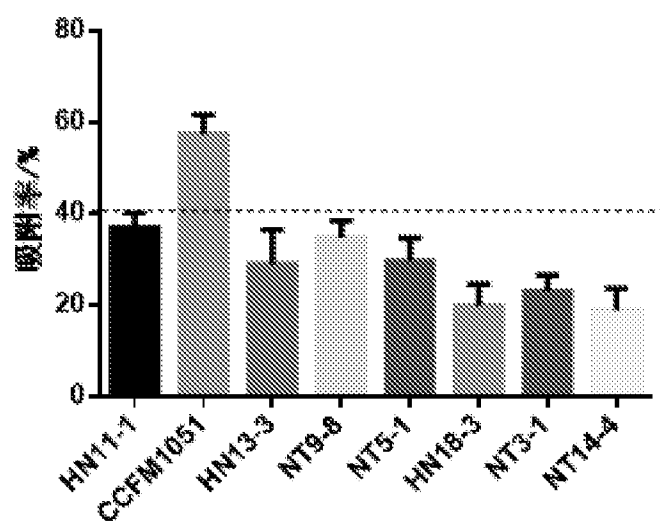


图 1

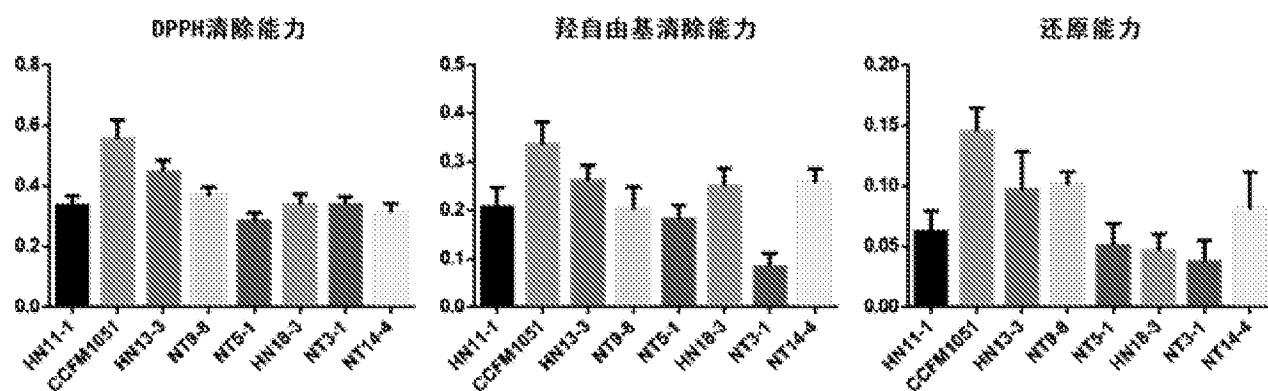


图 2

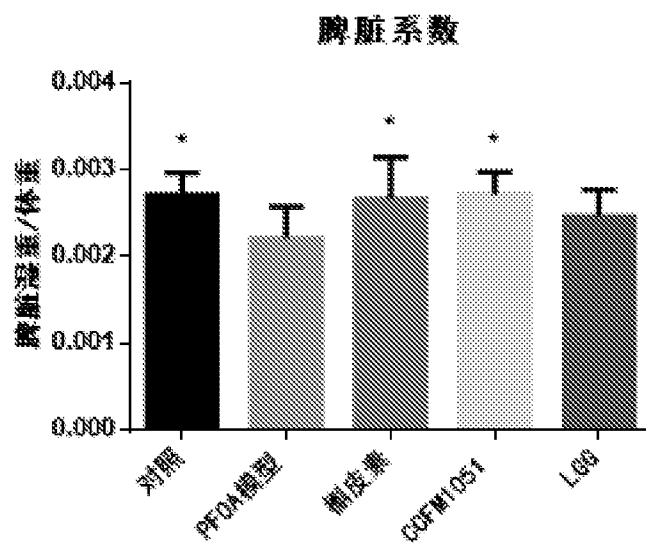


图 3

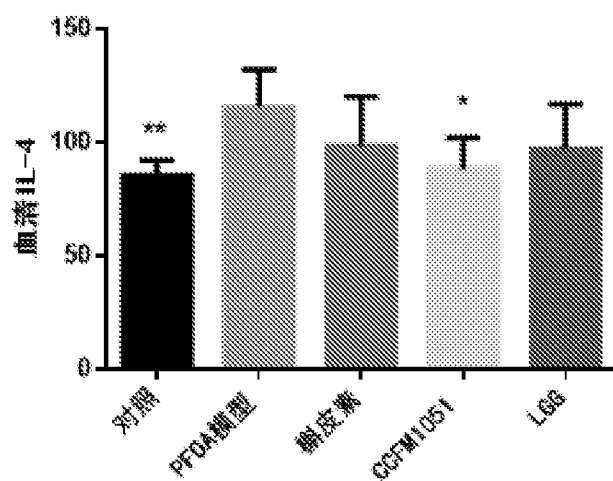


图 4

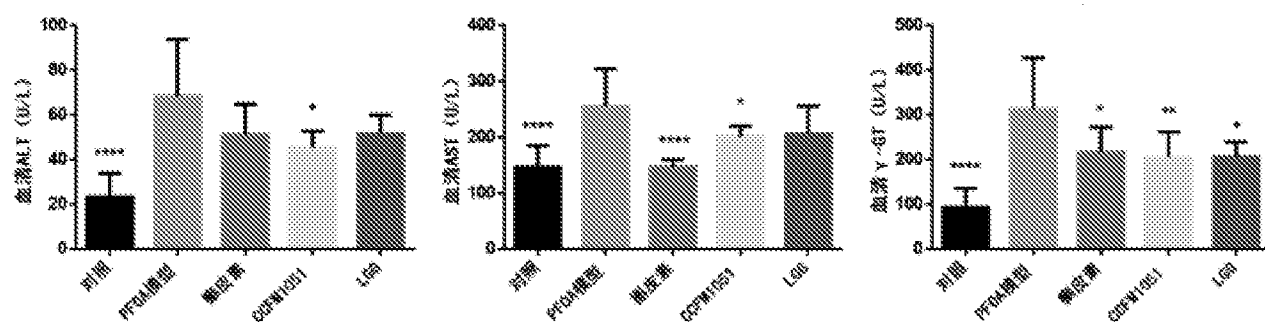


图 5

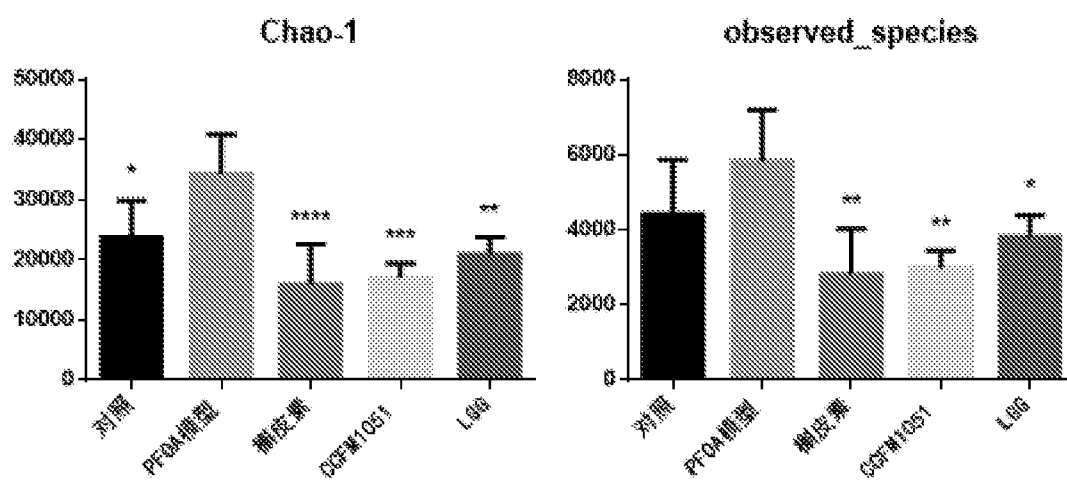


图 6

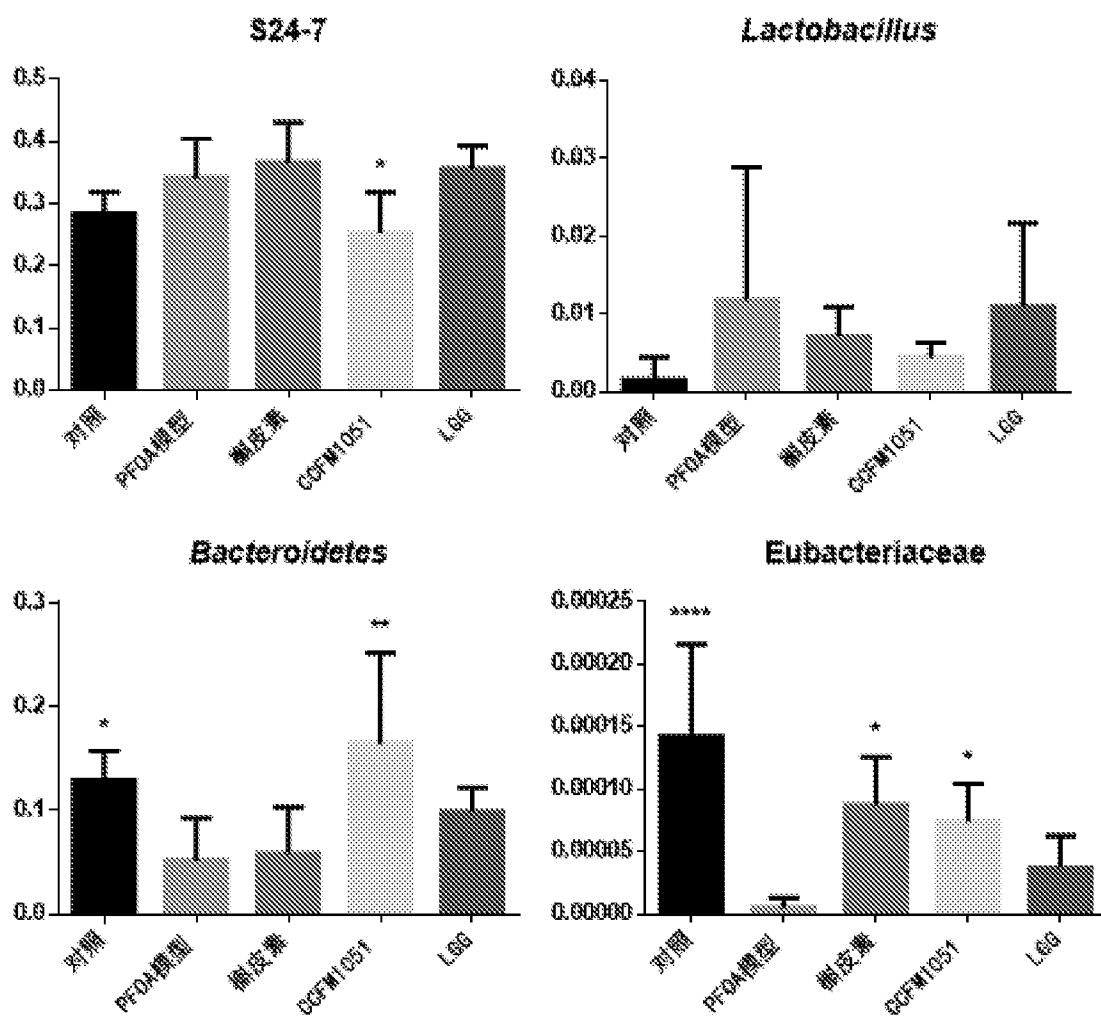


图 7

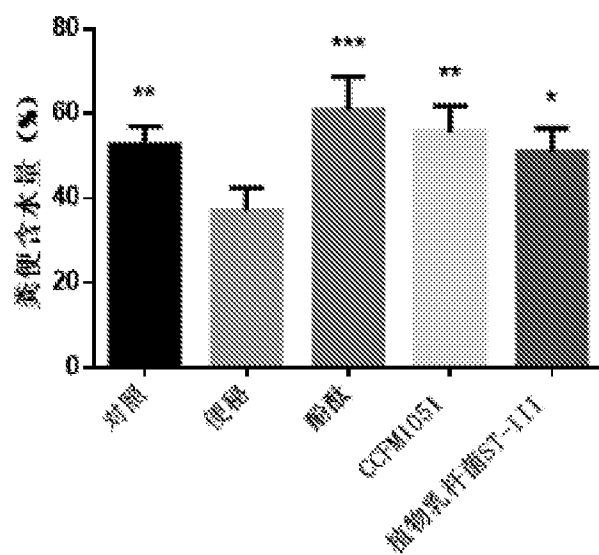


图 8

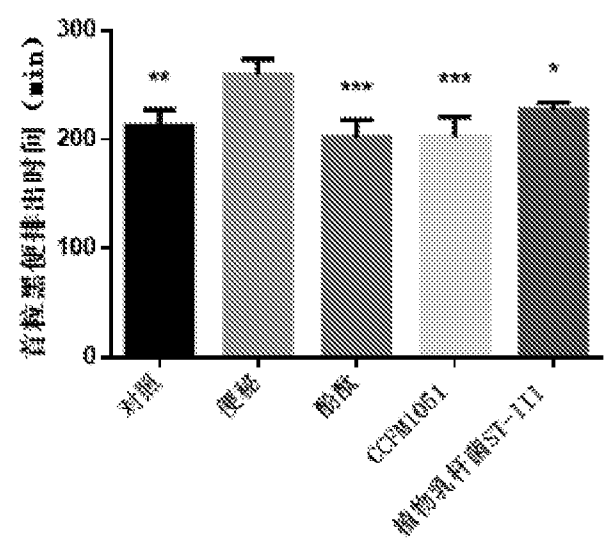


图 9

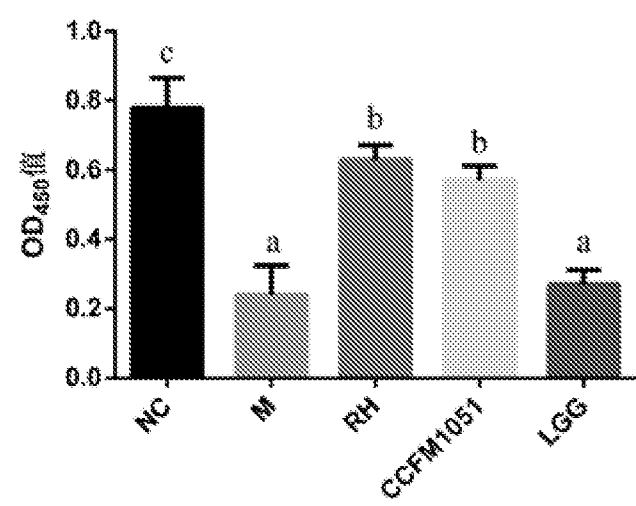


图 10

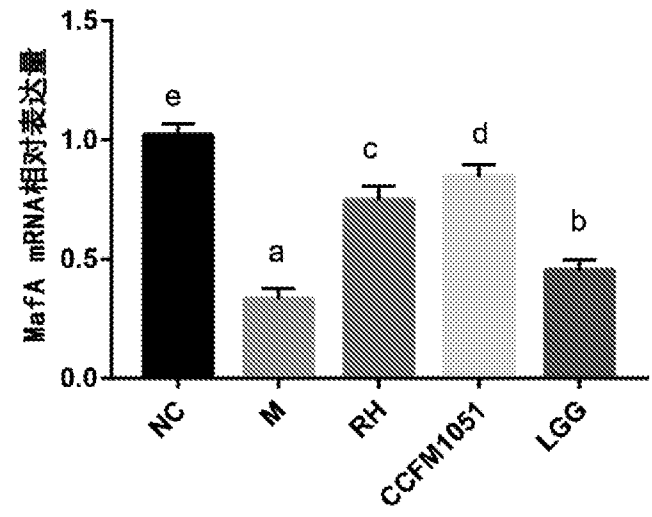


图 11

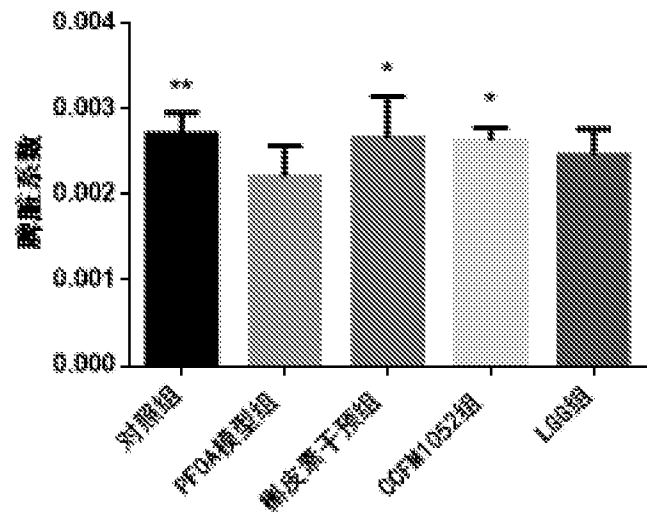


图 12

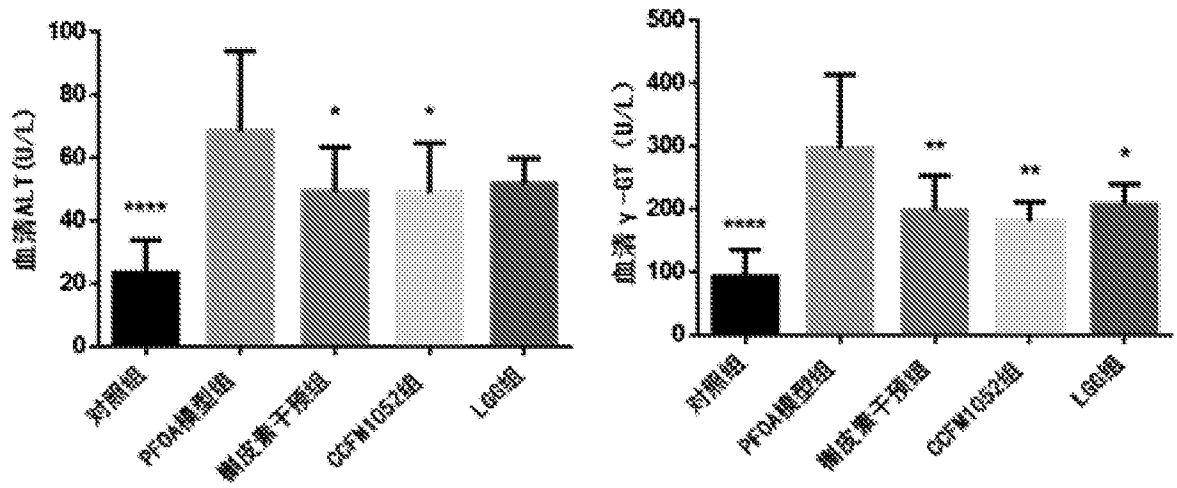


图 13

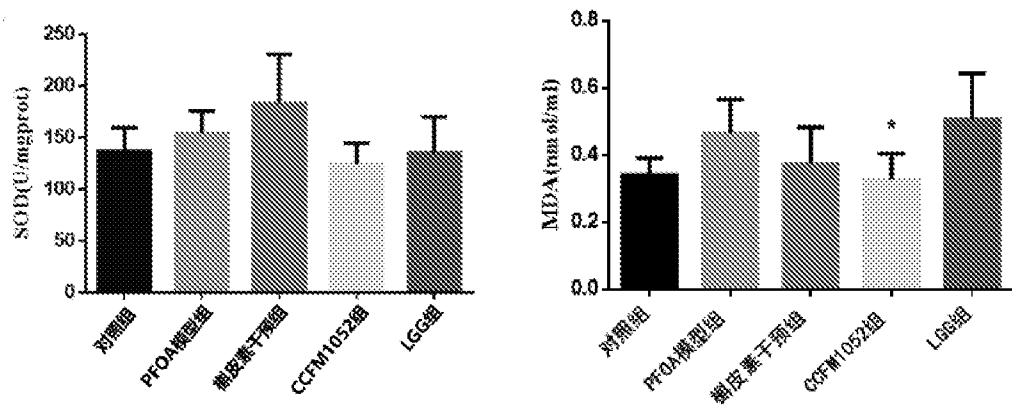


图 14

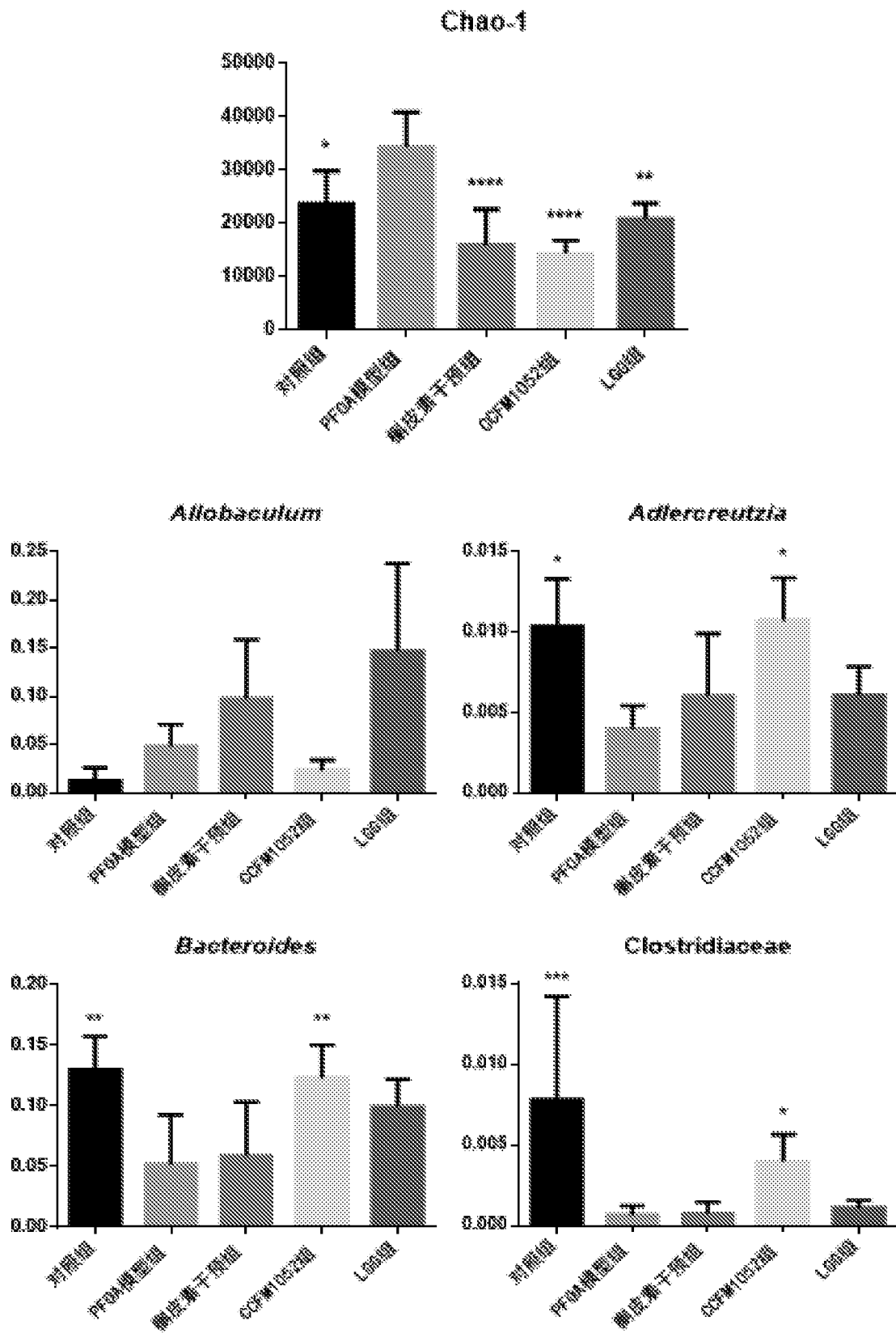


图 15

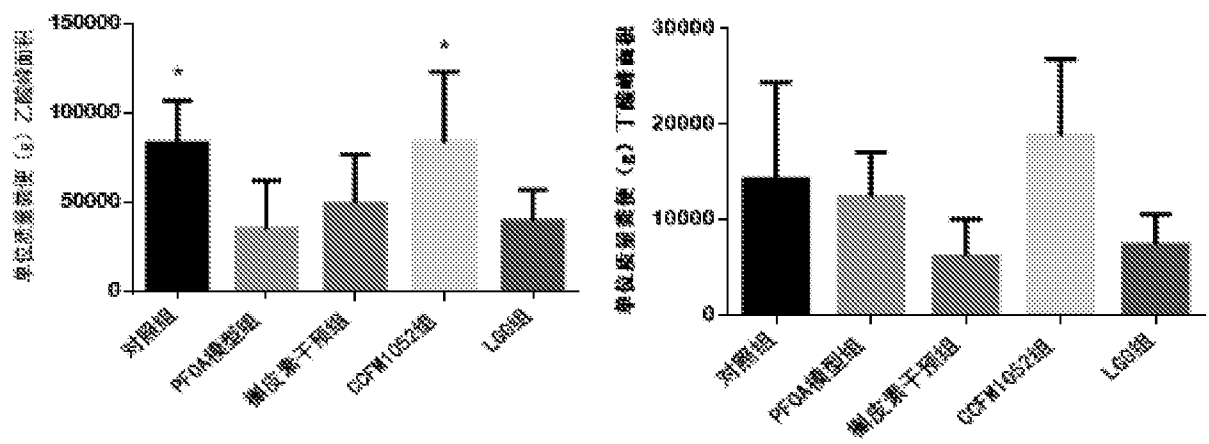


图 16

