



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113893267 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(21) 申请号 202111170929.5

A61P 11/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.10.08

G12N 1/20 (2006.01)

(71) 申请人 河北一然生物科技股份有限公司

A23L 33/135 (2016.01)

地址 050000 河北省石家庄市中国(河北)  
自由贸易试验区正定片区正定县高新  
技术产业开发区北区邦秀东路16号

C12R 1/23 (2006.01)

(72) 发明人 鄢梦洁 郭润晴 杨玲 齐世华  
路江浩 贾晓蒙 高景伟 张彦位  
赵林森 何方

(74) 专利代理机构 河北国维致远知识产权代理  
有限公司 13137

代理人 任青

(51) Int.Cl.

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 31/16 (2006.01)

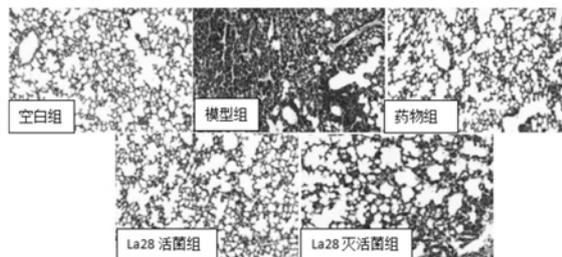
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

嗜酸乳杆菌La28在抗流感病毒中的新应用

(57) 摘要

本发明涉及益生菌技术领域,具体公开一种嗜酸乳杆菌La28在抗流感病毒中的新应用。所述嗜酸乳杆菌La28不仅活菌株可以实现很好的抗流感病毒的作用,其灭活菌株亦能达到较佳的抗流感病毒的作用,突破了大部分嗜酸乳杆菌灭活后降低或失去相应作用的应用局限,扩展了其应用范围。且该嗜酸乳杆菌La28还能有效消除因流感病毒感染引起的炎症以及修复因流感病毒感染造成的肺部损伤,不会产生任何毒副作用,在食品、药品、保健食品和日化用品领域中均具有极高的应用价值。



1. 保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28在制备抗流感病毒的产品中的应用。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于:保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的活菌株在制备抗流感病毒的产品中的应用。
3. 如权利要求2所述的应用,特征在于:所述嗜酸乳杆菌La28的活菌株的制备方法为:将所述嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在35-40℃下发酵培养18-24h,离心分离菌体,用PBS洗涤所述菌体,再离心分离菌体,得到所述嗜酸乳杆菌La28的活菌株。
4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于:保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株在制备抗流感病毒的产品中的应用。
5. 如权利要求4所述的应用,特征在于:所述嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株的制备方法为:将所述嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在35-40℃下发酵培养18-24h,离心分离菌体,用PBS洗涤所述菌体,再离心分离菌体,得到的所述菌体重悬于PBS中,于80℃水浴30-40min,离心分离菌株,得到所述嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株。
6. 如权利要求1~5任一项所述的应用,其特征在于:所述产品为用于杀灭和抑制流感病毒的产品;
  - 和/或所述产品为用于消除流感病毒引起的炎症的产品;
  - 和/或所述产品为用于修复流感病毒引起的肺损伤的产品;
  - 和/或所述产品为促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的抗流感病毒产品。
7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于:所述产品包括食品、药品和保健食品。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于:所述产品的剂型包括粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂和溶液剂。
9. 保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的活菌株在制备促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的产品中的应用。
10. 保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株在制备促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的产品中的应用。

## 嗜酸乳杆菌La28在抗流感病毒中的新应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及益生菌技术领域,尤其涉及一种嗜酸乳杆菌La28在抗流感病毒中的新应用。

### 背景技术

[0002] 据世界卫生组织统计,每年流感流行性季节可导致5-10%的成人和20-30%的儿童罹患流感,300万-500万重症病例,29万-65万因呼吸道感染(肺炎、支气管炎等)死亡。婴幼儿、老年人和免疫低下中年人等高危人群,患流感后出现严重疾病和死亡的风险更高。

[0003] 目前常用的抗流感的药物有奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦等,但这些药物都存在很强的副作用。在抗流感治疗中,也有服用清热解毒的中成药,但治疗周期长,效果并不显著。因此,目前还没有行之有效且无毒副作用的治疗流感的药物。

### 发明内容

[0004] 针对现有治疗抗流感病毒的药物存在的上述问题,本发明提供了一种嗜酸乳杆菌La28在抗流感病毒中的新应用,该嗜酸乳杆菌La28具有良好的体内和体外抗流感病毒的效果,并能有效消除流感病毒感染引起的炎症以及修复流感病毒感染造成的肺部组织损伤。

[0005] 为达到上述发明目的,本发明实施例采用了如下的技术方案:

[0006] 本发明提供了保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28在制备抗流感病毒的产品中的应用。

[0007] 本发明提供的保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28不仅具有提高免疫力的作用,其还可以在体外和体内实现有效的抑制和杀灭流感病毒的作用,具有良好的抗流感病毒的效果。经研究发现,该嗜酸乳杆菌La28菌株不仅活菌株可以实现很好的抗流感病毒的作用,其灭活菌株亦能达到较佳的抗流感病毒的作用,突破了大部分嗜酸乳杆菌灭活后降低或失去相应作用的应用局限,扩展了其应用范围。且本发明提供的嗜酸乳杆菌La28还能有效消除因流感病毒感染引起的炎症以及修复因流感病毒感染造成的肺部损伤。即将嗜酸乳杆菌La28应用到抗流感病毒药物中,在其提高免疫力、抑制病毒和修复病毒感染引起的炎症和组织损伤的多重作用的结合下,使包含嗜酸乳杆菌La28的药物达到了极佳的预防和治疗流感的效果,且不会产生任何毒副作用,非常适用于作为婴幼儿、老年人和免疫低下中年人的抗流感病毒产品。

[0008] 保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28为已公开菌株,其在公开号为CN106011006A,发明名称为“一株具有免疫调节及抗过敏功能的嗜酸乳杆菌La28及其应用”的专利申请文本中公开。

