

## 一株大熊猫源巴黎链球菌及其应用

### 技术领域

本发明涉及微生物技术领域，具体涉及一株大熊猫源巴黎链球菌及其应用。

### 背景技术

长期以来，大熊猫一直受到肠道疾病的困扰，胃肠道疾病是导致大熊猫死亡的主要原因。此外，在致病性方面，已证实某些肠道细菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和魏氏梭菌可引起大熊猫肠道疾病。这些细菌在一定程度上影响肠道微生态系统的平衡和稳定性，而肠道微生物群的不稳定会进一步影响大熊猫对竹子的消化，甚至影响到大熊猫的免疫系统。

链球菌等产乳酸菌能调节胃肠道正常菌群，维持微生态平衡，提高食物消化率，抑制肠道腐败菌生长，提高宿主免疫力。目前，大多数有关大熊猫肠道微生物的研究主要集中在肠道微生物对纤维素的降解能力上，对大熊猫相关益生菌的免疫功能知之甚少。巴黎链球菌 S7 表现出较好的耐受性，并携带可有利于宿主身体健康的基因 *sodA*（编码超氧化物歧化酶）。该菌株具有不错的益生潜力，但需要进一步核实。

DSS 动物模型的构建是基于葡聚糖硫酸钠（DSS）对啮齿类动物上皮的破坏，导致过多的组织中性粒细胞和其它的损伤和随后的浸润急性免疫细胞，从而引起的结肠炎。通常自由饮用 7 天即可见效。DSS 模型在形态学及症状上与溃疡性结肠炎极其相似，DSS 的造模机制与 DSS 药物对于肠上皮直接的毒性作用有关，从而能够引起肠上皮糜烂，最终导致黏膜屏障的完整性遭到破坏。DSS 造模具有方法简单、容易重复、DSS 药物具有容易获得且价格实惠的优点，是实验研究中使用较多的化学诱导模型。因此，本研究中使用 DSS 动物模型来评估获得菌株的益生作用。

### 发明内容

针对目前国内大熊猫相关益生菌免疫功能研究的空白，本发明提供一株大熊猫源巴黎链球菌及其应用，该菌株可以在 40℃ 的高温下生长，具有良好的耐酸耐胆盐特性，安全性高，并且可以调节结肠 *muc2* 表达促进粘液分泌，以及调节 DSS 小鼠模型结肠 *IL-1 $\beta$*  mRNA 和 *TNF $\alpha$*  mRNA 的相对表达量，在治疗大熊猫结肠炎以及提高大熊猫免疫力上有很好的应用前景。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一株大熊猫源巴黎链球菌，命名为：*Streptococcus lutetiensis*S7，保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No:61917。

分离得到的链球菌的菌落形态较小，呈乳白色且散发着乳香味。通过革兰氏染色油镜镜检（放大倍数：物镜 100 $\times$ 目镜 16 $\times$ ）发现，菌株为革兰氏阳性（蓝紫色）球菌，球菌排列成链状形态（图 2），测序鉴定该菌为巴黎链球菌。

进一步地，所述大熊猫源巴黎链球菌能够在 40℃ 温度下生长好（图 3）。

进一步地，所述大熊猫源巴黎链球菌不含有 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetM*、*sul1*、*dfrA1*、*dfrA5* 及 *int11* 等耐药基因。

进一步地，所述大熊猫源巴黎链球菌具有耐酸耐胆盐特性。

进一步地，所述大熊猫源巴黎链球菌可调节小鼠结肠 *muc2* 表达，并促进粘液分泌。

进一步地，所述大熊猫源巴黎链球菌可调节 DSS 诱导肠炎模型的 *IL-1 $\beta$*  mRNA 和 *TNF $\alpha$*  mRNA 表达。

DSS 动物模型的构建是基于葡聚糖硫酸钠（DSS）对啮齿类动物上皮的破坏，导致过多的组织中性粒细胞和其它的损伤和随后的浸润急性免疫细胞，从而引起结肠炎。通常自由饮用 7 天即可见效。DSS 模型在形态学及症状上与溃疡性结肠炎极其相似，DSS 的造模机制与 DSS 药物对于肠上皮直接的毒性作用有关，从而能够引起肠上皮糜烂，最终导致黏膜屏障的完整性遭到破坏。DSS 造模具有方法简单、容易重复、DSS 药物具有容易获得且价格实惠的优点，是

实验研究中使用较多的化学诱导模型。因此，本发明采用 DSS 动物模型来评估大熊猫源巴黎链球菌的益生作用。

第二个方面，本发明提供上述大熊猫源巴黎链球菌在制备大熊猫结肠炎药物上的应用。

第三个方面，本发明提供上述大熊猫源巴黎链球菌在制备大熊猫免疫调节药物上的应用。

与现有技术相比，本发明的有益效果是：

本发明首次对大熊猫肠道链球菌开展了分离培养及生物学特性研究，探究了分离链球菌的生长特性、生化特性及菌株的系统进化关系等。本发明的大熊猫源巴黎链球菌可以在 40℃ 的温度下生长，具有良好的耐酸耐胆盐特性，安全可靠，并且可以调节结肠 *muc2* 表达，增强了宿主肠道黏膜免疫屏障。DSS 诱导肠炎动物模型发现巴黎链球菌 S7 在免疫方面能降低相关肠道炎症指标、产生抗炎效果的免疫因子及缓解炎症反应。在治疗大熊猫结肠炎以及提高大熊猫免疫力上有很好的应用前景。

### 附图说明

图 1 为实施例 1 分离得到链球菌 S7 的革兰氏染色镜检（1000×）

图 2 为实施例 2 中巴黎链球菌 S7 在不同温度下的生长曲线。

图 3 为本发明实施例 3 中小鼠体重和摄食量变化柱状图，其中，图 3-1 表示急性毒性实验小鼠体重变化；图 3-2 表示慢性毒性实验小鼠体重变化；图 3-3 表示急性毒性实验小鼠摄食量变化；图 3-4 表示慢性毒性实验小鼠摄食量变化。

