



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112126604 A

(43) 申请公布日 2020.12.25

(21) 申请号 202011060751.4

A61P 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.30

A23L 33/135 (2016.01)

(83) 生物保藏信息

A23C 9/123 (2006.01)

GDMCC No:61163 2020.08.21

C12R 1/25 (2006.01)

(71) 申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72) 发明人 陆文伟 陈卫 王昱升 翟齐啸

赵建新 杭锋 张灏

(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9页

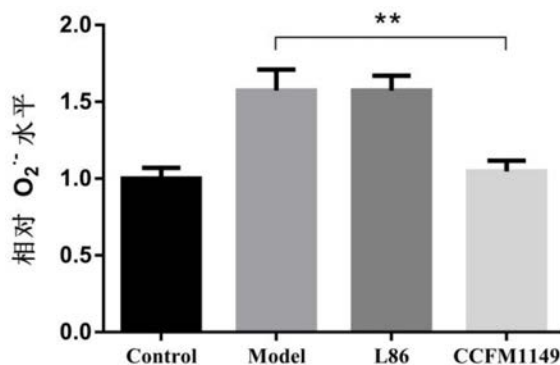
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一株可降低高血压发生风险因子的植物乳杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株可降低高血压发生风险因子的植物乳杆菌及其应用,属于微生物技术领域以及医药技术领域。本发明提供了一株植物乳杆菌CCFM1149,此植物乳杆菌CCFM1149能够缓解高血压,具体体现在:(1)显著降低Angiotensin II 刺激后A7R5细胞内O₂^{·-}水平;(2)显著降低Angiotensin II 刺激后A7R5细胞内H₂O₂水平;(3)显著提升A7R5细胞内SOD酶活力;(4)显著提升A7R5细胞内CAT酶活力,可见,植物乳杆菌CCFM1149在制备预防和/或治疗高血压的产品(如食品或药品等)中具有巨大的应用前景。



1. 一株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 其特征在于, 所述植物乳杆菌保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC No.61163, 保藏日期为2020年08月21日。
2. 权利要求1所述植物乳杆菌在制备预防和/或治疗心血管疾病的药品中的应用。
3. 一种产品, 其特征在于, 所述产品含有权利要求1所述植物乳杆菌。
4. 如权利要求3所述的一种产品, 其特征在于, 所述产品中, 权利要求1所述植物乳杆菌的活菌数为不低于 1×10^6 CFU/mL或 1×10^6 CFU/g。
5. 如权利要求3或4所述的一种产品, 其特征在于, 所述产品包含食品或药品。
6. 如权利要求5所述的一种产品, 其特征在于, 所述药品含有权利要求1所述植物乳杆菌、药物载体和/或药用辅料。
7. 如权利要求6所述的一种产品, 其特征在于, 所述药物载体包含微囊、微球、纳米粒和/或脂质体。
8. 如权利要求6或7所述的一种产品, 其特征在于, 所述药用辅料包含赋形剂和/或附加剂。
9. 如权利要求8所述的一种产品, 其特征在于, 所述赋形剂包含溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂和/或释放阻滞剂; 所述附加剂包含微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素和/或精制卵磷脂。
10. 如权利要求5任一项所述的一种产品, 其特征在于, 所述食品为保健食品; 或所述食品为使用含有权利要求1所述植物乳杆菌的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品; 或所述食品为含有权利要求1所述植物乳杆菌的饮料或零食。

一株可降低高血压发生风险因子的植物乳杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株可降低高血压发生风险因子的植物乳杆菌及其应用,属于微生物技术领域以及医药技术领域。

背景技术

[0002] 随着全球生活水平的提高,高血压正在影响着越来越多人的健康。调查发现,过去的50年间全球高血压患者数量呈现逐年上升趋势,如今全世界已有超过30%的人患有高血压。高血压是其他心血管疾病发生的重要风险因子,能够促进动脉粥样硬化及血栓的形成,增加卒中、心衰、心梗等心血管疾病的发病风险,对患者生命健康造成严重威胁。在高血压患者中超过90%为原发性高血压。原发性高血压成因复杂,并且其发病过程漫长,患者往往难以提前采取措施进行有效预防。高血压一旦形成,患者需依赖药物对血压进行控制,易形成药物依赖性。