[0009] 本发明还具体提供了保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的活菌株在制备抗流感病毒的产品中的应用。

[0010] 优选的,所述嗜酸乳杆菌La28的活菌株的制备方法为:将所述嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在35-40℃下发酵培养18-24h,离心分离菌体,用PBS洗涤所述菌体,

再离心分离菌体,得到所述嗜酸乳杆菌La28的活菌株。所述培养基为常规乳酸菌发酵用培养基。

[0011] 本发明还具体提供了保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株在制备抗流感病毒的产品中的应用。

[0012] 优选的,所述嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株的制备方法为:将所述嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在35-40℃下发酵培养18-24h,离心分离菌体,用PBS洗涤所述菌体,再离心分离菌体,得到的所述菌体重悬于PBS中,于80℃水浴30-40min,离心分离菌株,得到所述嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株。所述培养基为常规乳酸菌发酵用培养基。

[0013] 优选的,所述产品为可用于杀灭和抑制流感病毒的产品。

[0014] 优选的,所述产品为可用于消除流感病毒引起的炎症的产品。

[0015] 优选的,所述产品为可用于修复流感病毒引起的肺损伤的产品。

[0016] 优选的,所述产品为促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的抗流感病毒产品。

[0017] 优选的,所述产品包括食品、药品和保健食品。其中保健食品可以用于辅助治疗流感病毒引起的相关疾病。

[0018] 优选的,所述产品的剂型包括粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂和溶液剂。

[0019] 本发明还具体提供了保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的活菌株在制备促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的产品中的应用。

[0020] 本发明还具体提供了保藏号为CGMCCNo.11506的嗜酸乳杆菌La28的灭活菌株在制备促进巨噬细胞分泌白介素IL-10的产品中的应用。

## 附图说明

[0021] 图1是本发明实施例2中的各组小鼠的肺组织病理切片图;

[0022] 图2是本发明实施例3中的不同乳酸菌的粘附率统计图;

[0023] 图3是本发明实施例3中的不同乳酸菌活菌对巨噬细胞的增值量的影响的统计图;

[0024] 图4是本发明实施例3中的不同乳酸菌灭活菌对巨噬细胞的增值量的影响的统计图;

[0025] 图5是本发明实施例3中的不同乳酸菌活菌对巨噬细胞吞噬作用影响的统计图;

[0026] 图6是本发明实施例3中的不同乳酸菌灭活菌对巨噬细胞吞噬作用影响的统计图;

[0027] 图7是本发明实施例3中不同乳酸菌活菌对巨噬细胞分泌白介素IL-10的量的影响的统计图;

[0028] 图8是本发明实施例3中不同乳酸菌灭活菌对巨噬细胞分泌白介素IL-10的量的影响的统计图。

## 具体实施方式

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 实施例1

[0031] 嗜酸乳杆菌La28活菌菌粉的制备:

[0032] 将嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在37℃下发酵培养18h,离心分离菌体,用相当于菌体质量10倍的PBS溶液洗涤菌体,再离心分离菌体,对得到的菌体进行喷雾干燥,得到嗜酸乳杆菌La28的活菌菌粉。其中,培养基为常规乳酸菌发酵用培养基。

[0033] 嗜酸乳杆菌La28灭活菌菌粉的制备:

[0034] 将嗜酸乳杆菌La28活化后,接种至培养液中,在37℃下发酵培养18h,离心分离菌体,用相当于菌体质量10倍的PBS洗涤菌体,再离心分离菌体,得到的菌体重悬于用相当于菌体质量10倍的PBS中,于80℃水浴30min,离心分离菌株,对得到的菌体进行喷雾干燥,得到嗜酸乳杆菌La28的灭活菌菌粉。其中,培养基为常规乳酸菌发酵用培养基。

[0035] 实施例2

[0036] 1、体外抗病毒试验

[0037] 1.1、材料:

[0038] 嗜酸乳杆菌La28活菌菌粉、嗜酸乳杆菌La28灭活菌菌粉、鼠李糖乳杆菌LGG活菌菌粉和鼠李糖乳杆菌LGG灭活菌菌粉、利巴韦林。

[0039] 病毒株:甲型H1N1流感病毒。

[0040] 细胞株:MDCK细胞。

[0041] 细胞培养液:MDCK细胞专用培养基(含10v%胎牛血清的MEM培养基,且含有1v%的双抗,双抗指青链霉素混合液,青链霉素混合液中青霉素的含量为10000u/mL,链霉素的含量为10mg/mL)。

[0042] 1.2、方法:

[0043] 将MDCK细胞接种于含细胞培养液的96孔培养板中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境下培养24h后,分别加入上述5种样品(嗜酸乳杆菌La28活菌菌粉、嗜酸乳杆菌La28灭活菌菌粉、鼠李糖乳杆菌LGG活菌菌粉和鼠李糖乳杆菌LGG灭活菌菌粉、利巴韦林),通过计算细胞的存活率确定上述药物的最大无毒浓度。

[0044] 将MDCK细胞用细胞培养液稀释至 $5 \times 10^4$ 个/mL,按每孔100μL接种于96孔培养板中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境下培养24h后,形成单层细胞,弃去上清并用PBS洗涤细胞,然后进行甲型流感病毒感染,2h后,弃掉病毒液,分别加入上述5中样品(嗜酸乳杆菌La28活菌菌粉、嗜酸乳杆菌La28灭活菌菌粉、鼠李糖乳杆菌LGG活菌菌粉和鼠李糖乳杆菌LGG灭活菌菌粉、利巴韦林),菌粉终浓度为 $1.5 \times 10^7$ CFU/mL,利巴韦林浓度为1μg/mL,同时设置无病毒感染的空白组和感染病毒但未加任何药物的对照组。然后观察24h内的细胞病变程度,观察结果如表1所示。

[0045] 表1

	药物	细胞病变程度
[0046]	嗜酸乳杆菌 La28 活菌菌粉	++
	嗜酸乳杆菌 La28 灭活菌菌粉	++
	鼠李糖乳杆菌 LGG 活菌菌粉	++++
	鼠李糖乳杆菌 LGG 灭活菌菌粉	++++

