



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112608864 A

(43) 申请公布日 2021.04.06

(21) 申请号 202011522325.8

A61K 8/99 (2017.01)

(22) 申请日 2020.12.21

A61Q 11/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61P 1/02 (2006.01)

GDMCC No:61116 2020.08.01

A61P 31/04 (2006.01)

(71) 申请人 江南大学

A23L 33/135 (2016.01)

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

A23C 9/123 (2006.01)

A23G 4/12 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(72) 发明人 陈卫 张秋香 徐晚晴 陆文伟
张灏 赵建新

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 林娟

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

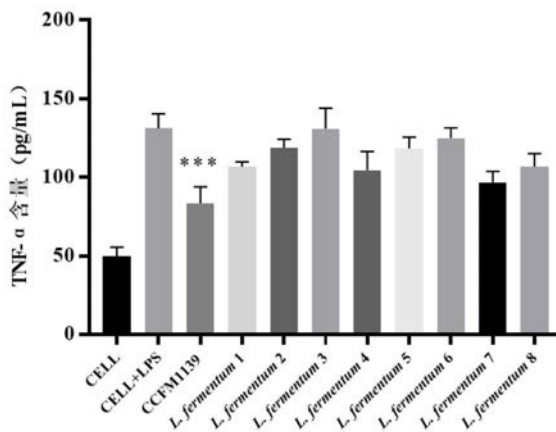
权利要求书1页 说明书12页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

一株能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌及其应用,属于微生物技术领域。本发明筛选得到了一株发酵乳杆菌CCFM1139,此发酵乳杆菌CCFM1139具有缓解牙周炎的作用,具体体现在:可以抑制牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和具核梭杆菌混菌生物膜的形成,使生物膜量减少52.45%;可以使牙周炎细胞模型中TNF- α 的含量由131.37pg/mL降低到83.31pg/mL、IL-8的含量由147.70pg/mL降低到121.12pg/mL;使牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌在口腔中的定植量减少1-2个数量级;使牙槽骨吸收量从1838.0 μ m减少到805.7 μ m。



1. 一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 其特征在于, 所述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 的分类学命名为 *Lactobacillus fermentum*, 已于2020年08月01日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No:61116。

2. 一种用于预防和/或治疗牙周炎的产品, 其特征在于, 所述产品含有权利要求1所述发酵乳杆菌。

3. 如权利要求2所述的产品, 其特征在于, 所述产品为药品、食品或日化产品。

4. 如权利要求3所述的产品, 其特征在于, 所述药品的成分包含权利要求1所述发酵乳杆菌以及药物载体。

5. 如权利要求4所述的产品, 其特征在于, 所述食品为含有权利要求1所述发酵乳杆菌的酸奶或口香糖。

6. 如权利要求5所述的产品, 其特征在于, 所述日化产品为含有权利要求1所述发酵乳杆菌的漱口水或牙膏。

7. 一种制备用于预防和/或治疗牙周炎的产品的方法, 其特征在于, 所述方法为使用权利要求1所述发酵乳杆菌。

8. 如权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述产品为药品、食品或日化产品。

9. 如权利要求8所述的方法, 其特征在于, 所述药品的成分包含权利要求1所述发酵乳杆菌以及药物载体; 所述食品为含有权利要求1所述发酵乳杆菌的酸奶或口香糖; 所述日化产品为含有权利要求1所述发酵乳杆菌的漱口水或牙膏。

10. 权利要求1所述的发酵乳杆菌在制备抑制中间普氏菌、牙龈卟啉单胞菌和/或具核梭杆菌的食品、药品或日化产品中的应用。

一株能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌及其应用,属于微生物技术领域。

背景技术

[0002] 牙周炎是一种常见的口腔疾病,可造成牙周组织附着丧失,最终导致牙齿松动脱落。牙周炎的主要致病菌包括牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌等革兰氏阴性厌氧菌,微生物引起的感染不仅会导致牙龈和牙周组织的破坏,还会刺激机体产生免疫反应,令宿主不断释放各种炎症因子,使机体长期处于炎症状态。

[0003] 在正常情况下,龈下区域中的各种微生物与富含免疫炎症介质的环境间存在一种平衡状态,能够实现宿主牙周组织内的稳态。而一旦平衡状态被破坏,原本表现为共生状态的病原菌在失调状态下便会表现出致病性。致病菌及宿主大量释放能够破坏组织的蛋白水解酶,从而刺激中性粒细胞,释放出多种酶分解牙周支持组织和结缔组织。菌斑细菌通过释放脂多糖等毒力因子到龈沟,刺激组织内的免疫细胞及成骨细胞释放炎症介质,激活巨噬细胞和成纤维细胞分泌细胞因子,诱导大量的破骨细胞形成和牙槽骨吸收。

[0004] 而细胞因子如IL-8、TNF- α 在牙周炎的进展和骨吸收中也起到了重要的作用。这些细胞因子大多由巨噬细胞、上皮细胞、成纤维细胞等对微生物、细菌毒素或机体损伤的反应而产生。这些细胞因子可以诱导破骨细胞的前体细胞增生、分化,并间接作用于成熟的破骨细胞刺激骨吸收,同时抑制骨形成。许多研究表明,牙周炎患者的牙龈组织中有较高水平的TNF- α 、IL-8等细胞因子。

[0005] 目前牙周基础非手术治疗的方式主要为机械法去除菌斑。但此方法虽然有效,却不可避免地会对包括软组织和牙骨质等牙周组织产生损伤,同时在洁治过程中出现的酸软、疼痛等不适也是患者拒绝治疗的原因之一。药物治疗是牙周炎治疗的辅助手段,可以控制牙菌斑形成,但是长期使用会造成耐药性、菌群失调等情况。

[0006] 因此发掘非抗生素类、安全有效的治疗方法是目前的一大研究热点。乳杆菌作为益生菌的一类,具有经济实惠、毒副作用小等优点,正逐步应用于口腔疾病的干预和治疗。

[0007] 经检索,对于采用乳杆菌预防治疗牙周炎的方法,现有技术已有相关的申请案公开。公开号为CN101190239B的中国专利申请中公开了一种含有类干酪乳杆菌的产品,该类干酪乳杆菌对牙周病致病菌牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、中间普氏菌(*Prevotella intermedia*)、牙周蜈蚣菌(*Centipeda periodontii*)有抑制的功效,但是,由申请文本中可知,该类干酪乳杆菌仅仅只是对单一菌种具有抑制作用,而牙周炎环境中存在多种致病菌株,并且,菌株之间也会有相互作用,这样体外抑制单一菌种的类干酪乳杆菌对牙周炎环境中的混菌膜不一定有抑制作用,因此,仍需找到一种可抑制混菌生长的益生菌制剂。

[0008] 再如公开号为CN111642746A的专利文本中公开了一种由副干酪乳杆菌和发酵乳杆菌组合使用的产品,用于抑制牙周炎致病菌牙龈卟啉单胞菌,但是申请文本中公开了副

干酪乳杆菌、发酵乳杆菌LBF128分别单独同牙龈卟啉单胞菌共培养时,牙龈卟啉单胞菌在6小时时的数量比单独培养时数量还要多,证明两者单独使用时,并没有抑制牙龈卟啉单胞菌的作用,尤其是发酵乳杆菌LBF128和牙龈卟啉单胞菌共培养时,不仅不能抑制牙龈卟啉单胞菌的生长,反倒是具有一定的促进其生长的作用;并且申请文本中公开了只有在两者共同配合使用的时候,才会有抑制牙龈卟啉单胞菌生长的作用。而该产品要发挥抑制牙龈卟啉单胞菌的作用,需要同时具备两种益生菌,无形中增加了生产成本,其次,该产品也仅仅只是能抑制牙龈卟啉单胞菌菌株的生长,而牙周炎环境中有多种细菌,因此仅仅抑制一种治病菌的生长,是无法达到治疗牙周炎的目的的,并且牙周炎环境当中混菌之间也会相互作用,因此,如何能得到一种能够抑制混菌生长的益生菌制剂,成为了研究的热点和难点。

[0009] 由上述可知,按照现有的方法均需添加多种乳杆菌才能发挥有益效果,成本较高。此外,现有方法仅针对口腔病原菌生物量的减少,而对于口腔中由多种致病菌形成的生物膜量和牙周炎所引起的炎症反应并未涉及,治疗效果有限。因此基于现有技术的缺陷,亟需发明一种新的低成本、效果好的产品。

发明内容

[0010] [技术问题]

[0011] 本发明要解决的技术问题是提供一种能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)。

[0012] [技术方案]

[0013] 为解决上述问题,本发明提供了一株发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139,所述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的分类学命名为*Lactobacillus fermentum*,已于2020年08月01日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:61116,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0014] 所述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139来源于扬州地区,该菌株经测序分析,其16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示,将测序得到的序列在NCBI中进行核酸序列比对,结果显示菌株为发酵乳杆菌,同源度为99.85%;命名为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139。

[0015] 所述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139在MRS培养基上的菌落呈小的半透明白色圆形。

