

# 说明书

## 一株朱红硫磺菌及其在治疗消化道溃疡和结肠炎中的应用

### 技术领域

本发明涉及微生物技术领域，尤其涉及一株朱红硫磺菌及其在治疗消化道溃疡和结肠炎中的应用。

### 背景技术

朱红硫磺菌，中文别名硫色多孔菌朱红色变种、红色硫黄菌、鸡冠菌等，属担子菌门（Basidiomycota），伞菌亚纲（Agaricomycetes），非褶菌目（Polyporales），硫磺菌属（Laetiporus），广泛分布于我国黑龙江、河北、四川、西藏、新疆、台湾等地区，是大型珍稀食药兼用真菌。子实体幼嫩至成熟时可食用，味道鲜美，营养丰富，老后呈干酪状，不宜食用，但可入药，性温，味甘，具有提高人体免疫力等多种功效。目前朱红硫磺菌的生产主要以菌包栽培为主，受产地环境条件影响较大，且受季节限制，产量全年分布不均，加上朱红硫磺菌自身生态的特殊性和复杂性，以及外部条件制约，资源匮乏，使人们难以大量获得这一珍贵的资源。采用液体深层发酵获得真菌菌丝体及液体制剂的方式是近年发展起来的人工获取珍稀真菌的新方法，不受季节限制，易于人工控制，生产周期短，生产速度快，有效成分含量高，成本低和具有实现规模化和集约化的优势，更具发展前景。然而，目前还没有适用于朱红硫磺菌的液体深层发酵技术，更不能大规模生产，本领域需要建立一种高效、快速的培养方式。

消化道溃疡和结肠炎是全球常见病，可发生于食管、胃、十二指肠、结肠等部位，可发于任何年龄段，主要病因是幽门螺杆菌感染、长期服用糖皮质激素、化疗药物以及应激反应、吸烟、饮酒、长期精神紧张及不规律饮食习惯等。腹痛、腹泻、便血或者不适的感觉是该病的主要症状。这是一类具有反复发作倾向的慢性病，病程长者可达一、二十年，高龄患者一旦并发大量出血、穿孔或幽门梗阻，病情较凶险，少数患者可发生癌变，则预后较差。目前治疗困难，

且容易复发。本领域需要新的治疗方法。

## 发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足，提供一株朱红硫磺菌及其在治疗消化道溃疡和结肠炎中的应用，利用该菌发酵制备得到的液体制剂，对消化道溃疡和结肠炎治疗效果显著。

为实现上述目的，本发明采取的技术方案为：提供一株朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997，所述朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997 已于 2020 年 12 月 3 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，分类学命名为朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*)，保藏编号为：CGMCC No.21084，保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

本发明还提供所述朱红硫磺菌 ttys-997 在制备治疗消化性溃疡的药物或食品中的应用。

本发明还提供所述朱红硫磺菌 ttys-997 在制备治疗结肠炎的药物或食品中的应用。

本发明还提供一种包含所述朱红硫磺菌 ttys-997 的微生物菌剂。

作为本发明所述微生物菌剂的优选实施方式，所述微生物菌剂为片剂、胶囊剂、口服液或冻干粉剂。

作为本发明所述微生物菌剂的优选实施方式，所述微生物菌剂为将所述的朱红硫磺菌 ttys-997 进行发酵得到。

作为本发明所述微生物菌剂的优选实施方式，所述微生物菌剂的制备方法具体包括以下步骤：

(1) 按 5-10%的比例向培养基中接种所述朱红硫磺菌 ttys-997 的种子液，20-32℃搅拌培养 4-6 天，使其菌体浓度达到 30-40%，pH2-3，获得发酵液；

(2) 将发酵液离心，得上清液，用纯净水与上清液混合至 pH5~6，灭菌

后即得微生物菌剂。

作为本发明所述微生物菌剂的优选实施方式，所述培养基包括以下组分：土豆水煮液 15-30%，蛋白胨 2-4%，葡萄糖 10-25%，黄豆粉 10-15%，牛肉膏 1-3%，硫酸二氢钾 0.1-0.3%，蒸馏水 1L，pH 自然。

作为本发明所述微生物菌剂的优选实施方式，所述朱红硫磺菌 ttys-997 的种子液为将所述朱红硫磺菌 ttys-997 接种在固体斜面培养基上，培养，得到菌种斜面培养物；将斜面培养物接到液体培养基中培养，得到种子液。