[0047]	利巴韦林	+
	空白组	-
	对照组	++++

[0048] 其中每组设置10个重复,表1中的值为10个重复的平均值。

[0049] “-”细胞生长正常,无病变出现;

[0050] “+”细胞病变占整个单层细胞的25%以下;

[0051] “++”细胞病变占整个单层细胞的50%以下;

[0052] “+++”细胞病变占整个单层细胞的75%以下;

[0053] “++++”细胞病变占整个单层细胞的以上75%以上。

[0054] 结果显示,嗜酸乳杆菌La28活菌菌粉及La28灭活菌菌粉对甲型流感病毒所致的细胞病变均有一定的抑制作用。

[0055] 2、体内抗病毒试验

[0056] 2.1、材料

[0057] La28活菌菌粉、嗜酸乳杆菌La28灭活菌菌粉、鼠李糖乳杆菌LGG活菌菌粉和鼠李糖乳杆菌LGG灭活菌菌粉、利巴韦林。

[0058] 50只6周龄雄性SPF级BABL/c健康小鼠(购自北京维通利华公司)。

[0059] 2.2、方法

[0060] 50只小鼠的饲养环境保持在(23±2)℃,相对湿度(50±10)%,12h光照12h黑夜交替。将50只小鼠随机平均分成空白组、模型组、药物阳性组(利巴韦林)、嗜酸乳杆菌La28活菌组和嗜酸乳杆菌La28灭活菌组。小鼠适应7d后开始灌胃,从第8天到第21天,空白组和模型组每天灌胃0.2mL生理盐水溶液,嗜酸乳杆菌La28活菌组灌胃相应的用0.2mL生理盐水溶液重悬的活菌菌粉悬液(菌体浓度 $5 \times 10^8$ CFU/mL),嗜酸乳杆菌La28灭活菌组灌胃相应的用0.2mL生理盐水溶液重悬的活菌菌粉悬液(菌体浓度 $5 \times 10^8$ CFU/mL)。在第15天,除空白组外,其它组进行甲型H1N1流感病毒感染。药物阳性组(利巴韦林)在病毒感染的第二天腹腔注射利巴韦林药物对小鼠进行治疗。第21天牺牲所有小鼠,检测相应指标。

[0061] 2.2.1、小鼠肺指数的测定

[0062] 在实验过程中,每周测定小鼠的体重一次。处死前测定小鼠的空腹体重,记为V1;小鼠解剖后取完整的肺组织在冰的生理盐水中漂洗拭干,称重,记为V2;肺指数为肺脏重量与体重的质量比,记为V2/V1,肺指数结果如表2中所示。

[0063] 表2肺指数结果

	分组	摄食量/g	肺重指数/%
[0064]	空白组	34.10±2.70*	0.70±0.08*
	模型组	29.80±6.13	1.14±0.13
	药物阳性组	29.23±6.67	0.81±0.14*
	La28 活菌	28.17±5.75	0.97±0.16*
	La28 灭活菌	29.13±6.26	0.91±0.13

## [0065] 2.2.2、血常规检测

[0066] 试验结束后,采用浓度为1%的戊巴比妥钠溶液对小鼠进行腹腔注射使其麻醉,眼眶取血,分离血清,通过检测各组小鼠血常规其中血白细胞(WBC#)、中性粒细胞数(Gran#)、淋巴细胞数目(Lymph#)、单核细胞数(Mon#)、血小板压积百分比(PCT%)和血细胞数量(PLT#)。检测结果如表3所示。

## [0067] 表3血常规

	分组	WBC#	Lymph#	Mon#	Gran#	PLT#	PCT%
[0068]	空白组	5.49±0.87	4.15±0.34	0.175±0.089	1.16±0.55	239.25± 100.32	0.12±0.05
	模型组	6.41±2.11*	4.68±1.56*	0.188±0.083*	1.55±0.55*	338.00± 99.20*	0.17±0.05*
[0069]	药物阳性组	3.69±0.60	2.80±0.52	0.088±0.035	0.80±0.15	302.88± 50.49	0.15±0.02
	La28 活菌组	3.75±0.89	2.54±0.64	0.100±0.054	1.11±0.36	245.88± 59.64	0.12±0.03
	La28 灭活菌组	3.81±0.74	2.21±0.71	0.121±0.063	1.01±0.44	276.33± 60.20	0.12±0.02

[0070] 注:含\*表示模型组与其他组有显著性差异(P<0.05)

[0071] 由表3中的数据可知,各组小鼠血常规其中血白细胞(WBC#)、中性粒细胞数(Gran#)、淋巴细胞数目(Lymph#)、单核细胞数(Mon#)、血小板压积百分比(PCT%)和血细胞数量(PLT#),有明显差异。其中,空白组各项指标正常,模型组小鼠在病毒感冒后血白细胞(WBC#)、中性粒细胞数(Gran#)、淋巴细胞数目(Lymph#)、单核细胞数(Mon#)、血小板压积百分比(PCT%)和血细胞数量(PLT#),与空白组相比有显著性增长(P<0.05)。La28活菌组、La28灭活菌组和药物阳性组,与模型组相比有明显的下降,有显著性(P<0.05)。说明La28活菌粉或La28灭活菌粉在预防治疗流感病毒性感冒有一定的效果。

## [0072] 2.2.3、肺组织病理切片

[0073] 分离小鼠肺脏,用质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定后,经过石蜡包埋、切片、烤片、苏木精和伊红染料染色、封片等操作后,在切片扫描仪下扫片观察并拍照。

[0074] 各组小鼠的肺组织病理切片如图1所示,与空白组相比,模型组的气管、支气管、肺泡及血管周围可见大量的嗜酸性细胞和淋巴细胞等浸润、黏膜上皮增生明显、气道上皮损伤严重及肺泡间隔增厚等病理表现。药物阳性组基本恢复正常,部分仍有肺泡间隔增厚的现象。La28活菌组和La28灭活菌组的病理损伤程度较模型组明显减轻,肺组织及周围的炎症细胞浸润明显减少、黏膜上皮轻度增生、气道上皮损伤减轻及肺泡间隔增厚程度减轻。由此表明La28活菌菌粉和La28灭活菌菌粉可以很好的保护肺组织,避免和修复由于病毒性流感导致的肺部组织严重受损,同时,可以明显减少肺部炎症细胞的浸润。

