



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116622572 A

(43) 申请公布日 2023.08.22

(21) 申请号 202310578935.7 *A61K 35/745* (2015.01)
(22) 申请日 2023.05.22 *A61P 31/04* (2006.01)
(83) 生物保藏信息 *A23L 33/135* (2016.01)
CGMCC NO.25896 2022.10.12 *A23K 10/18* (2016.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 深圳保时健生物工程有限公司
地址 518000 广东省深圳市龙岗区宝龙街
道宝龙社区锦龙一路9号多利工业厂
区A栋厂房101整栋、及C栋厂房2-3楼

(72) 发明人 肖国勋 郑彦懿 张思璐 冯岳彪
滕欣

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002
专利代理师 商秀玲

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

抑制幽门螺杆菌的动物双歧杆菌乳亚种
ATM-209及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物技术领域,具体涉及抑制
幽门螺杆菌的动物双歧杆菌乳亚种ATM-209及其
应用。本发明提供的动物双歧杆菌乳亚种
(*Bifidobacterium animalis subsp.lactis*)
ATM-209(GOLDGUT-BB18)保藏于中国微生物菌种
保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为
CGMCC No.25896。该菌株具有较好的耐酸能力,
可很好地适应于胃部环境;该菌株对幽门螺杆菌
具有明显的生长抑制作用,在动物实验中能够抑
制幽门螺杆菌在体内的定植并缓解幽门螺杆菌
感染所造成的炎症,在临床预防、治疗和抑制幽
门螺杆菌感染相关病症以及胃肠道保健食品等
领域具有广阔的应用前景。

1. 动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209, 其特征在于, 其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No. 25896。

2. 一种微生物制剂, 其特征在于, 所述微生物制剂包含权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209。

3. 权利要求2所述的微生物制剂的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括培养所述动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209的步骤。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其特征在于, 所述培养为在35-37°C条件下厌氧培养。

5. 权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂在制备用于抑制幽门螺杆菌的产品中的应用。

6. 权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂在制备用于预防、缓解或治疗幽门螺杆菌感染或由幽门螺杆菌感染导致疾病的产品中的应用。

7. 权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂在制备用于预防、缓解或治疗幽门螺杆菌感染导致炎症的产品中的应用。

8. 权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂在制备食品、饲料或药物中的应用。

9. 一种食品, 其特征在于, 所述食品包含权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂。

10. 一种药物, 其特征在于, 所述药物包含权利要求1所述的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) ATM-209或权利要求2所述的微生物制剂。

抑制幽门螺杆菌的动物双歧杆菌乳亚种ATM-209及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其涉及抑制幽门螺杆菌的动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)及其应用。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*,Hp)是一种螺旋弯曲、有鞭毛、微好氧的革兰氏阴性菌。幽门螺杆菌感染是人类最普遍的慢性细菌性疾病之一。幽门螺杆菌也是世界卫生组织(WHO)和国际癌症研究机构(IARC)认定的一级人类致癌物。幽门螺杆菌在胃部感染并定植时,会分泌大量尿素酶将胃粘液中的尿素转化为氨以中和胃酸,避免受胃酸影响,进而使其在胃与十二指肠中大量增殖,破坏胃粘膜屏障,诱导胃粘膜细胞凋亡,导致组织损伤和溃疡形成。因此幽门螺杆菌感染与胃肠道恶性及非恶性疾病有关,如胃炎(gastritis)、慢性消化不良、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)以及胃腺癌(gastric adenocarcinoma)等。胃癌最常见的原因是幽门螺杆菌感染,因此抑制幽门螺杆菌感染是预防胃癌最有效的方法。

[0003] 幽门螺杆菌感染的治疗通常会使用3或4种不同的药物或抗生素以获得足够的根除率。近年来,由于越来越多幽门螺杆菌菌株对抗生素的耐药性增加,许多治疗方案的有效性也在下降,而且某些抗生素可能会引起更多的副作用与不良反应。因此,本领域的相关研究人员致力于探究有效且不产生副作用的治疗方法,如使用益生菌(probiotics)结合抗生素来治疗或根除幽门螺杆菌感染,其中益生菌可以减少抗生素的耐药性,并具有平衡肠道菌群,改善肠道微生态的作用。