图 4 为本发明实施例 4 中实验组和对照组之间 t-test 差异显著的菌属，其中图 4-1 为 14 天的结果，图 4-2 为 28 天的结果。

图 5 为本发明实施例 5 中实时荧光定量 PCR 检测小鼠结肠 *muc2* mRNA 表达水平。

图 6 为本发明实施例 5 中黏膜厚度的统计分析。

图 7 为本发明实施例 5 中通过 AB-PAS 染色检测各组小鼠结肠黏膜厚度(28 d)，其中图 7-1 为对照组 28 天结果，图 7-2 为治疗组 28 天结果。

图 8 为本发明实施例 6 中 DSS 动物模型构建。

图 9 为本发明实施例 6 中造模期各组小鼠体重变化曲线。

图 10 为本发明实施例 6 中各组 DAI 指数记录。

图 11 为本发明实施例 6 中各组小鼠结肠长度柱状图。

图 12 为本发明实施例 6 中各组小鼠脾脏重量柱状图。

图 13 为本发明实施例 6 中各组小鼠结肠组织 MPO 酶活柱状图。

图 14 为本发明实施例 6 中各组小鼠结肠 *IL-6*、*IL-1 $\beta$*  和 *TNF $\alpha$*  基因 mRNA 表达量柱状图，其中图 14-1 为 *IL-6* 基因 mRNA 表达量，图 14-2 为 *IL-1 $\beta$*  基因 mRNA 表达量，图 14-3 为 *TNF $\alpha$*  基因 mRNA 表达量。

图 15 为本发明实施例 6 中各组小鼠部分结肠组织 HE 染色图，图 15-1 和 15-2 分别为对照组 200 $\mu$ m 和 50 $\mu$ m 的染色图，图 15-3 和 15-4 分别为 DSS 组 200 $\mu$ m 和 50 $\mu$ m 的染色图，图 15-5 和 15-6 分别为处理组 200 $\mu$ m 和 50 $\mu$ m 的染色图。

图 16 为本发明实施例 6 中各组小鼠组织学评分柱状图。

### 具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

### 实施例 1

#### 大熊猫源巴黎链球菌 S7 的分离鉴定及活化

### 1、大熊猫源巴黎链球菌 S7 分离鉴定

用 PBS 将采集的大熊猫粪便样品梯度稀释，并涂布于 MRS 固体培养基，置于恒温培养箱于 37℃ 培养 18 h。挑取可疑菌落进行再次分离纯化，分离得到的链球菌的菌落形态较小，呈乳白色且散发着乳香味。通过革兰氏染色油镜镜检（放大倍数：物镜 100×目镜 16×）发现，菌株为革兰氏阳性（蓝紫色）球菌，球菌排列成链状形态（图 1）。挑取单个菌落于 MRS 液体培养基富集培养 18 h（37℃）。按照百泰克细菌 DNA 提取试剂盒上的步骤提取 DNA，以细菌 DNA 为模板，27F 和 1492R 为引物扩增 16S rRNA 基因，进行 16S rRNA 标记基因测序鉴定。

### 2、菌株的活化与培养

从-80℃冰箱中取出保菌管，于 MRS 固体平板划线复苏巴黎链球菌 S7，37℃ 培养 18 h 后，挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基，37℃ 培养 18 h，之后以 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中，37℃ 培养 18 h，连续活化三代后以 2% 的接种量接种于 1 L 的 MRS 液体培养基中扩大培养，37℃ 培养 18 h。8000×g 离心 10 min，用 PBS 洗涤菌体沉淀 3 次后用于后续实施例的实验。

## 实施例 2

### 大熊猫源巴黎链球菌 S7 的温度耐受性、抗生素耐受性、耐酸耐胆盐特性评价

#### 1、菌株的温度耐受性测定

具体步骤包括：

（1）菌液培养：在大熊猫源巴黎链球菌 S7 菌株的斜面培养物上挑取一环菌苔，接种于肉汤培养基（牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g，加水至 1000 mL）中，37℃ 静置培养 12 h 左右，此菌液即为种子培养液。

（2）分装培养液及校正零点：用无菌移液管吸取 25 mL 培养基加至有侧臂试管的三角烧瓶中，将未接种的培养液倾入其侧臂试管中，并在光电比色计上调节零点，即使光电比色计上的 OD600 值在零点上（每个菌株设定三个平行重复）。

（3）接种及零时测定：用移液吸管吸取 2.5 mL 种子培养液接种瓶中，并充

## 说明书

分摇匀。将刚接种的培养液倾入侧臂试管中，测定光电比色计 OD600 值，此时的读数为接种后菌种生长曲线中的零时读数值。

(4) 培养及生长量测定：将零时测定后的三角烧瓶立即放入恒温水浴摇床上震荡培养，培养温度为 37℃，摇床的频率为 100×g /min 左右。在培养中，应每隔 30 min 从摇床上取下三角烧瓶，将菌液倾入侧臂试管中，并在光电比色计（上海仪电仪器有限公司，721G 型）上读取 OD600 值，记录每次所测得的数据，在每次测定时，均要用空白对照管的培养液来校正光电比色计的零点。

(5) 绘制生长曲线：以测定的时间为横坐标，菌数的对数（OD600 值）为纵坐标，在半对数坐标纸上描点绘图，所得的曲线即为被测菌株在实验条件下的生长曲线。设置温度梯度（20℃、30℃、35℃、40℃、50℃及 60℃），测定最适生长温度，比浊法测定菌体浓度，绘制菌株在不同温度（t）下生长曲线，如图 2 所示，巴黎链球菌 S7 在 40℃下生长良好。

### 2、抗生素耐受性实验

挑取数个单个大熊猫源巴黎链球菌 S7 菌落，直接接种 4.5%生理盐水制成菌悬液，使用比浊仪调整悬液的浊度使其达到 0.5 麦氏单位；调整好悬液的浊度后，用无菌棉签浸入悬液内，紧贴试管内壁在液体上方旋转拭子数次，除去棉签上多余的液体，但也应适度。用拭子划线整个琼脂表面，从平板顶部到底部，均匀涂布；将抗菌药物纸片贴于已接种细菌的琼脂表面，每个纸片必须压下以确保与琼脂表面完全接触，无论是单独放置的纸片或有纸片分配设备，纸片必须分布均匀，两纸片之间圆心的距离不少于 24 mm，纸片边缘距离琼脂边缘不少于 15 mm；在放置好纸片后，15 min 内，将 MH 琼脂倒置于恒温培养箱中，孵育 16-18 h。孵育后，将贴有纸片的 MH 平板置于黑色不反光的背景上，采用游标卡尺，来测量抑菌环的直径（完全抑制区的直径）。菌株敏感性判读参照 CLSI 标准，根据抑菌环的直径的数值报告测试的细菌对测试药物敏感、中介及耐药。抗生素的检测主要包括：四环素、多西环素、复方新诺明、阿奇霉素、万古霉素、利福平、克林霉素、美罗培南、左氧氟沙星、克拉霉素、氧氟沙星、氯霉素、青霉素、头孢曲松、红霉素及氨苄西林。运用 PCR 检测耐药