[0003] 目前,针对高血压的干预主要包括药物干预与膳食辅助干预。降血压药物主要包括血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂类、血管紧张素受体拮抗剂类、利尿剂类、 β -受体阻滞剂类以及 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂类等五个大类,每个类别的降压药物均有不同程度的毒副作用,长期服用将对患者身体健康造成损害。针对高血压的干预,国际上推出了高血压膳食干预指南,强调减少钠与脂肪的摄入,增加果蔬、完全谷物等高纤维食物的摄入,并倡导以植物蛋白代替动物蛋白并减少红肉的摄入。膳食干预虽然能够改善患者健康状况,有助于控制血压水平并降低代谢综合征等慢性疾病的发生风险,但见效缓慢,并且对血压的控制往往难以达到显著的程度。因此,开发新的高血压防治方法对于降低高血压发病率,提升国民健康水平具有重要意义。

[0004] 研究表明,血管壁组织中的活性氧(ROS)是高血压发生发展的重要风险因子。心血管组织中ROS的产生可归因于血管紧张素II(Ang II)、醛固酮、内皮素等血管收缩因子的刺激。在原发性高血压患者与动物模型中均存在Ang II和/或醛固酮水平升高的现象。当这些激素作用于血管壁后可激活血管内皮与平滑肌中的NADPH氧化酶,产生ROS。ROS是调控血管紧张度的重要信号分子,能够引起平滑肌收缩,同时抑制血管的舒张,引起高血压。除升高血压外,ROS还可参与血管病理性变化相关通路,引起血管壁增厚与血管腔狭窄,同时促进血管纤维化。血管壁的这些结构病变将可能进一步促进高血压的发展,同时增加动脉粥样硬化等其他心血管疾病的发病风险。因此,降低心血管组织中的ROS将有助于预防高血压与心血管疾病的发生发展。

[0005] 近年来益生菌的健康功效已被大量报道,并且,适量摄入益生菌也不会对宿主产生副作用。研究表明,部分乳杆菌属的益生菌具有降低血压的功效。因此,将益生菌作为膳食补充剂将有助于改善患者健康状况,增强非药物干预的效果。但是,现有的具有抗高血压功能的益生菌作用靶点较为单一,主要通过抑制血管紧张素转换酶(ACE)活性而降低血压,并不适用于干预醛固酮等其他因子引起的高血压。因此,基于ROS在高血压发病通路中的重要性,急需筛选出能够降低血管壁内ROS水平的益生菌,作为具有预防高血压潜力的益生菌

菌株。

发明内容

[0006] [技术问题]

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一株可降低血管平滑肌细胞内活性氧水平等高血压发生风险因子的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

[0008] [技术方案]

[0009] 为解决上述问题,本发明提供了一株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149,所述植物乳杆菌CCFM1149保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No.61163,保藏日期为2020年08月21日,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0010] 所述植物乳杆菌CCFM1149来源于泡菜样本,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GeneBank中进行核酸序列比对,结果显示菌株为植物乳杆菌,命名为植物乳杆菌CCFM1149。

[0011] 所述植物乳杆菌CCFM1149的菌体呈短杆状;菌落呈圆形粗糙、透明。

[0012] 本发明还提供了上述植物乳杆菌在制备预防和/或治疗心血管疾病的中的应用。

[0013] 本发明的一种实施方式中,所述心血管疾病为高血压。

[0014] 本发明的一种实施方式中,所述产品中,上述植物乳杆菌CCFM1149的活菌数为不低于 1×10^6 CFU/mL或 1×10^6 CFU/g。

[0015] 本发明的一种实施方式中,所述产品包含食品或药品。

[0016] 本发明的一种实施方式中,所述药品含有上述植物乳杆菌CCFM1149、药物载体和/或药用辅料。

[0017] 本发明的一种实施方式中,所述药物载体包含微囊、微球、纳米粒和/或脂质体。

[0018] 本发明的一种实施方式中,所述药用辅料包含赋形剂和/或附加剂。

[0019] 本发明的一种实施方式中,所述赋形剂包含溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂和/或释放阻滞剂。

[0020] 本发明的一种实施方式中,所述附加剂包含微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素和/或精制卵磷脂。

[0021] 本发明的一种实施方式中,所述药品的剂型为粉剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂、丸剂或口服液。

[0022] 本发明的一种实施方式中,所述食品为保健食品;或所述食品为使用含有上述植物乳杆菌CCFM1149的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品;或所述食品为含有上述植物乳杆菌CCFM1149的饮料或零食。

[0023] 本发明的一种实施方式中,所述发酵剂的制备方法为将上述植物乳杆菌CCFM1149按照占培养基总质量2~4%的接种量接种到培养基中,于37℃下培养36h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液清洗2~4次后用冻干保护剂重悬,得到重悬液;将重悬液用真空冷冻法进行冻干,得到发酵剂。

[0024] 本发明的一种实施方式中,所述冻干保护剂和菌体的质量比为2:1。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述培养基包含占培养基总质量87.7%的水、10%