[0004] 乳酸菌(lactic acid bacteria,LAB)属于一般被公认为安全(generally recognized as safe,GRAS)且广泛应用于医药、食品等行业的益生菌。乳酸菌能够将碳水化合物发酵成乳酸,可用于制造酸奶、奶酪、酸菜、啤酒、葡萄酒、泡菜、腌渍食品和其他发酵食品。常见的乳酸菌属包括:乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)以及明串珠菌属(*Leuconostoc*)等。乳酸菌可以对人类宿主产生较多的有益作用,包括抗过敏作用、抗菌作用、调节肠道微生物菌群、刺激免疫系统和预防结肠癌等,且已有一些关于乳酸菌菌株在抗幽门螺杆菌上的应用研究。

[0005] 为了更好地满足临床实践需求,需要开发多样化和有效的益生菌来抑制和治疗幽门螺杆菌相关感染疾病。

发明内容

[0006] 本发明提供抑制幽门螺杆菌的动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)及其应用。

[0007] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis subsp.lactis*) ATM-209(GOLDGUT-BB18),该菌株于2022年10月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员

会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),分类命名为动物双歧杆菌乳亚种*Bifidobacterium animalis* subsp.lactis,保藏编号为CGMCC No.25896。

[0008] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)分离自健康婴儿粪便。通过细菌形态学、生理学以及16S rDNA(SEQ ID NO.1)测序对该菌株进行鉴定,结果为动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp.lactis),命名为动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)。该菌株具有较好的耐胃酸能力,对幽门螺杆菌有明显的生长抑制作用,在动物实验中能够显著降低胃部幽门螺杆菌载量并缓解致病菌感染所造成的炎症,为开发抑制幽门螺杆菌的食品(例如膳食补充剂、保健品)、药物等产品提供了菌种资源。

[0009] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)具有以下微生物学特性:

[0010] (1)形态学特征

[0011] 革兰染色呈阳性,光镜下为直杆或弯曲短杆,单个或成对排列,V型或弯曲状;在MRS固体培养基上形成菌落,菌落光滑,凸圆,边缘完整,呈乳白色,闪光并有柔软质地。

[0012] (2)生理特性

[0013] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)能在人工胃酸条件下生长良好,并能在体外培养实验中抑制幽门螺杆菌的生长,抑菌环直径达18.0mm,在动物实验中能抑制幽门螺杆菌在体内的定植并缓解致病菌感染所造成的炎症。

[0014] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)可采用以下方法进行培养:将动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)接种于培养基中,35-37℃厌氧培养,培养时间可为12-24h。所述培养基可以采用本领域常规的培养基,能够使得动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)生长即可,优选采用MRS肉汤培养基(酪蛋白酶消化物10.0g/L,牛肉膏粉10.0g/L,酵母膏粉4.0g/L,柠檬酸三铵2.0g/L,乙酸钠5.0g/L,七水硫酸镁0.2g/L,四水硫酸锰0.05g/L,葡萄糖20.0g/L,磷酸氢二钾2.0g/L,吐温80 1.0g/L,pH=5.7±0.2),固体培养基加入1.5%琼脂。

[0015] 经安全性评估,按GB 15193.3-2014相关规定进行急性经口毒性实验,结果表明小鼠行为和精神状态良好,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)属于实际无毒级别;依据《食品安全国家标准食品用菌种安全性评价程序(征求意见稿)》相关规定,对动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)全基因组测序后,将全基因组序列同CARD、ResFinder、Argannot、NDARO的最新版本中存储的序列进行比对,结合抗生素耐药性测试实验,结果证明该菌株不含可转移的抗生素抗性基因;将全基因组序列同VFDB、PAIDB、MvirDB、CGE数据库中最新序列进行了比对,结果表明该菌株不含毒力因子。

[0016] 本发明提供一种微生物制剂,所述微生物制剂包含动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)。

[0017] 优选地,以上所述的微生物制剂中,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)以活菌形式存在。

[0018] 以上所述的微生物制剂可为固体制剂(例如菌粉)或液体制剂(例如乳液制剂)。

[0019] 本发明提供以上所述的微生物制剂的制备方法,所述方法包括培养所述动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)的步骤。