[0016] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗牙周炎的产品,所述产品含有上述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139。

[0017] 在本发明的一种实施方式中,所述产品中,上述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的活菌数为不低于 1×10^9 CFU/mL或 1×10^{12} CFU/g。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,所述产品为药品、食品或日化产品。

[0019] 在本发明的一种实施方式中,所述药品的成分包含上述发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139以及药物载体。

[0020] 在本发明的一种实施方式中,所述载体为药学上可接受的载体。

[0021] 在本发明的一种实施方式中,所述载体为药学上可接受的填充剂、润湿剂、崩解

剂、粘合剂、润滑剂或矫味剂中的一种或多种。

[0022] 在本发明的一种实施方式中,所述食品为上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的酸奶或口香糖。

[0023] 在本发明的一种实施方式中,所述日化产品为含有上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的漱口水或牙膏。

[0024] 本发明还提供了一种制备用于预防和/或治疗牙周炎的产品的方法,所述方法为使用上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述产品中,上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的活菌数为不低于 1×10^9 CFU/mL或 1×10^{12} CFU/g。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述产品为药品、食品或日化产品。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,所述药品的成分包含上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139以及载体。

[0028] 在本发明的一种实施方式中,所述载体为药学上可接受的载体。

[0029] 在本发明的一种实施方式中,所述载体为药学上可接受的填充剂、润湿剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂或矫味剂中的一种或多种。

[0030] 在本发明的一种实施方式中,所述食品为含有上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的酸奶或口香糖。

[0031] 在本发明的一种实施方式中,所述日化产品为含有上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的漱口水或牙膏。

[0032] 本发明还提供了上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139在制备抑制中间普氏菌、牙龈卟啉单胞菌和/或具核梭杆菌的食品、药品或化妆品中的应用。

[0033] 有益效果

[0034] 1、本发明筛选得到了一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139,此发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139具有缓解牙周炎的作用,具体体现在:

[0035] (1) 可以抑制牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和具核梭杆菌混菌生物膜的形成,使生物膜量减少52.45%;

[0036] (2) 可以使牙周炎细胞模型中TNF- α 的含量由131.37pg/mL降低到83.31pg/mL,降低了37%;使牙周炎细胞模型中的IL-8的含量由147.70pg/mL降低到121.12pg/mL,降低了18%;

[0037] (3) 可以使牙周炎细胞模型中Occludin的表达量由0.42升高到0.67,提高了60%;Claudin-1的表达量由0.55升高到0.69,提高了25%;

[0038] (4) 可以使牙周炎大鼠的体重由245.20g增加到322.58g,基本接近空白组;

[0039] (5) 使牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌在大鼠口腔中的定植量减少1-2个数量级;

[0040] (6) 使牙周炎大鼠的牙槽骨吸收量从1838.0 μ m减少到805.7 μ m。

[0041] 因此,此发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139在制备预防和/或治疗牙周炎的产品(如药品、食品或日化产品等)中,具有巨大的应用前景。

[0042] 2、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 是益生菌的一种,目前已被纳入卫生部下发的《可用于食品的菌种名单》,因此,本发明筛选得到的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139不会给人体带来任何副作用,用于预防和/或治疗牙周炎的产品(如药

品、食品或日化产品等)中时,安全性较高。

[0043] 生物材料保藏

[0044] 一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139, 分类学命名为 *Lactobacillus fermentum*, 已于2020年08月01日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC No:61116, 保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼, 广东省微生物研究所。

附图说明

- [0045] 图1:不同组牙周炎细胞模型中TNF- α 的含量。
- [0046] 图2:不同组牙周炎细胞模型中IL-8的含量。
- [0047] 图3:不同组牙周炎细胞模型中Occludin的相对表达量。
- [0048] 图4:不同组牙周炎细胞模型中Claudin-1的相对表达量。
- [0049] 图5:发酵乳杆菌CCFM1139对溶菌酶的耐受性。
- [0050] 图6:实验流程图。
- [0051] 图7:大鼠体重变化图。
- [0052] 图8:乳杆菌在大鼠口腔中的定植情况。
- [0053] 图9:牙龈卟啉单胞菌在大鼠口腔中的定植情况。
- [0054] 图10:具核梭杆菌在大鼠口腔中的定植情况。
- [0055] 图11:大鼠牙龈组织TNF- α 相对表达量。
- [0056] 图12:大鼠牙龈组织IL-8相对表达量。
- [0057] 图13:大鼠牙周组织病理切片。
- [0058] 图14:大鼠上颌牙Micro-CT图。
- [0059] 图15:大鼠牙槽骨吸收量。

具体实施方式

[0060] 下面结合具体实施例和附图对本发明进行进一步的阐述。

[0061] 下述实施例中涉及的牙龈卟啉单胞菌购自广东省微生物菌种保藏中心, 产品编号为:GDMCC 1.851; 下述实施例中涉及的具核梭杆菌购自广东省微生物菌种保藏中心, 产品编号为:GDMCC 1.1290; 下述实施例中涉及的中间普氏菌购自广东省微生物菌种保藏中心, 产品编号为:GDMCC 1.849; 下述实施例中涉及的口腔上皮癌细胞Ca9-22购自北纳生物有限公司; 下述实施例中涉及的牙龈卟啉单胞菌脂多糖购自法国InvivoGen公司; 下述实施例中涉及的溶菌酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 下述实施例中DMEM培养基、胎牛血清购于美国Gibco公司; 下述实施例中涉及的SPF级Wistar大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(生产许可证号SCXK(京)2012-0001)。

[0062] 下述实施例中涉及的培养基如下:

[0063] MRS培养基:酵母粉5.0g/L、牛肉膏10.0g/L、蛋白胨10.0g/L、葡萄糖20.0g/L、无水乙酸钠2.0g/L、柠檬酸氢二铵2.0g/L、三水合磷酸氢二钾2.6g/L、一水合硫酸锰0.25g/L、七水合硫酸镁0.5g/L和吐温-80 1mL/L, pH 6.2~6.4。

[0064] BHI培养基:胰蛋白胨10.0g/L、牛心浸粉17.5g/L、氯化钠5.0g/L、酵母提取物

5.0g/L、葡萄糖2.0g/L、十二水合磷酸氢二钠2.5g/L、一水合L-半胱氨酸盐酸盐0.4g/L、0.5%维生素K1-氯化血红素1mL/L,pH 7.2~7.4。

[0065] 下述实施例中涉及的菌悬液的制备方法如下:

[0066] 具核梭杆菌菌悬液:将具核梭杆菌菌体以占BHI培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至BHI培养基中,于37℃厌氧培养48h后,用BHI培养基调节菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0067] 牙龈卟啉单胞菌菌悬液:将牙龈卟啉单胞菌菌体以占BHI培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至BHI培养基中,于37℃厌氧培养48h后用BHI培养基调节菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0068] 中间普氏菌菌悬液:将中间普氏菌菌体以占BHI培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至BHI培养基中,于37℃厌氧培养48h后用BHI培养基调节菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0069] 下述实施例中涉及的PBS缓冲液的配备方法如下:

[0070] PBS缓冲液:氯化钠8g/L,十二水合磷酸氢二钠3.63g/L,磷酸二氢钾0.24g/L,氯化钾0.2g/L,pH 7.4。

[0071] 实施例1:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139的筛选及菌种鉴定

[0072] 1、筛选

[0073] 以来源于扬州地区的健康人的粪便样本,将样本经预处理后,在20%甘油中保存于-80℃冰箱,取出解冻后,混匀样本,吸取0.5mL样本加到4.5mL 9g/L生理盐水进行梯度稀释,选择合适的梯度稀释液涂布在含有20g/L琼脂的MRS培养基上,于37℃培养48h,挑取发酵乳杆菌的典型菌落至含有20g/L琼脂的MRS培养基上划线纯化,挑取单菌落转接至MRS培养基增菌,30%甘油保藏,分别得到菌株CCFM1139和同期筛选的菌株1~19;其中,发酵乳杆菌的典型菌落呈小的白色半透明圆形。

[0074] 2、鉴定

[0075] 分别提取菌株CCFM1139和菌株1~19的基因组,将菌株CCFM1139和菌株1~19的16S rDNA进行扩增和测序(由英维捷基公司进行,CCFM1139扩增得到的16S rDNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示),将该序列在NCBI中进行核酸序列比对,结果显示菌株CCFM1139和菌株1~19均为发酵乳杆菌,分别命名为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139(原始菌株编号为96)和发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 1~19。

[0076] 实施例2:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对混菌生物膜量的影响

[0077] 实验分为两组,分别为发酵乳杆菌介导组和空白对照组;

[0078] 其中,发酵乳杆菌介导组按照如下方法处理:

[0079] (1) 分别将发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~19的菌体以占MRS培养基总体积2%的接种量接种至MRS培养基中,于37℃培养24h,获得培养液,将培养液分别于8000r/min、4℃下离心5min,获得上清液,将上清液分别以0.22μm无菌滤膜过滤,分别获得菌液均为 10^9 CFU/mL的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~19的上清;