的酶水解脱脂乳、0.5%的葡萄糖、1.5%的胰蛋白胍以及0.3%的酵母浸膏。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述培养基的pH为6.8。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,所述保护剂包含100g/L脱脂奶粉、150g/L海藻糖以及10g/L L-谷氨酸钠。

[0028] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗心血管疾病的产品,所述产品含有上述植物乳杆菌CCFM1149。

[0029] 本发明的一种实施方式中,所述心血管疾病为高血压。

[0030] 本发明的一种实施方式中,所述产品中,上述植物乳杆菌CCFM1149的活菌数为不低于 1×10^6 CFU/mL或 1×10^6 CFU/g。

[0031] 本发明的一种实施方式中,所述产品包含食品或药品。

[0032] 本发明的一种实施方式中,所述药品含有上述植物乳杆菌CCFM1149、药物载体和/或药用辅料。

[0033] 本发明的一种实施方式中,所述药物载体包含微囊、微球、纳米粒和/或脂质体。

[0034] 本发明的一种实施方式中,所述药用辅料包含赋形剂和/或附加剂。

[0035] 本发明的一种实施方式中,所述赋形剂包含溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂、反絮凝剂、助滤剂和/或释放阻滞剂。

[0036] 本发明的一种实施方式中,所述附加剂包含微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素和/或精制卵磷脂。

[0037] 本发明的一种实施方式中,所述药品的剂型为粉剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂、丸剂或口服液。

[0038] 本发明的一种实施方式中,所述食品为保健食品;或所述食品为使用含有上述植物乳杆菌CCFM1149的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品;或所述食品为含有上述植物乳杆菌CCFM1149的饮料或零食。

[0039] 本发明的一种实施方式中,所述发酵剂的制备方法为将上述植物乳杆菌CCFM1149按照占培养基总质量2~4%的接种量接种到培养基中,于37℃下培养36h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液清洗2~4次后用冻干保护剂重悬,得到重悬液;将重悬液用真空冷冻法进行冻干,得到发酵剂。

[0040] 本发明的一种实施方式中,所述冻干保护剂和菌体的质量比为2:1。

[0041] 在本发明的一种实施方式中,所述培养基包含占培养基总质量87.7%的水、10%的酶水解脱脂乳、0.5%的葡萄糖、1.5%的胰蛋白胍以及0.3%的酵母浸膏。

[0042] 在本发明的一种实施方式中,所述培养基的pH为6.8。

[0043] 在本发明的一种实施方式中,所述保护剂包含100g/L脱脂奶粉、150g/L海藻糖以及10g/L L-谷氨酸钠。

[0044] 有益效果:

[0045] 1、本发明提供了一株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149,此植物乳杆菌CCFM1149能够降低高血压发生风险因子,具体体现在:

[0046] (1) 显著降低Angiotensin II刺激后A7R5细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 水平;

[0047] (2) 显著降低Angiotensin II刺激后A7R5细胞内 H_2O_2 水平;

[0048] (3) 显著提升A7R5细胞内SOD酶活力;

[0049] (4) 显著提升A7R5细胞内CAT酶活力,

[0050] 可见,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149在制备预防和/或治疗高血压的产品(如食品或药品等)中具有巨大的应用前景。

[0051] 2、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 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》,具有调节肠道健康的功效,因此,本发明得到的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149对人体而言,相对健康,无副作用。

[0052] 生物材料保藏

[0053] 一株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149,分类学命名为 *Lactobacillus plantarum*,已于2020年08月21日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No.61163,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

附图说明

[0054] 图1:不同组别A7R5细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 水平对比。

[0055] 图2:不同组别A7R5细胞内 H_2O_2 水平对比。

[0056] 图3:不同组别A7R5细胞内SOD酶活力对比。

[0057] 图4:不同组别A7R5细胞内CAT酶活力对比。

[0058] 其中,“##”表示与Control组相比具有显著性差异 ($p < 0.01$),“###”表示与Control组相比具有显著性差异 ($p < 0.001$),“**”表示与Model组相比具有显著性差异 ($p < 0.01$)。

具体实施方式

[0059] 下述实例中涉及的胰蛋白酶和HBSS缓冲液购自Thermo Fisher公司,Angiotensin II 购自MCE公司,脱脂乳购自光明乳业股份有限公司,葡萄糖与酵母浸膏购自国药集团化学试剂有限公司,胰蛋白胨购自英国OXOID公司,DHE荧光探针、DCFH-DA荧光探针、BCA蛋白浓度测定试剂盒与蛋白酶抑制剂混合物购自碧云天生物技术研究, SOD测定试剂盒与CAT测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

[0060] 下述实施例中涉及的培养基如下:

[0061] MRS液体培养基:蛋白胨10g/L、牛肉膏10g/L、葡萄糖20g/L、乙酸钠2g/L、酵母粉5g/L、柠檬酸氢二铵2g/L、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L、 $MnSO_4$ 0.05 g/L、吐温-80 1ml/L, pH 7.0。

[0062] MRS固体培养基:蛋白胨10g/L、牛肉膏10g/L、葡萄糖20g/L、乙酸钠2g/L、酵母粉5g/L、柠檬酸氢二铵2g/L、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L、 $MnSO_4$ 0.05 g/L、吐温-80 1ml/L、琼脂20g/L、L-半胱氨酸盐酸盐0.05g/L, pH 7.0。

[0063] DMEM培养基:甘氨酸30mg/L、L-精氨酸盐酸盐84mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐63mg/L、L-谷氨酰胺584mg/L、L-组氨酸盐酸盐42mg/L、L-异亮氨酸105mg/L、L-亮氨酸105mg/L、L-赖氨酸盐酸盐146mg/L、L-甲硫氨酸30mg/L、L-苯丙氨酸66mg/L、L-丝氨酸42mg/L、L-苏氨酸95mg/L、L-色氨酸16mg/L、L-酪氨酸二钠104mg/L、L-缬氨酸94mg/L、氯化胆碱4mg/L、D-泛酸钙4mg/L、叶酸4mg/L、烟酰胺4mg/L、盐酸吡哆醇4mg/L、核黄素0.4mg/L、盐酸硫胺素4mg/L、i-肌醇7.2mg/L、 $CaCl_2$ 200 mg/L、 $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 0.1mg/L、 $MgSO_4$ 97.67mg/L、KCl 400mg/L、 $NaHCO_3$ 3700 mg/L、NaCl 6400mg/L、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 125mg/L、D-葡萄糖4500mg/L、酚红15mg/L

L。

[0064] 下述实施例中涉及的检测方法如下：

[0065] 活菌数的检测方法：采用国标《GB 4789.35-2016食品安全国家标准食品微生物学检测乳酸菌检测》。

[0066] 下述实施例中涉及的乳酸菌培养上清的制备方法如下：

[0067] 将乳酸菌划线于MRS固体培养基上，37℃条件下培养48h，得到单菌落；挑取单菌落接种于MRS液体培养基中，37℃条件下培养18h进行活化，连续活化两代，得到活化液；将活化液按2% (v/v) 的接种量接种于MRS液体培养基中，37℃条件下培养18h，得到菌液；将菌液经8000g离心10min，取上清；将上清用浓度为1mol/L的NaOH溶液调pH值至7.0后经0.22μm滤膜过滤除菌，得到乳酸菌培养上清。

[0068] 实施例1：植物乳杆菌的获取

[0069] 具体步骤如下：

[0070] 1、筛选

[0071] 以泡菜为样本，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，以含有0.05g/L半胱氨酸的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MRS固体培养基上，于37℃培养48h，挑取植物乳杆菌的典型菌落至MRS固体培养基上划线纯化，挑取单菌落转接至MRS液体培养基（含有0.05g/L半胱氨酸）增菌，30%甘油保藏，得到菌株CCFM1149和菌株L86；其中，植物乳杆菌的典型菌落呈圆形粗糙、透明。

[0072] 2、鉴定

[0073] 提取菌株菌株CCFM1149和菌株L86的基因组，将菌株CCFM1149和菌株L86的16S rDNA进行扩增和测序（由苏州金唯智生物科技有限公司进行，CCFM1149、L86的16S rDNA核苷酸测定序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2所示，菌种鉴定的上游引物27F序列如SEQ ID NO.3所示，下游引物1492R序列如SEQ ID NO.4所示），将该序列在NCBI中进行核酸序列比对，结果显示菌株CCFM1149和菌株L86均为植物乳杆菌，分别命名为植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）CCFM1149和植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）L86。

[0074] 实施例2：植物乳杆菌对A7R5细胞内O₂^{·-}水平的影响

[0075] 具体步骤如下：

[0076] 大鼠胸主动脉平滑肌细胞A7R5购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，以含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基进行培养。细胞培养于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中。细胞生长至70%~80%密度时进行传代。

[0077] 选取生长状态良好的A7R5细胞，将A7R5细胞经胰蛋白酶消化后离心、用DMEM培养基重悬，进行细胞计数，得到重悬液；将重悬液按照20000细胞/孔接种至24孔板中后，在24孔板中继续添加500μL含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基，于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养48h；培养48h后，将24孔板中的含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基替换为500μL含有0.1% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基，并将24孔板于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置24h；静置24h后，以24孔板中每个孔内细胞为单位，将细胞分为空