## 说明书

基因，检测的耐药基因为：*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetM*、*sul1*、*dfrA1*、*dfrA5* 及 *int11*，测试结果为未检测出耐药基因。

### 3、目标菌株耐酸耐胆盐特性的测定

将胃蛋白酶重悬于经灭菌的 0.5% (W/V) 生理盐水中使其浓度达到 3 g/L，将 pH 调至 2.0 得到模拟胃液。将胰酶重悬于经灭菌的 0.5% (W/V) 生理盐水中使其浓度达到 1 g/L，加入 0.3% 胆盐并将 pH 调至 8.0 得到模拟肠液。取 3 份 1 mL 大熊猫源巴黎链球菌 S7 菌液，离心洗涤，分别重悬于 1 mL 0.5% (W/V) 无菌盐水、1 mL 模拟胃液和 1 mL 模拟肠液混匀，置于 37℃ 恒温培养箱中培养。1 mL 模拟胃液，分别在 1、3 h 时取出 100  $\mu$ L 菌液进行活菌计数，计算存活率，确定耐酸特性。1 mL 模拟肠液，分别在 2、4 h 时取出 100  $\mu$ L 菌液进行活菌计数，计算存活率，确定耐胆盐特性。其中存活率 (%) =  $P_1/P_0 \times 100$ ， $P_1$  为胁迫处理后活菌数， $P_0$  为胁迫处理前活菌数。

如表 1 所示，巴黎链球菌 S7 在 1 h 时在胃液中的存活率为  $1.3\% \pm 0.5\%$  ( $9.4 \times 10^7$  CFU/mL)，在 3 h 时菌株在胃液中的存活率为存活率为  $0.1\% \pm 0.1\%$  ( $9.8 \times 10^6$  CFU/mL)；巴黎链球菌 S7 在 2 h 时在胰液中存活率为  $28.0\% \pm 5.3\%$  ( $2.1 \times 10^8$  CFU/mL)，巴黎链球菌 S7 在 4 h 时在胰液中存活率为  $3.2\% \pm 0.5\%$  ( $2.5 \times 10^7$  CFU/mL)。巴黎链球菌 S7 拥有相对较好的耐酸耐胆盐特性。

表 1 菌株 S7 的耐酸耐胆盐特性结果

	处理时间	S7
胃液存活率 (%)	1 h	$1.3 \pm 0.5$
	3 h	$0.1 \pm 0.1$
胰液存活率 (%)	2 h	$28.0 \pm 5.3$
	4 h	$3.2 \pm 0.5$

根据以上对该菌株温度耐受性、抗生素耐受性、耐酸耐胆盐特性的测定，本菌株具有成为益生菌的潜力。

### 实施例 3

### 急慢性毒性动物实验

#### 3.1 实验动物

选取体重相似的 4 周龄 SPF 级成年 C57BL/6 品系小鼠雌、雄性各 40 只，并严格控温控湿。小鼠适应 7 天后开始实验，并按照实验要求做好相关实验记录。

#### 3.2 急性毒性动物实验

参考国标 GB15193.3-2014《食品安全国家标准急性经口毒性实验》要求开展实验，适应期结束后随机选取雌雄小鼠，分成 2 组，分别为空白组和配方组，每组雌雄各 10 只，其中配方组灌胃大熊猫源巴黎链球菌 S7 菌悬液，其中灌胃菌量达到  $10^9$  CFU/只，空白组灌胃 PBS。一次性灌胃，剂量 0.2 mL/只。灌胃后，观察记录小鼠的行为特征以及死亡和中毒情况。在实验前 0，3，7 和 14 天称重记录体重和摄食量，在第 14 天，对小鼠进行眼眶取血测定血常规和血生化，大体解剖小鼠，并对相关脏器进行称重，若器官有体积、颜色等变化，应对该器官进行病理学检查。实验数据均以平均值 $\pm$ 均值标准误差表示，数据统计采用单因素 ANOVA 分析，以及 Tukey's 多重检验， $p$  值小于 0.05 被认为数据差异显著。

#### 3.3 慢性毒性实验

参考国标 GB 15193.13-2015《食品安全国家标准 30 天喂养试验》和 GB15193.22-2014《食品安全国家标准 28 天进口毒性试验》要求开展实验，适应期结束后随机选取雌雄小鼠，分成 2 组，分别为空白组和配方组，每组雌雄各 10 只，空白组灌胃 PBS，配方组灌胃大熊猫源巴黎链球菌 S7 菌悬液，灌胃菌量达到  $10^9$  CFU/只，连续每日灌胃，观察记录小鼠的行为特征以及死亡和中毒情况。在实验 0，3，7，14，21，28 天称重记录体重和摄食量，在第 28 天，对小鼠进行眼眶取血测定血常规和血生化。解剖小鼠并对相关脏器进行称重，若器官有体积、颜色等变化，应对该器官进行病理学检查。实验数据均以平均值 $\pm$ 均值标准误差表示，数据统计采用单因素 ANOVA 分析，以及 Tukey's 多重检验， $p$  值小于 0.05 被认为数据差异显著。



### 3.4 小鼠血液生理指标检测

小鼠血液生理指标用全自动血液细胞分析仪进行检测，检测指标包括白细胞（WBC）、红细胞（RBC）、血红蛋白（HGB）、血小板（PLT）。肝肾功能检测指标包括谷丙转氨酶（ALT）采用干式化学法，详细步骤参照谷丙转氨酶测试条使用说明书，碱性磷酸酶（ALP）的检测采用磷酸苯二钠比色法，详细步骤参照碱性磷酸酶测定试剂盒（购自于南京建成生物工程研究所）。肝肾功能指标检测方法采用肌酐（Cr）用苦味酸法，详细步骤参照肌酐测定试剂盒。小鼠血液中的尿素（Urea）用尿酶靛蓝法检测，详细步骤参照测定试剂盒。所有实验数据用 SPSS 软件进行因子方差分析及相关性分析。实验数据均以平均值±均值标准误差表示，数据统计采用单因素 ANOVA 分析，以及 Tukey's 多重检验， $p$  值小于 0.05 被认为数据差异显著。