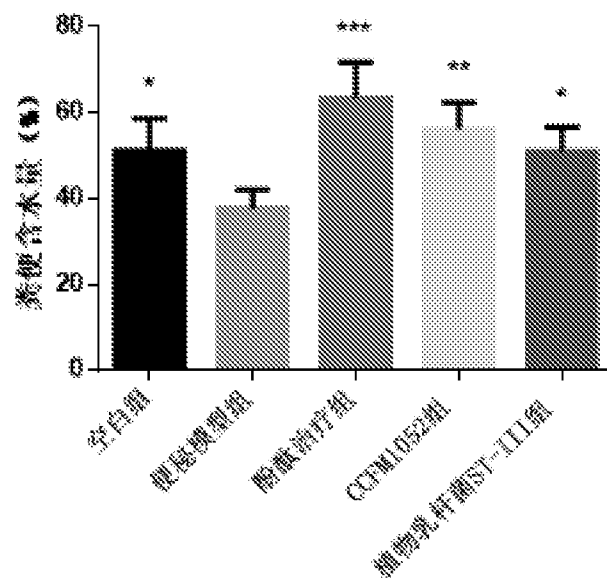


图 17

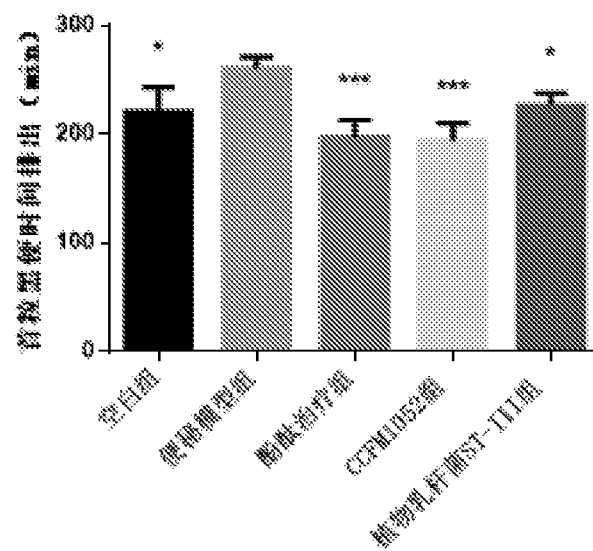


图 18

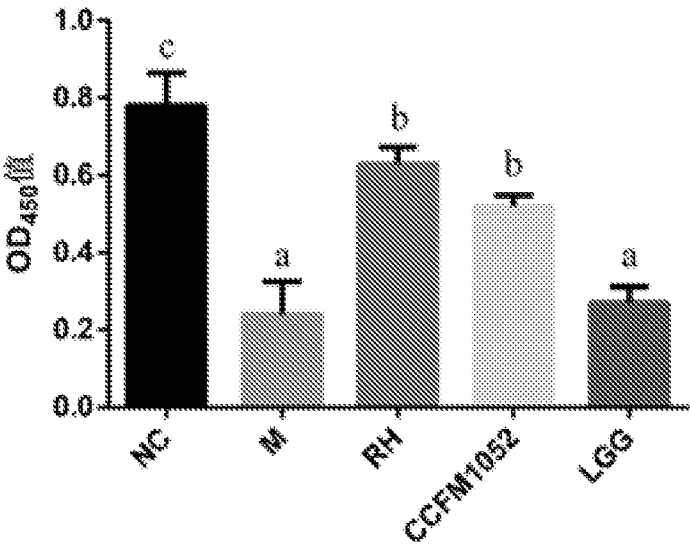


图 19

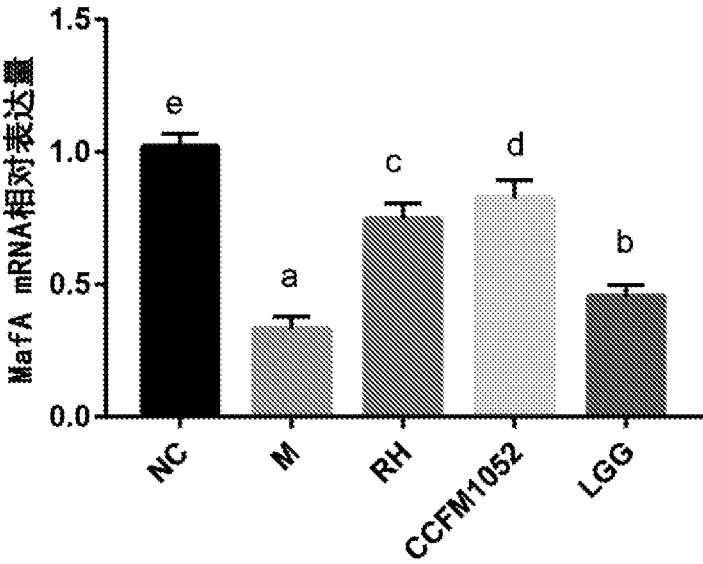


图 20

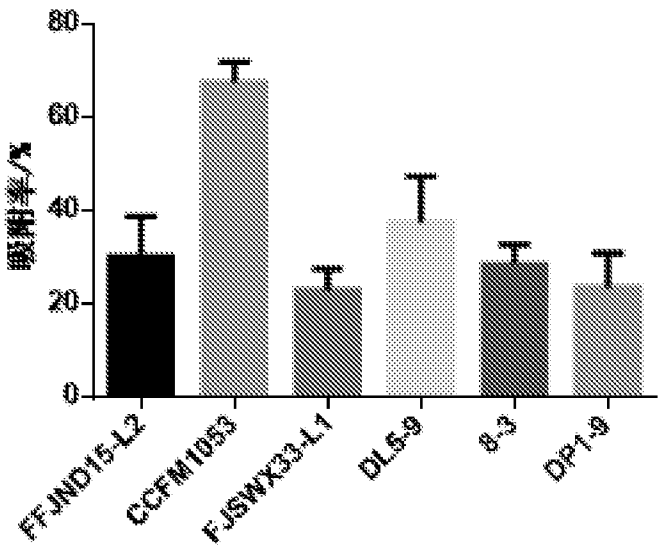


图 21

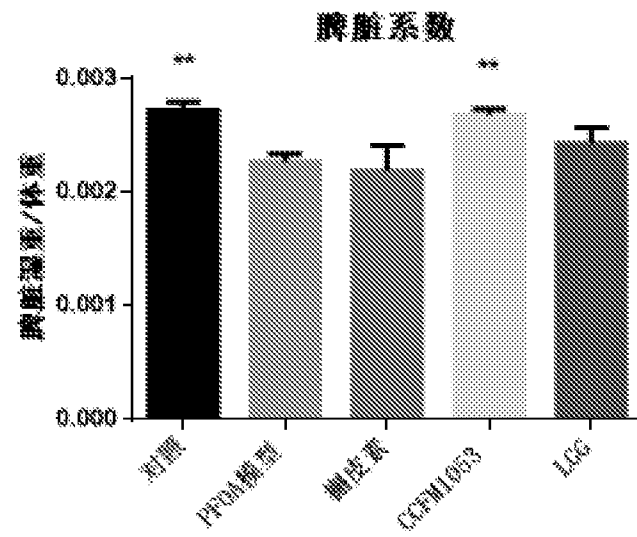


图 22

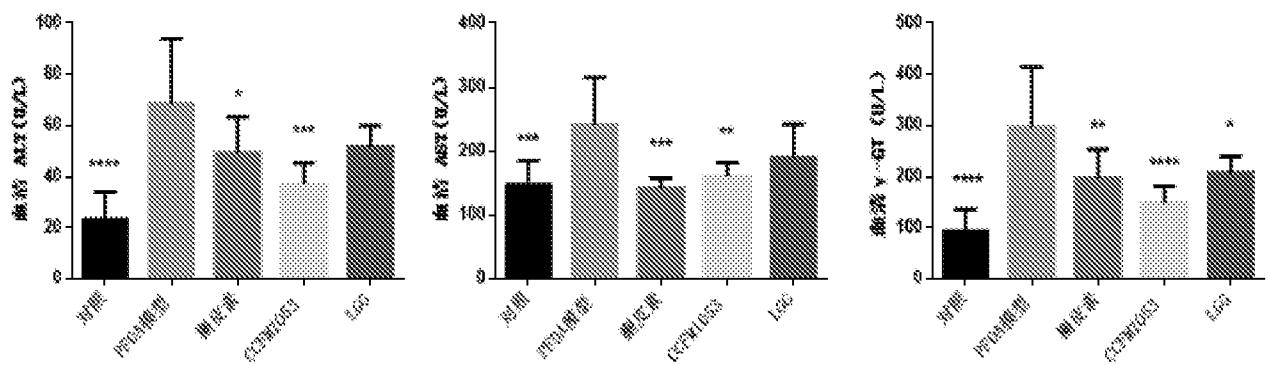


图 23

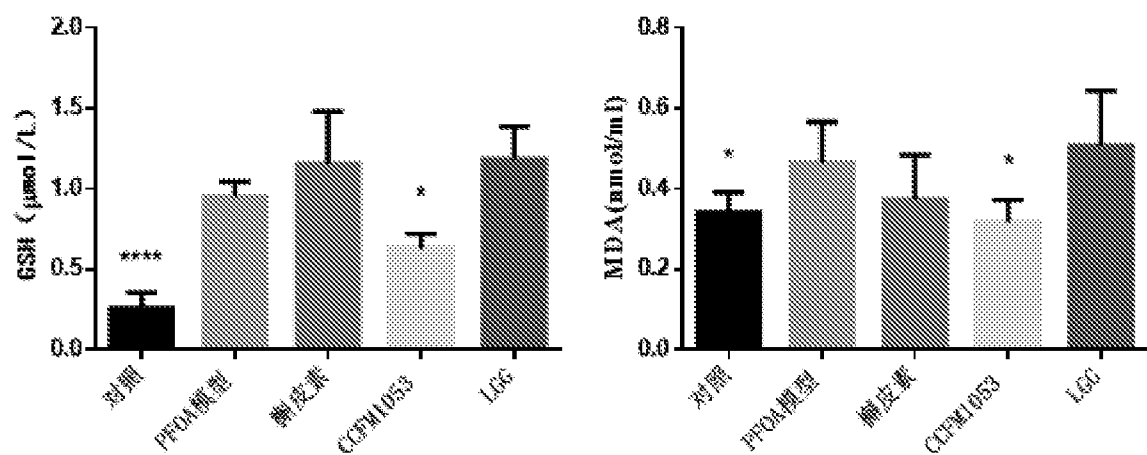


图 24

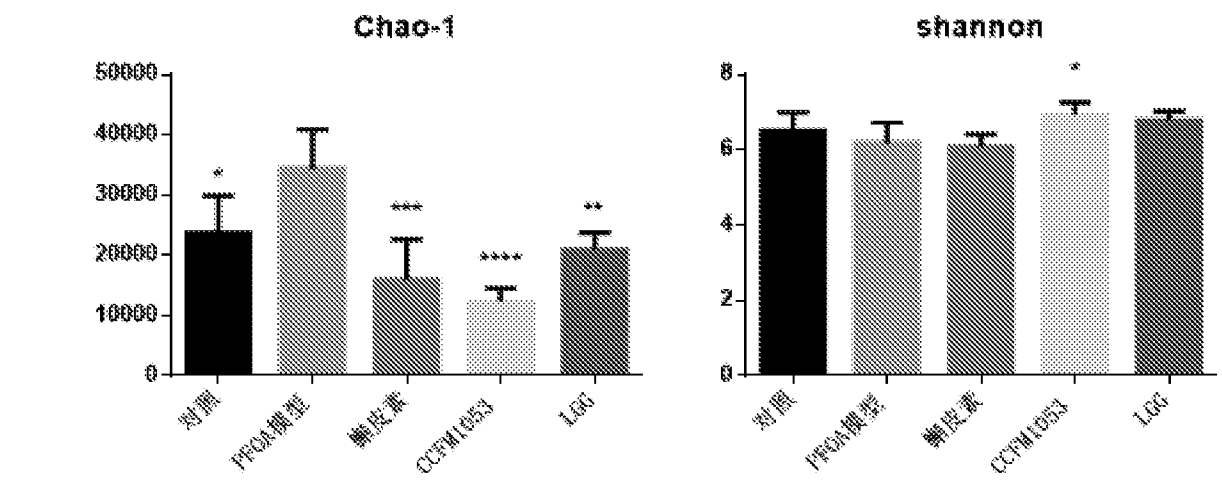


图 25

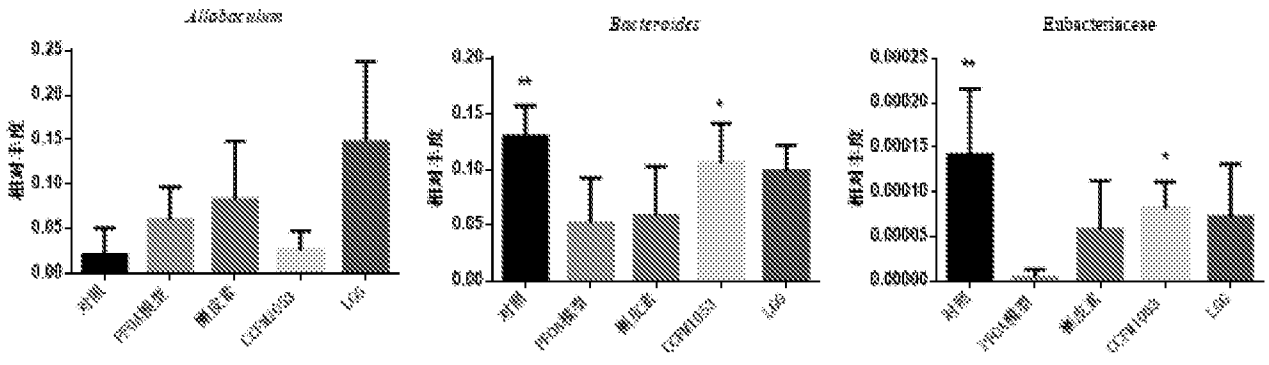


图 26

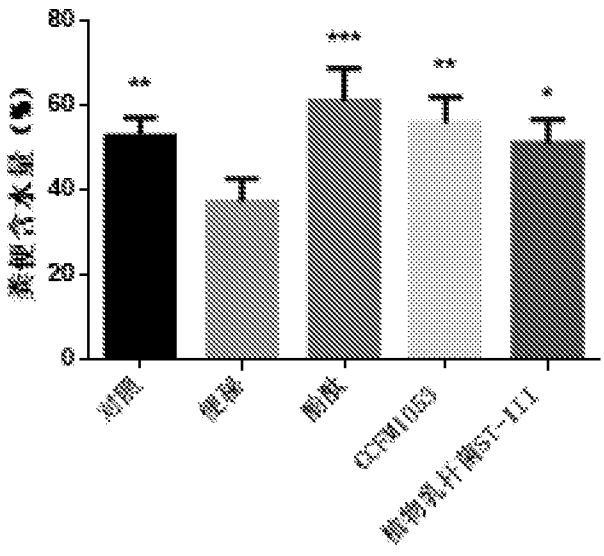


图 27

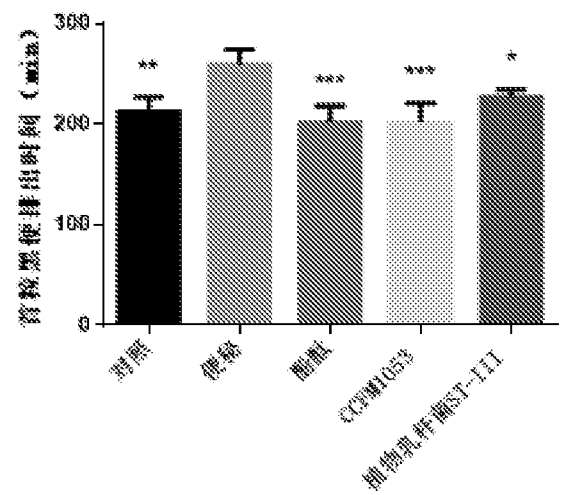


图 28

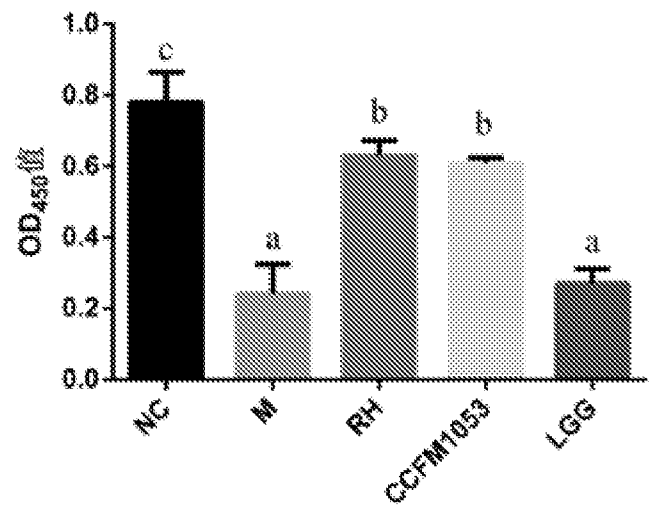


图 29

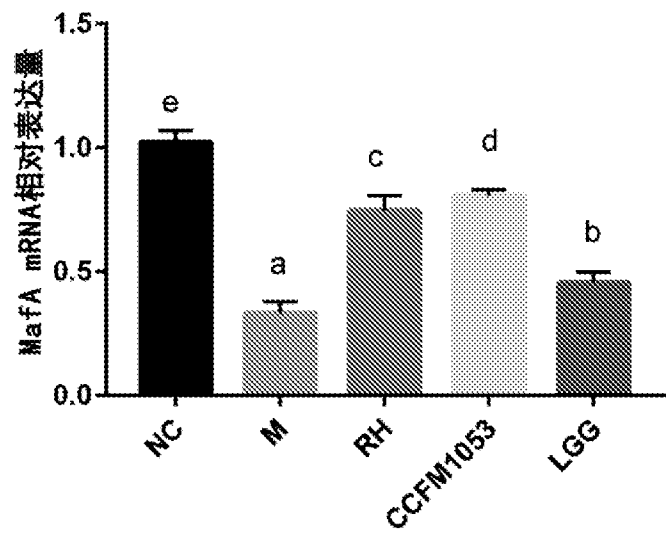


图 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/098036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A23C 