### 本发明的有益效果：

本发明的朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997，生长能力旺盛，采用现代化发酵罐生产技术，可明显缩短生长周期，降低生产成本，提高有效成分产量。利用该菌发酵制备得到的液体制剂，将该液体制剂喂饲醋酸湿敷法制备的慢性胃溃疡大鼠，可显著降低溃疡面积与溃疡体积，且呈剂量效应关系，对胃溃疡有明显治疗作用；将该液体制剂喂饲硫酸葡聚糖钠制备的慢性结肠炎大鼠，可明显降低粪便评分及肠炎评分，并可显著降低相关炎性因子，且呈剂量效应关系，对结肠炎有较好的治疗作用。

### 生物材料保藏

本发明的朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997，已于 2020 年 12 月 3 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，分类学命名为朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*)，保藏编号为：CGMCC No.21084，保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

### 附图说明

图 1：朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997 扩增的 18S rDNA-ITS 序列基因比对结果图。

图 2：朱红硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) ttys-997 扩增的 ITS 序列结果。

### 具体实施方式

为更清楚地表述本发明的技术方案，下面结合具体实施例进一步说明，但不能用于限制本发明，此仅是本发明的部分实施例。

实施例 1 菌株的筛选与鉴定

朱红硫磺菌 ttys-997 的培养基：土豆水煮液 15-30%，蛋白胨 2-4%，葡萄糖 10-25%，黄豆粉 10-15%，牛肉膏 1-3%，硫酸二氢钾 0.1-0.3%，蒸馏水 1L，pH 自然。

朱红硫磺菌 ttys-997 的培养特征：朱红硫磺菌 ttys-997 在固体培养基上生长旺盛，菌丝浓密，25-28℃培养，菌落圆形，表面干燥，5d 开始大量生成气生菌丝，并产生黄色色素。

提取菌株 ttys-997 的基因组 DNA，以 NS1、NS6、ITS1、ITS4-R 为引物进行 PCR（表 1），扩增菌株的 18S rDNA 和 ITS 序列（序列如 SEQ ID NO:1 所示）。纯化后进行基因测序，并将所测序列与 Genbank 中的 rDNA 序列比较，该菌株被鉴定为 Laetiporus（硫磺菌属），为 Laetiporus sulphureus（朱红硫磺菌）。其分类单元为：Eukaryota;Fungi;Dikarya;Basidiomycota;Agaricomycotina;Agaricomycetes;Ployporales;Laetiporus.最终确定 ttys-997 为朱红硫磺菌。

表 1 引物序列

| 引物名称   | 引物序列                     | 编号          |
|--------|--------------------------|-------------|
| NS1    | GTAGTCATATGCTTGTCTC      | SEQ ID NO:2 |
| NS6    | GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC | SEQ ID NO:3 |
| ITS1   | TCCGTAGGTGAACCTGCGG      | SEQ ID NO:4 |
| ITS4-R | TCCTCCGCTTATTGATATGC     | SEQ ID NO:5 |

本发明的朱红硫磺菌（*Laetiporus sulphureus*）ttys-997，已于 2020 年 12 月 3 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，分类学命名为朱红硫磺菌（*Laetiporus sulphureus*），保藏编号为：CGMCC No.21084，保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

实施例 2 朱红硫磺菌 ttys-997 液体制剂的制备

朱红硫磺菌 ttys-997 的培养基：土豆水煮液 15-30%，蛋白胨 2-4%，葡萄糖

10-25%，黄豆粉 10-15%，牛肉膏 1-3%，硫酸二氢钾 0.1-0.3%，蒸馏水 1L，pH 自然。

朱红硫磺菌 ttys-997 液体制剂的制备具体包括以下步骤：

(1) 在上述斜面培养基上接菌，于 25-28℃培养 5-8d，得到斜面培养物；将新鲜斜面培养物接到上述液体培养基中，22-25℃培养 4-5d，得到种子液；然后将种子液按照 5-10%浓度接种到发酵罐中。

(2) 在发酵罐子中放入纯净水，加入上述培养基成分，高温加热后维持 100-120℃，保温 20-30min，降温至室温，按 5-10%接种，20-32℃搅拌培养 4-6d，使其菌体浓度达到 30-40%，pH 2-3，室温下放罐，获得发酵液。

(3) 将发酵液置于离心机中 3000-5000rpm，离心 30min，得上清液。用纯净水与上清液混合稀释，至 pH 5~6。置于灭菌锅中，高温加热后维持 113-115℃，保温 30min，灭菌后即得液体制剂。

### 实施例 3 朱红硫磺菌 ttys-997 对胃溃疡的治疗情况

以大鼠为模型动物，醋酸湿敷法构建胃溃疡动物模型，研究 ttys-997 液体制剂对胃溃疡的治疗情况。

#### 1 实验动物

SD 大鼠，雄性 180-220g。饲养环境：22±2℃，湿度为 45~65%，12h 昼夜交替；自由进食与饮水。

#### 2 实验方案

##### 2.1 造模

将大鼠适应性饲养 7 天后，将动物禁食不禁水 24 小时，乙醚麻醉后于剑突下切开腹腔，将胃轻拉出腹腔外，用直径 5mm 的圆滤纸片浸适量醋酸，在胃窦部浆膜层贴敷 10s 三次，缝合切口，术后单笼饲养 3 天。

