



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113122485 A

(43) 申请公布日 2021.07.16

(21) 申请号 202110620926.0

A61P 29/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.03

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

GDMCC NO:61552 2021.03.09

(71) 申请人 海南大学

地址 570100 海南省海口市人民大道58号

(72) 发明人 张家超 汪媛媛 黎嘉和 霍冬雪

张琳 韩哲 沈思源

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司

公司 31253

代理人 龙凯

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

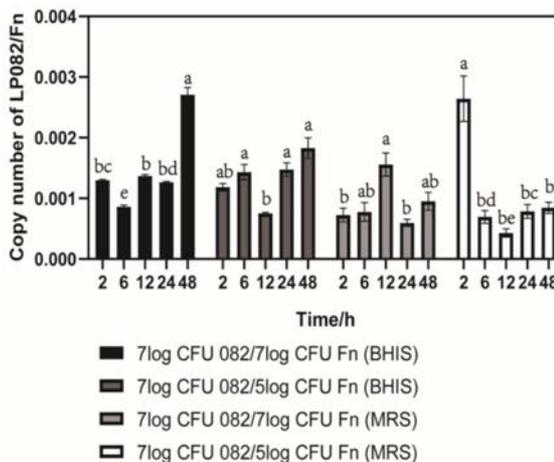
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用

(57) 摘要

本发明具体公开了一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用。该菌株已于2021年3月9日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:61552,保藏地址:中国广州市先烈中路一百号省微生物所实验楼五楼,分类学命名:植物乳杆菌(Lactiplantibacillus plantarum);本发明从大量的样品筛选得到一株植物乳杆菌HNU082,该菌无论是在体外还是在体内,均表现出对具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum)较好的拮抗作用;另外,所述的植物乳杆菌HNU082能诱导抗炎细胞因子的产生,增强肠道和系统免疫反应,通过降低pH值抑制致病菌的生长,并且增加短链脂肪酸的含量,从而降低炎症因子的表达,为益生菌对Fusobacterium nucleatum的体内拮抗提供了一种可行的干预策略,为早期结直肠癌的预防提供了可靠依据。



1. 一株植物乳杆菌 HNU082, 其特征在于, 分类学命名为植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*), 其保藏编号为 GDMCC NO:61552。

2. 权利要求1所述的植物乳杆菌 HNU082 的应用, 其特征在于, 所述植物乳杆菌 HNU082 用于具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 的拮抗作用。

3. 如权利要求2所述的植物乳杆菌 HNU082 的应用, 其特征在于, 所述植物乳杆菌 HNU082 对具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 产生拮抗作用时, 所述植物乳杆菌 HNU082 菌液浓度大于所述具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 菌液浓度。

4. 如权利要求2所述的植物乳杆菌 HNU082 的应用, 其特征在于, 所述植物乳杆菌 HNU082 对具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 产生拮抗作用的培养基成分如下: 脑心浸液肉汤 37.0g, 酵母提取物 5.0g, 刃天青 0.001g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g, 血晶素 0.0025g, 维生素 K1 0.001g, 蒸馏水定容至 1L。

一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用。

背景技术

[0002] 结直肠癌(CRC)是一种常见的胃肠道恶性肿瘤,处于全球内致死癌症的第二位。特别是在50岁以下的人群中,结直肠癌的发病率正在上升,预计到2030年,结直肠癌患者的数量将增加60%,新增病例将超过220万,死亡人数将达到110万。很多因素与CRC发病相关,如饮食、遗传等因素;除上述因素外,大量研究表明CRC与胃肠道中的一些细菌密切相关,越来越多的证据表明,具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)是一种潜在的生物标志物,其与结直肠癌(CRC)的发生发展呈正相关。不同地区的研究均发现,结直肠癌患者粪便样本中的*Fusobacterium nucleatum*的相对丰度不仅高于健康组,而且在肿瘤组织中的*Fusobacterium nucleatum*的相对丰度也明显高于其他健康组织。随着研究的进一步深入,研究人员发现,从早期癌症前期的病变到晚期癌症这一过程中,*Fusobacterium nucleatum*的数量显著增加;此外,菌株*Fusobacterium nucleatum*与CRC患者生存率呈负相关。有研究表明,与其对照的组织相比,含有高相对丰度*Fusobacterium nucleatum*的肿瘤组织的CRC患者更容易发生癌细胞的转移,其总生存时间更短,这表明*Fusobacterium nucleatum*丰度的增加与结直肠癌的发生和发展有关。因此,减少患者肠道内*Fusobacterium nucleatum*的丰度可能是预防和治疗结肠直肠癌的一种潜在策略。

[0003] 甲硝哒唑是一种用于治疗小鼠结肠癌异种移植的抗生素,其可以减少小鼠体内*Fusobacterium nucleatum*的丰度,降低癌细胞增殖和整体肿瘤生长。然而,使用抗生素治疗会对小鼠肠道内微生物产生影响,因为其非选择性地杀死其他细菌,改变肠道微生物群结构,降低整体微生物多样性,导致微生物群紊乱。同时,抗生素会破坏正常肠道菌群的定殖抗性,使病原体或潜在病原体更容易繁殖。此外,抗生素还会对肠道微生物的代谢能力产生暂时或永久的影响,这是对肠道菌群造成不可逆转的损害。为了特异性地抑制*Fusobacterium nucleatum*增殖,研究人员采用了噬菌体疗法,但这可能会加重炎症,因为噬菌体增加了上皮细胞的通透性,改变了肠道免疫力。