白对照组 (Control)、模型组 (Model)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149 干预组 (CCFM1149) 以及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86 干预组 (L86), 每组3个孔, 其中, 在空白对照组与模型组的每个孔中分别加入15 μ L MRS液体培养基, 在CCFM1149干预组的每个孔中加入15 μ L植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清, 在L86干预组的每个孔中加入15 μ L植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清, 将24孔板于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中干预12h; 干预12h后, 在模型组、CCFM1149干预组以及CCFM1149干预组的每个孔内分别添加Angiotensin II至浓度为 1×10^{-7} M, 同时, 在空白对照组的每个孔内添加同样体积的DMEM培养基作为对照, 将24孔板于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置4h; 静置4h后, 将24孔板从细胞培养箱中取出, 吸去每孔内液体并在每孔中加入500 μ L含10 μ M DHE荧光探针的DMEM培养基, 将24孔板于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中孵育30min; 孵育30min后, 将24孔板从细胞培养箱中取出, 吸去每孔内液体并用HBSS缓冲液清洗每孔内细胞2遍; 清洗结束后, 在24孔板的每孔加入500 μ L HBSS缓冲液, 通过倒置荧光显微镜进行观察, 采用绿色波段激发光激发细胞产生红色荧光, 选择合适的视野进行拍摄; 采用Image pro plus计算图片荧光密度以表征胞内O₂^{·-}水平, 以空白对照组为对比处理数据, 结果如图1所示。

[0078] 由图1可知, 用 1×10^{-7} M Angiotensin II刺激4h后, 模型组A7R5细胞内O₂^{·-}水平显著升高至空白对照组的1.6倍 ($p < 0.01$), CCFM1149干预组A7R5细胞内O₂^{·-}水平较模型组降低34% ($p < 0.01$), 而L86干预组A7R5细胞内O₂^{·-}水平较模型组未发生明显变化。

[0079] 可见, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够显著降低Angiotensin II刺激后A7R5细胞内O₂^{·-}水平的上升, 能够降低高血压发生的风险因子。

[0080] 实施例3: 植物乳杆菌对A7R5细胞内H₂O₂水平的影响

[0081] 具体步骤如下:

[0082] 大鼠胸主动脉平滑肌细胞A7R5购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 以含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基进行培养。细胞培养于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中。细胞生长至70%~80%密度时进行传代。

[0083] 选取生长状态良好的A7R5细胞, 将A7R5细胞经胰蛋白酶消化后离心、用DMEM培养基重悬, 进行细胞计数, 得到重悬液; 将重悬液按照20000细胞/孔接种至24孔板中后, 在24孔板中继续添加500 μ L含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基, 于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养48h; 培养48h后, 将24孔板中的含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基替换为500 μ L含有0.1% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基, 并将24孔板于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置24h; 静置24h后, 以24孔板中每个孔内细胞为单位, 将细胞分为空白对照组 (Control)、模型组 (Model)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149干预组 (CCFM1149) 以及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86干预组 (L86), 每组3个孔, 其中, 在空白对照组与模型组的每个孔中分别加入15 μ L MRS液体培养基, 在CCFM1149干预组的每个孔中加入15 μ L植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清, 在L86干预组的每个孔中加入15 μ L植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清, 将24孔板于37 $^{\circ}$ C、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中干预12h; 干预12h后, 在模型组、

CCFM1149干预组以及CCFM1149干预组的每个孔内分别添加Angiotensin II至浓度为 1×10^{-7} M,同时,在空白对照组的每个孔内添加同样体积的DMEM培养基作为对照,将24孔板于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置4h;静置4h后,将24孔板从细胞培养箱中取出,吸去每孔内液体并在每孔中加入500μL含8μM DCFH-DA荧光探针的DMEM培养基,将24孔板于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中孵育20min;孵育20min后,将24孔板从细胞培养箱中取出,吸去每孔内液体并用HBSS缓冲液清洗每孔内细胞2遍;清洗结束后,在24孔板的每孔加入500μL HBSS缓冲液,通过倒置荧光显微镜进行观察,采用蓝色波段激发光激发细胞产生绿色荧光,选择合适的视野进行拍摄;采用Image pro plus计算图片荧光密度以表征胞内H₂O₂水平,以空白对照组为对比处理数据,结果如图2所示。

[0084] 由图2可知,用 1×10^{-7} M Angiotensin II刺激4h后,模型组A7R5细胞内H₂O₂水平显著升高至空白对照组的1.8倍 ($p < 0.001$),CCFM1149干预组A7R5细胞内H₂O₂水平较模型组降低30% ($p < 0.01$),而L86干预组A7R5细胞内H₂O₂水平较模型组未发生明显变化。