[0075] 2.2.4、病毒载量的测定

[0076] 为检测流感病毒对小鼠机体内的侵染程度,以NP蛋白进行RT-PCR实验测定流感小鼠肺部病毒载量情况。检测结果如表4所示。

[0077] 表4各组小鼠肺部病毒载量相对倍数

分组	相对倍数
空白组	1*
模型组	2204.88±1546.16
[0078] 药物阳性组	878.10±1103.46*
La28 活菌组	878.11±928.36*
La28 灭活菌组	875.34±970.12*

[0079] 注:含\*表示与模型组的显著性差异( $P < 0.05$ )

[0080] 从表4可知,与模型组的病毒载量相对倍数比较,La28活菌组、La28灭活菌组和药物阳性组均能阻止病毒的释放。且La28活菌组、La28灭活菌组与药物阳性组无显著性差异( $P > 0.05$ ),由此可知La28活菌组和La28灭活菌组均可阻止病毒的释放,减轻了流感呼吸道炎症。

[0081] 综上,根据肺重指数、血常规、肺组织病理分析和病毒载量显示,La28活菌菌粉和La28灭活菌菌粉对流感病毒性感冒有阻止病毒的释放,减轻流感呼吸道炎症的作用。

[0082] 实施例3

[0083] 嗜酸乳杆菌La28的其它辅助抗病毒作用

[0084] 1、黏附实验

[0085] 1.1、试验菌株:嗜酸乳杆菌La28、鼠李糖乳杆菌LGG

[0086] 1.2、实验材料与仪器

[0087] 实验材料:MRS液体培养基、曲拉通X-100、96孔板。

[0088] pH7.0 PBS:NaCl 8g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g定容1L。

[0089] 仪器:流式细胞仪。

[0090] 1.3、乳酸菌黏附率实验方法

[0091] 1) 黏蛋白母液的制备:称取黏蛋白0.1g溶于10mL PBS (pH 7.0) 中,制成10mg/mL的黏蛋白母液,4℃备用;

[0092] 2) 黏液蛋白的制备:将黏蛋白母液10倍稀释,终浓度为1.0mg/mL的黏液蛋白,分装后4℃保存备用;

[0093] 3) 蛋白固定:在96孔细胞培养板中加入黏液蛋白100μL/孔,置于4℃下过夜,使蛋白固定在细胞培养板上;吸取pH7.0 PBS缓冲液200μL洗涤96孔板2次,以除去未固定的黏液蛋白;

[0094] 4) 黏附实验:将乳酸菌接种于新鲜配制的MRS液体培养基中,37℃厌氧培养18h;于4℃下6000r/min离心10min,收集菌体,弃上清;用无菌pH7.0 PBS洗涤菌体2次,然后重悬于PBS中,采用流式细胞仪调整菌液浓度为 $1 \times 10^8$ CFU/mL,形成乳酸菌菌悬液,4℃保存备用;

[0095] 5) 测定初始细菌数:取100μL上述乳酸菌菌悬液进行活菌计数,作为初始细菌数;

[0096] 6) 在96孔板的每个孔中加入100μL乳酸菌菌悬液,于37℃孵育3h,用pH7.0 PBS缓冲液反复冲洗2次,以除去未黏附的乳酸菌;加入0.1mL含有0.05% (v/v) 曲拉通X-100的PBS溶液,37℃裂解30min,将裂解洗脱下来的乳酸菌进行梯度稀释,进行活菌计数;计算每孔黏附在粘蛋白上的乳酸菌数与96孔板中加入的乳酸菌总数的比值,以此计算黏附率。

[0097] 黏附率(%) = 黏附在粘蛋白上的乳酸菌数/初始细菌数  $\times$  100%。

[0098] 经计算,La28乳酸菌的黏附率高于对照LGG,如图2所示。其中,La28黏附率为 $10.09 \pm 1.565\%$ ,LGG黏附率为 $7.117 \pm 1.436\%$ 。即La28相比于其它乳酸菌更易定植在体内长期发挥作用。

## [0099] 2、细胞实验

### [0100] 2.1实验试剂与仪器

[0101] 实验试剂:DMEM高糖培养液,美国Invitrogen公司;胎牛血清、PBS缓冲液、青链霉素混合液、CCK-8试剂盒、刀豆球蛋白A (Con A)、0.4%台盼蓝染色液、细胞刮,上海生工生物工程有限公司;快速细胞冻存液(无血清),上海雅酶生物医药科技有限公司;脂多糖(LPS),美国Sigma公司;中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒,碧云天;MouseIL-10ELISA KIT,北京四正柏生物科技有限公司;DMEM完全培养液按体积比由90%DMEM、10%胎牛血清、1%青链霉素组成。

[0102] 实验仪器:低速离心机、自动细胞计数仪、倒置显微镜

[0103] 实验细胞与菌株:J774A.1(小鼠单核巨噬细胞);嗜酸乳杆菌La28、鼠李糖乳杆菌LGG、空白对照。

### [0104] 2.2实验方法

#### [0105] 2.2.1、细胞培养:

[0106] 将J774A.1(小鼠单核巨噬细胞)细胞复苏后,置于含有DMEM完全培养液的培养瓶中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育,待细胞生长良好密度达80%左右进行传代,传代3次进行实验。

#### [0107] 2.2.2、La28菌悬液的制备:

[0108] La28活菌菌悬液:取实施例1中的La28活菌菌粉,用4ml细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基)重悬混匀,用0.9%生理盐水对重悬后的1ml菌液进行梯度稀释,用流式细胞仪检测菌浓,调整菌液浓度 $1.5 \times 10^8$ CFU/mL。