[0004] 近年来,益生菌成为研究热点,因为益生菌能够调节肠道菌群,增强肠道上皮屏障,调节机体的代谢。相比抗生素、噬菌体疗法,益生菌疗法是一种新型的、对机体副作用小、效果显著的疗法。因此,如何找到一株能抑制具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)增殖的益生菌,已经成为预防和治疗结肠直肠癌的一种潜在方向和策略。

发明内容

[0005] 针对现有技术中的不足,本发明提供了一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用。本发明从大量的样品筛选得到一株植物乳杆菌HNU082,该菌无论是在体外还是在体内,均表现出对具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)较好的拮抗作用;另外,所述的

植物乳杆菌HNU082能诱导抗炎细胞因子的产生,增强肠道和系统免疫反应,通过降低pH值抑制致病菌的生长,并且增加短链脂肪酸的含量,从而降低炎症因子的表达,为益生菌对*Fusobacterium nucleatum*的体内拮抗提供了一种可行的干预策略,为早期结直肠癌的预防提供了可靠依据。

[0006] 为解决现有技术中存在的问题,本发明是通过如下技术方案实现的:

[0007] 本发明的一个目的在于提供一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082。

[0008] 一株植物乳杆菌HNU082,该菌株已于2021年3月9日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:61552,保藏地址:中国广州市先烈中路一百号省微生物所实验楼五楼,分类学命名:植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。

[0009] 植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) HNU082在MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,菌落称白色,直径0.1-0.2cm,表面光滑、湿润、隆起,边缘齐整,在光学显微镜下观察,呈杆状;扩增的16S rDNA由1474bp组成,同源比对分析发现,HNU082与*Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917(T)的序列相似性为99.80%,与*Lactiplantibacillus fabifermentans* DSM 21115(T)的序列相似性为98.91%,与*Lactiplantibacillus songbeiensis* 398-2(T)的序列相似性为98.40%。进化树分析显示HNU082与*Lactiplantibacillus plantarum*聚集在同一分支,所述的植物乳杆菌HNU082的16S rDNA的序列如SEQ ID NO:1所示,基于细胞形态、16S rDNA测序比对分析可知,HNU082归属于植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082的应用。

[0011] 所述植物乳杆菌HNU082用于具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)的拮抗作用。

[0012] 进一步地,所述植物乳杆菌HNU082对具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)产生拮抗作用时,所述植物乳杆菌HNU082菌液浓度大于所述具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)菌液浓度。

[0013] 进一步地,所述植物乳杆菌HNU082对具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)产生拮抗作用的培养基成分如下:脑心浸液肉汤37.0g,酵母提取物5.0g,刃天青0.001g,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g,血晶素0.0025g,维生素K1 0.001g,蒸馏水定容至1L。

[0014] 与现有技术,本发明具有如下优点:

[0015] 本发明从大量的样品筛选得到一株植物乳杆菌HNU082,该菌无论是在体外还是在体内,均表现出对具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)较好的拮抗作用;另外,所述的植物乳杆菌HNU082能诱导抗炎细胞因子的产生,增强肠道和系统免疫反应,通过降低pH值抑制致病菌的生长,并且增加短链脂肪酸的含量,从而降低炎症因子的表达,为益生菌对*Fusobacterium nucleatum*的体内拮抗提供了一种可行的干预策略,为早期结直肠癌的预防提供了可靠依据。

附图说明

[0016] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅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。

[0017] 图1为菌株HNU082菌落形态图；

[0018] 图2为菌株HNU082系统进化树, *Secundilactobacillus silagei* JCM19001作为外群；

[0019] 图3为实施例2中植物乳杆菌HNU082对 *Fusobacterium nucleatum* 体外拮抗结果图(横坐标:时间,纵坐标:L.plantarum HNU082的拷贝数/*F.nucleatum*的拷贝数,使用ANOVA检验,误差棒:均值±SE)；

[0020] 图4为实施例3中小鼠体内植物乳杆菌HNU082对 *Fusobacterium nucleatum* 拮抗作用结果图(双尾检验, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)；

[0021] 图5为实施例3中小鼠体内肠道组织切片染色结果图；

[0022] 图6为实施例3中小鼠血清中IL-6、IL-10、IL-1 β 和TNF- α 含量结果图；其中,图(A)为IL-6(白细胞介素6)含量结果图,图(B)为IL-1 β (白细胞介素1 β)含量结果图,图(C)为TNF- α (肿瘤坏死因子 α)含量结果图,图(D)为IL-10(白细胞介素10)含量结果图；

[0023] 图7为实施例3中小鼠体内肠道代谢物短链脂肪酸的含量结果图。

具体实施方式

[0024] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明的实施例,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。

[0025] 本发明实施例中涉及到的培养基配方及试剂组分如下：

[0026] MRS肉汤培养基:蛋白胨10g,牛肉膏粉8g,酵母膏粉4g,葡萄糖20g,磷酸氢二钾(无水)2g,柠檬酸三氨(无水)2g,乙酸钠(含三水)5g,硫酸镁(七水)0.2g,硫酸锰(含四水)0.05g,吐温-80 1g,蒸馏水定容至1L,调节pH至 6.2 ± 0.2 ,121℃高压灭菌15min。

[0027] MRS琼脂培养基:在MRS肉汤培养基的基础上加入2%琼脂。

[0028] BHIS培养基:脑心浸液肉汤37.0g,酵母提取物5.0g,刃天青0.001g,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g,血晶素0.0025g,维生素K1 0.001g,蒸馏水定容至1L,121℃高压灭菌15min。