[0085] 可见,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够显著降低Angiotensin II刺激后A7R5细胞内H₂O₂水平的上升,能够降低高血压发生的风险因子。

[0086] 实施例4:植物乳杆菌对A7R5细胞内SOD酶活力的影响

[0087] 具体步骤如下:

[0088] 大鼠胸主动脉平滑肌细胞A7R5购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,以含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基进行培养。细胞培养于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中。细胞生长至70%~80%密度时进行传代。

[0089] 选取生长状态良好的A7R5细胞,将A7R5细胞经胰蛋白酶消化后离心、用DMEM培养基重悬,进行细胞计数,得到重悬液;将重悬液按照 2×10^5 细胞/孔接种至6cm细胞培养皿中后,在细胞培养皿中继续添加4mL含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基,于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养48h;培养48h后,将细胞培养皿中的含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基替换为4mL含有0.1% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基,并将细胞培养皿于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置24h;静置24h后,以每皿细胞为单位,将细胞分为空白对照组 (Control)、模型组 (Model)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149干预组 (CCFM1149) 以及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86干预组 (L86),每组3个皿,其中,在空白对照组与模型组的每个皿中分别加入120μL MRS液体培养基,在CCFM1149干预组的每个孔中加入120μL植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清,在L86干预组的每个孔中加入120μL植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清,将细胞培养皿于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中干预12h;干预12h后,将细胞培养皿从细胞培养箱中取出,吸去每皿内液体并置于冰上,用冰浴预冷的PBS缓冲液清洗5遍;清洗5遍后,将每皿细胞转移至不同的15mL离心管中,以冰浴预冷的PBS缓冲液清洗2遍;清洗2遍后,在离心管中添加含有2.0% (v/v) 蛋白酶抑制剂混合物的PBS缓冲液 (1mL/管细胞) 重悬细胞,得到细胞悬液;将细胞悬液转移至新的无菌1.5mL离心管中,置于冰浴上超声破碎 (超声功率:300W,单次破碎时长:3~5秒,间隔30秒,重复3~5次),得到细胞破碎液;将细胞破碎液于显微镜下观察,无完整细胞即可确认破碎完全,完成细胞匀浆的制备;采用碧云

天BCA蛋白浓度测定试剂盒进行细胞匀浆蛋白浓度测定,细胞匀浆SOD活力采用南京建成总超氧化物歧化酶测试盒进行测定,胞内总SOD酶活力以测定SOD活力/匀浆蛋白浓度表示,以对照组为对比处理数据,结果如图3所示。

[0090] 由图3可知,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够提高A7R5细胞内SOD酶活力至空白对照组的1.9倍 ($p < 0.001$),而植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清干预未能显著改变A7R5细胞内CAT酶活力。

[0091] 可见,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够通过提升A7R5细胞内SOD酶活力而提升细胞抗氧化能力,能够降低高血压发生的风险因子。

[0092] 实施例5:植物乳杆菌对A7R5细胞内CAT酶活力的影响

[0093] 具体步骤如下:

[0094] 大鼠胸主动脉平滑肌细胞A7R5购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,以含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基进行培养。细胞培养于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中。细胞生长至70%~80%密度时进行传代。

[0095] 选取生长状态良好的A7R5细胞,将A7R5细胞经胰蛋白酶消化后离心、用DMEM培养基重悬,进行细胞计数,得到重悬液;将重悬液按照 2×10^5 细胞/孔接种至6cm细胞培养皿中后,在细胞培养皿中继续添加4mL含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基,于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中培养48h;培养48h后,将细胞培养皿中的含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素的DMEM培养基替换为4mL含有0.1% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基,并将细胞培养皿于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中静置24h;静置24h后,以每皿细胞为单位,将细胞分为空白对照组 (Control)、模型组 (Model)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149干预组 (CCFM1149) 以及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86干预组 (L86),每组3个皿,其中,在空白对照组与模型组的每个皿中分别加入120μL MRS液体培养基,在CCFM1149干预组的每个孔中加入120μL植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清,在L86干预组的每个孔中加入120μL植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清,将细胞培养皿于37℃、气相含5% (v/v) CO₂的细胞培养箱中干预12h;干预12h后,将细胞培养皿从细胞培养箱中取出,吸去每皿内液体并置于冰上,用冰浴预冷的PBS缓冲液清洗5遍;清洗5遍后,将每皿细胞转移至不同的15mL离心管中,以冰浴预冷的PBS缓冲液清洗2遍;清洗2遍后,在离心管中添加含有2.0% (v/v) 蛋白酶抑制剂混合物的PBS缓冲液 (1mL/管细胞) 重悬细胞,得到细胞悬液;将细胞悬液转移至新的无菌1.5mL离心管中,置于冰浴上超声破碎 (超声功率:300W,单次破碎时长:3~5秒,间隔30秒,重复3~5次),得到细胞破碎液;将细胞破碎液于显微镜下观察,无完整细胞即可确认破碎完全,完成细胞匀浆的制备;采用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒进行细胞匀浆蛋白浓度测定,细胞匀浆CAT酶活力采用南京建成过氧化氢酶测定试剂盒进行测定,胞内CAT酶活力以测定匀浆CAT活力除以匀浆蛋白浓度表示,以对照组为对比处理数据,结果如图4所示。