[0109] La28灭活菌菌悬液:取实施例1中的La28灭活菌菌粉,用4mL细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基)重悬混匀,用0.9%生理盐水对重悬后的1mL菌液进行梯度稀释,用流

式细胞仪检测菌浓,调整菌液浓度 $1.5 \times 10^8$ CFU/mL。

#### [0110] 2.2.3、巨噬细胞增殖实验

[0111] 收集传代3次的巨噬细胞,用0.4%台盼蓝染色液进行细胞染色,取40 $\mu$ L细胞悬液与40 $\mu$ L的0.4%台盼蓝溶液以1:1混匀,3分钟后,取20 $\mu$ L用自动细胞计数仪计数和稀释,按密度 $1.5 \times 10^5$ 个/mL接种于96孔板,每孔100 $\mu$ L细胞悬液在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜孵育。

[0112] 待细胞贴壁后,弃去上清液,每孔加入100 $\mu$ L细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基),再各自加入100 $\mu$ L的La28活菌菌悬液或La28灭活菌菌悬液,空白对照组为100 $\mu$ L细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基),阳性对照组加入100 $\mu$ L刀豆蛋白A,阴性对照组一为LGG活菌菌悬液(菌体浓度 $1.5 \times 10^8$ CFU/mL),阴性对照组二为LGG灭活菌菌悬液(菌体浓度 $1.5 \times 10^8$ CFU/mL),每组5个重复,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下活菌与细胞共孵育4h,灭活菌与细胞共孵育24h。

[0113] CCK-8法检测巨噬细胞活性及增殖情况:每孔内加入10 $\mu$ L的CCK-8溶液,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育1h,在450nm波长下测定吸光度OD值。计算细胞增殖指数和增值率。

[0114] 细胞增殖指数 =  $(A_s - A_c) / A_c$ ;

[0115] 增值率 = 细胞增殖指数  $\times 100\%$ ;

[0116] 式中: $A_s$ 表示实验组OD值, $A_c$ 表示空白对照组OD值。

[0117] 检测和计算结果如图3和图4所示,乳酸菌La28的活菌菌悬液和灭活菌菌悬液对巨噬细胞都有增值作用;活性乳酸菌La28对细胞的增值效果略低于LGG;灭活型LGG对细胞无增值效果,灭活型乳酸菌La28对细胞的增值效果明显高于灭活型LGG,且有极显著性差异( $P < 0.0001$ ),同时灭活型乳酸菌La28对细胞的增值效果要优于活性乳酸菌La28和LGG。

[0118] 即,La28的活菌和灭活菌体都有促进巨噬细胞增值的作用。

#### [0119] 2.3、细胞吞噬试验

[0120] 收集巨噬细胞对数生长期细胞,用0.4%台盼蓝染色液进行细胞染色,取40 $\mu$ L细胞悬液与40 $\mu$ L的0.4%台盼蓝溶液以1:1混匀,3分钟后,取20 $\mu$ L用自动细胞计数仪计数和稀释,调整浓度为 $1 \times 10^5$ cells/mL,在96孔板中每孔加入100 $\mu$ L细胞悬液,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜。

[0121] 弃去培养液,随后加入100 $\mu$ L细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基),并加入100mL的各乳酸菌菌悬液,每组5个复孔,同时设定LPS组(100 $\mu$ g/mL)和空白组细胞培养液(含10%胎牛血清的DMEM培养基),其中活菌组与巨噬细胞共孵育4h,灭活菌组与巨噬细胞共孵育24h。

[0122] 中性红试剂盒检测巨噬细胞吞噬效果:至待检测时间点,吸出上清液,PBS洗涤2次,随后加入200 $\mu$ L细胞培养液,同时加入20 $\mu$ L中性红染液,细胞培养箱内孵育2h。除去含有中性红染液的细胞培养液,PBS洗涤1次,于每孔加入200 $\mu$ L中性红检测裂解液,至室温摇床裂解10min。于540nm波长处测定OD值,计算细胞吞噬指数和吞噬率。

[0123] 细胞吞噬指数 =  $A_s / A_c$ ;

[0124] 吞噬率 = 细胞吞噬指数  $\times 100\%$ ;

[0125] 式中: $A_s$ 表示实验组OD值, $A_c$ 表示空白对照组OD值。

[0126] 检测和计算结果如图5和图6所示,乳酸菌La28的活菌菌悬液和灭活菌菌悬液都可促进巨噬细胞的吞噬作用;活性乳酸菌La28对细胞的吞噬能力高于活性LGG;灭活型乳酸菌

La28对细胞的吞噬效果也明显高于灭活型LGG,且有显著性差异( $P < 0.01$ )。

[0127] 2.4、乳酸菌La28对小鼠巨噬细胞分泌的细胞因子的影响

[0128] 巨噬细胞培养方法和制备乳酸菌La28菌悬液方法同上,以 $2 \times 10^5$ 个/mL浓度的巨噬细胞接种于24孔板中,在 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中过夜培养,每孔加入 $100\mu\text{L}$ 菌悬液( $1.5 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ ),在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中,活菌组中乳酸菌与巨噬细胞共孵育4h,灭活菌组中乳酸菌与巨噬细胞共孵育24h。收集细胞培养上清液, $1000\text{r/min}$ 离心 $10\text{min}$ 去除颗粒和聚合物,分装到无菌离心管中, $-80^\circ\text{C}$ 保藏备用。

[0129] 按ELISA试剂盒说明书测定巨噬细胞的IL-10细胞因子的分泌量:

[0130] 1) 将标准品进行梯度稀释(标准品稀释为1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、 $0\text{pg/ml}$ ),根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔;

[0131] 2) 分别将待测样品和不同浓度标准品( $100\mu\text{L/孔}$ )加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液),用封板胶纸封住反应孔, $37^\circ\text{C}$ 孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外);

[0132] 3) 洗板4次:甩尽孔内液体,每孔加洗涤液 $350\mu\text{L}$ ,静置30秒后甩尽液体,在厚迭吸水纸上拍干;

[0133] 4) 加入生物素化抗体工作液( $100\mu\text{L/孔}$ )。用封板胶纸封住反应孔, $37^\circ\text{C}$ 孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外);