[0029] 正常脂肪饲料配方:以质量100%计,包含质量分数为41%的玉米、质量分数为26%的麸皮、质量分数为29%的豆饼、质量分数为1%的氯化钠、质量分数为1%的骨粉、质量分数为1%的赖氨酸和质量分数为1%其他微量元素。

[0030] 本发明所使用的具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 购自广东省微生物菌种保藏中心。

[0031] 4周龄C57BL/6J雄性小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,饲养于特定的无病原体环境中,在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55\% \pm 10\%$ 相对湿度下昼夜循环12小时。

[0032] 其他常规试剂和设备,如无特别说明,均可市售获得。

[0033] 实施例1植物乳杆菌HNU082筛选及鉴定

[0034] 初筛:从中国海南省不同地区(包括东线地区:万宁,文昌,琼海,陵水;西线地区:临高,东方,昌江,白沙;中线地区:琼中,五指山)农贸市场共采集36份发酵蔬菜样品,准确称取10g发酵蔬菜汁于90mL无菌NaCl溶液(0.85%,W/V)中混合,采用10倍稀释法制备梯度

为 10^{-1} - 10^{-5} 的样品稀释液,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度梯度稀释液各100 μ L分别涂布于MRS琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C厌氧培养48h,经过多次分离纯化培养,得到29株初筛菌株。

[0035] 复筛:对上述29株初筛菌株进行耐酸、耐胆盐性能测定,进一步筛选出耐受力强的菌株。菌株的耐酸能力测定方法如下:用1mol/L的HCl调节MRS肉汤培养基至pH值分别为2.5、3.5,将活化好的菌株按3% (V/V) 接种量分别接种于不同pH值的MRS肉汤培养基中,37 $^{\circ}$ C培养4h,10倍梯度稀释后涂布于MRS琼脂培养基上,计数,测定其中的活菌数,计算存活率,同时设置空白对照,结果见表1;菌株的耐胆盐能力测定方法如下:制备含0.3%、0.4%、0.5% (V/V) 牛胆盐的MRS肉汤培养基中,37 $^{\circ}$ C培养4h,10倍梯度稀释后涂布于MRS琼脂培养基上,计数,测定其中的活菌数,计算存活率,同时设置空白对照,结果见表2:

[0036] 表1不同pH下菌株的存活率

[0037]	菌株	存活率 (%)		菌株	存活率 (%)	
		pH=2.5	pH=3.5		pH=2.5	pH=3.5
	M6-4	84.50	100	R19-1	26.60	36.40
	R1-2	75.30	99.10	M21-2	55.20	35.80
	M7-1	85.10	81.30	R18-2	28.5	33.90
	R21-4	83.80	72.20	M19-3	26.70	28.90
	RE-3	72.10	67.30	M1-3	20.80	26.20
	M20-6	62.40	65.10	R9-5	16.10	25.00
	R21-3	52.60	59.60	R22-2	18.60	24.60
[0038]	RD-1	50.80	56.50	M20-5	17.60	24.50
	HNU082	42.00	51.90	R26-4	20.10	24.40
	RB-3	42.40	51.70	R21-2	15.30	20.70
	R21-1	48.50	49.80	R27-1	14.80	19.40
	R4-3	42.20	49.40	M3-5	17.80	19.30
	R22-1	41.30	47.70	M9-4	15.00	18.80
	R25-3	45.50	46.80	R5-2	13.90	16.80
	R9-7	33.20	43.00			

[0039] 表2不同胆盐浓度下菌株的存活率

菌株	存活率 (%)			菌株	存活率 (%)		
	0.3%	0.4%	0.5%		0.3%	0.4%	0.5%
HNU082	36.9	23.4	23.1	M19-3	1	0.6	0.5
M20-6	22.3	17.4	10.8	RD-1	6.4	1.9	0.3
M7-1	53.5	19.5	9.9	R22-2	19.3	0.1	0.2
R27-1	10.6	6.4	5.8	M9-4	1.4	1.6	0.2
RB-3	25.4	21.5	5.7	M1-3	0.4	0.2	0.2
M20-5	4.5	10.9	4.4	R22-1	2.2	1	0.2
R26-4	6.4	4.3	3.9	R19-1	1	0.4	0.2
R21-1	16.8	4.7	3	M6-4	0.1	0	0.1
M3-5	5.3	4.7	2.5	R25-3	0.2	0	0.1
R1-2	4.7	4.3	2.1	R4-3	0.6	0	0
R21-3	5.4	1.3	1.7	RE-3	3.7	0.2	0
R5-2	14.3	32.9	1.5	R21-4	0.2	0	0
M21-1	2.3	1.5	0.9	R18-2	0.1	0	0
R21-2	1	0.9	0.7	R9-7	1.2	0.3	0
R9-5	1.1	0.7	0.5				

[0041] 从表1和表2的结果可以看出,随着环境中pH值的降低,各菌株的酸耐受能力逐渐降低,随着胆盐浓度的逐步增加,各菌株的存活率也显著下降。综合耐酸、耐胆盐性能来看,HNU082菌株在0.3%、0.4%、0.5%胆盐浓度下的存活率分别能够达到36.9%、23.4%、23.1%,在pH=2.5、pH=3.5的环境下存活率能够达到42%、51.9%,表明HNU082菌株具有良好的耐受性。

