

分类号：  
学号：20212013048

密级：内部1年  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 益生菌发酵黄芪等中药效果分析与益生菌外囊泡作为亚单位抗原递送载体的初步研究

学位申请人	王贺
指导教师	何高明 教授 崔红玉 副研究员
申请学位门类级别	农学硕士
学科、专业名称	兽医学
研究方向	临床兽医学
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024年5月 分类号：

密级：内部1年

学 号：20212013048

单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 益生菌发酵黄芪等中药效果分析与益生菌外囊泡作为亚单位抗原递送载体的初步研究

学 位 申 请 人	王贺
指 导 教 师	何高明 教授 崔红玉 副研究员
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	兽医学
研 究 方 向	临床兽医学
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子  
2024 年 5 月

**Screening of probiotics, fermentation of astragalus and other  
traditional Chinese medicines, analysis and fusion of probiotic outer  
vesicles as subunit antigen delivery carriers**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Agriculture**

By

**Wang he**

**Clinical Veterinary Medicine**

Dissertation Supervisor: Prof. He Gao-ming

Associate Researcher: Cui Hong-yu

May, 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

贾

时间： 2024 年 5 月 16 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

贾

时间： 2024 年 5 月 16 日

导师签名: 何志峰

时间: 2024 年 5 月 16 日

## 摘要

目的：本研究以降解植物纤维的益生菌为发酵菌株，探讨益生菌中药发酵的效果，为提高中药的生物利用率或药效提供新思路。同时，初步研究以益生菌外囊泡作为病毒亚单位抗原黏膜递送载体的潜在作用，为黏膜疫苗研发和应用提供参考。

方法：(1) 选取3株益生菌与五种中药单剂进行逐级发酵，通过ÅKTAavant 分子层析液相色谱和薄层色谱仪检测发酵液小分子活性成分变化情况。(2) 获取健康成年野猪的空肠和回肠内的肠道菌群，分别与清热解毒中药组方在体外进行仿生发酵，通过ÅKTAavant 分子层析液相色谱检测分析发酵液小分子活性成分变化情况。(3) 筛选具有良好免疫调节特性的出发菌4株，经两两融合获取融合菌株，融合菌株经与J774-Dual™巨噬细胞系相互作用后，评估NF-κB和IRF信号通路的激活情况。

(4) 融合菌株外囊泡Fusant-283-BEVs的提取及其免疫调节特性的检测。(5) 动物实验验证外囊泡Fusant-283-BEVs的黏膜免疫激活特性：将7日龄SPF鸡随机分为实验组和对照组，分别在免疫后48 h采集抗凝血，并分离获取气管黏膜上皮内淋巴细胞、固有层淋巴细胞、哈氏腺淋巴细胞。流式细胞分析PBMCs细胞CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>情况和其增殖活性；荧光定量检测Fusant-283-BEVs诱导淋巴细胞产生细胞因子水平。(6) Fusant-283-BEVs-VP2作为亚单位黏膜疫苗的初步研究：利用超声、孵育和转染试剂将VP2蛋白装载Fusant-283-BEVs作为亚单位黏膜疫苗滴鼻免疫21日龄SPF鸡，免疫后1周、2周均采集血清进行IBDV抗体检测；免疫后第2周采集抗凝血制备PBMCs分析淋巴细胞增殖活性。

结果：(1) 益生菌与中药单剂逐级发酵研究表明，黄芩经过植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉三级发酵后，分析结果显示：发酵液小分子成分含量随逐级发酵而增加，发酵液小分子活性成分显著增多 ( $P < 0.0001$ )，且三级发酵液比一级和二级发酵液小分子活性成分显著增高 ( $P < 0.0001$ )。

(2) 中药组方经肠道菌群仿生发酵后其小分子含量显著增多 ( $P < 0.0001$ )。(3) 筛选出4株出发菌株，融合菌株及其外囊泡的筛选结果表明，融合菌株Fusant-283及其外囊泡Fusant-283-BEVs均能够极显著激活NF-κB和IRF双信号通路 ( $P < 0.0001$ )。(4) 动物实验结果表明：滴鼻免疫Fusant-283-BEVs显著可以激活鸡黏膜淋巴细胞 (IELs、LPLs、HGLs) 以及PBMCs 的抗感染免疫应答。(5) VP2蛋白装载外囊泡Fusant-283-BEVs的复合物经滴鼻点眼免疫SPF鸡的结果表明：Fusant-283-BEVs-VP2在免疫2周后部分免疫鸡 (3/8) 血清ELISA抗体滴度达到2000以上；且免疫组PBMCs中的CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>两大T细胞群极其显著增加 ( $P < 0.0001$ )，提示Fusant-283-BEVs-VP2复合物具有作为黏膜递送载体的潜力。