[0134] 5) 洗板4次(方法同上);

[0135] 6) 加入酶结合物工作液( $100\mu\text{L/孔}$ )。用封板胶纸封住反应孔, $37^\circ\text{C}$ 孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外);。

[0136] 7) 洗板4次;

[0137] 8) 加入显色剂 $100\mu\text{L/孔}$ ,避光, $37^\circ\text{C}$ 孵箱孵育10-20分钟。

[0138] 9) 加入终止液 $100\mu\text{L/孔}$ ,混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

[0139] 检测结果如图7和图8所示,嗜酸乳杆菌La28的活菌和灭活菌体都可以显著刺激巨噬细胞分泌白介素IL-10,活性嗜酸乳杆菌La28对细胞IL-10分泌量的影响显著高于活性的LGG( $P < 0.05$ ),灭活型嗜酸乳杆菌La28对细胞IL-10分泌量的影响也显著高于灭活的LGG( $P < 0.001$ ),尤其是灭活型嗜酸乳杆菌La28对细胞IL-10的分泌具有极大的促进作用。

[0140] 综上,根据细胞增殖、吞噬、细胞因子实验结果显示,嗜酸乳杆菌La28活菌和灭活菌可有效的激活巨噬细胞,促进抗炎因子(IL-10)的分泌,且效果显著优于鼠李糖乳杆菌LGG。可见,嗜酸乳杆菌La28还具有提高吞噬细胞的活性的作用,即嗜酸乳杆菌La28本身的抗病毒作用与增加免疫细胞活性的作用的结合,可以在体内发挥良好的抗流感病毒的作用,以及修复流感病毒感染引起的炎症和肺组织损伤。