### 3.5 实验结果分析

在急性毒性动物实验的 14 天及慢性毒性动物实验的 28 天观察期内，各组小鼠均正常活动，精神良好，饮水正常，小鼠未出现中毒和死亡的情况。小鼠解剖后未发现小鼠脏器出现明显病理变化。在急性及慢性毒性动物实验中，解剖后测量对照组与处理组小鼠的脏器系数无显著差异（ $p > 0.05$ ）（表 2 和表 3）。在急性毒性动物实验的 14 天及慢性毒性动物实验的 28 天观察期内，各实验组小鼠的体重以及摄食量变化情况如图 3 所示，对照组与处理组小鼠的体重、摄食量无明显异常（ $p > 0.05$ ）。此外，在急性及慢性毒性动物实验中，各组小鼠的血液指标皆正常，对照组与处理组小鼠的血液指标之间无显著差异（ $p > 0.05$ ）（如表 2 到表 9 所示）。

表 2 急性毒性实验喂养试验小鼠脏器系数指标

T-test (Acute)	heart	liver	spleen	lung	kidney	stomach	colon	denum	cecum
Control	0.23 ±	1.76 ±	0.13 ±	0.19 ±	0.16 ±	0.80 ±	0.52 ±	2.51 ±	0.40 ±
(g)	0.03	0.30	0.02	0.03	0.01	0.09	0.06	0.10	0.06
Treat (g)	0.20 ±	1.86 ±	0.12 ±	0.19 ±	0.18 ±	0.80 ±	0.53 ±	2.54 ±	0.42 ±

# 说明书

	0.02	0.19	0.03	0.02	0.01	0.11	0.03	0.15	0.07
<i>p</i> value	0.09	0.57	0.32	0.89	0.11	0.97	0.73	0.64	0.58

注：Heart：心、liver：肝、spleen：脾、lung：肺、kidney 肾、stomach：胃、colon：结肠、denum：十二指肠、cecum：盲肠。各组没有显著性差异  $p>0.05$ 。

表 3 慢性毒性实验喂养试验小鼠脏器系数指标

T-test (Chronic)	heart (g)	liver	spleen	lung	kidney	stomach h	colon	denum	cecum
Control (g)	0.19 ± 0.01	1.78 ± 0.11	0.11 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.73 ± 0.06	0.54 ± 0.06	2.53 ± 0.19	0.54 ± 0.04
Treat (g)	0.21 ± 0.02	1.92 ± 0.10	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.88 ± 0.12	0.52 ± 0.05	2.67 ± 0.10	0.47 ± 0.06
<i>p</i> value	0.29	0.07	0.54	0.81	0.42	0.06	0.49	0.16	0.05

注：Heart：心、liver：肝、spleen：脾、lung：肺、kidney 肾、stomach：胃、colon：结肠、denum：十二指肠、cecum：盲肠。各组没有显著性差异  $p>0.05$ 。

表 4 (a) 急性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Acute)	WBC ( $10^9/L$ )	Neu (%)	Lym (%)	Mon (%)	Eos (%)	Bas (%)	Neu# ( $10^9/L$ )	Lym# ( $10^9/L$ )	Mon# ( $10^9/L$ )	Bas# ( $10^9/L$ )
Control	3.85 ± 0.48	3.84 ± 1.01	84.2 ± 7.91	7.03 ± 1.52	0.14 ± 0.05	0.82 ± 0.15	0.16 ± 0.04	3.33 ± 0.35	0.23 ± 0.06	0.01 ± 0.02
Treat	3.89 ± 0.96	3.72 ± 1.07	78.1 ± 11.01	6.24 ± 0.79	0.14 ± 0.05	0.88 ± 0.37	0.15 ± 0.02	3.08 ± 0.49	0.22 ± 0.05	0.01 ± 0.01
<i>p</i> value	0.93	0.86	0.34	0.35	0.07	0.67	0.41	0.36	0.95	0.83

注：WBC ( $10^9/L$ )：白细胞数目；Neu (%)：中性粒细胞百分比；Lym (%)：淋巴细胞百分比；Mon (%)：单核细胞百分比；Eos (%)：嗜酸性粒细胞百分比；Bas (%)：嗜碱性粒细胞百分比；Neu# ( $10^9/L$ )：中性粒细胞数目；

## 说 明 书

Lym#( $10^9/L$ ): 淋巴细胞数目; Mon#( $10^9/L$ ): 单核细胞数目; Bas#( $10^9/L$ ): 嗜碱性粒细胞数目。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

表 5 (b) 急性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Acute)	RBC ( $10^{12}/L$ )	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW_C V (%)	RDW_SD (fL)
Control	8.43 ± 0.65	129 ± 13	48.2 ± 4.1	56.7 ± 2.5	15.7 ± 0.3	280 ± 13	16.7 ± 2.3	38.3 ± 5.7
Treat	8.29 ± 0.68	127 ± 13	47.2 ± 9.8	56.8 ± 3.6	17.2 ± 1.6	283 ± 17	16.3 ± 1.8	38.3 ± 2.5
p value	0.75	0.83	0.86	0.98	0.06	0.78	0.81	0.99

注: RBC ( $10^{12}/L$ ): 红细胞数目; HGB (g/L): 血红蛋白浓度; HCT (%): 红细胞压积; MCV (fL): 平均红细胞压积; MCH (pg): 平均红细胞血红蛋白含量; MCHC (g/L): 平均红细胞血红蛋白浓度; RDW\_CV (%): 红细胞分布宽度变异系数; RDW\_SD (fL): 红细胞分布宽度标准差。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

表 6 (c) 急性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Acute)	PLT ( $10^9/L$ )	MPV (fL)	PDW	PCT (%)	ALT (U/L)	Cre ( $\mu\text{mol}/L$ )
Control	388 ± 61	6.22 ± 0.68	15.1 ± 0.8	0.22 ± 0.02	41.7 ± 5.4	130 ± 33
Treat	374 ± 70	6.11 ± 0.69	15.2 ± 0.5	0.18 ± 0.08	40.8 ± 9.8	129 ± 22
p value	0.73	0.81	0.85	0.38	0.86	0.99