[0042] 菌株形态学观察:将纯化的HNU082菌株接种于MRS肉汤培养基过夜活化,涂布于MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,观察菌落的表面形态。

[0043] 分子生物学鉴定:对HNU082菌株的16S rRNA基因进行测序,具体如下:以HNU082菌株的基因组DNA为模板,通用引物27F和1492R扩增16S rDNA序列,纯化后插入到pMD18-T载体(Takara),转化到E.coli DH5α,得到阳性克隆送上海美吉生物医药科技有限公司测序,将测序得到的序列与在线软件,将测序得到的序列与在线软件EzBioCloud's Identify Service模块的EzTaxon-e(<http://www.ezbiocloud.net/identify>)中细菌数据库序列进行同源比对分析,使用MEGA6.5软件,以N-J法进行聚类分析和系统进化树的构建,重复取样1000次,并且运用自展(Bootstrap)法检验所计算的进化树拓扑结构稳定性,发育树节点只显示Bootstrap值大于50%数值,上标的“T”表示模式菌株。

[0044] 引物序列如下:

[0045] 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(SEQ ID NO.2);

[0046] 1492R:R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO.3)

[0047] HNU082菌株具体鉴定信息如下:

[0048] 形态特征:在MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,菌落称白色,直径0.1-0.2cm,表面光滑、湿润、隆起,边缘齐整,在光学显微镜下观察,呈杆状,见图1。

[0049] 16s rDNA测序:扩增的16s rDNA由1474bp组成,同源比对分析发现,HNU082与Lactiplantibacillus plantarum ATCC 14917 (T) 的序列相似性为99.80%,与Lactiplantibacillus fabifermentans DSM 21115 (T) 的序列相似性为98.91%,与Lactiplantibacillus songbeiensis 398-2 (T) 的序列相似性为98.40%。进化树分析显示HNU082与Lactiplantibacillus plantarum聚集在同一分支,见图2。所述的植物乳杆菌HNU082的16S rDNA的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0050] 基于细胞形态、16S rDNA测序比对分析可知,HNU082归属于植物乳杆菌(Lactiplantibacillus plantarum)。

[0051] 实施例2植物乳杆菌HNU082对Fusobacterium nucleatum体外拮抗实验

[0052] 为了研究植物乳杆菌HNU082和Fusobacterium nucleatum的体外拮抗作用,将上述两种菌株接种到BHIS液体培养基(MRS液体培养基)中,在37℃,150rpm/min的条件下共培养,并在不同时间点(2h、6h、12h、24h、48h)提取DNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time Polymerase Chain Reaction,qPCR)方法,从而获得F.nucleatum和L.plantarum HNU082的丰度。实验共分为4组,具体信息如表3所示:

[0053] 表3实验分组情况

[0054]

项目	分组情况
第一组	BHIS+10 ⁷ CFU/mL L.plantarum HNU082+10 ⁷ CFU/mL F.nucleatum
第二组	BHIS+10 ⁷ CFU/mL L.plantarum HNU082+10 ⁵ CFU/mL F.nucleatum
第三组	MRS+10 ⁷ CFU/mL L.plantarum HNU082+10 ⁷ CFU/mL F.nucleatum
第四组	MRS+10 ⁷ CFU/mL L.plantarum HNU082+10 ⁵ CFU/mL F.nucleatum

[0055] 根据使用说明书,使用QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen,Hilden, Germany)从细菌样本中提取基因组DNA,DNA浓度的测定在仪器NanoDrop2000 (Novogene, Beijing,China)上进行;qPCR使用SYBR Green Master Mix在Roche LightCycler 480Real-Time PCR System (Indianapolis,IN,USA)上进行。F.nucleatum对应的引物分别为:

[0056] 上游引物序列5'-CTTAGGAATGAGACAGAGATG-3' (SEQ ID NO.4)

[0057] 下游引物序列5'-TGATGGTAACATACGAAAGG-3' (SEQ ID NO.5)

[0058] 菌株F.nucleatum的qPCR方法如下:95℃预变性10min,95℃退火15sec,56℃延伸30sec,72℃末端延伸30sec,其中退火,延伸和末端延伸共循环45次。

[0059] L.plantarum HNU082对应的引物分别为:

[0060] 上游引物序列5'-GCCTTGAACCTTGTGCCTGTC-3' (SEQ ID NO.6)

[0061] 下游引物序列5'-GGCTTGCCTGTTGATGCTTA-3' (SEQ ID NO.7)

[0062] 菌株L.plantarum HNU082的qPCR方法如下:94℃预变性5min,94℃退火1min,62℃延伸45sec,72℃末端延伸20sec,其中退火,延伸和末端延伸共循环30次。

[0063] 上述所有qPCR反应均在20μL反应体系中进行,所述反应体系包括1μLDNA模板,1μL上游引物,1μL下游引物,10μL Light Cycler 480SYBR Green I Master,7μL dd H₂O,所有的PCR样品都重复3次,所得的结果如图3所示:

[0064] 从图3的结果图可以看出,当浓度为10⁷CFU/mL的F.nucleatum与浓度为10⁷CFU/mL的L.plantarum HNU082在BHIS液体培养基中共培养时,F.nucleatum生长受到抑制;当浓度