[0020] 优选地,所述培养为在35-37℃条件下厌氧培养。

[0021] 优选地,所述培养为在液体培养基中厌氧培养,获得菌液。

[0022] 上述菌液可直接或者经浓缩和/或加入其他辅料制备为液体制剂,或者经干燥制备为固体制剂,或者将菌液中的菌体进行分离再将菌体制备为固体制剂。

[0023] 基于动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)的功能,本发明提供该菌株的以下应用:

[0024] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂在制备用于抑制幽门螺杆菌的产品中的应用。

[0025] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂在抑制幽门螺杆菌中的应用。

[0026] 其中,抑制幽门螺杆菌包括在体外抑制幽门螺杆菌的生长,或者在体内抑制幽门螺杆菌的定植、感染、增殖、生长。

[0027] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂在制备用于预防、缓解或治疗幽门螺杆菌感染或由幽门螺杆菌感染导致疾病的产品中的应用。

[0028] 其中,由幽门螺杆菌感染导致疾病优选为胃肠道疾病,包括胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌等。

[0029] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂在制备用于预防、缓解或治疗幽门螺杆菌感染导致的炎症的产品中的应用。

[0030] 其中,幽门螺杆菌感染导致的炎症包括胃粘膜组织炎症、十二指肠炎症等。

[0031] 以上所述的产品包括食品、饲料或药物。

[0032] 本发明提供动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂在制备食品、饲料或药物中的应用。

[0033] 本发明中,食品包括普通食品、膳食补充剂、保健品。

[0034] 本发明提供一种食品,所述食品包含动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂。

[0035] 除包含动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂外,所述食品还可包含食品领域允许的原料。所述食品可为膳食补充剂、保健品或发酵食品。

[0036] 本发明提供一种药物,所述药物包含动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂。

[0037] 除包含动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)或所述微生物制剂外,所述药物还可包含药学领域允许的辅料(例如填充剂、赋型剂、润滑剂、润湿剂、稀释剂等)。药物的制剂类型可为固体制剂(例如粉剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂等)或液体制剂(例如口服液等)。

[0038] 本发明的有益效果至少包括:本发明提供的动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)在胃酸存在环境下生长良好,具有较好的耐酸能力,可很好地适应于胃部环境;该菌株对幽门螺杆菌具有明显的生长抑制作用,在动物实验中能够抑制幽门螺杆菌在体内的定植、降低幽门螺杆菌载量,并缓解幽门螺杆菌感染所造成的炎症,从而可起到调节消化道微生物菌群的作用。

[0039] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)可用于制备用于预防、缓解或治疗幽门螺杆菌感染或其导致疾病的产品,在临床预防、治疗和抑制幽门螺杆菌感染相关病症

以及胃肠道保健食品等领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0040] 为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0041] 图1为实施例1中动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 在MRS培养基上的菌落形态图。

[0042] 图2为实施例1中动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 镜检图。

[0043] 图3为实施例2中动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 在人工胃酸和PBS对照条件下生长2h后存活率比较,其中数据来自三次重复实验,误差线表示标准差,其中ns表示无显著性差异。

[0044] 图4为实施例3中动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 体外抑菌圈直径大小,其中数据来自两次重复实验,误差线表示标准差;统计分析方法为Student's t-test,**表示p值小于0.01。

[0045] 图5为实施例4中不同组别胃组织硝酸银染色结果图,其中,A:空白组,B:Hp感染组,C:抗生素药物组,D:益生菌组。

[0046] 图6为实施例5中不同组别胃组织苏木精-伊红染色结果图,其中,A:空白组,B:Hp感染组,C:抗生素药物组,D:益生菌组。

[0047] 图7为实施例6中不同组别胃粘膜组织尿素酶检测结果图,其中,A:空白组,B:Hp感染组,C:抗生素药物组,D:益生菌组。

[0048] 图8为实施例7中不同组别胃粘膜组织促炎细胞因子白介素-6 (IL-6,A) 和促炎细胞因子白介素-8 (IL-8,B) 含量测定结果图,其中,相对蛋白浓度是各组蛋白浓度相对于空白组蛋白浓度归一化后的相对值;误差线表示标准差;统计分析方法为单因素方差分析(One-Way ANOVA),*表示p值小于0.05,**表示p值小于0.01,ns表示无显著性差异。