9/123(2006.01)i; A23L 19/20(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN; CNABS, CNTXT, 万方, CNKI, NCBI, ISI web of science, 百度学术: 王刚, 陈卫, 梁席, 孔庆敏, 翟齐啸, 陆文伟, 崔树茂, 杨波, 毛丙永, 赵建新, 全氟辛酸, PFOA, perfluoro octanoic acid, 肝病, 肝脏, liver, 肝, 降解, degrad+, remov+, 高血压, 降血压, hypertension, 便秘, constipation, 糖尿病, diabetes, 肥胖, 减肥, obesity, 乳杆菌, 发酵乳杆菌, 干酪乳杆菌, 布氏乳杆菌, lactobacillus, fermentum, casei, buchneri, CCFM1051, CCFM1052, CCFM1053, microbial, fungal, microorganism, bacterial, 代谢

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110229769 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 13 September 2019 (2019-09-13) claims 1-10	1-18,
PX	CN 110684682 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 January 2020 (2020-01-14) claims 1-10	1-18,
PX	CN 110226630 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 13 September 2019 (2019-09-13) claims 1-10	1-18,
A	CN 105462887 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 06 April 2016 (2016-04-06) entire document	1-18,
A	CN 108018248 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 11 May 2018 (2018-05-11) entire document	1-18,
A	CN 107227275 A (SOUTHWEST UNIVERSITY) 03 October 2017 (2017-10-03) entire document	1-18,



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 September 2020

Date of mailing of the international search report

28 September 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/098036

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	周璐璐 等 (ZHOU, Lulu et al.). "降解全氟辛酸真菌的分离与鉴定 (Isolation and Identification of Perfluorooctanoic Acid-Degrading