结论：本研究利用益生菌逐级发酵和肠道菌群仿生发酵技术，有效转化和提高了中药黄芩及中药组方的小分子活性成分，为中药发酵和中药高效利用提供了新思路。同时初步验证了以益生菌外囊泡作为病毒亚单位抗原递送载体的潜力，为新型黏膜疫苗递送载体的研发提供了参考。

**关键词:** 益生菌; 中药发酵; 鸡传染性法氏囊病毒; 鸡传染性法氏囊病毒VP2蛋白; 外囊泡

## Abstract

**Objective:** In this study, probiotics that degrade plant fiber were used as fermentation strains to explore the effect of probiotic traditional Chinese medicine (TCM) fermentation, so as to improve the bioavailability or efficacy of TCM. At the same time, the potential role of probiotic outer vesicles as mucosal delivery carriers of viral subunit antigens was preliminarily studied, which provided a reference for the development and application of mucosal vaccines.

**Methods:** (1) Three strains of probiotics and five kinds of TCM were selected for step-by-step fermentation, and the changes of small molecule active components in fermentation broth were detected by ÄKTAavant molecular chromatography liquid chromatography and thin layer chromatography. (2) The intestinal flora in the jejunum and ileum of healthy adult wild boars were obtained, and biomimetic fermentation was carried out in vitro with the traditional Chinese medicine formula of heat clearing and detoxification, and the changes of small molecule active components of the fermentation broth were detected and analyzed by ÄKTAavant molecular chromatography liquid chromatography. (3) Four strains of the departure strain with good immunomodulatory properties were screened, and the fusion strains were obtained by pairwise fusion, and the activation of NF- $\kappa$ B and IRF signaling pathways was evaluated after the fusion strains interacted with the J774-Dual™ macrophage cells. (4) Extraction of Fusant-283-BEVs from extracellular vesicles of fusion strains and detection of their immunomodulatory properties. (5) Animal experiments to verify the mucosal immune activation characteristics of outer vesicles Fusant-283-BEVs: 7-day-old SPF chickens were randomly divided into experimental group and control group, and anticoagulant blood was collected 48 h after immunization, and tracheal mucosal intraepithelial lymphocytes, lamina propria lymphocytes and Hassel's gland lymphocytes were isolated and obtained. Flow cytometry analysis of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> in PBMCs cells and their proliferative activity; Fluorescence quantification PCR was used to detect the level of cytokines induced by Fusant-283-BEVs in lymphocytes. (6) Preliminary study of Fusant-283-BEVs-VP2 as a subunit mucosal vaccine: 21-day-old SPF chickens were immunized with VP283-BEVs loaded with VP2 as a subunit mucosal vaccine by nasal drops using ultrasound, incubation and transfection kits, and serum was collected for IBDV antibody detection at 1 and 2 weeks after immunization. Anticoagulant blood was collected at the second week after immunization, and PBMCs were prepared to analyze lymphocyte proliferation activity.

**Results:** The results of molecular chromatography liquid chromatography (LCLC) showed that the content of small molecule components in the fermentation broth increased with the step-by-step

fermentation, and the active components of the small molecule components in the fermentation broth increased significantly ( $P<0.0001$ ) compared with the primary and secondary fermentation broths, and the active components of the tertiary fermentation broth increased significantly compared with the primary and secondary fermentation broths ( $P<0.0001$ ). (2) The small molecule content of the TCM formula increased significantly after biomimetic fermentation of intestinal flora ( $P<0.0001$ ). (3) Four strains of the original strains were screened, and the screening results of the fusion strains and their outer vesicles showed that the fusion strain Fusant-283 and its outer vesicles Fusant-283-BEVs could significantly activate the NF- $\kappa$ B and IRF dual signaling pathways ( $P<0.0001$ ). (4) The results of animal experiments showed that nasal drop immunization against Fusant-283-BEVs could significantly activate the anti-infective immune response of chicken mucosal lymphocytes (IELs, LPLs, HGLs) and PBMCs. (5) VP2 protein loaded with outer vesicles Fusant-283-BEVs, and the complex was immunized with SPF chickens through nasal drops, and the results showed that the serum ELISA antibody titer of Fusant-283-BEVs-VP2 reached more than 2000 in some immunized chickens (3/8) after 2 weeks of immunization. In addition, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell populations in PBMCs in the immune group were significantly increased ( $P<0.0001$ ), suggesting that Fusant-283-BEVs-VP2 complex has the potential to be used as a mucosal delivery vehicle.