##### 2.2 分组及给药

选取手术成功的大鼠 60 只，按照体重随机分为对照组、模型组、ttys-997

低、中、高剂量组 (2mL/100g, 4mL/100g, 8mL/100g)、兰索拉唑 5mg/kg 组, 每组 10 只。各组按相应剂量灌胃给药, 连续 14 天。

2.3 取材

末次给药后禁食 24 小时, 动物处死, 取出整个胃浸泡于 10%的甲醛内, 浸泡 20 分钟后沿胃大弯剪开, 洗净内容物, 取腺胃区展开平铺于玻璃板上, 用纸吸干溃疡内的水分, 测量其面积和体积。

2.4 检测指标

观察记录溃疡面积、体积。溃疡面积测量方法: 于带标尺的解剖显微镜下计数溃疡所占的方格数, 换算成面积。体积测量法: 用微量注射器将有色墨水注入溃疡内, 将溃疡填满与周边平齐, 读取微量注射器上刻度即为溃疡的体积。

2.5 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 分析软件进行分析, 实验结果以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。多组均数之间的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 评价整体方差差异, 并用 LSD 进行多重比较。对于两组间比较, 采用非配对 t 检验进行比较。定义  $P<0.05$  为显著性差异。

3 实验结果

表 2 ttys-997 对胃溃疡大鼠的溃疡发生率、溃疡面积及溃疡体积的治疗作用 (mean±SD)

| 组别       | 动物数 | 溃疡面积 (mm <sup>2</sup> ) | 溃疡体积 (μL)                |
|----------|-----|-------------------------|--------------------------|
| 对照组      | 10  | 0.00±0.00               | 0.00±0.00                |
| 模型组      | 10  | 15.4±3.57 <sup>**</sup> | 24.05±6.31 <sup>**</sup> |
| 兰索拉唑组    | 10  | 8.06±1.89 <sup>##</sup> | 8.65±4.10 <sup>##</sup>  |
| 997 低剂量组 | 10  | 17.35±4.52              | 17.30±4.44 <sup>##</sup> |
| 997 中剂量组 | 10  | 9.8±2.44 <sup>##</sup>  | 12.30±4.94 <sup>##</sup> |
| 997 高剂量组 | 10  | 6.05±2.60 <sup>##</sup> | 8.05±2.02 <sup>##</sup>  |

注: <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs. Control group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$  vs. Model group。

由表 2 可知，与对照组相比，模型组溃疡面积、溃疡体积均有显著性升高，说明胃溃疡模型制备成功；与模型组相比，兰索拉唑组、997 中、高剂量组溃疡面积均显著下降，且呈剂量效应关系；与模型组相比，兰索拉唑组、997 低、中、高剂量组溃疡体积均显著下降，且呈剂量效应关系；以上结果表明朱红硫磺菌液对醋酸湿敷法制备的胃溃疡模型具有治疗作用。

#### 实施例 4 朱红硫磺菌 ttys-997 对肠炎的治疗作用

以大鼠为模型动物，灌胃给予 5% 硫酸葡聚糖钠构建结肠炎模型，研究 ttys-997 液体制剂对肠炎的治疗作用。

##### 1 实验动物

SD 大鼠，雄性 180-220g。饲养环境：22±2℃，湿度为 45~65%，12h 昼夜交替；自由进食与饮水。

##### 2 实验方案

###### 2.1 造模

单笼饲养，除空白组外，其余 5 组用 5% 硫酸葡聚糖钠 (0.75g/kg) 连续灌胃 10 天，每日 1 次，空白组给予等量生理盐水。

###### 2.2 分组及给药

大鼠按照体重随机分为空白组、模型组、ttys-997 低、中、高剂量组、整肠生 0.15g/kg，每组 10 只。从第 1 天灌胃硫酸葡聚糖钠开始，隔 8 小时后分别灌胃给药，共 14 天。

###### 2.3 取材

取材前一天，单笼饲养，观察粪便形态，用粪便潜血试剂盒测定并评分。大鼠最末次给药后禁食 12 小时，乙醚麻醉，下腔静脉取血，用于 IL-6、TNF-α 测定。解剖剪取结肠，剪开肠腔，生理盐水冲洗后用滤纸吸干，观察结肠情况并进行评分。