[0141] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

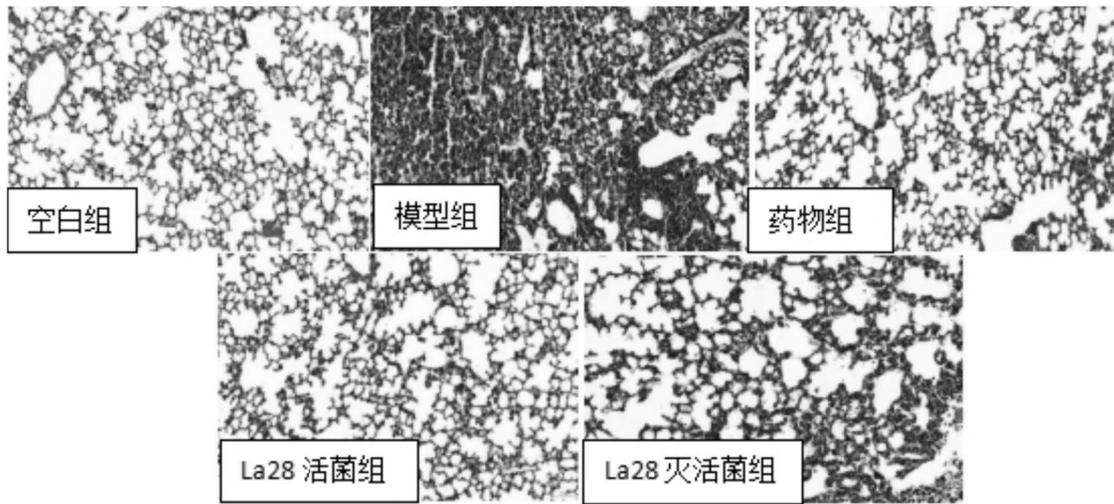


图1

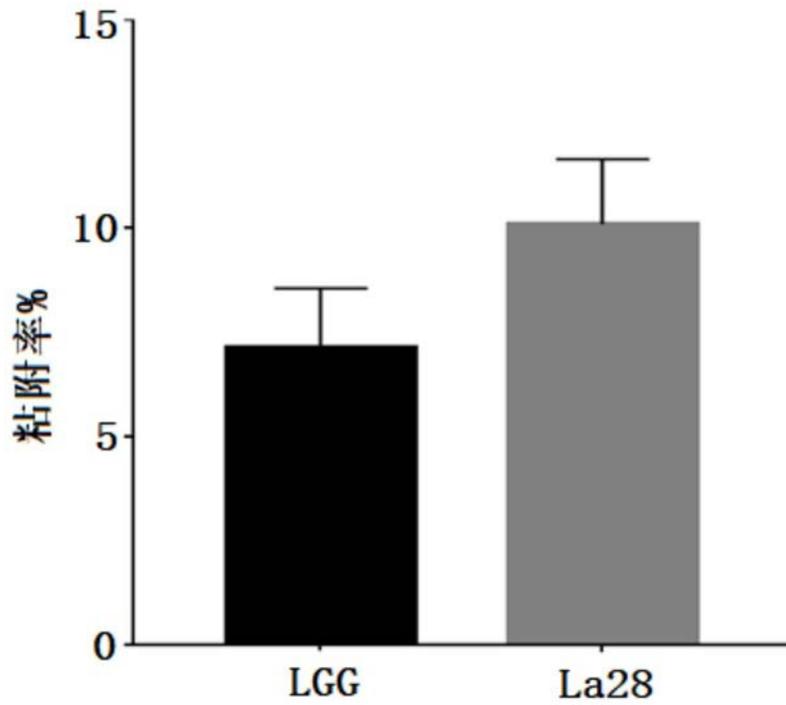


图2

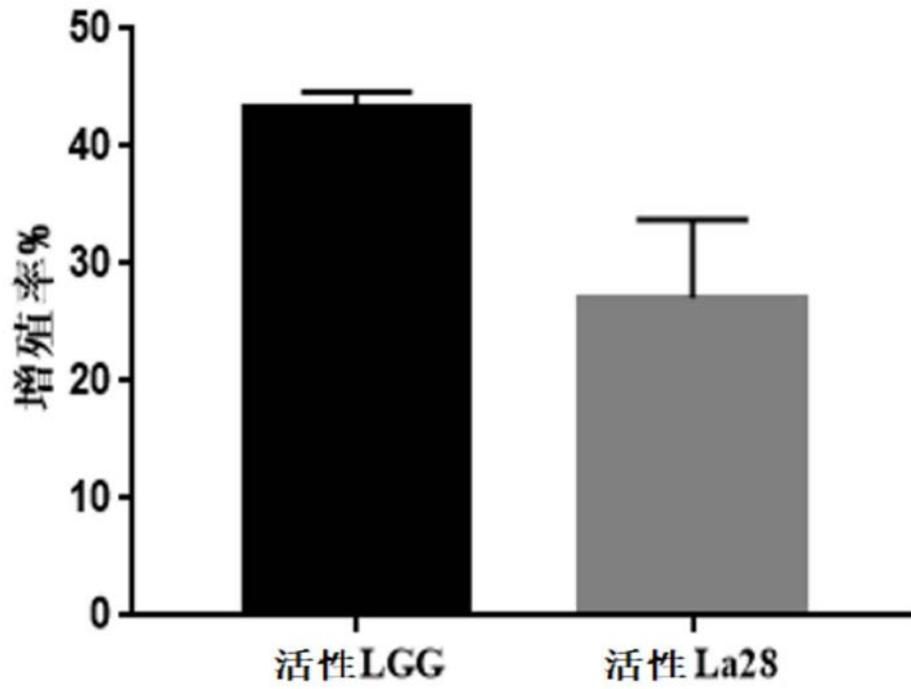


图3