具体实施方式

[0049] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明中的附图,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0050] 以下实施例中所用的幽门螺杆菌菌株为*Helicobacter pylori* NCTC11639,受赠于南昌大学第一附属医院消化系统疾病研究所。

[0051] 实施例1动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 的分离及鉴定

[0052] 1、动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18) 的分离

[0053] 1.1样品来源

[0054] 本发明所使用的动物双歧杆菌乳亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp.lactis) 菌株分离自健康婴儿粪便。

[0055] 1.2培养基的配制

[0056] 样品分离和菌株筛选所用的培养基为MRS固体培养基,MRS培养基成分如下:酪蛋白酶消化物10.0g/L,牛肉膏粉10.0g/L,酵母膏粉4.0g/L,柠檬酸三铵2.0g/L,乙酸钠5.0g/L,七水硫酸镁0.2g/L,四水硫酸锰0.05g/L,葡萄糖20.0g/L,磷酸氢二钾2.0g/L,吐温80 1.0g/L,pH=5.7±0.2,加入1.5%琼脂即为MRS固体培养基。

[0057] 1.3菌株的分离

[0058] 将1g粪便样品放入10mL步骤1.2制得的MRS液体培养基中,混匀后于36℃下培养,然后在超净台中吸取富集液1mL,进行10倍梯度稀释,选取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释梯度的菌液100μL涂于含有无菌MRS固体培养基的培养皿上,于有氧条件下36℃静置培养24-48h,至有明显单菌落形成后,从培养基中选择生长有70-120个单菌落的平板,挑取典型菌落,在MRS固体平板培养基上多次划线纯化,直至整个平板上的菌落形态一致的培养物做菌株鉴定。

[0059] 2、动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)的鉴定

[0060] 2.1菌落特征

[0061] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)在MRS固体培养基中培养24h后,菌落呈光滑,凸圆,边缘完整,呈乳白色,闪光并有柔软质地,见图1。

[0062] 2.2显微镜下形态

[0063] 动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)菌落涂片:革兰染色呈阳性,光镜下为直杆或弯曲短杆,单个或成对排列,V型或弯曲状。见图2。

[0064] 2.3 16S rDNA鉴定

[0065] 鉴定单位:擎科生物科技有限公司。

[0066] 鉴定序列:16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0067] 鉴定结果:根据菌株的序列比对结果和生理生化结果相结合,确定该菌株为动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp.lactis)。

[0068] 实施例2动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)耐胃酸能力检测

[0069] 人体胃环境中整体pH条件呈强酸性,因此,菌株的耐酸能力是评估其是否能在胃酸环境下存活、定植的重要指标。使用人工胃液模拟胃部环境,胃酸消化组中,向含有100μL动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)菌液的96孔板中加入100μL模拟人工胃液,吹打混匀,37℃,厌氧共孵育2h;对照组中,向含有100μL动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)菌液的96孔板中加入100μL PBS,吹打混匀,37℃,厌氧共孵育2h,孵育结束后取出孔板。

[0070] 取胃酸消化组孵育样品,用PBS稀释到 $10E^{-5}$;取对照组孵育样品,用PBS稀释到 $10E^{-6}$ 。将稀释后样品涂布在MRS琼脂平板上,于37℃厌氧培养16h后进行菌落计数,并计算菌体存活率,计算公式为:存活率/%=(胃酸消化组活菌数logCFU/mL/对照组活菌数logCFU/mL)×100%。

[0071] 经胃酸消化2小时后,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)存活率为121%(图3),与PBS对照组相比没有显著性差异,表明该菌株耐酸能力强,能够在胃部环境中存活、定植。

[0072] 实施例3动物双歧杆菌乳亚种ATM-209 (GOLDGUT-BB18)体外抑菌性能检测

[0073] 1、菌株培养

[0074] 幽门螺杆菌*Helicobacter pylori* NCTC11639(以下简称*H. pylori*)经血平板培养基复苏后接种于BD液体培养基,37℃微需氧条件培养48h;动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)经MRS固体培养基活化后接种于MRS液体培养基,37℃培养24h。