为 10^7 CFU/mL的*F.nucleatum*与浓度为 10^5 CFU/mL的*L.plantarum* HNU082在BHIS液体培养基中共培养时,*F.nucleatum*受到的抑制作用无显著性差异;因此,在BHIS液体培养基中,当*L.plantarum* HNU082的菌液浓度较大时,菌株*L.plantarum* HNU082可以拮抗菌株*F.nucleatum*。在BHIS液体培养基中,当初始*L.plantarum* HNU082的菌液数量大于*F.nucleatum*的菌液数量时,*L.plantarum* HNU082对*F.nucleatum*的抑制作用会随着培养时间的增加而增强;然而在MRS培养基中,*L.plantarum* HNU082与*F.nucleatum*之间没有显著的相关性。

[0065] 实施例3植物乳杆菌HNU082对*Fusobacterium nucleatum*体内拮抗动物实验

[0066] 取4周龄C57BL/6J雄性小鼠24只,经过14天的正常饲养适应后,将小鼠随机分为3组,具体分组见表4。每组8只,各组每日灌胃量均为300 μ L;所有小鼠进行6周的干预,在最后一天,小鼠禁食24小时后安乐死,然后进行眼球取血、收集结肠和直肠结肠等操作。

[0067] 表4试验小鼠分组情况

组别	动物数	灌胃方式	灌胃剂量
control	8	正常脂肪饮食+生理盐水	300 μ L
Fn	8	正常脂肪饮食+ 10^8 CFU/mL <i>F. nucleatum</i>	300 μ L
LP082	8	正常脂肪饮食+ 10^8 CFU/mL <i>F. nucleatum</i> + 10^9 CFU/mL <i>L. plantarum</i> HNU082	300 μ L

[0069] 3.1小鼠体内植物乳杆菌HNU082对*Fusobacterium nucleatum*拮抗作用试验

[0070] 取各实验小组小鼠体内的肠道内容物,一部分用于拮抗作用的测试,另一部分用于短链脂肪酸的测试。具体地,采用实施例2中的方法提取肠道内容物中的基因组,并进行qPCR的测试,所得的结果如图4所示:

[0071] 从图4的结果可以看出,与对照组相比,Fn组的*F.nucleatum*相对丰度显著增加($p < 0.01$),LP082组的*F.nucleatum*相对丰度显著降低,略高于对照组;这一结果表明,在小鼠体内*L.plantarum* HNU082对*F.nucleatum*有较好的拮抗作用。

[0072] 3.2小鼠体内肠道组织学和形态学评估

[0073] 将收集的各组小鼠结肠和直肠用磷酸盐缓冲液洗涤,并立即用多聚甲醛固定;对直肠组织进行脱水干燥、石蜡处理、包埋和切片处理,然后用苏木精和伊红对4微米厚的组织切片进行染色,最后用显微镜观察(Nikon, Shanghai, China),并进行图像采集和分析,具体结果见图5:

[0074] 从图5的结果图可以看出,与对照组相比,Fn组结肠组织结构略有改变,包括肌肉层增厚,免疫细胞轻度浸润;灌胃*F.nucleatum*可导致结肠炎症细胞因子异常和轻微的组织学变化;与Fn组相比,LP082组的肌肉层厚度明显降低,而且免疫细胞浸润减少,进一步地表明,*L.plantarum* HNU082对*F.nucleatum*有较好的拮抗作用。

[0075] 3.3小鼠血清中IL-6、IL-10、IL-1 β 和TNF- α 的检测

[0076] 取各组小鼠眼球,放出其中的血液,血液静置后离心,得到血清;用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Xin Yu Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China)检测血清中白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等免疫因子,具体结果见图6:

[0077] 从图6的结果图可以看出,小鼠经过6周饲养后,血液指标显示:与对照组相比,Fn

组的血清中促炎因子IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度升高, 抗炎因子IL-10浓度降低; IL-6和TNF- α 刺激多种信号通路, 如导致肿瘤细胞增殖的JAK/STAT。灌胃F.nucleatum可导致结肠炎症细胞因子异常, 表明F.nucleatum对小鼠的健康有一定的影响; 与Fn组相比, 加入L.plantarum HNU082后, 可减轻F.nucleatum诱导的炎症反应, 显著降低IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平; 此外, LP082组小鼠IL-10恢复到正常水平。进一步地表明L.plantarum HNU082和F.nucleatum等量灌胃可减少F.nucleatum诱导的促炎细胞因子和抗炎细胞因子的分泌, 减轻炎症反应, 促进愈合。

[0078] 3.4小鼠体内肠道代谢物短链脂肪酸的检测

[0079] 用镊子将步骤3.1中的另外一部分小鼠体内的肠道内容物从结肠中轻轻压出, 向小鼠结肠内容物加入1mL 0.5mol/L硫酸溶液, 超声振荡20min (40 $^{\circ}$ C, 35kHz)。在样品中准确加入1ml的4 $^{\circ}$ C的乙醚后, 涡旋5分钟, 随后12000g离心5分钟, 将上方的乙醚溶液收集到自动进样瓶中进行分析。GC-MS分析采用Agilent 7890A-5975C GC-MS系统, 该系统采用了Agilent DB-WAX柱 (0.25mm \times 0.25 μ m \times 50cm), 气相色谱条件为: 进样口温度250 $^{\circ}$ C; 气体界面温度250 $^{\circ}$ C; 载气流速1.5mL/min; 分流比为3:1; 进样体积1 μ L; 温度程序如下: 最初的70 $^{\circ}$ C保持3min; 然后以10 $^{\circ}$ C/min的速度提高到100 $^{\circ}$ C, 保持2分钟; 接着以8 $^{\circ}$ C/min的速度提高到180 $^{\circ}$ C, 保持0min; 最后以10 $^{\circ}$ C/min的速度提高到250 $^{\circ}$ C, 保持15分钟。质谱条件如下: 离子源温度, 230 $^{\circ}$ C; 四极温度, 150 $^{\circ}$ C; E1电离, 70eV; 全扫描35~550da, 具体的结果见图7:

[0080] 从图7的结果图中可以看出, Fn组、LP082组和对照组的肠腔内会产生不同水平的短链脂肪酸; 灌胃F.nucleatum会抑制小鼠肠腔内短链脂肪酸的产生, 而LP082组肠道内短链脂肪酸含量高于Fn组, 说明灌胃L.plantarum HNU082会刺激了短链脂肪酸的产生, 从而降低炎症因子的表达。

[0081] 以上实施例, 仅为本发明的具体实施方式, 用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制, 本发明的保护范围并不局限于此, 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: 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内, 其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改或可轻易想到变化, 或者对其中部分技术特征进行等同替换; 而这些修改、变化或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 海南大学

<120> 一株具有拮抗作用的植物乳杆菌HNU082及其应用

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1474

<212> DNA

<213> 植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*)

<400> 1

```

gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgaactct ggtattgatt ggtgcttgca 60
tcatgattta catttgagtg agtggcgaac tggtgagtaa cacgtgggaa acctgcccag 120
aagcggggga taacacctgg aacagatgc taataccgca taacaacttg gaccgcatgg 180
tccgagtttg aaagatggct tcggctatca cttttgatg gtcccgcggc gtattagcta 240
gatggtgggg taacggctca ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg 300
ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc 360
acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgta 420
aaactctggt gtaaagaag aacatatctg agagtaactg ttcaggtatt gacggtatth 480
aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccacgg taatacgtag gtggcaagcg 540
ttgtccggat ttattgggcg taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag 600
ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca 660
gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag 720
gcggtgtctt ggtctgtaac tgacgtgag gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta 780
gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag tgttgagggg tttccgcct 840
tcagtgtgc agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcta 960
cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac tatgcaaac taagagatta gacgttcct 1020
tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg cgatgttggg 1080
ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggcactct 1140
ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaac atcatgcccc 1200
ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcg aactcgcgag 1260
agtaaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat 1320
gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct 1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct 1440
ttaggaacc agccgcctaa ggtggacaga tgat 1474