[0080] (2) 在96孔板中加入中间普氏菌、牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌菌悬液各40μL,得到混合菌悬液;再分别加入步骤(1)得到的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~19的上清80μL,于37℃厌氧培养48h,得到混菌生物膜;

[0081] (3) 分别将在96孔板上得到的混菌生物膜分别用PBS缓冲液清洗2遍,并在25℃下

静置晾干后,在96孔板中加入100 μ L的浓度为0.1% (v/v) 的结晶紫溶液,对混菌生物膜染色30min,将染色后的混菌生物膜分别用PBS缓冲液清洗2遍后,在96孔板中加入100 μ L浓度为95% (v/v) 的乙醇溶解,于酶标仪中读取OD₆₀₀ 下的吸光度值,得到介导后的混菌生物膜量,通过介导后的混菌生物膜量计算发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~19介导后混菌生物膜的减少量;

[0082] 空白对照组为:在发酵乳杆菌介导组的基础上,将发酵乳杆菌CCFM1139上清替换为空白MRS培养基,得到空白对照组的混菌生物膜量;

[0083] 介导后混菌生物膜的减少量(%) = (空白对照组的混菌生物膜量-介导后的混菌生物膜量)/空白对照组的混菌生物膜量。

[0084] 计算结果见表1:由中间普氏菌、牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌所形成的混菌生物膜其吸光度为3.639;20株发酵乳杆菌对混菌生物膜的减少量在1%~53%之间,其中,发酵乳杆菌CCFM1139的抑制效果最好,经发酵乳杆菌CCFM1139介导后吸光度为1.730,混菌生物膜量减少了52.45%,为20株发酵乳杆菌中效果最佳。

[0085] 可见,发酵乳杆菌CCFM1139能够有效抑制由中间普氏菌、牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌所形成的混菌生物膜,有效缓解牙周炎的形成。

[0086] 表1不同发酵乳杆菌介导后混菌生物膜的减少量

组别	吸光度	生物膜减少量
空白对照组	3.639 \pm 0.158	0.00%
发酵乳杆菌 CCFM1139	1.730 \pm 0.049	52.45%
发酵乳杆菌 1	2.499 \pm 0.035	31.34%
发酵乳杆菌 2	3.036 \pm 0.181	16.57%

[0088]	发酵乳杆菌 3	3.300±0.025	9.32%
	发酵乳杆菌 4	1.793±0.047	50.73%
	发酵乳杆菌 5	2.657±0.198	27.00%
	发酵乳杆菌 6	3.551±0.078	2.42%
	发酵乳杆菌 7	2.176±0.051	40.20%
	发酵乳杆菌 8	3.462±0.046	4.85%
	发酵乳杆菌 9	2.103±0.053	43.02%
	发酵乳杆菌 10	1.833±0.008	49.64%
	发酵乳杆菌 11	3.327±0.058	8.56%
	发酵乳杆菌 12	3.203±0.028	12.00%
	发酵乳杆菌 13	2.103±0.053	42.22%
	发酵乳杆菌 14	3.542±0.098	2.67%
	发酵乳杆菌 15	3.578±0.037	1.67%
	发酵乳杆菌 16	3.478±0.065	4.42%
	发酵乳杆菌 17	2.738±0.185	24.76%
	发酵乳杆菌 18	2.155±0.080	40.79%
	发酵乳杆菌 19	3.142±0.086	13.67%

[0089] 实施例3:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对牙周炎细胞模型中TNF- α 、IL-8含量的影响

[0090] 牙周炎细胞模型构建:将口腔上皮癌细胞Ca9-22接种于含有10% (v/v) 胎牛血清的DMEM培养基中,于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养活化至细胞浓度为2×10⁵个/mL后,将Ca9-22细胞培养液添加至6孔板中,每孔加入2mL;将6孔板于37℃预孵育2h后,向每孔中加入1 μ g/mL的牙龈卟啉单胞菌脂多糖。

[0091] 实验分为三组,分别为发酵乳杆菌介导组、阴性对照组和空白对照组;

[0092] 其中,发酵乳杆菌介导组按照如下方法处理:

[0093] (1) 将发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~8的菌体分别以占MRS培养基总体积2%的接种量分别接种至MRS培养基中,于37℃培养24h,分别获得培养液,将培养液分别于8000r/min、4℃下离心5min,获得上清液,将上清液分别以0.22 μ m无菌滤膜过滤,分别获得菌浓均为10⁹CFU/mL的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~8的上清;

[0094] (2) 分别向牙周炎细胞模型中按照3% (v/v) 的接种量加入步骤(1)得到的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~8的上清,于37℃继续孵育4h;收集6孔板中的细胞上清液,3000r/min、4℃下离心20min;使用ELISA试剂盒测定细胞上清液中TNF- α 、IL-8的含量;

[0095] 阴性对照组 (CELL+LPS组) 为:在牙周炎细胞模型中加入3% (v/v) 的MRS培养基;

[0096] 空白对照组 (CELL组) 为:在发酵乳杆菌介导组的基础上,不在6孔板中添加牙龈卟啉单胞菌脂多糖,以及3% (v/v) 的发酵乳杆菌CCFM1139或发酵乳杆菌1~8的上清。

[0097] 结果见图1~2:相比较空白对照组 (CELL组),阴性对照组 (CELL+LPS组) 在牙龈卟啉单胞菌脂多糖的刺激下,TNF- α 的表达量由49.69pg/mL升高至131.37pg/mL。

[0098] 经发酵乳杆菌CCFM1139介导后,TNF- α 的表达量由131.37pg/mL降低至83.31pg/mL,降低了37%,与阴性对照组 (CELL+LPS组) 相较,具有极显著差异 ($p < 0.001$)。而经其他发酵乳杆菌介导后的组别,不具有降低TNF- α 表达的效果或效果不如发酵乳杆菌CCFM1139。

[0099] 相比较空白对照组 (CELL组),阴性对照组 (CELL+LPS组) 在牙龈卟啉单胞菌脂多糖的刺激下,IL-8的表达量由58.78pg/mL上升至147.70pg/mL。

[0100] 发酵乳杆菌3、6和CCFM1139均能显著降低IL-8的表达量 ($p < 0.001$),其中发酵乳杆菌CCFM1139的效果最好,可使IL-8的表达量由147.70pg/mL降低到121.12pg/mL,降低了18%。

[0101] 实施例4:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对牙周炎细胞模型中Occludin、Claudin-1表达量的影响

[0102] 牙周炎细胞模型构建:将口腔上皮癌细胞Ca9-22接种于含有10% (v/v) 胎牛血清的DMEM培养基中,于37°C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养活化至细胞浓度为 2×10^5 个/mL后,将Ca9-22细胞培养液添加至6孔板中,每孔加入2mL;将6孔板于37°C预孵育2h后,向每孔中加入1 μ g/mL的牙龈卟啉单胞菌脂多糖。

[0103] 实验分为三组,分别为发酵乳杆菌介导组、阴性对照组 (CELL+LPS组) 和空白对照组 (CELL组);

[0104] 其中,发酵乳杆菌介导组按照如下方法处理:

[0105] (1) 将发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~3的菌体分别以占MRS培养基总体积2%的接种量接种至MRS培养基中,于37°C培养24h,获得培养液,将培养液分别于8000r/min、4°C下离心5min,获得上清液,将上清液分别以0.22 μ m无菌滤膜过滤,分别获得菌浓均为 10^9 CFU/mL的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~3的上清;

[0106] (2) 分别向牙周炎细胞模型中按照3% (v/v) 的接种量加入步骤(1)得到的发酵乳杆菌CCFM1139、发酵乳杆菌1~3的上清,于37°C继续孵育12h;用Trizol法提取孵育后的6孔板中的细胞总RNA,根据反转录试剂盒说明书反转录成cDNA,通过荧光定量PCR检测细胞中Occludin和Claudin-1的表达量;

[0107] 阴性对照组 (CELL+LPS组) 为:在牙周炎细胞模型中加入3% (v/v) 的MRS培养基;

[0108] 空白对照组 (CELL组) 为:在发酵乳杆菌介导组的基础上,不在6孔板中添加牙龈卟啉单胞菌脂多糖,以及,3% (v/v) 的发酵乳杆菌CCFM1139或发酵乳杆菌1~3的上清。

[0109] 而由检测结果可知(图3~4),相比于空白对照组 (CELL组),阴性对照组CELL+LPS组) 牙周炎细胞模型中Occludin和Claudin-1的表达量明显下调,相较于发酵乳杆菌1~3,发酵乳杆菌CCFM1139可显著上调Occludin和Claudin-1,其中,使牙周炎细胞模型中Occludin的表达量由0.42升高到0.67,提高了60%;Claudin-1的表达量由0.55升高到0.69,提高了25%。

[0110] 可见,发酵乳杆菌CCFM1139对口腔上皮屏障具有很好的保护作用。

[0111] 实施例5:发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对溶菌酶的耐受性

[0112] 具体步骤如下:

[0113] 实验分为两组,分别为实验组和空白对照组;

[0114] 其中,实验组的处理方法为:在96孔培养板中加入200 μ L MRS培养基,继续于96孔培养板中分别添加不同浓度的溶菌酶溶液使得MRS培养基中溶菌酶的终浓度分别为0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0mg/mL,得到实验组培养基1~6;

[0115] 空白对照组的处理方法为:在96孔培养板中加入200 μ L MRS培养基,继续于96孔培养板中添加与溶菌酶溶液等体积的无菌水,得到空白组培养基;

[0116] 将发酵乳杆菌CCFM1139菌体以占MRS培养基总体积5%的接种量接种到96孔培养板中,37 $^{\circ}$ C培养24h;24h后,测定96孔培养板中培养液在OD₆₀₀下的吸光度,根据吸光度值判断发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)CCFM1139对溶菌酶的耐受性,检测结果见图5。

[0117] 根据图5所示,发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)CCFM1139对溶菌酶的耐受临界值在1.6~2.0mg/mL之间,远高于人口腔唾液中溶菌酶的浓度(1~57 μ g/mL),说明,发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)CCFM1139具备在口腔环境中存活的能力。

[0118] 实施例6:发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)CCFM1139在牙周炎大鼠模型中的防治作用

[0119] 一、牙周炎大鼠实验设计方案

[0120] 选择雄性、5周龄、体重为150~170g的SPF级Wistar大鼠30只,按每组平均体重一致的原则随机分成5组,每组6只。5组分别为空白组(Control组)、模型组(Model组)、发酵乳杆菌CCFM1139组(CCFM1139组)、发酵乳杆菌1组(*L.fermentum* 1组)、发酵乳杆菌2组(*L.fermentum* 2组)。

[0121] 实验进行5周(第0周开始~第4周结束),共35天。除空白组外,其他组大鼠在实验第0周开始时进行牙周炎造模。造模方法为:肌肉注射200mg/kg的盐酸氯胺酮对大鼠进行麻醉,用0.22mm的正畸钢丝对大鼠左上颌第二磨牙进行丝线结扎。在结扎手术结束后,每只老鼠每2天口服一次20mg氨苄青霉素,持续3次。第1周开始,用牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌悬液进行侵染,每2天一次,持续3次。其中,侵染的具体操作手法为:用无菌针管吸取牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌菌悬液各1mL,进行管饲并禁食禁水半小时。

[0122] 实验期间,Model组、CCFM1139组、*L.fermentum* 1组、*L.fermentum* 2组均喂以饲料Keyes 2000并在饮食中辅以添加有10% (m/m) 蔗糖的蒸馏水,空白对照组正常饮食。大鼠分组及饮食情况见表1。

[0123] 表1大鼠分组情况

[0124]

组别	数量	饮食
Control组	6	正常饮食饮水
Model组	6	饲料Keyes 2000加10%蔗糖水
CCFM1139组	6	饲料Keyes 2000加10%蔗糖水
<i>L.fermentum</i> 1组	6	饲料Keyes 2000加10%蔗糖水
<i>L.fermentum</i> 2组	6	饲料Keyes 2000加10%蔗糖水

[0125] Keyes 2000饲料(w/w):奶粉28%,蔗糖56%,小麦粉6%,酵母4%,苜蓿粉3%,肝粉1%,盐2%。

[0126] 同时对CCFM1139组、*L.fermentum* 1组和*L.fermentum* 2组进行防治,具体防治方

式为:在第1周开始管饲牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌菌悬液并禁水禁食半小时后,分别管饲发酵乳杆菌CCFM1139、*L.fermentum* 1或*L.fermentum* 2菌悬液,并禁食禁水半小时。第1周造模结束后,CCFM1139组、*L.fermentum* 1组和*L.fermentum* 2组再继续用发酵乳杆菌CCFM1139、*L.fermentum* 1或*L.fermentum* 2菌悬液分别进行连续防治,持续3周。防治的具体操作手法为:用无菌针管吸取发酵乳杆菌1mL,进行管饲并禁食禁水半小时。实验流程见图6。

[0127] 发酵乳杆菌CCFM1139、*L.fermentum* 1、*L.fermentum* 2菌悬液的配制方法如下:

[0128] 发酵乳杆菌CCFM1139菌悬液:将发酵乳杆菌CCFM1139以占MRS培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至MRS培养基中,于37℃厌氧培养24h后调节菌液浓度至终浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0129] *L.fermentum* 1菌悬液:将发酵乳杆菌*L.fermentum* 1以占MRS培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至MRS培养基中,于37℃厌氧培养24h后调节菌液浓度至终浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0130] *L.fermentum* 2菌悬液:将发酵乳杆菌*L.fermentum* 2以占MRS培养基总体积2% (v/v) 的接种量接种至MRS培养基中,于37℃厌氧培养24h后调节菌液浓度至终浓度为 1×10^9 CFU/mL。

[0131] 二、实验结果:

[0132] 1、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对大鼠体重的影响

[0133] 每星期对大鼠进行称重,比较各大鼠的生长情况。

[0134] 从图7的结果可以发现,正常饮食的空白组与其他组相比,体重增加的趋势更加明显。第4周时,空白组平均体重为376.64g。

[0135] 模型组体重在第3周时开始趋于稳定,在第4周时,平均体重为245.20g。

[0136] *L.fermentum* 1和*L.fermentum* 2组的大鼠体重在第4周时分别达到280.58g和266.17g,体重相较于模型组有所上升,但效果不如发酵乳杆菌CCFM1139组。

[0137] CCFM1139组的大鼠在第4周时平均体重可达到322.58g,为所有实验组中效果最佳,较模型组增加了约80g。

[0138] 2、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CCFM1139对牙周炎致病菌及乳杆菌定植情况的影响

[0139] 实验期间,使用灭菌镊子将灭菌纸尖插入牙周袋,采集大鼠左上颌第二磨牙龈下菌斑,放置约20s后取出,将纸尖插入有1mL无菌PBS的EP管中,稀释涂布于相应平板并计数,作为致病菌定植检验。本次实验共进行四次采样,分别为造模结束后的每一周;检查不同防治方式对牙周炎致病菌定植情况的影响。

[0140] 其中,菌落计数用到的固体平板为:用添加万古霉素 (20 μ g/mL) 和20g/L琼脂的MRS固体培养基对大鼠口腔中的乳杆菌进行计数;添加氨苄青霉素 (12 μ g/mL) 、5% (v/v) 羊血和20g/L琼脂的BHI固体培养基并结合菌落形态特征对大鼠口腔中的具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌进行计数。

[0141] (1) 根据图8乳杆菌计数结果可知,在第1周时,CCFM1139组中发酵乳杆菌CCFM1139的定植量在 10^5 CFU/mL左右,实验进行至第3周时,乳杆菌的定植量突破 10^6 CFU/mL。

[0142] *L.fermentum* 1组中乳杆菌*L.fermentum* 1的定植量在第1周时约为 10^5 CFU/mL,在

第2-3周开始逐步下降,在第4周时不足 10^5 CFU/mL。

[0143] *L.fermentum* 2组中乳杆菌*L.fermentum* 2的定植量在4周的时间里不断下降,至第4周时不足 10^4 CFU/mL。

[0144] 因此,相较于*L.fermentum* 1和*L.fermentum* 2,发酵乳杆菌CCFM1139拥有更好的口腔定植效果。

[0145] (2)图9为牙龈卟啉单胞菌的定植计数,Model组在造模第4周时,牙龈卟啉单胞菌的定植量可以到达 1.5×10^6 CFU/mL。在3个介导组中,发酵乳杆菌CCFM1139的效果最好,在第4周时,牙龈卟啉单胞菌的定植量降低到不足 10^4 CFU/mL。

[0146] *L.fermentum* 1的效果次之,在第4周时,牙龈卟啉单胞菌的定植量略超过 10^4 CFU/mL

[0147] *L.fermentum* 2的效果最差,在4周的介导时间里,牙龈卟啉单胞菌的定植量始终在 10^6 CFU/mL左右。

[0148] (3)图10为具核梭杆菌定植量计数,Model组中具核梭杆菌的定植量在第4周时约为 1.5×10^5 CFU/mL。在第4周时,CCFM1139组和*L.fermentum* 1组中具核梭杆菌定植量接近,均为 10^4 CFU/mL左右,CCFM1139组中具核梭杆菌的定植量略少于*L.fermentum* 1组。*L.fermentum* 2对具核梭杆菌的定植虽具有一定的抑制效果,但是不如CCFM1139组和*L.fermentum* 1,在第4周时,具核梭杆菌的定植量达到 10^5 CFU/mL。

[0149] 综上发酵乳杆菌CCFM1139具有良好的口腔定植能力,且对牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌在口腔中的定植具有良好的抑制作用。