[0075] 微需氧条件是指氧气浓度5%(体积百分含量)、二氧化碳浓度10%(体积百分含量)的环境。

[0076] 2、抑菌试验

[0077] 采用打孔法进行抑菌试验,将动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)过夜培养菌液于6000rpm离心10分钟后取上清,经0.22μm滤头除菌后得到菌株发酵上清液。在MH固体培养基上涂布幽门螺杆菌至10E9 CFU,待平板干涸后用打孔器打孔,向孔中加入菌株发酵上清液,以PBS作为阴性对照。37℃微需氧孵箱中培养血平板48h,测量抑菌圈直径。与PBS对照组相比,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)发酵上清液显著增加了抑菌圈直径(图4),表现出明显的体外抑制幽门螺杆菌的效果。

[0078] 实施例4沙鼠模型中动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)抑制幽门螺杆菌效果检测

[0079] 分组:36只蒙古沙鼠,雄性,6-8周龄,适应喂养一周后随机分为4组,分别为空白组(6只)、Hp感染组(只灌胃*H. pylori*,12只)、抗生素药物组(先灌胃*H. pylori*后灌胃铋剂四联,6只)、益生菌组(先灌胃*H. pylori*后灌胃动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18),12只)。

[0080] 造模:待造模沙鼠禁食不禁水24h后,使用小鼠灌胃针进行10⁸CFU幽门螺杆菌菌液的灌胃处理,灌胃处理持续10日。

[0081] 干预:确认造模成功后开始进行抗生素药物和益生菌饲喂。抗生素药物组沙鼠,使用铋剂四联;益生菌组沙鼠,使用小鼠灌胃针进行10⁸CFU益生菌的灌胃处理,持续21天。益生菌选择处于生长对数期的生长旺盛的菌液。Hp感染组沙鼠和空白组沙鼠,同样使用小鼠灌胃针进行生理盐水的灌胃处理,持续21天。

[0082] 干预21天后处死小鼠,取胃部组织,用10%福尔马林固定,经石蜡切片后,进行Warthin-Starry硝酸银染色。螺旋体表面的粘蛋白会特异性的与银结合,呈黑色。Hp感染组胃组织硝酸银染色图中可看到黑色短棒状颗粒及菌丝,被染色程度最严重,面积最大。抗生素治疗可以改变感染情况,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)可以轻微改善被感染情况(图5)。

[0083] 实施例5沙鼠模型中胃组织病理学分析

[0084] 取实施例4中灌胃后四组实验沙鼠的胃组织切片,进行苏木精-伊红染色。结果见图6。图片均显示了前胃和后胃,前胃主要为鳞状上皮,后胃为柱状上皮。胃壁主要包括黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层,各层组织结构正常。在空白组中,未见黏膜上皮细胞变性、坏死,固有层、黏膜下层未见炎细胞浸润;Hp感染组中黏膜上皮细胞轻度变性、坏死,固有层、黏膜下层少见炎细胞浸润;而在抗生素药物组和益生菌组中,黏膜上皮细胞轻微变性、坏死,固有层、黏膜下层轻微炎细胞浸润。病理组织评分见表1。以上结果表明,与抗生素类似,动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)干预减轻了幽门螺杆菌感染造成的胃组织病变和炎症。

[0085] 表1实施例5中不同组别胃组织病理组织评分表

组织病理学检查记录表		
组别	编号	病理组织学评分
空白组	1	0
	2	0
	3	1
	4	0
	5	0
益生菌组	1	1
	2	2
	3	1
	4	0
	5	1
[0086] 抗生素组	1	1
	2	1
	3	0
	4	0
	5	1
感染组	1	2
	2	1
	3	2
	4	2
	5	2
注：所有形态改变根据轻重标记为“1分”“2分”“3分”“4分”，分别表示轻微、轻度、中度、重度，无病变标记为“0分”，缺失记“无”。		