注: PLT ( $10^9/L$ ): 血小板数目; MPV (fL): 平均血小板体积; PDW: 血小板分布宽度; PCT (%): 血小板压积; ALT (U/L): 丙氨酸氨基转移酶; Cre ( $\mu\text{mol}/L$ ): 肌酐。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

表 7 (a) 慢性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Chron	WBC ( $10^9/$	Neu (%)	Lym (%)	Mon (%)	Eos (%)	Bas (%)	Neu# ( $10^9/$	Lym# ( $10^9/$	Mon# ( $10^9/$	Bas# ( $10^9$
------------------	------------------	------------	------------	------------	------------	------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------

# 说明书

ic)	L)	)	)	)	)	)	L)	L)	L)	/L)
Control	4.29 ±	4.34	77.8	6.92	0.12	0.72	0.15 ±	3.11 ±	0.22 ±	0.01 ±
	1.01	±	± 6.3	±	±	±	0.03	0.21	0.05	0.01
		0.67		0.69	0.04	0.11				
Treat	4.44 ±	4.44	83.6	7.38	0.14	0.72	0.15 ±	3.21 ±	0.25 ±	0.01 ±
	0.61	±	± 5.1	±	±	±	0.01	0.49	0.05	0.01
		0.77		0.58	0.05	0.08				
p value	0.79	0.83	0.14	0.28	0.54	0.92	0.93	0.68	0.31	0.39

注：WBC (10<sup>9</sup>/L)：白细胞数目；Neu (%)：中性粒细胞百分比；Lym (%)：淋巴细胞百分比；Mon (%)：单核细胞百分比；Eos (%)：嗜酸性粒细胞百分比；Bas (%)：嗜碱性粒细胞百分比；Neu# (10<sup>9</sup>/L)：中性粒细胞数目；Lym# (10<sup>9</sup>/L)：淋巴细胞数目；Mon# (10<sup>9</sup>/L)：单核细胞数目；Bas# (10<sup>9</sup>/L)：嗜碱性粒细胞数目。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

表 8 (b) 慢性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Chronic )	RBC (10 <sup>12</sup> / L)	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW_C V (%)	RDW_SD (fL)
Control	8.23 ±	135 ±	46.8 ±	53.6 ±	16.1 ±	287 ± 49	17.1 ± 0.8	38.1 ± 3.5
	0.66	13	6.3	3.6	0.7			
Treat	8.19 ±	130 ±	45.8 ±	57.2 ±	16.5 ±	262 ± 25	16.8 ± 1.5	41.2 ± 5.8
	0.68	20	9.3	2.3	1.3			
p value	0.94	0.72	0.86	0.11	0.58	0.33	0.68	0.36

注：RBC (10<sup>12</sup>/L)：红细胞数目；HGB (g/L)：血红蛋白浓度；HCT (%)：红细胞压积；MCV (fL)：平均红细胞压积；MCH (pg)：平均红细胞血红蛋白含量；MCHC (g/L)：平均红细胞血红蛋白浓度；RDW\_CV (%)：红细胞分布宽度变异系数；RDW\_SD (fL)：红细胞分布宽度标准差。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

表 9 (c) 慢性毒性实验喂养试验小鼠血液指标

T-test (Chronic)	PLT (10 <sup>9</sup> /L)	MPV (fL)	PDW	PCT (%)	ALT (U/L)	Cre (μmol/L)
---------------------	--------------------------	----------	-----	---------	-----------	--------------

## 说 明 书

Control	371 ± 31	6.15 ± 0.92	15.1 ± 0.5	0.25 ± 0.04	40.8 ± 8.8	133 ± 16
Treat	375 ± 37	6.15 ± 0.85	14.6 ± 0.6	0.25 ± 0.06	45.5 ± 5.5	124 ± 10
<i>p</i> value	0.88	0.98	0.23	0.99	0.45	0.33

注：PLT (10<sup>9</sup>/L)：血小板数目；MPV (fL)：平均血小板体积；PDW：血小板分布宽度；PCT (%)：血小板压积；ALT (U/L)：丙氨酸氨基转移酶；Cre (μmol/L)：肌酐。各组没有显著性差异  $p > 0.05$ 。

总之，本发明的大熊猫源巴黎链球菌有望开发成制备大熊猫结肠炎药物以及大熊猫免疫调节药物。

## 实施例 4

### 小鼠粪便 16S rRNA 高通量测序

#### 4.1 样品采集

在实施例 3 的小鼠慢性实验的过程中，于实验中期（第 14 天）及实验末期（第 28 天）无菌条件下采集小鼠粪便用于 16S rRNA 高通量测序。

#### 4.2 总 DNA 提取及 16S rRNA 高通量测序

根据制造商的说明，使用 Mobio Power Fecal™ DNA 试剂盒从收集的小鼠粪便中提取总体基因组 DNA，用通用引物 520F (5'- barcode + AYTGGGYDTAAAGNG-3') 和 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3') PCR 扩增 16S rRNA 基因的高可变区 V4 (83bp)，然后将 PCR 产物提交给上诺禾生物技术有限公司进行测序，测序基于 Illumina HiSeq 2500 平台。

#### 4.3 数据质控及统计分析

对测序的下机数据进行质控获得 clean data，并根据 out 分析菌群结构，对照组和实验处理组之间的差异物种通过 T-test 计算得出。如图 4 所示，在第 14 天时，实验处理组中链球菌的丰度就已显著高于对照组了 ( $p = 0.003 < 0.01$ )。而在第 28 天时，实验处理组中链球菌的丰度则更加显著高于对照组 ( $p = 0.002 < 0.01$ )。可见，链球菌属已在小鼠肠道内达到稳定的富集状态，值得注意的是，实验组中的明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*) 也逐渐高于