**Conclusion:** This study effectively transformed and improved the small molecule active ingredients of Chinese medicine skullcap and traditional Chinese medicine formulas by using the step-by-step fermentation of probiotics and the biomimetic fermentation technology of intestinal flora, which provided a new idea for the fermentation of traditional Chinese medicine and the efficient utilization of traditional Chinese medicine. At the same time, the potential of using probiotic outer vesicles as viral subunit antigen delivery carriers was preliminarily verified, which provided a reference for the development of new mucosal vaccine delivery systems.

**Key words:** Probiotics; Chinese herbal fermentation; IBDV; Subunit protein VP2; Bacterial extracellular vesicles

## 英文缩略

英文缩写	英文全称	中文名称
TLC	Thin layer chromatography	薄层色谱法
CFU	Colony Forming Units	菌落形成单位
SPF	Specific-pathogen-free	无特定病原体
PBS	Phosphate Buffer solution	磷酸盐缓冲液
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖
EVs	Extracellullar vesicles	细胞外囊泡
BEVs	Bacterial extracellular vesicles	细菌来源外囊泡
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
IELs	Intestinal intraepithelial lymphocytes	上皮内淋巴细胞
LPLs	Lamina propria lymphocytes	固有层淋巴细胞
HGLs	Harderian gland lymphocytes	哈德氏腺淋巴细胞
CK	Cytokine	细胞因子
IBDV	Infectious bursal disease	鸡传染性法氏囊病

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
英文缩略 .....	V
引言 .....	1
<b>第 1 章 文献综述 .....</b>	<b>2</b>
1.1 益生菌 .....	2
1.1.1 益生菌概念及分类 .....	2
1.1.2 肠道菌群概念 .....	2
1.1.3 益生菌与肠道菌群的关系 .....	2
1.2 益生菌与免疫 .....	3
1.2.1 益生菌参与免疫调节 .....	3
1.2.2 益生菌免疫调节机制及途径 .....	3
1.3 中药益生菌发酵技术 .....	3
1.3.1 传统和现代中药发酵技术概述 .....	3
1.3.2 中药益生菌发酵原理及技术 .....	4
1.3.3 中药发酵常用益生菌 .....	5
1.3.4 中药益生菌发酵的优势 .....	6
1.3.5 中药益生菌发酵发展趋势及存在问题 .....	6
1.4 益生菌外囊泡 .....	6
1.4.1 细菌外囊泡概述 .....	6
1.4.2 益生菌外囊泡的免疫调节作用 .....	7
1.4.3 益生菌外囊泡作为递送载体的研究 .....	7
1.4.4 益生菌外囊泡作为黏膜疫苗递送载体的研究 .....	9
1.5 鸡传染性法氏囊病 .....	9
1.5.1 鸡传染性法氏囊病的活疫苗 .....	9
1.5.2 鸡传染性法氏囊灭活疫苗及亚单位疫苗 .....	10
1.6 研究目的及意义 .....	10
<b>第 2 章 益生菌逐级发酵黄芪等五种中药单剂的研究 .....</b>	<b>11</b>
2.1 材料、试剂及仪器 .....	11
2.2 试验方法 .....	12

2.2.1 中药单剂的逐级发酵 .....	12
2.2.2 中药发酵液的 ÄKTAavant 分子层析液相色谱分析 .....	13
2.2.3 中药发酵液的薄层色谱分析 .....	13
2.2.4 统计分析 .....	14
2.3 结果与分析 .....	14
2.3.1 三株益生菌与中药单剂的逐级发酵 .....	14
2.3.2 ÄKTAavant 分子层析液相色谱分析中药发酵液 .....	15
2.3.3 薄层色谱分析中药发酵液 .....	16
2.3.4 讨论 .....	18
2.4 本章小结 .....	19
<b>第 3 章 肠道菌群发酵中药组方的研究 .....</b>	<b>20</b>
3.1 材料、试剂及仪器 .....	20
3.2 试验方法 .....	20
3.2.1 中药组方仿生发酵 .....	20
3.2.2 仿生发酵液的 ÄKTAavant 分子层析液相色谱分析 .....	21
3.3 结果与分析 .....	21
3.3.1 中药组方的仿生发酵 .....	21
3.3.2 ÄKTAavant 分子层析液相色谱分析中药组方仿生发酵液 .....	22
3.3.3 讨论 .....	24
3.4 本章小结 .....	24
<b>第 4 章 益生菌融合菌株的构建及筛选 .....</b>	<b>25</b>
4.1 材料、试剂及仪器 .....	25
4.2 试验方法 .....	26
4.2.1 候选益生菌融合出发菌株的培养及筛选 .....	26
4.2.2 融合菌株的构建及筛选 .....	27
4.2.3 统计分析 .....	27
4.3 结果与分析 .....	28
4.3.1 筛选融合出发菌株 .....	28
4.3.2 筛选目标融合菌株 .....	28
4.3.3 讨论 .....	29
4.4 本章小结 .....	30
<b>第 5 章 Fusant-283-BEVs 外囊泡提取及其免疫调节特性的检测 .....</b>	<b>31</b>
5.1 材料、试剂及仪器 .....	31
5.2 试验方法 .....	32