Fungi)" <i>中国微生态学杂志 (Chinese Journal of Microecology)</i> , Vol. 31, No. 3, 31 March 2019 (2019-03-31), pp. 249-253	1-18,
A	XING, J.L. et al. "Screening of potential probiotic lactic acid bacteria based on gastrointestinal properties and perfluorooctanoate toxicity" <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> , Vol. 100, 19 April 2016 (2016-04-19), pp. 6755-6766	1-18,
A	KOUTNIKOVA, H. et al. "Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials" <i>BMJ Open</i> , Vol. 9, 30 March 2019 (2019-03-30), e017995 pages 1-12	1-18,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/098036

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/098036

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110229769	A	13 September 2019	None			
CN	110684682	A	14 January 2020	None			
CN	110226630	A	13 September 2019	None			
CN	105462887	A	06 April 2016	CN	105462887	B	28 August 2018
CN	108018248	A	11 May 2018	CN	108018248	B	07 February 2020
CN	107227275	A	03 October 2017	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/098036

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; A23C 9/123(2006.01)i; A23L 19/20(2016.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A23C

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

VEN;CNABS, CNTXT, 万方, CNKI, NCBI, ISI web of science, 百度学术:王刚, 陈卫, 梁席, 孔庆敏, 翟齐啸, 陆文伟, 崔树茂, 杨波, 毛丙永, 赵建新, 全氟辛酸, PFOA, perfluoro octanoic acid, 肝病, 肝脏, liver, 肝, 降解, degrad+, remov+, 高血压, 降血压, hypertension, 便秘, constipation, 糖尿病, diabetes, 肥胖, 减肥, obesity, 乳杆菌, 发酵乳杆菌, 干酪乳杆菌, 布氏乳杆菌, lactobacillus, fermentum, casei, buchneri, CCFM1051, CCFM1052, CCFM1053, microbial, fungal, microorganism, bacterial, 代谢