对照组 ( $p < 0.01$ )。

## 实施例 5

### 小鼠肠黏膜相关研究

#### 5.1 小鼠结肠组织 RNA 提取及 *muc2* 基因定量实时 PCR 扩增

基于实施例 3 中小鼠慢性毒性实验，于第 30 天获取小鼠结肠组织，按照制造商的说明，使用 RNA 提取试剂盒从小鼠结肠组织提取总 RNA。然后用 RT Easy<sup>TM</sup>II 试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA，用 SYBRGreen Master Mix 试剂盒实时定量 PCR (qPCR) 检测基因 *muc2* 的 mRNA 表达情况。特异性引物(*muc2*) 采用：上游引物：5'-ATGC-CCACCTCCTCAAAGAC-3'，下游引物：5'-GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA-3'，GAPDH 被用作内部参考，相关基因表达用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法测定，GAPDH 上游引物为 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'，下游引物为 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTT-GA-3'。实验数据均以平均值 $\pm$ 均值标准误差表示，数据统计采用单因素 ANOVA 分析，以及 Tukey's 多重检验， $p$  值小于 0.05 被认为数据差异显著。

#### 5.2 小鼠 AB-PAS 病理观察

无菌条件下取小鼠结肠，并取小鼠结肠组织 1 cm<sup>3</sup> 于 4%多聚甲醛 (CAS: 30525-89-4, 成都市科隆化学品有限公司)，固定的组织样本固定 48 h 后，参考 HE 染色的方法进行制片。用 AB-PAS 进行染色，切片脱蜡至水，阿利新蓝染液浸染或滴染 5-10 min，稍水洗，用 0.5%高碘酸水溶液氧化 5-10 min，流水冲洗数分钟蒸馏水换洗两次，雪夫试剂暗处浸染 30 min，流水冲洗 5-10 min，用光学显微镜对染片进行镜检观察。

#### 5.3 结果分析

为了评价巴黎链球菌 S7 是否能刺激小鼠结肠 *muc2* 的表达，本研究首先用 qPCR 检测了小鼠结肠 *muc2* 基因的 mRNA 的表达水平，结果表明在接种菌株 14 天后，处理组小鼠的结肠 *muc2* mRNA 表达较对照组增加约  $1.6 \pm 0.5$  倍 ( $p < 0.05$ )；在接种菌株 28 天后，处理组小鼠的结肠 *muc2* mRNA 表达较对照组增加约  $1.9 \pm 0.3$  倍 ( $p < 0.01$ ) (如图 5)。此外，AB-PAS 染色表明 (如图 6 和图

7), 在第 28 d 时, 处理组小鼠的结肠黏膜厚度( $p = 0.02 \leq 0.05$ )有显著的增加。这些结果表明, 巴黎链球菌 S7 可能调节了结肠 *muc2* 表达, 促进了粘液分泌。

## 实施例 6

### 构建 DSS 肠炎疾病模型

实验所用小鼠为健康的 C57BL/6 雌性小鼠, 购自四川达硕生物科技有限公司, 鼠龄是 7 周, 体重为  $18 \pm 1$  g, 实验所有操作按照动物福利规范的进行。按照成熟的 DSS 动物预防实验模型(图 8), 将实验小鼠随机分成三组, 每组 5 只, 实验共计 30 天, 第 1 天到第 21 天作为预防期, 第 22 天到第 28 天作为造模期, 在第 30 天处死小鼠, 解剖取结肠组织, 同时取脾脏称重。

实验期间各组小鼠分别做了不同的处理(表 10), (1) 对照组(control): 整个实验阶段, 供应小鼠饲料和正常饮水, 同时每天灌胃无菌 PBS 200  $\mu$ L。(2) DSS 组(DSS): 在预防期, 供应小鼠饲料和正常饮水, 在造模期, 正常供应饲料, 饮水改为 2.5% 的 DSS 水溶液, 每天灌胃无菌 PBS 200  $\mu$ L。(3) 处理组(treat): 在预防期, 供应小鼠饲料和正常饮水, 处理组在造模期正常供应饲料, 饮用水为 2.5% 的 DSS 水溶液, 整个实验期间每天灌胃  $10^{10}$  CFU/mL 的巴黎链球菌 S7 浓缩菌液 200  $\mu$ L。实验期间, 每日观察小鼠体征变化, 同时做好相关数据的记录。

表 10 实验设计内容

预防期		造模期	灌胃处理
对照组	正常饮水		PBS（200 μL/day）
DSS 组			
处理组	正常饮水	2.5% DSS 自由饮用	S7（200 μL/day）

实验过程及结果分析:

#### 6.1 DSS 动物模型体重变化情况

在预防期, 各组小鼠的体重基本维持了缓慢的生长状态, 并且各组小鼠体重之间都没有显著差异。进入造模期后, 对照组小鼠继续保持原有的缓慢生长

## 说明书

速度，且状态比较平稳；从体重变化趋势来看，DSS 组小鼠的体重下降比较明显；处理组小鼠的体重也发生了下降现象，但下降曲线相比 DSS 组要少许缓慢。在造模期的最后一天时，各组的体重彼此之间都拉开了较大差距。从图 9 可见，在造模期第 7 天时，处理组和 DSS 组小鼠的体重和对照组相比存在极显著差异（ $p < 0.001$ ）；同时，处理组和 DSS 组的小鼠体重变化也存在显著差异（ $p < 0.05$ ）。

### 6.2 疾病活动指数评分

疾病活动指数（Disease activity index, DAI）包括体重变化、便血情况和大便性状，具体评分标准如表 11 所示。造模期间，每天测量小鼠体重，检测小鼠便血情况和大便性状。根据表 11 进行评分， $DAI = \text{体重变化分数} + \text{便血分数} + \text{大便性状分数} / 3$ 。粪便隐血情况用粪便潜血测试使用联苯胺法测定，若粪便肉眼可见有红褐色或鲜红色血液，则为肉眼血便。粪便性状分为正常、松散和稀便，小鼠正常粪便成型，为颗粒状，若粪便粘度增加且易散，但不粘附于肛门则为松散，若粪便不成形或呈稀水样，且粘附于肛门则为稀便。

表 11 DAI 评分标准

计分	体重下降（%）	大便性状	大便隐血/血便
0	0	正常	正常
1	1-5		
2	5-10	松散	隐血阳性
3	10-15		
4	>15	稀便	肉眼便血

注：体重百分变化量 = 「（X 天体重 - 初始体重）/ 初始体重」×100%

除了对照组小鼠外，DSS 和处理组的小鼠皆经过 2.5% 的 DSS 诱导形成实验性结肠炎模型。在对照组中，所有小鼠的饮食和饮水都正常，粪便颜色和形状正常；在 DSS 组中，造模期间未见小鼠死亡，从第 3 天开始，小鼠体重出现了严重下降，并于第 4 天开始出现便血症状，且大便松散不成形状；在处理组中，整个实验过程未发生小鼠死亡，从第 4 天开始体重出现下降态势，并于第 5 天