5.2.1 Fusant-283-BEVs 的提取.....	32
5.2.2 Fusant-283-BEVs 的密度梯度纯化.....	32
5.2.3 Fusant-283-BEVs 透射电镜鉴定及分析.....	32
5.2.4 Fusant-283-BEVs 的粒径和 Zeta 电位测量.....	32
5.2.5 体外检测 Fusant-283-BEVs 免疫调节特性.....	33
5.2.6 体内验证 Fusant-283-BEVs 免疫调节特性.....	33
5.2.7 统计分析.....	37
5.3 结果与分析.....	37
5.3.1 Fusant-283-BEVs 的表征及生物学特性.....	37
5.3.2 Fusant-283-BEVs 免疫增强活性.....	38
5.3.3 体内检测 Fusant-283-BEVs 免疫调节特性.....	40
5.3.4 讨论.....	46
5.4 本章小结.....	47
<b>第 6 章 Fusant-283-BEVs 作为亚单位 VP2 抗原黏膜递送载体的研究.....</b>	<b>48</b>
6.1 材料、试剂及仪器.....	48
6.2 试验方法.....	48
6.2.1 Fusant-283-BEVs 装载 VP2 亚单位抗原.....	48
6.2.2 滴鼻点眼 Fusant-283-BEVs-VP2 复合物的免疫效果评估.....	49
6.2.3 统计分析.....	50
6.3 结果与分析.....	50
6.3.1 Fusant-283-BEVs 装载 VP2 亚单位.....	50
6.3.2 滴鼻点眼 Fusant-283-BEVs-VP2 复合物的免疫效果.....	51
6.3.3 讨论.....	52
6.4 本章小结.....	53
<b>全文结论.....</b>	<b>54</b>
<b>创新点.....</b>	<b>55</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>56</b>
<b>致谢.....</b>	<b>62</b>
<b>作者简介.....</b>	<b>63</b>

## 引言

近年来，益生菌和中药发酵在医学领域取得了显著的进展。益生菌作为有益微生物在平衡肠道菌群和增强免疫功能等方面发挥重要作用，并且在预防和治疗多种疾病中的应用也越来越广泛。而益生菌发酵中药会释放更多的天然活性化学成分，如多糖、甙类、生物碱、有机酸等<sup>[1]</sup>，通过益生菌发酵处理还可以改变中药的理化性质，提高药效<sup>[2-4]</sup>。这些发酵成分对人和动物的健康及免疫力也具有广泛的影响。目前益生菌发酵中药一般均有明确的目的性和方向性<sup>[5-6]</sup>，通过益生菌酶解中药，可以酶解产生多种目标生物活性成分，可能会增加中药其它有效成分的比例或提高多组分效价<sup>[7-8]</sup>。因此，中药的益生菌发酵在预防和治疗疾病方面具有巨大的潜力，有望为中医药的现代化发展提供新的途径。

另外，本课题初步研究益生菌外囊泡作为黏膜递送载体递呈 VP2 亚单位抗原疫苗的研究。传统亚单位疫苗往往需要免疫佐剂并且需要多次注射才能达到较好的免疫效果，而益生菌外囊泡可以作为一种天然递送载体，可以携带亚单位抗原在黏膜上形成稳定的附着和递呈释放，可以实现更好的黏膜免疫递送效果。本研究将益生菌外囊泡作为黏膜递送载体携带 VP2 亚单位抗原，有望提高黏膜免疫效果，为新型黏膜疫苗的研发提供参考。

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 益生菌

#### 1.1.1 益生菌概念及分类

在 1965 年的《科学》杂志上, Lilly 和 Stillwell 首次提出了益生菌 (probiotics) 的概念<sup>[9]</sup>, 益生菌是指对宿主有益的微生物, 主要指那些在人体肠道内发挥有益作用的菌种。它们通过调节肠道菌群平衡、增强肠道黏膜屏障功能以及抑制有害菌生长等方式, 发挥益生作用。益生菌种类较多, 常见的有乳杆菌属的乳杆菌等; 乳酸球菌属的乳酸乳球菌等; 芽孢杆菌属枯草杆菌、蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等, 这些菌种早在我国畜禽生产中被广泛采用<sup>[10]</sup>。