2.4 检测指标

粪便评分，结肠评分，血清 IL-6 与 TNF-α 含量情况。

表 3 粪便评分标准

| 粪便形态           | 评分  |
|----------------|-----|
| 正常（暗褐色，硬，呈椭圆形） | 0 分 |
| 松软隐血阴性         | 1 分 |
| 松软隐血阳性         | 2 分 |
| 稀溏隐血阴性         | 3 分 |
| 稀溏隐血阳性         | 4 分 |

表 4 结肠评分标准

| 损伤                       | 评分  |
|--------------------------|-----|
| 无损伤                      | 0 分 |
| 黏膜充血、水肿、未出现溃疡            | 1 分 |
| 黏膜充血、水肿、轻度糜烂、无溃疡         | 2 分 |
| 黏膜充血、水肿、中度糜烂、有单个溃疡       | 3 分 |
| 黏膜充血、水肿、高度糜烂、有多处溃疡       | 4 分 |
| 黏膜充血、水肿、重度糜烂、有 1 cm 以上溃疡 | 5 分 |

2.5 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 分析软件进行分析，实验结果以平均值±标准差（mean±SD）表示。多组均数之间的比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）评价整体方差差异，并用 LSD 进行多重比较。对于两组间比较，采用非配对 t 检验进行比较。定义  $P<0.05$  为显著性差异。

3 实验结果

表 5 ttys-997 对大鼠粪便评分与结肠评分的影响（mean ± SD）

| 组别  | 动物数 | 粪便评分      | 结肠评分      |
|-----|-----|-----------|-----------|
| 对照组 | 10  | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |

|                |    |                         |                         |
|----------------|----|-------------------------|-------------------------|
| 模型组            | 10 | 3.20±0.79 <sup>**</sup> | 3.9±0.99 <sup>**</sup>  |
| 整肠生 0.15g/kg 组 | 10 | 2.20±0.92 <sup>#</sup>  | 2.10±1.20 <sup>##</sup> |
| 997 低剂量组       | 10 | 2.90±0.99               | 3.40±1.43               |
| 997 中剂量组       | 10 | 2.30±1.06 <sup>#</sup>  | 2.70±1.42 <sup>#</sup>  |
| 997 高剂量组       | 10 | 1.70±0.95 <sup>##</sup> | 2.30±1.16 <sup>##</sup> |

注：<sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs. Control group；<sup>#</sup> $P<0.05$ ，<sup>##</sup> $P<0.01$  vs. Model group。

如表 5 所示，与对照组相比，模型组粪便评分与结肠评分均显著升高，说明肠炎模型制备成功；与模型组相比，整肠生 0.15g/kg 组粪便评分与结肠评分显著降低 ( $P<0.01$ )，997 中剂量组、高剂量组粪便评分与结肠评分显著降低 ( $P<0.05$ ； $P<0.01$ ) 且呈剂量效应关系。

表 6 朱红硫磺菌 ttys-997 对大鼠血清 IL-6 与 TNF-α 水平的影响 (mean ± SD)

| 组别             | 动物数 | IL-6 (pg/mL)              | TNF-α (pg/mL)             |
|----------------|-----|---------------------------|---------------------------|
| 对照组            | 10  | 21.86±9.73                | 28.23±15.23               |
| 模型组            | 10  | 68.72±24.09 <sup>**</sup> | 57.25±21.83 <sup>**</sup> |
| 整肠生 0.15g/kg 组 | 10  | 39.98±16.69 <sup>##</sup> | 30.89±9.55 <sup>##</sup>  |
| 低剂量组           | 10  | 57.68±30.14               | 45.09±17.95               |
| 中剂量组           | 10  | 43.26±17.31 <sup>##</sup> | 36.31±13.82 <sup>##</sup> |
| 高剂量组           | 10  | 36.53±16.01 <sup>##</sup> | 30.11±11.47 <sup>##</sup> |

注：<sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs. Control group；<sup>#</sup> $P<0.05$ ，<sup>##</sup> $P<0.01$  vs. Model group。

如表 6 所示：与对照组相比，模型组 IL-6 与 TNF-α 均显著升高；与模型组相比，整肠生 0.15g/kg 组 IL-6 与 TNF-α 均显著降低 ( $P<0.01$ )，997 中剂量组、高剂量组 IL-6 与 TNF-α 显著降低 ( $P<0.05$ ； $P<0.01$ ) 且呈剂量效应关系。

本实施例的结果表明，朱红硫磺菌 ttys-997 对硫酸葡聚糖钠致大鼠结肠炎有较好的治疗作用。

以上各结果充分说明，本发明提供的朱红硫黄菌 ttys-997 及其制备的液体制



剂对消化道溃疡、结肠炎有显著的治疗效果，起效快，绿色、安全、可靠，具有良好的经济效益和社会效益。

最后所应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。