出现便血症状，同样大便松散不成形状。从 DAI 指数也可看出（图 10），对照组从始至终 DAI 指数都为 0。在造模期的最后一天时，DSS 组（ $6.89 \pm 0.89$ ）和处理组（ $6.53 \pm 0.45$ ）的 DAI 指数同对照组之间拉开较大差距（ $p < 0.001$ ）。DSS 和处理组之间在 DAI 指数上未出现显著差异（ $p > 0.05$ ）。

### 6.3 动物模型结肠长度及脾脏重量测定

动物模型于解剖后测量各实验组小鼠结肠长度（cm）及脾脏重量（g）。

在实验结束的第 30 天，解剖取出小鼠结肠，记录小鼠结肠长度（从盲肠至肛门）。如图 11 所示，对照组小鼠结肠长度平均为  $8.34 \pm 0.11$  cm；DSS 组小鼠结肠长度平均为  $7.28 \pm 0.15$  cm；处理组小鼠结肠长度平均为  $7.54 \pm 0.11$  cm。通过统计学 t-test（ANOVA）分析，DSS 组与处理组小鼠结肠长度和对照组小鼠结肠长度的差异极显著（ $p < 0.001$ ）。同时，DSS 组与处理组的差异显著（ $p < 0.05$ ）。

解剖各组小鼠后，测量各组小鼠脾脏重量。对照组小鼠的脾脏重量为  $0.066 \pm 0.011$  g，DSS 组小鼠的脾脏重量为  $0.096 \pm 0.011$  g，处理组小鼠的脾脏重量为  $0.088 \pm 0.008$  g。经过统计学分析，DSS 组小鼠脾脏重量和对照组相比差异显著（ $p < 0.01$ ），处理组小鼠脾脏重量和对照组的差异也显著（ $p < 0.05$ ）；然而，DSS 组和处理组之间无显著差异（图 12）。

### 6.4 结肠组织髓过氧化物酶（MPO）的测定

取出结肠组织，PBS 冲洗干净，研磨，取上清液按照髓过氧化物酶检测试剂盒（生工生物工程股份有限公司）步骤进行检测。首先在管中加入 3 mL 蒸馏水，0.2 mL 样品，0.2 mL 试剂四，混匀后，37℃水浴 30 min，再加入试剂七 0.05 mL，混匀，60℃水浴 10 min，取出后随即在 460 nm（OD<sub>460</sub>）处进行检测吸光度。其计算公式如下：MPO 酶活（U / g 组织湿重）=（测定 OD 值-对照 OD 值）/ 11.3×取样量（g）。酶活力单位定义：每克组织湿片在 37℃的反应体系中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 被分解 1 μmol 为 1 个酶活力单位（U）。

MPO 是中性粒细胞功能激活的标志，代表着炎性细胞的浸润程度，MPO 酶活越高，炎性细胞浸润程度就加深。从图 13 可看到：经过 DSS 诱导后，DSS 组（ $9.03 \pm 1.56$  U/g）和处理组（ $6.89 \pm 1.19$  U/g）小鼠结肠组织中的 MPO 大幅

度上升，与对照组 ( $3.96 \pm 0.86$  U/g) 的差异极显著 ( $p < 0.001$ )。经饲喂巴黎链球菌 S7，相对 DSS 组，处理组降低了 DSS 诱导所导致的 MPO 酶活 ( $p < 0.05$ )。

### 6.5 结肠 *IL-6*、*IL-1 $\beta$* 及 *TNF $\alpha$* 荧光定量分析

#### 6.5.1 结肠组织 RNA 提取及逆转录

取 450  $\mu$ L Buffer Rlysis-AG 加入 1.5 mL RNase-free 的离心管中备用；取 20-50 mg 对照组、DSS 组、处理组的小鼠结肠组织用液氮研磨成粉末，加到上述 1.5 mL 离心管中，立即震荡混匀，震荡 2 min 后，室温再放置 3 min；12,000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min，将上清移至 1.5 mL RNase-free 的离心管中；加入 1/2 体积无水乙醇，充分混匀；将吸附柱放入收集管中，用移液器将溶液全部转移至吸附柱中，静置 1 min，室温 12,000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中废液；将吸附柱放回收集管中，加入 500  $\mu$ L GT Solution，静置 1 min，室温 10,000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中废液；将吸附柱放回收集管中，加入 500  $\mu$ L NT Solution，静置 2 min，室温 10,000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中废液；将吸附柱放回收集管中，室温 12,000 $\times$ g 离心 2min；将吸附柱放入 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中，在吸附膜中央加入 30-50  $\mu$ L DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O，静置 2 min，室温 12,000 $\times$ g 离心 2 min，将所得到的 RNA 溶液置于 -70 $^{\circ}$ C 保存或用于后续试验。用 RT Easy<sup>TM</sup>II 试剂盒（成都福际生物技术有限公司），将总 RNA 反转录成 cDNA，步骤试剂盒说明书。在进行 Real-time Quantification PCR 反应时，需要对反转录产物进行稀释使内参基因 CT 值在 16-18 之间，取 1  $\mu$ L 稀释好的 cDNA 进行反应。

#### 6.5.2 荧光定量 PCR (Real-time PCR)

使用引物如下：*TNF $\alpha$*  上游引物：5'-CCAAAGGGATGAGAAGTTCC-3'，下游引物：5'-CTCCACTTGGTGGTTTGCTA-3'；

*IL-1 $\beta$*  上游引物：5'-TTCAGGCAGGCA-GTATCA-3'，下游引物：5'-GTCACAACCAGCAGGTTA-3'；

*IL-6* 上游引物：5'-C-CCGGAGGAGACTTCAG-3'，下游引物：5'-CAGATTGCCATTGCACAAC-3'；

GAPDH 上游引物：5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'，下游引物：

5'-CCTGCTT-CACCACCTTCTTGA-3'。

反应体系为：上游引物（10  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、下游引物（10  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ L 及 1  $\mu$ L 模版 cDNA，并用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。反应条件为：95℃预变性 30 s、95℃变性 5 s、60℃退火/延伸 30 s，反应共计 40 个循环。通过比较 Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 法计算相对 mRNA 表达量，其中 GAPDH 作为参考基因。