```

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

tacggctacc ttgttacgac tt 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

cttaggaatg agacagagat g 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

tgatggtaac atacgaaagg 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

gccttgaact ttgtgcctgt c 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

ggctttgcct gttgatgett a 21

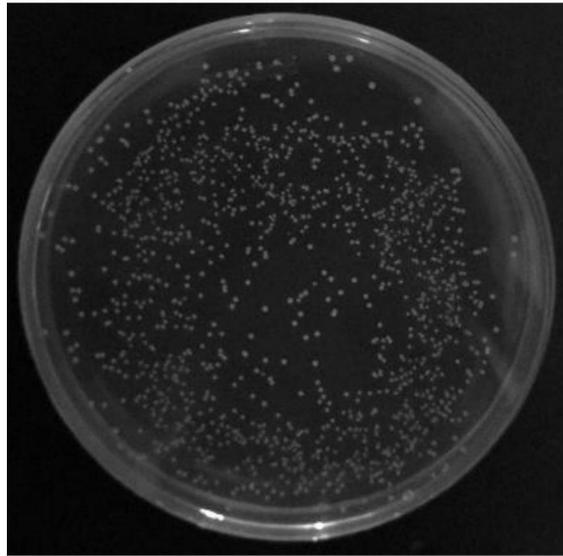


图1

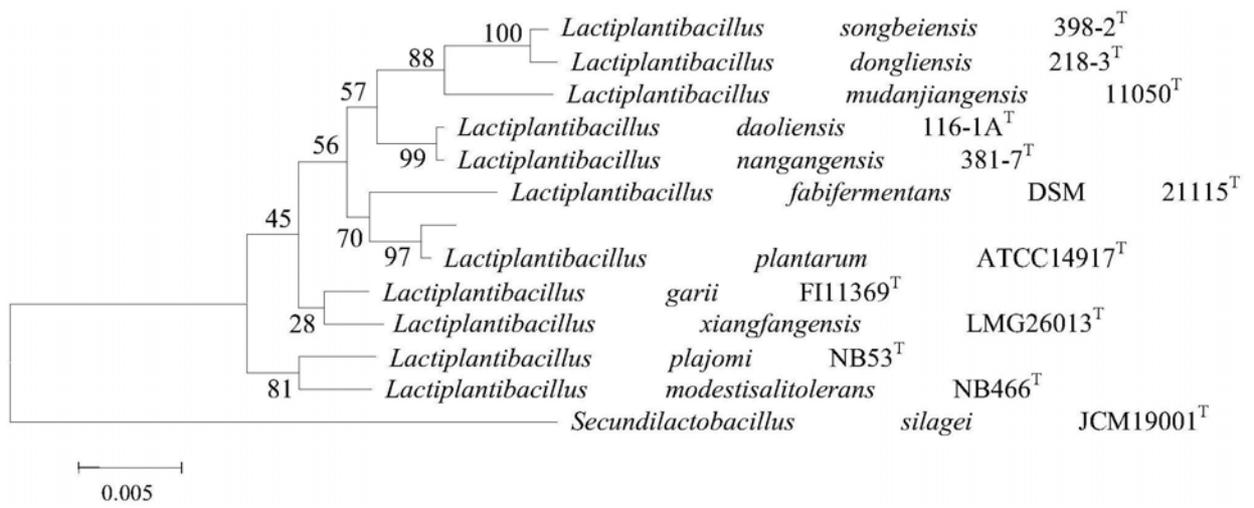


图2

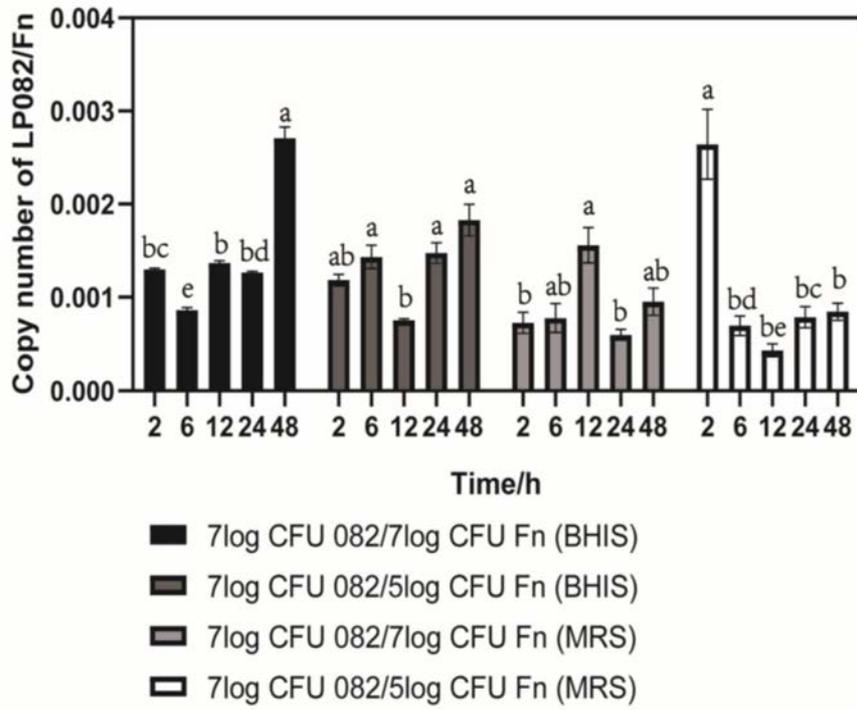


图3

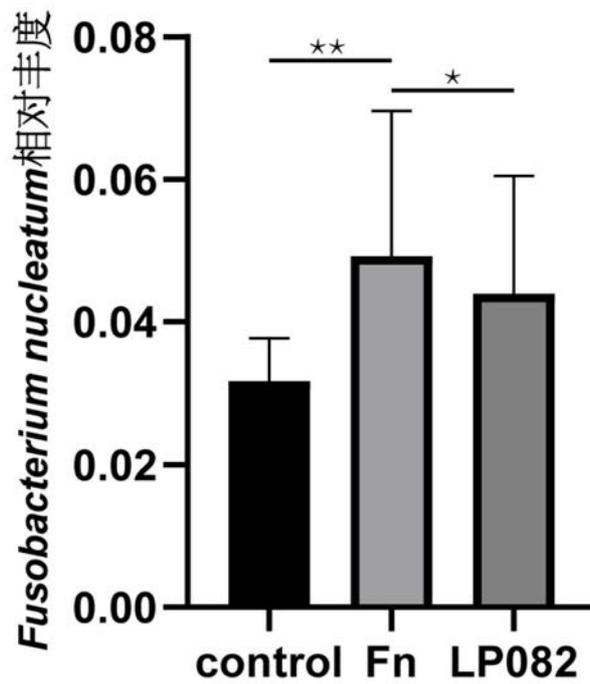


图4

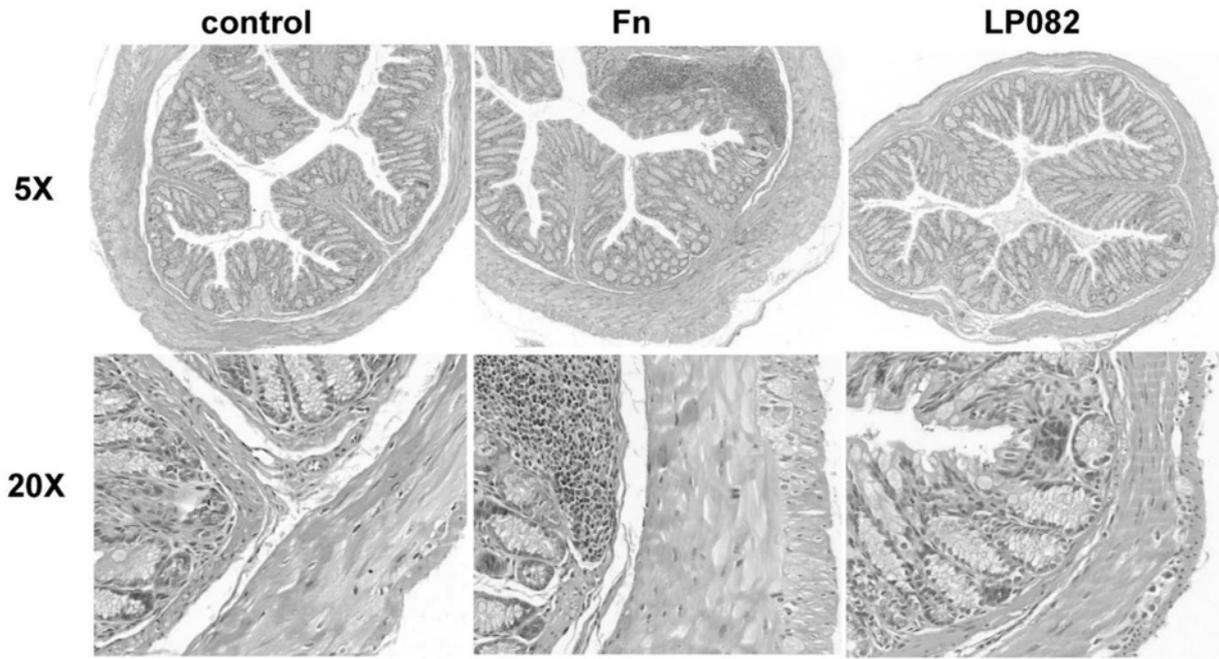


图5

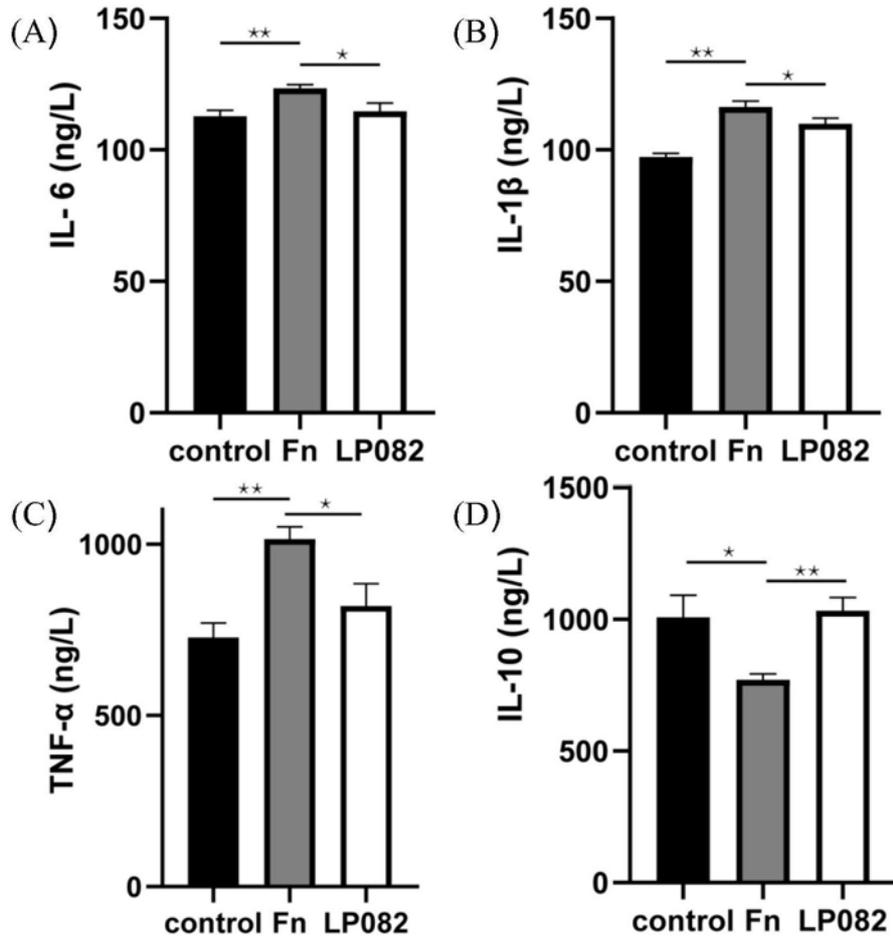


图6

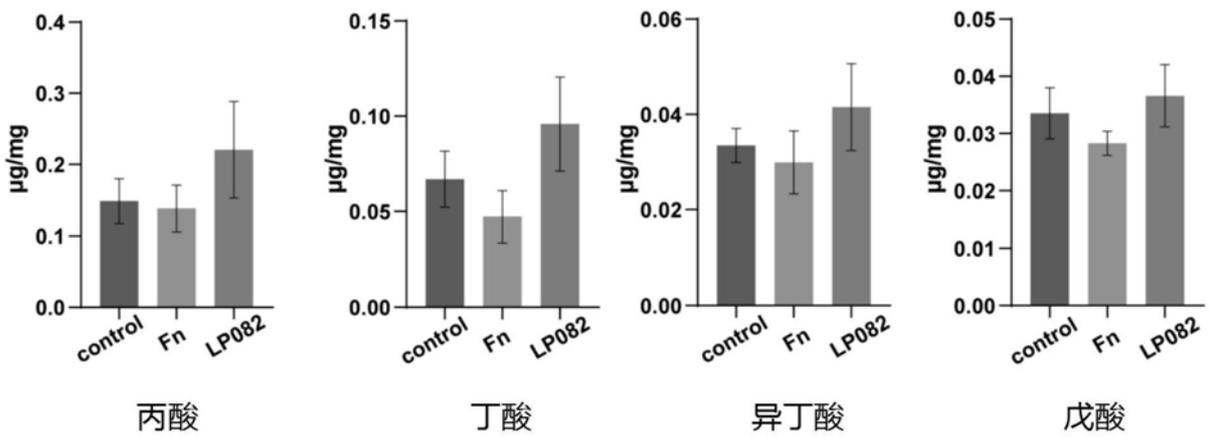


图7