[0087] 实施例6沙鼠模型中胃粘膜组织尿素酶分析

[0088] Hp在胃内可以产生大量尿素酶，因此可通过检测尿素酶来判断Hp感染。尿素酶黄色试纸的最终颜色为黄色则视为阴性，为玫瑰色或者浅红色则视为阳性。取实施例4灌胃后四组实验沙鼠的胃组织粘膜，用牙签取组织放在尿素酶黄色试纸中央，然后将不干胶覆合在塑料胶片上，使不干胶与塑料胶片紧密结合，1-3分钟观察试纸颜色变化，见图7。抗生素药物组与空白组HP未显示为阳性，Hp感染组与益生菌组的HP结果为阳性，但益生菌组与感染组相比，试纸颜色明显偏黄，这表明动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)干预可

以明显降低幽门螺杆菌载量。

[0089] 实施例7沙鼠模型中胃粘膜组织炎症分析

[0090] 取实施例4灌胃后四组实验沙鼠的胃组织粘膜,加入RIPA裂解液后充分匀浆,提取组织中的蛋白质。采用BCA试剂盒测定总蛋白含量。使用酶联免疫吸附试剂盒测定促炎细胞因子白介素-6(IL-6)和促炎细胞因子白介素-8(IL-8)的含量。从图8可以看出,与感染组相比,益生菌处理显著降低了IL-6和IL-8蛋白水平,且益生菌组的IL-6和IL-8蛋白水平显著低于抗生素药物组,这表明动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)能够减轻幽门螺杆菌感染造成的胃组织炎症反应,其效果优于常用于幽门螺杆菌感染治疗的抗生素。

[0091] 综上所述,本发明通过分离筛选获得了一株动物双歧杆菌乳亚种,命名为动物双歧杆菌乳亚种ATM-209(GOLDGUT-BB18)。对该株动物双歧杆菌乳亚种进行体外耐酸、抑制幽门螺杆菌生长的实验,证明该株动物双歧杆菌乳亚种对胃环境具有强耐受性且具有抑制幽门螺杆菌生长的效果。进一步通过蒙古沙鼠模型发现该株动物双歧杆菌乳亚种能够有效降低幽门螺杆菌的体内生长以及缓解由幽门螺杆菌感染所造成的胃组织炎症。由此表明,该菌株适于消化道环境,且具有优异的对抗幽门螺杆菌的能力,在对抗胃肠道致病菌幽门螺杆菌方面具有广阔的应用前景。