[0096] 由图4可知,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够提高A7R5细胞内CAT酶活力至空白对照组的3.3倍 ($p < 0.001$),而植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) L86培养上清干预未能显著改变A7R5细胞内CAT酶活力。

[0097] 可见,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CCFM1149培养上清干预能够通过提升A7R5细胞内CAT酶活力而提升细胞抗氧化能力,能够降低高血压发生的风险因子。

[0098] 实施例6:植物乳杆菌的应用

[0099] 植物乳杆菌CCFM1149可用于制备牛乳,牛乳的具体制备过程如下:

[0100] 将植物乳杆菌CCFM1149按照占培养基总质量2~4%的接种量接种到培养基中,于37℃下培养36h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液清洗2~4次后用冻干保护剂重悬,得到重悬液;将重悬液用真空冷冻法进行冻干,得到发酵剂;冻干保护剂和菌体的质量比为2:1;培养基包含占培养基总质量87.7%的水、10%的酶水解脱脂乳、0.5%的葡萄糖、1.5%的胰蛋白胨以及0.3%的酵母浸膏,pH为6.8;保护剂包含100g/L脱脂奶粉、150g/L海藻糖以及10g/L L-谷氨酸钠。

[0101] 将脱脂乳在95℃热杀菌20min,冷却至4℃,加入发酵剂,使脱脂乳中植物乳杆菌CCCFM1149活菌浓度达到 1×10^9 CFU/mL,于4℃条件下冷藏保存,得到含植物乳杆菌CCCFM1149活菌的牛乳。

[0102] 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。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一株可降低高血压发生风险因子的植物乳杆菌及其应用

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1021

<212> DNA

<213> 植物乳杆菌

<400> 1

```

gctaatacat gcagtcgaac gaactctggt attgattggt gcttgcataca tgatttacat 60
ttgagtgagt ggcgaaactgg tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag cgggggataa 120
cacctggaaa cagatgctaa taccgcataa caacttggac cgcattgtcc gagcttgaaa 180
gatggcttcg gctatcaact ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat ggtggggtaa 240
cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact 300
gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa 360
gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttggt 420
aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac ggtatttaac cagaaagcca 480
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggattta 540
ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct tcggctcaac 600
cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gactgcagaa gaggacagt gaactccatg 660
tntagcgggtg aatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggccaaggcg gctgtctggt 720
ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg gtagcaaac aggattagat accctggtag 780
tccataccgt aacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc 840
taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg 900
acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt gtttaattc gaagctacgc gaagaacctt 960
accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg gggacatgga 1020
t 1021

```

<210> 2

<211> 954

<212> DNA

<213> 植物乳杆菌

<400> 2

```

gctatacatg cagtcgaacg aactctggta ttgattggtg cttgcataca gatttagcat 60
ttgagtgagt ggcgaaactgg tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag cgggggataa 120
cacctggaaa cagatgctaa taccgcataa caacttggac cgcattgtcc gagtttgaaa 180
gatggcttcg gctatcaact ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat ggtggggtaa 240
cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact 300

```

gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa 360
gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttggt 420
aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac ggtatttaac cagaaagcca 480
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta 540
ttgggcgtaa agcgagcgc ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct tcggctcaac 600
cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg 660
tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt gccgaaggcg gctgtctggt 720
ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag 780
tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc 840
taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg 900
acggggggccc gcacaagcgg tgagcatgtg ttttaattcga agctacgcga agaa 954