[0150] 3、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)CCFM1139对炎症因子TNF- α 、IL-8的影响取0.1g大鼠牙龈组织加入0.9mL含有磷酸酶抑制剂及蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液进行裂解,经组织破碎仪充分震裂后,12000r/min离心10min,弃沉淀,吸上清,后根据BCA蛋白浓度试剂盒说明书对蛋白浓度进行测定。同时根据大鼠TNF- α 、IL-8的ELISA试剂盒说明书对大鼠牙龈组织中的TNF- α 、IL-8进行测定,炎症因子(TNF- α 、IL-8)量/总蛋白量=炎症因子(TNF- α 、IL-8)相对表达量。

[0151] 根据图11~12可知,相对于空白组,在患牙周炎的大鼠牙龈组织中TNF- α 、IL-8两个炎症指标均出现了显著上调的情况($p < 0.05$)。

[0152] 对于TNF- α 这一指标,发酵乳杆菌CCFM1139与*L.fermentum* 1均能在一定程度上降低TNF- α 的分泌,其中CCFM1139效果最好,可使TNF- α 的分泌量从18.015pg/mg降低至11.608pg/mg。

[0153] 对于IL-8,*L.fermentum* 1和*L.fermentum* 2并不能显著降低IL-8的分泌($p > 0.05$),而发酵乳杆菌CCFM1139可以使IL-8的分泌量从66.674pg/mg降低到62.142pg/mg。

[0154] (4)组织学观察

[0155] 将大鼠上颌骨组织修整后放入质量分数为4%的多聚甲醛中固定48h,放入质量分数为10%的EDTA溶液中,4℃脱钙7天,逐级酒精脱水,常规石蜡包埋,沿牙长轴颊舌向纵切(切片厚度4 μ m),HE染色后进行观察。

[0156] 根据图13可知,Control组大鼠牙槽骨完整无吸收现象,牙槽嵴顶高度正常。牙周纤维排列整齐致密,Model组牙槽骨吸收明显,牙周纤维破坏明显,发酵乳杆菌CCFM1139组大鼠牙槽骨组织相较于Model组无明显吸收的情况,牙周纤维细胞排列整齐,与牙骨质之前

无明显分离。而*L.fermentum* 1组虽无牙周纤维细胞排列紊乱的情况,但牙槽骨吸收明显,可见少量炎细胞浸润。而*L.fermentum* 2组牙槽嵴顶形态不规则,可见牙周组织胶原纤维排列紊乱。

[0157] (5) 牙槽骨吸收量

[0158] 将大鼠上颌骨固定于质量分数为4%的多聚甲醛中48h,剔除软组织,结束后用清水清洗晾干。上颌骨样本用活体Micro-CT影像系统进行X射线扫描成像。参数为电压:90kV,电流:88 μ A,视野范围:18 μ m,采集时间:4min,相机模式:高分辨率。将每个样本旋转360°后重建上颌骨的三维图像,见图14。测量牙槽骨吸收量(ABL),即第二磨牙的釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离,每牙测量4个位点:颊、舌处的近端及远端。各位点测量值的平均值为该牙的牙槽骨吸收值,见图15。

[0159] 根据图14-15可知,Control组大鼠牙槽骨平滑无明显缺失且牙齿排列紧致,牙槽骨吸收量为313.2 μ m。

[0160] Model组明显出现牙槽骨吸收,磨牙间隙变大的情况,牙槽骨呈现弹坑状缺失,牙根暴露严重,牙槽骨吸收量达到1838.0 μ m。

[0161] 发酵乳杆菌CCFM1139组牙槽骨略有部分吸收的情况,但效果优于*L.fermentum* 1和*L.fermentum* 2组,CCFM1139的牙槽骨吸收量为805.7 μ m,而*L.fermentum* 1和*L.fermentum* 2组的牙槽骨吸收量分别为994.3 μ m和1442.1 μ m。因此,发酵乳杆菌CCFM1139可以有效改善牙周炎大鼠的牙槽骨吸收情况。

[0162] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 江南大学

<120> 一株能够预防和/或治疗牙周炎的发酵乳杆菌及其应用

<130> BAA201366A

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gcggtgtgta caaggcccgg gaacgtattc accgcgceat gctgatccgc gattactagc 60
gattccgact tcgtgcagge gagttgcagc ctgcagtcgc aactgagaac ggttttaaga 120
gatttgcttg ccctcgcgag ttcgcgactc gttgtaccgt ccattgtagc acgtgtgtag 180
cccaggtcat aaggggcatg atgatctgac gtctgcecca cttctctccg gtttgcacc 240
ggcagtctca ctagagtgcc caacttaatg ctggcaacta gtaacaaggg ttgcgctcgt 300
tgcgggactt aaccaacat ctacgacac gagctgacga cgaccatgca ccacctgtca 360
ttgcgttccc gaaggaaacg ccctatctct agggttggcg caagatgtca agacctggta 420
aggttcttcg ctagcttcg aattaaacca catgctccac cgcttgtgcg ggcccccgtc 480
aattcctttg agtttcaacc ttgcggtcgt actccccagg cggagtgtt aatgcgttag 540
ctccggcact gaagggcgga aacctccaa cacctagcac tcatcgttta cggcatggac 600
taccagggta tctaactctg ttcgctacc atgettctga gtctcagcgt cagttgcaga 660
ccaggtagcc gccttcgcca ctgggtgttct tccatatac tacgcattcc accgctacac 720
atggagttcc actaccctct tctgcactca agttatccag tttccgatgc acttctccgg 780
ttaagccgaa ggctttcaca tcagacttag aaaaccgctt gcactctctt tacgcccatt 840
aaatccggat aacgcttgcc acctacgtat taccgcggt gctggcacgt agttagccgt 900
gactttcttg ttaaataaccg tcaacgtatg aacagttact ctcatcgtg ttcttcttta 960
acaacagagc tttacgagcc gaaaccctt ttcactcac cgggtgtgct ccatcaggct 1020
tgcgcccatt gtggaagatt cctactgct gcctcccgtg ggagtatggg ccgtgtctca 1080
gtcccattgt ggccgatcag tctctcaact cggtatgca tcatgcctt ggtaggccgt 1140
taccacacca acaagctaat gcaccgcagg tccatccaga agtgatagcg agaagccatc 1200
ttttaagcgt tgttcatgcg aacaacgttg ttatgcggta ttagcatctg tttccaaatg 1260
ttgtcccccg cttctgggca ggttacctac gtgttactca cccgtccgc actcgttggc 1320
gaccaagatc aatcaggtgc aagcaccatc aatcaattgg gccaacgctg tcgactgc 1378