[0092] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

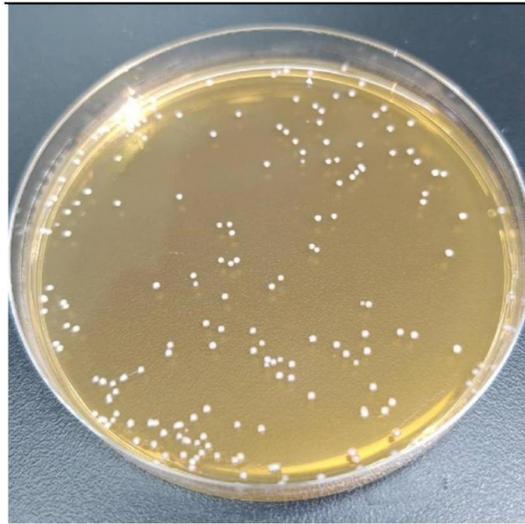


图1

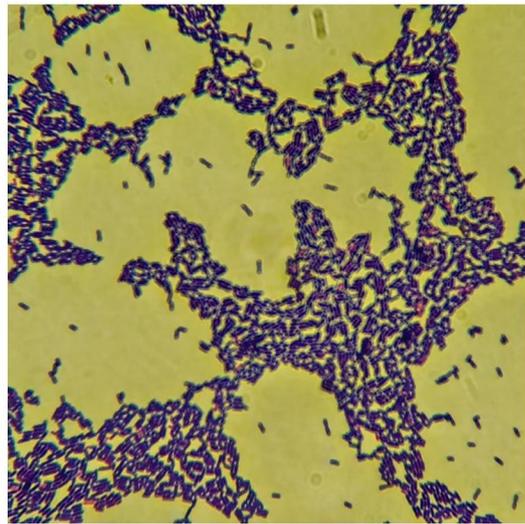


图2

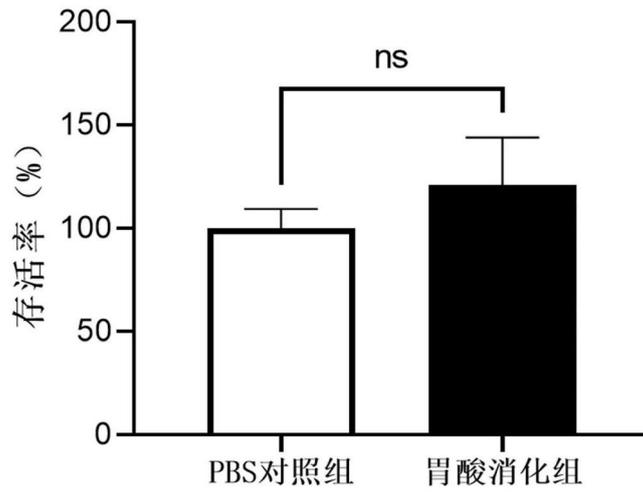


图3

动物双歧杆菌乳亚种ATM-209抗幽能力检测

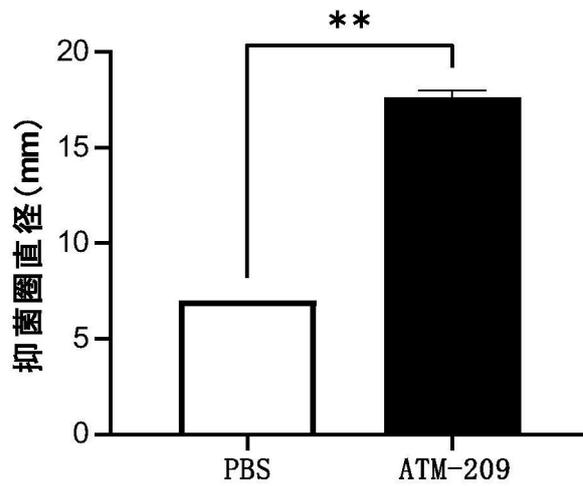
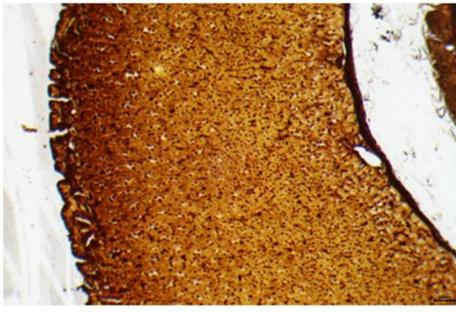
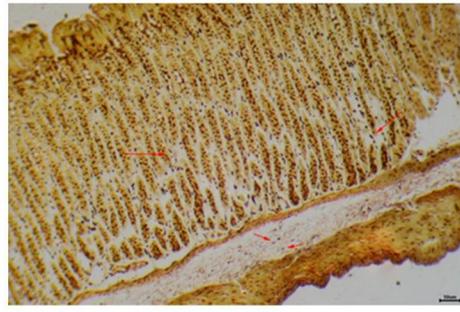