#### 1.1.2 肠道菌群概念

肠道菌群是肠道内存在的广泛微生物群落, 其中包括细菌、真菌等多种微生物。肠道菌群对人体的健康产生重要影响, 其中包括影响营养物质吸收和消化、调节免疫系统、抑制有害菌的生长等作用和功能<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.3 益生菌与肠道菌群的关系

益生菌作为肠道菌群的一部分组成部分发挥诸多积极的作用<sup>[12]</sup>。首先, 益生菌通过产生有益的代谢产物如乳酸和短链脂肪酸, 调节肠道环境的酸碱度, 从而抑制了有害菌的生长。这些代谢产物有助于创造一个不利于有害菌存活和繁殖的环境。其次, 益生菌还能加强肠道黏膜屏障的功能, 形成一道保护屏障, 防止有害菌和毒素进入血液循环, 保护肠道组织的健康。益生菌能够促进黏膜细胞的修复和生长, 增强黏膜屏障的完整性和屏障作用, 从而降低有害物质的吸收<sup>[13]</sup>。此外, 益生菌通过调节肠道免疫系统的功能, 增强宿主机体的免疫力<sup>[14]</sup>。有研究显示, 益生菌可以刺激免疫细胞增加浆细胞和抗体的产生, 从而增强免疫细胞的活性, 提升机体对病原体的防御能力<sup>[15]</sup>, 这种调节作用有助于增强整体免疫系统的功能, 使身体更具抵抗力和免疫力。总的来说, 益生菌与肠道菌群之间存在着密切的关系。通过优化肠道菌群的结构发挥功能, 益生菌能够对宿主的健康产生积极的影响。

## 1.2 益生菌与免疫

### 1.2.1 益生菌参与免疫调节

益生菌具备调节机体免疫系统的能力，益生菌可以直接与黏膜内淋巴细胞相互作用，进而调节和增强黏膜免疫细胞的活性，促进其分化和功能发挥，并提高免疫细胞对病原菌和有害物质的清除能力。这种作用有助于加强免疫系统的有效响应，增强身体对外界威胁的防御能力<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 益生菌免疫调节机制及途径

益生菌对机体免疫功能的调控主要包括非特异性免疫和特异性免疫调节两方面<sup>[17]</sup>。研究表明，益生菌可以刺激肠道并促进免疫系统生成抗体，其中包括免疫球蛋白 A (IgA)，这种作用有助于增强肠道免疫系统的防御功能。益生菌通过刺激 IgA 的产生，可参与抗病原微生物的清除，从而提高肠道的免疫保护程度。肠道黏膜细胞中分泌的抗体可以通过阻断病原体在肠道细胞膜上的受体位点，从而阻止病原体附着在肠道细胞上。益生菌还可以提高先天免疫细胞的活力。例如，它们通过调节树突状细胞 (DCs)、T 和 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞的功能，以增强宿主巨噬细胞的吞噬和杀伤作用，提高对病原微生物的清除效率。因此，益生菌可以通过平衡免疫系统来调节机体的免疫反应<sup>[18]</sup>。此外，益生菌通过与免疫细胞的相互作用，促进免疫细胞产生细胞因子<sup>[12,19]</sup>，例如，益生菌向 DC 细胞发出信号，促使其分泌抗炎细胞因子，如 IL-10，抑制炎症因子的释放，并抑制了抗体的产生。这种作用有助于调节免疫系统的平衡，并触发先天免疫系统的抗炎反应，从而减少促炎细胞因子在炎症阶段的释放量。在抗炎过程中，益生菌作为媒介引起促炎细胞因子的减少缓解炎症。

此外，益生菌还对肠道内的微生物群落结构产生影响，进而对免疫系统产生间接的影响。肠道内的益生菌通过与有害菌竞争营养物质，从而限制有害菌的繁殖，以维持肠道菌群的稳态和平衡<sup>[20]</sup>。研究表明，肠道菌群的失衡与多种胃肠道疾病的发生有关，如炎症性肠病 (IBD) 等。

综上所述，益生菌通过多种机制，包括调节免疫细胞的活性、调控细胞因子的产生，以及维持肠道屏障等方式，对免疫系统产生调节作用，并维护宿主的健康<sup>[19]</sup>。

## 1.3 中药益生菌发酵技术

### 1.3.1 传统和现代中药发酵技术概述

根据《本草纲目》《本草汇言》《中国药典》等文献记载，我国古代早已有数千年的