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ggttaccttg ttacgactt 19

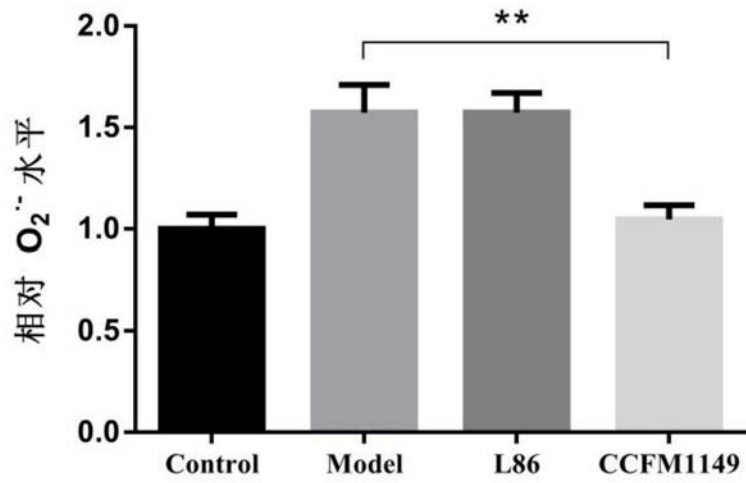


图1

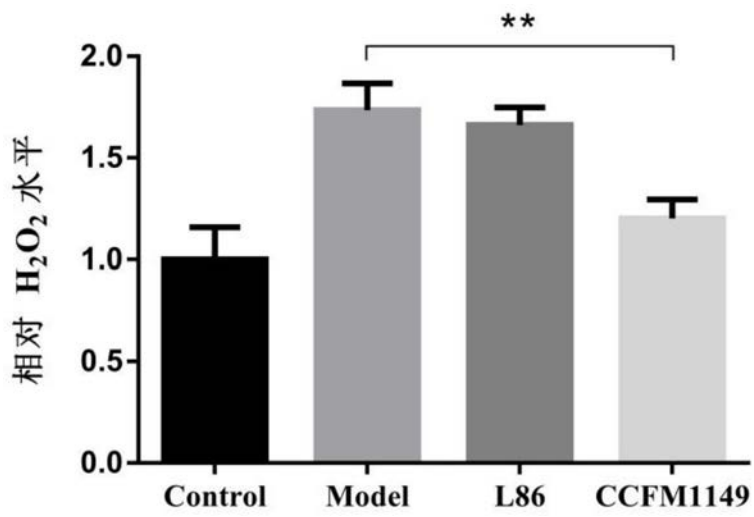


图2

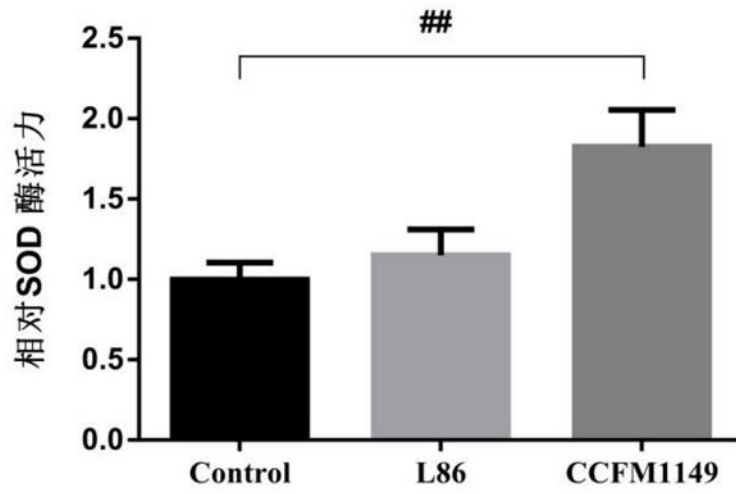


图3

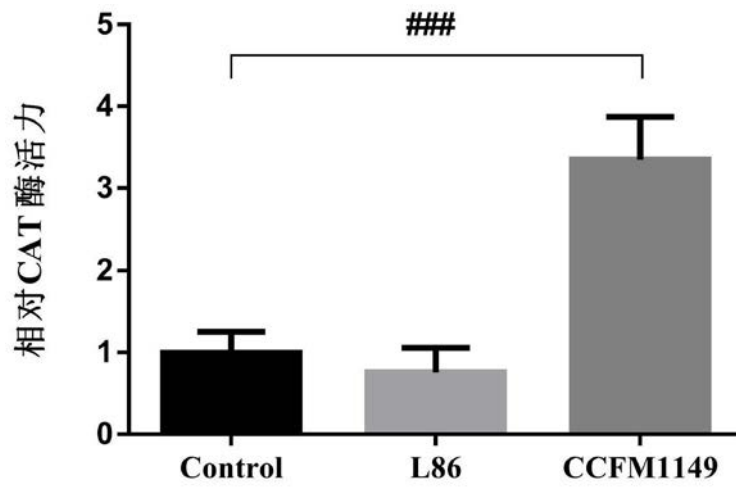


图4