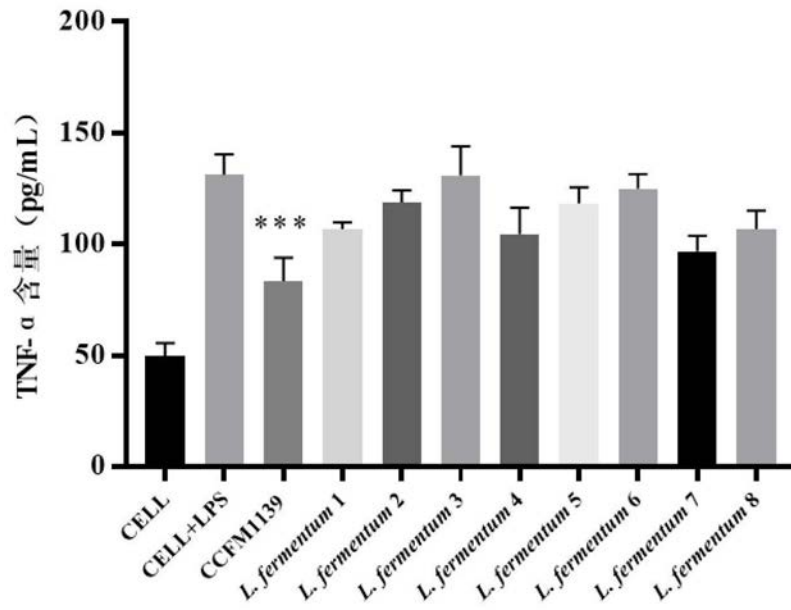


图1

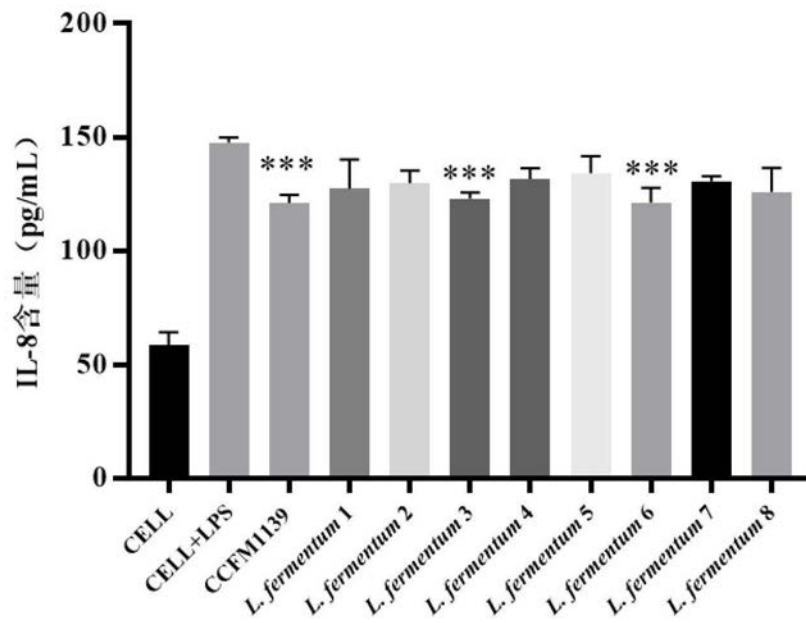


图2

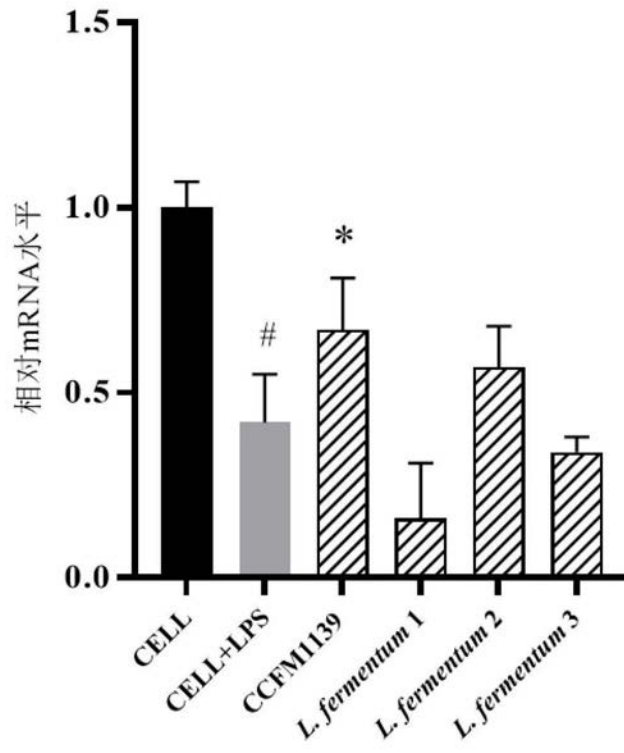


图3

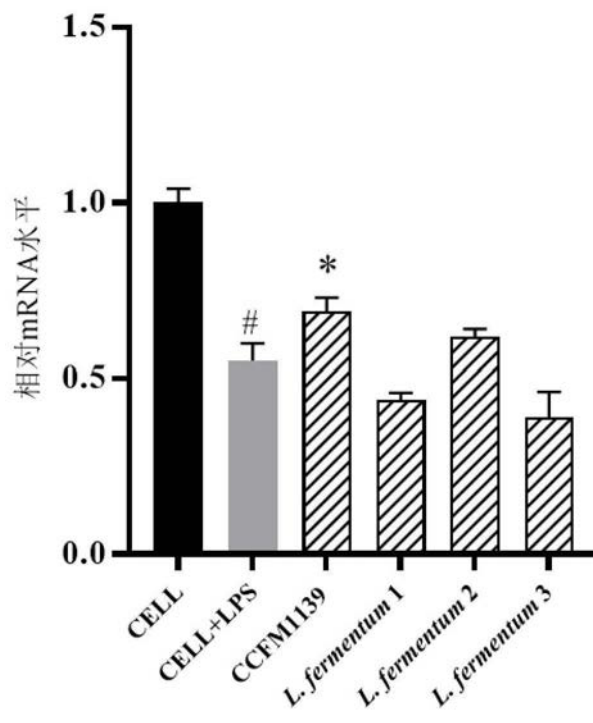


图4

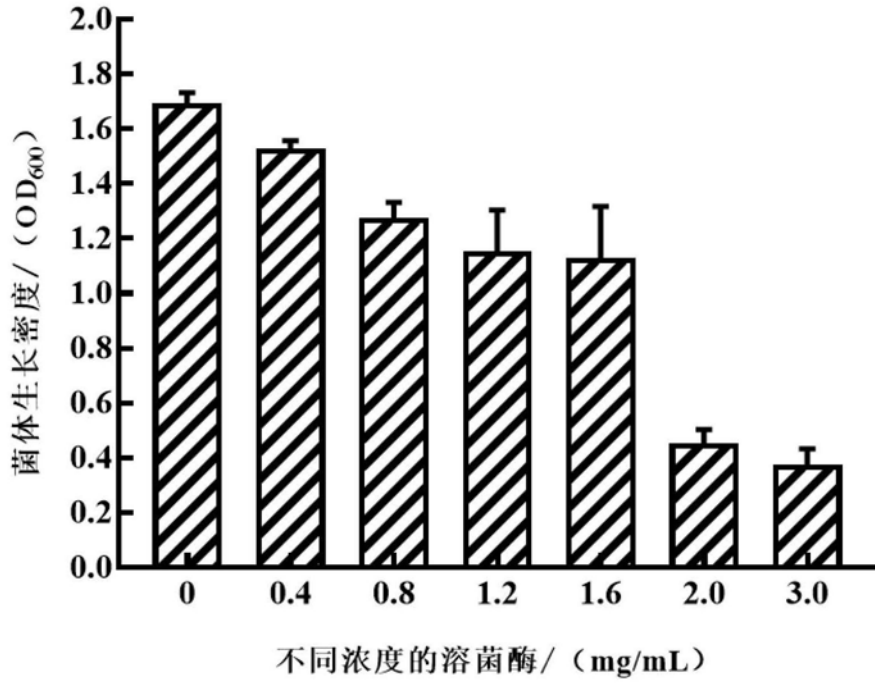


图5