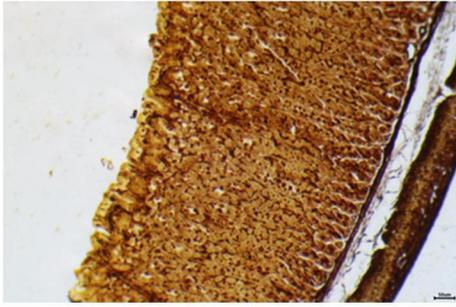
图4



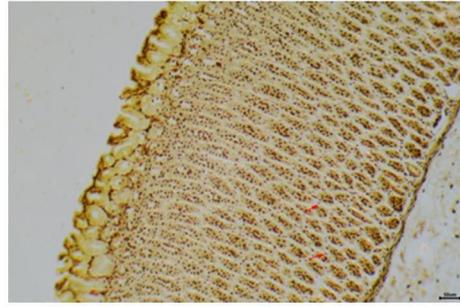
A



B

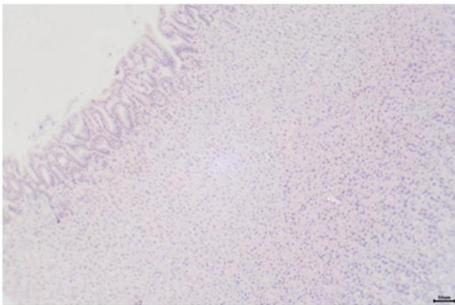


C

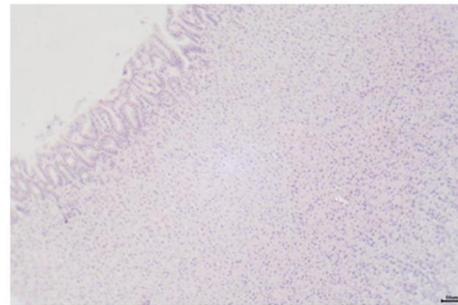


D

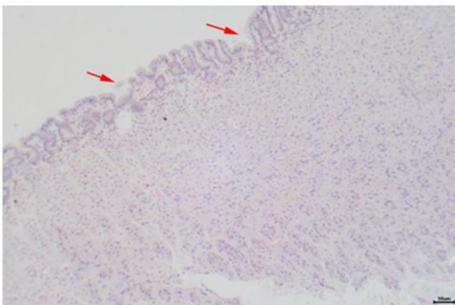
图5



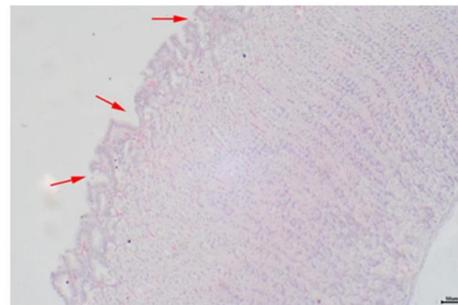
A



B



C



D

图6



A



B



C



D

图7

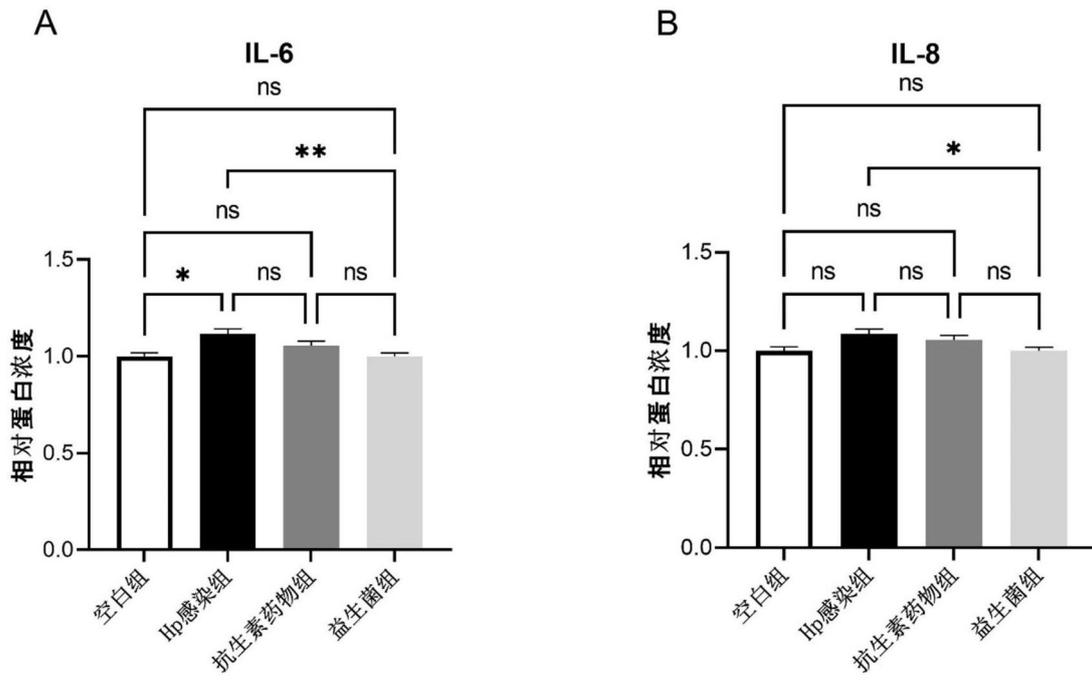


图8