### 6.5.3 结果分析

通过 qPCR 检测了各组小鼠结肠相关炎症因子 mRNA 的表达情况(图 14)。就 *IL-6* 基因而言，DSS 组小鼠结肠 *IL-6* mRNA 的相对表达量为  $3 \pm 0.99$  倍；处理组小鼠结肠 *IL-6* mRNA 的相对表达量为  $3 \pm 1.02$  倍。其中，DSS 组小鼠结肠 *IL-6* mRNA 的相对表达量和处理组相比无显著差异。就 *IL-1 $\beta$*  基因而言，DSS 组小鼠结肠的 *IL-1 $\beta$*  mRNA 的相对表达量为  $7 \pm 1.79$  倍；处理组小鼠结肠的 *IL-1 $\beta$*  mRNA 的相对表达量为  $5 \pm 0.94$  倍。其中，DSS 组小鼠结肠 *IL-1 $\beta$*  mRNA 的相对表达量和处理组相比差异显著 ( $p < 0.05$ )。就 *TNF $\alpha$*  而言，DSS 组小鼠结肠 *TNF $\alpha$*  mRNA 的相对表达量为  $7 \pm 0.69$  倍；处理组小鼠结肠 *TNF $\alpha$*  mRNA 的相对表达量为  $5 \pm 1.45$  倍。其中，DSS 组小鼠结肠 *TNF $\alpha$*  mRNA 的相对表达量和处理组相比差异极显著 ( $p < 0.01$ )。

### 6.6 病理学观察 HE 染色

无菌条件下取对照组、DSS 组、处理组的结肠 1-2 cm<sup>3</sup> 于 10%中性福尔马林溶液中固定 48 h 后，把组织块修剪为厚 5 mm；面积 < 0.7 cm<sup>2</sup> 然后水洗；酒精上行脱水（低到高）50%（2 h）→70%（过夜）→80%（2 h）→90%（2 h）→95%（2 h）→100%（2 次，1 h/次）；再用二甲苯透明（置换出酒精）20 min/次；将组织块浸蜡，熔点为 56-58℃，浸蜡 1.5 h，分三次，0.5 h/次，恒温箱里操作；石蜡包埋组织并修整蜡块，使用木块 2 cm<sup>3</sup>（没有蜡的向上）粘住蜡块；切片：使用切片机，切片刀→磨刀（光镜，油石，刀刃在后）将组织切为 5-10  $\mu$ m 薄；并于 40℃水浴展片；粘片：胶水与蛋白甘油按 1: 1 的比例配制；切片 24 h 自然干燥；二甲苯脱蜡 2 次 3 min/次；酒精（下行）出去二甲苯：100%（2 min）

## 说 明 书

→100% (2 min) →90% (2 min) →80% (2 min) →70% (2 min) →50% (2 min) →水(2 min); 苏木精染 C 核 30 min; 0.5%盐酸水溶液或 0.1%盐酸酒精(10%) 溶液分色 50 s; 流水冲洗 1 h 或快速蓝化 (一烧杯水+10 滴氨水 1 min, 之后水洗) 伊红染 C 质: 50%酒精 (2 min) →70% (2 min) →80% (2 min) →伊红 (1-3 min) →90% (2 min) →100% (2 min) →100% (2 min); 二甲苯再次透明 2 次, 3 min/次; 树胶封片 (溶剂: 二甲苯)。光学显微镜成像系统下观察切片。采用 Fedorak 组织学积分标准进行组织学评分 (表 12)。

表 12 组织学损伤评分标准

计分	炎症	病变深度	隐窝破坏	病变范围
0	无	无	无	/
1	轻度	黏膜下层	基底 1/3 隐窝破坏	1%-25%
2	重度	肌层	基底 2/3 隐窝破坏	26%-50%
3	/	浆膜层	仅有完整表面上皮	51%-75%
4	/	/	全部隐窝和上皮被破坏	76%-100%

注意: (a) 溃疡形成个数: 无—0, 1 个溃疡—1, 2 个溃疡—2, 3 个溃疡—3, >3 个溃疡—4; (b) 上皮细胞变化: 正常—0, 杯状细胞缺失—1, 杯状细胞大面积缺失—2, 隐窝缺失—3, 隐窝大面积缺失或息肉状再生—4; (c) 炎症浸润: 无—0, 隐窝周围浸润—1, 黏膜肌层出现浸润—2, 黏膜肌层普遍浸润, 黏膜增厚—3, 黏膜下层浸润—4; (d) 淋巴结形成: 无—0, 1 个淋巴结—1, 2 个淋巴结—2, 3 个淋巴结—3, >3 个溃疡—4。

实验结果: 对照组小鼠的结肠上皮细胞完整, 无明显病变; DSS 组小鼠的结肠上皮细胞遭到严重破坏, 无法观察到隐窝状结构和杯状细胞, 并且可以清晰的观察到大量的炎性细胞浸润; 处理组结肠上皮细胞轻度坏死, 同样无法看到隐窝结构, 此外, 仅有少量杯状细胞以及轻度炎性细胞浸润 (图 15)。从组织学评分来看 (图 16), 与对照组相比, DSS 组小鼠的结肠组织学评分显著升高 ( $p < 0.001$ ), 处理组可以降低 DSS 诱导的组织学评分 ( $p < 0.05$ )。

综上所述，本发明对大熊猫肠道巴黎链球菌的生物学特性进行研究，并评估了巴黎链球菌的益生功能。该大熊猫源巴黎链球菌的拉丁文为 *Streptococcus lutetiensis*，能耐受相关酸碱胆盐，安全可靠，饲喂巴黎链球菌上调了小鼠结肠 *muc2* 基因的表达，增强了宿主肠道黏膜免疫屏障，DSS 诱导肠炎动物模型发现巴黎链球菌 S7 具有减轻肠道炎症的作用。因此，本发明的大熊猫源巴黎链球菌有望开发成制备大熊猫结肠炎药物以及大熊猫免疫调节药物。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。