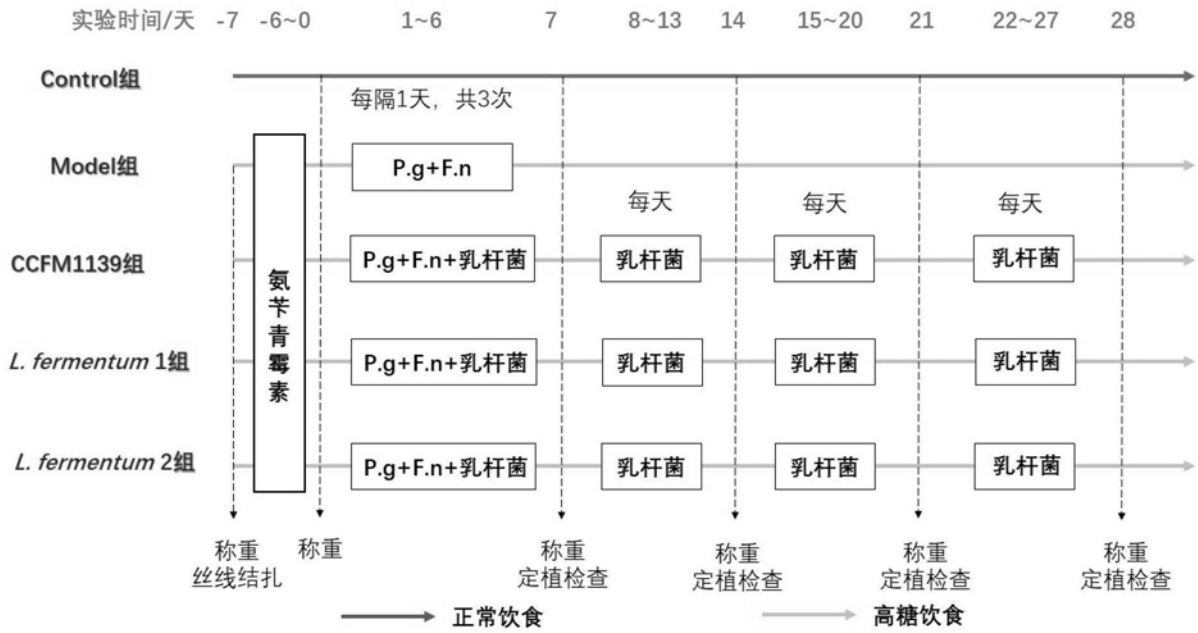


图6

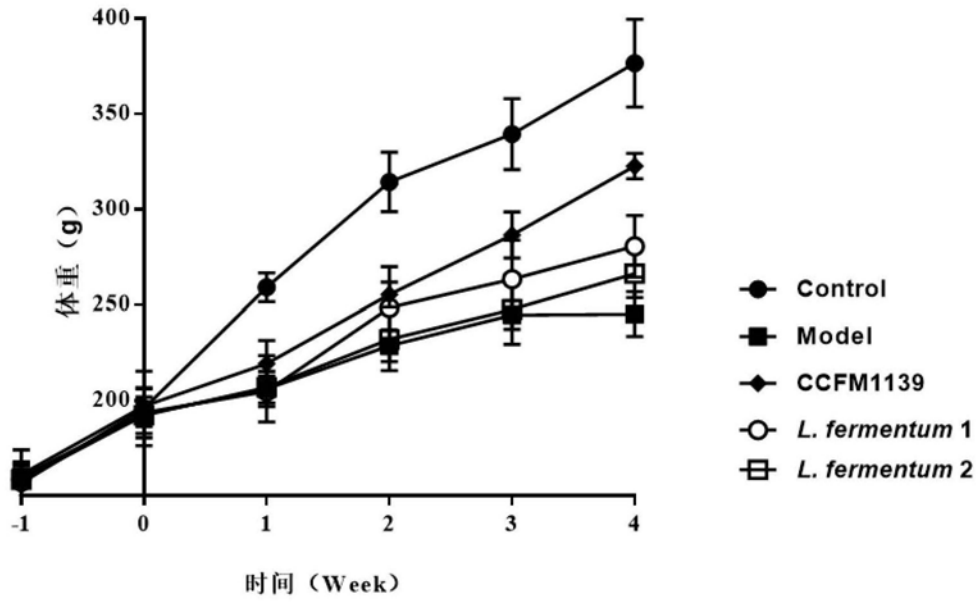


图7

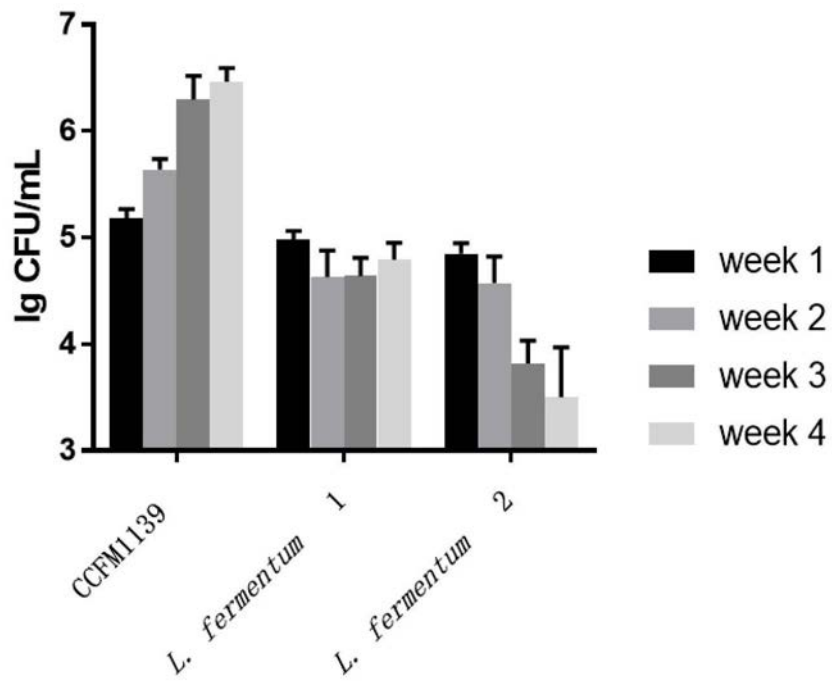


图8

牙龈卟啉单胞菌定植量

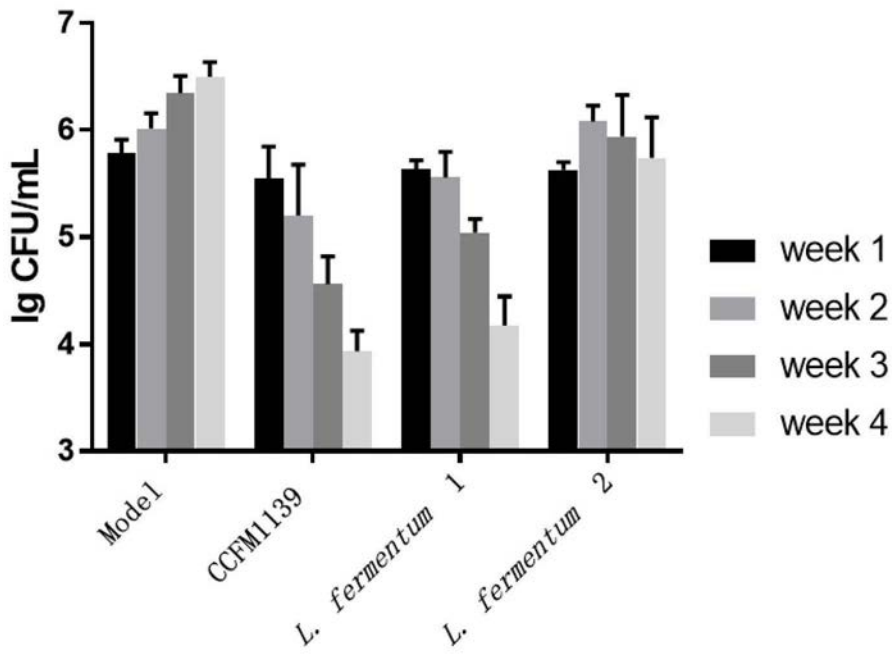


图9

具核梭杆菌定植量

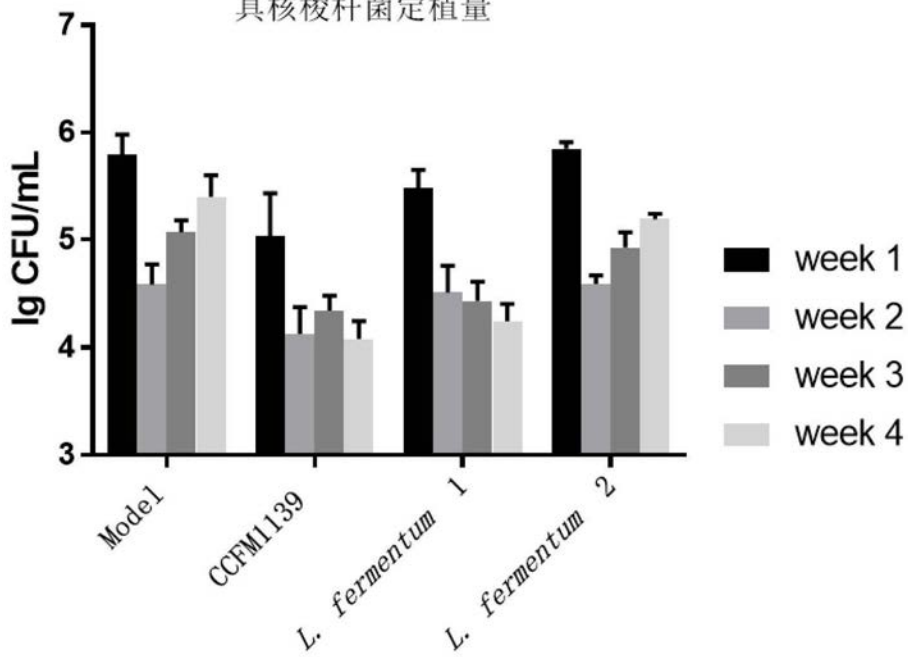