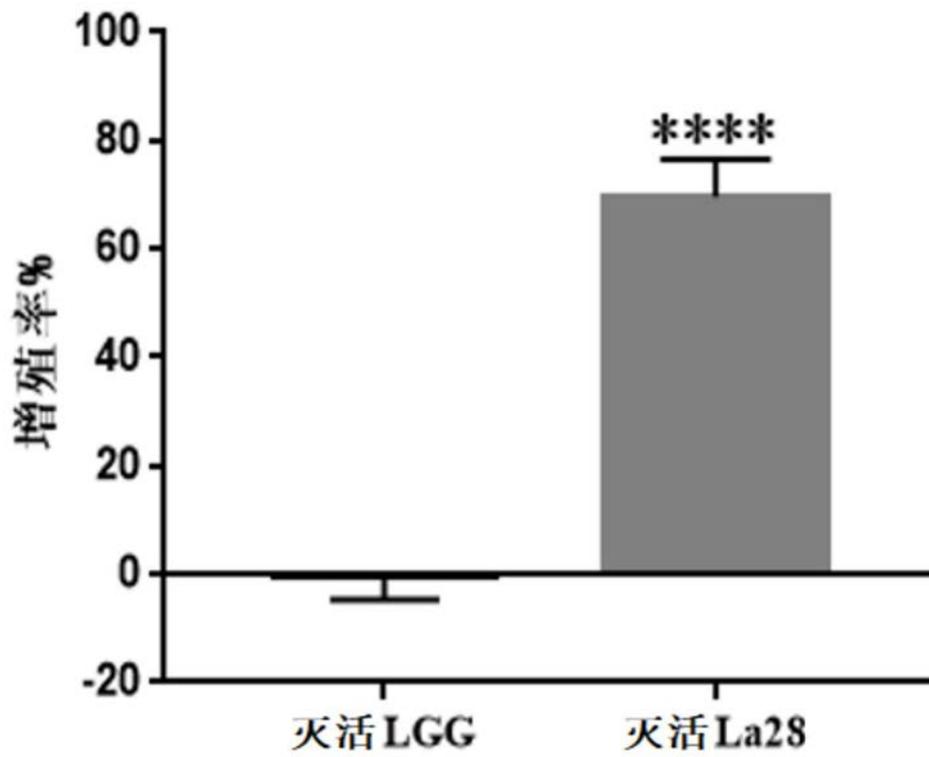


图4

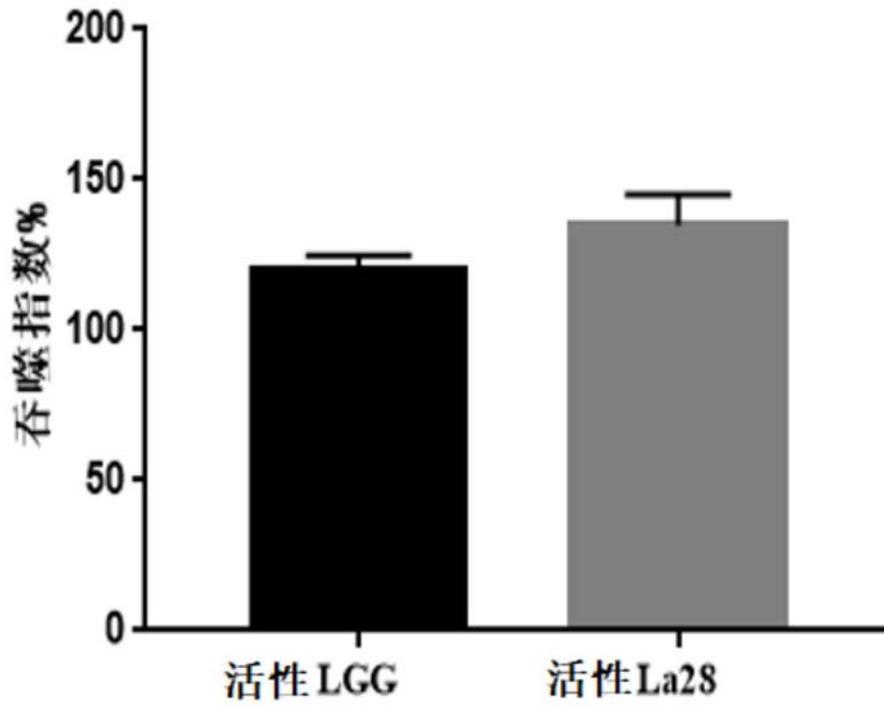


图5

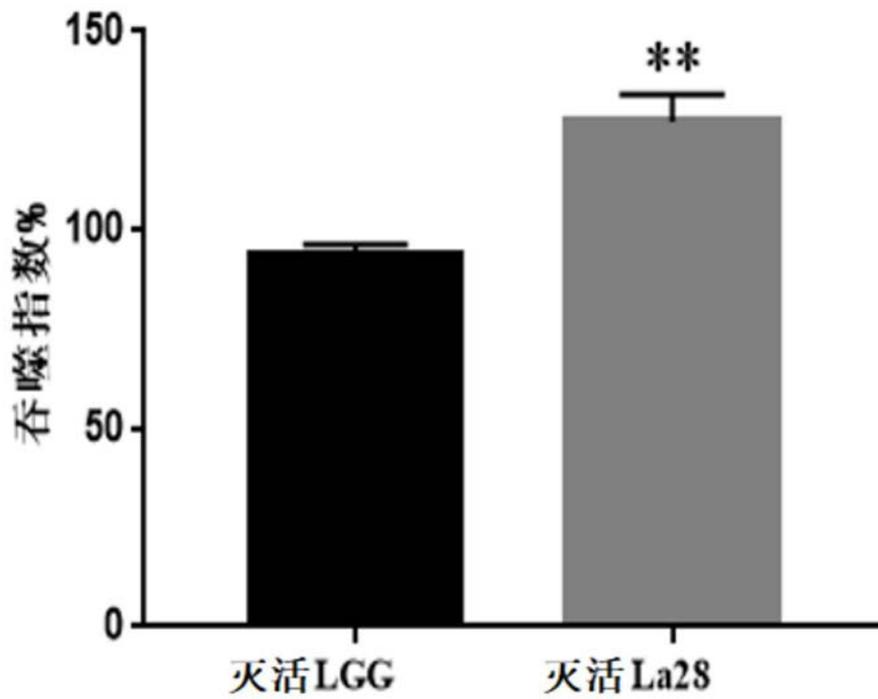


图6

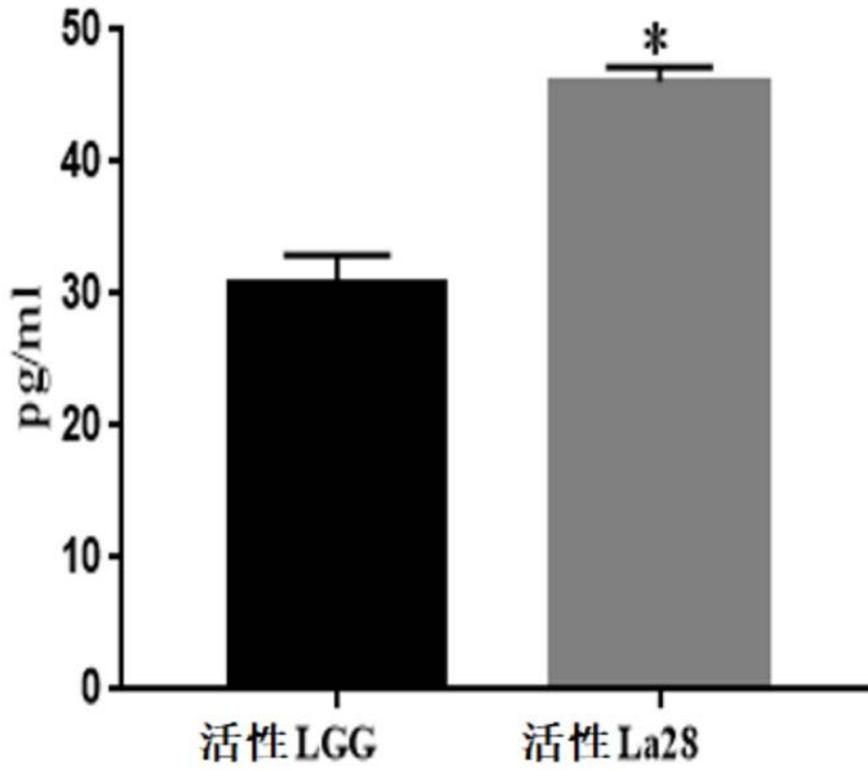


图7

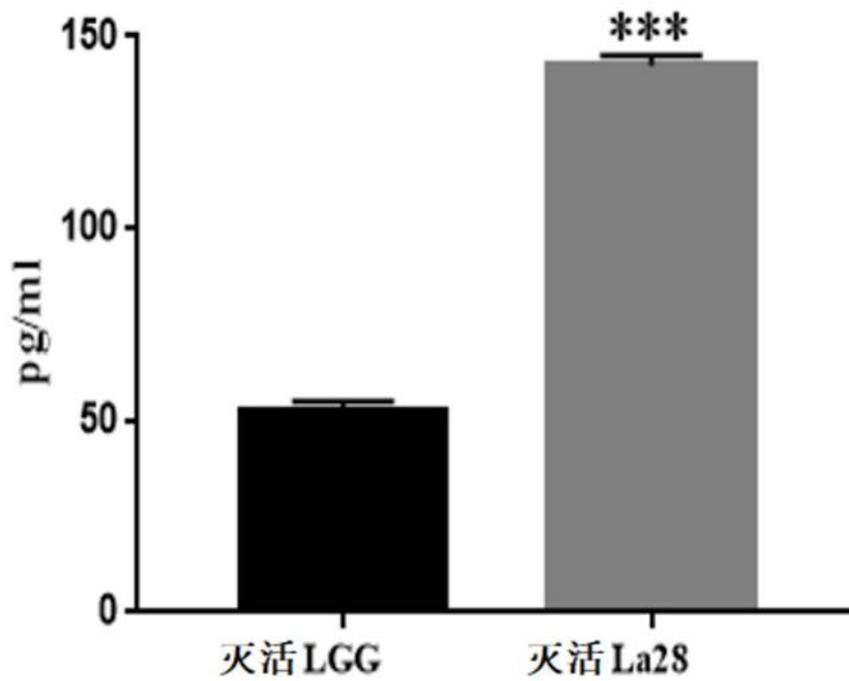


图8