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110229769 A (江南大学) 2019年 9月 13日 (2019 - 09 - 13) 权利要求1-10	1-18
PX	CN 110684682 A (江南大学) 2020年 1月 14日 (2020 - 01 - 14) 权利要求1-10	1-18
PX	CN 110226630 A (江南大学) 2019年 9月 13日 (2019 - 09 - 13) 权利要求1-10	1-18
A	CN 105462887 A (江南大学) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 全文	1-18
A	CN 108018248 A (江南大学) 2018年 5月 11日 (2018 - 05 - 11) 全文	1-18
A	CN 107227275 A (西南大学) 2017年 10月 3日 (2017 - 10 - 03) 全文	1-18

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 9月 8日

国际检索报告邮寄日期

2020年 9月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

罗洋

电话号码 86-(10)-53961959

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	周璐璐 等. "降解全氟辛酸真菌的分离与鉴定" 中国微生态学杂志, 第31卷, 第3期, 2019年 3月 31日 (2019 - 03 - 31), 第249-253页	1-18
A	XING, J.L. 等. "Screening of potential probiotic lactic acid bacteria based on gastrointestinal properties and perfluorooctanoate toxicity" Appl Microbiol Biotechnol, 第100卷, 2016年 4月 19日 (2016 - 04 - 19), 第6755-6766页	1-18
A	KOUTNIKOVA, H. 等. "Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials" BMJ Open, 第9卷, 2019年 3月 30日 (2019 - 03 - 30), e017995第1-12页	1-18

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/098036

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	110229769	A	2019年 9月 13日	无	
CN	110684682	A	2020年 1月 14日	无	
CN	110226630	A	2019年 9月 13日	无	
CN	105462887	A	2016年 4月 6日	CN 105462887	B 2018年 8月 28日
CN	108018248	A	2018年 5月 11日	CN 108018248	B 2020年 2月 7日
CN	107227275	A	2017年 10月 3日	无	