图10

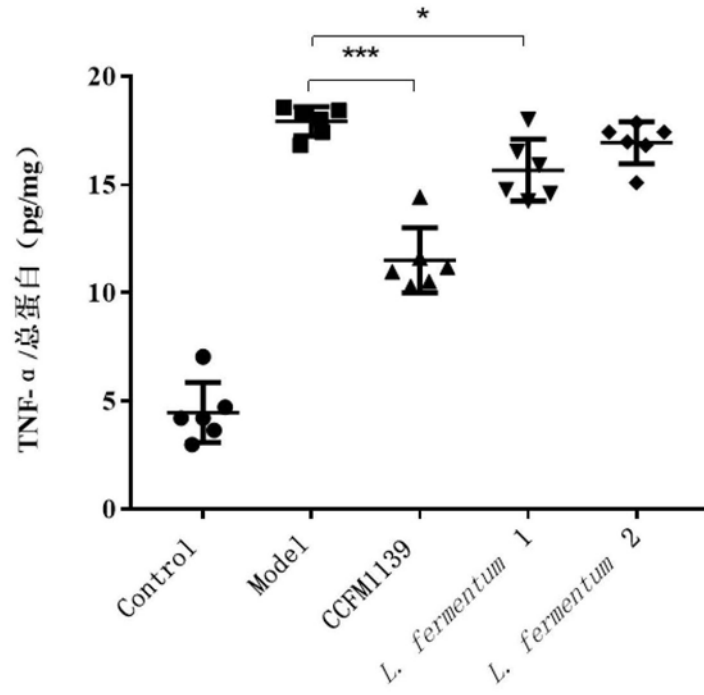


图11

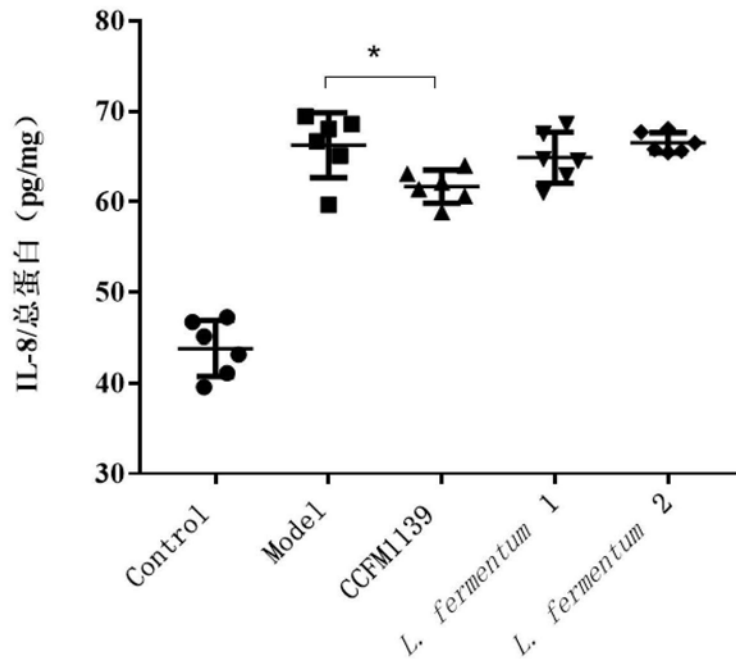


图12

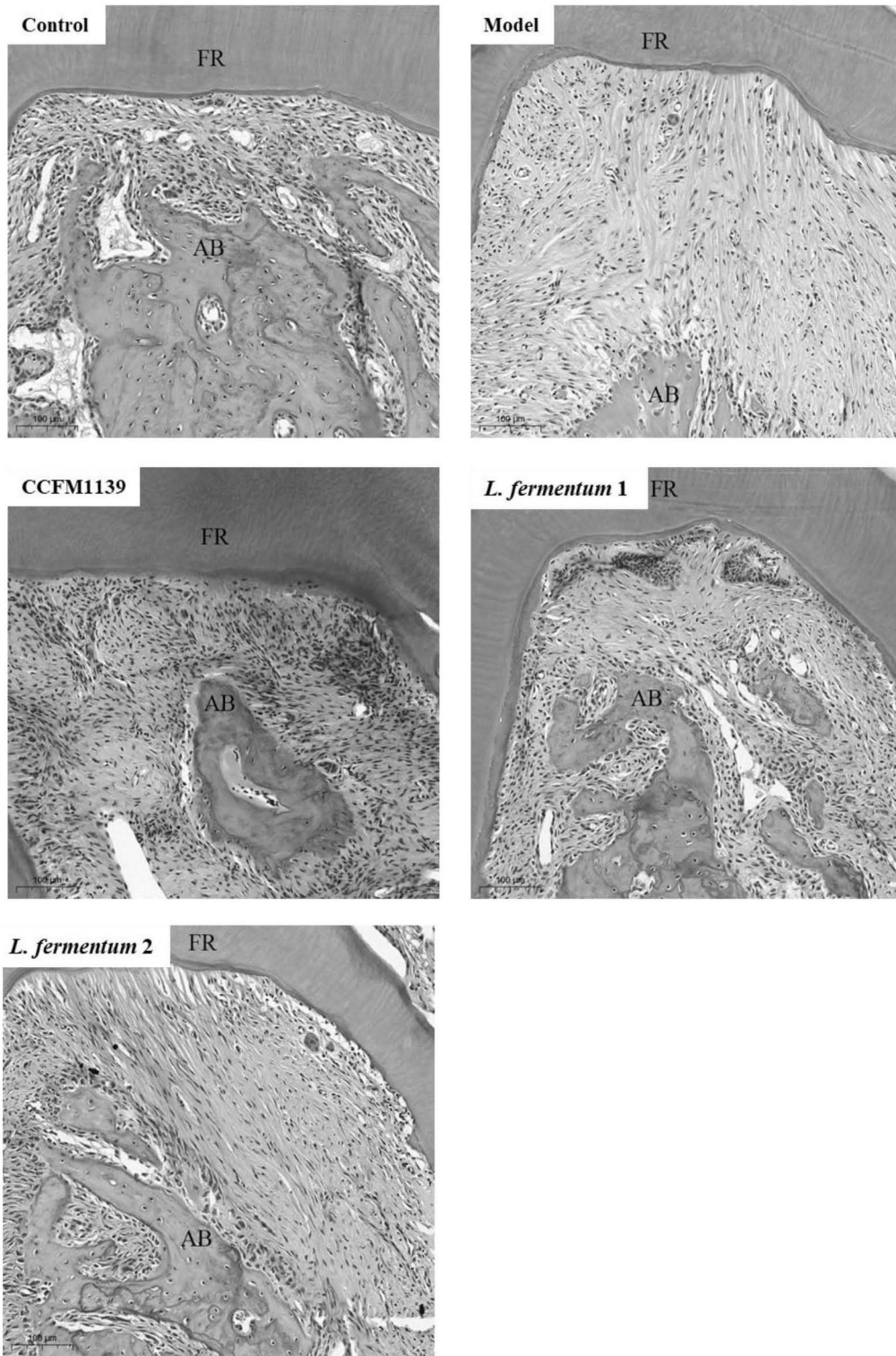


图13

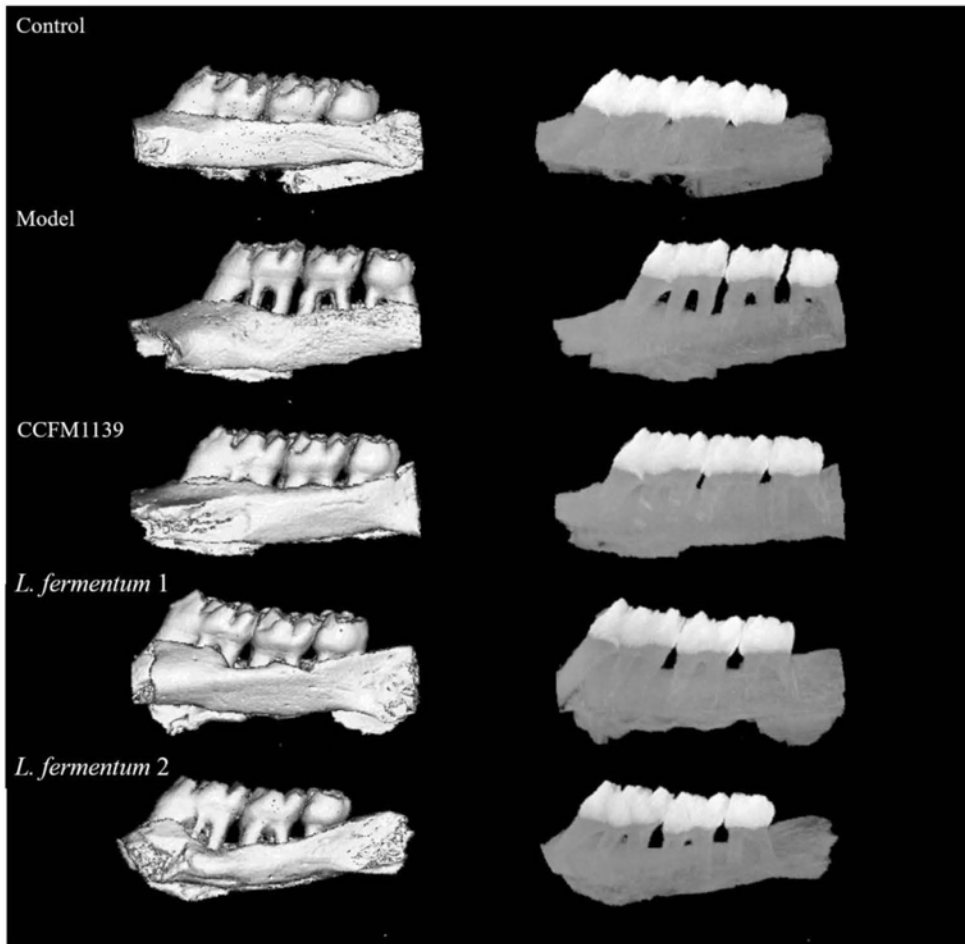


图14

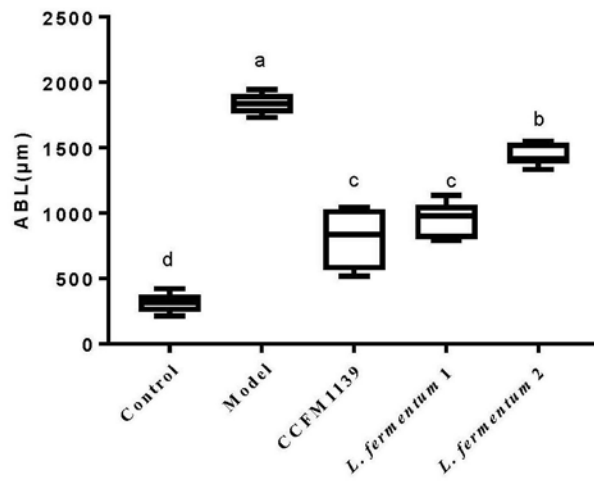


图15