

## 鼠李糖乳杆菌聚乳酸多孔微球的制备和性质评价

肖聪聪, 宋孟修, 陈波翰, 龚黎明, 刘陈霏, 冯 靖, 陈丽青, 金明姬,  
高钟镐, 黄 伟\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 药物传输技术与新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 口服益生菌易受胃肠道环境影响, 到达肠道的益生菌数目很少, 难以定植, 限制了益生菌疗法的应用。本研究选择常见益生菌——鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, LGG) 作为模型, 制备了鼠李糖乳杆菌聚乳酸多孔微球制剂, 考察其体外性质。采用复乳-溶剂挥发法制备得到左旋聚乳酸多孔微球 (poly-L-lactic acid porous microsphere, PLPM), 形态圆整, 大小均匀, 有开放及连通的多孔结构, 平均粒径为 138.5  $\mu\text{m}$ 。在 37  $^{\circ}\text{C}$  将 PLPM 与 LGG 共孵育 8 h, 得到高载菌率的鼠李糖乳杆菌多孔微球 (LGG-loaded porous microsphere, LPM)。通过静电作用逐层将乙二醇壳聚糖 (glycol chitosan, GCS) 和海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 包裹于 LPM 表面, 得到乙二醇壳聚糖和海藻酸钠包封的鼠李糖乳杆菌多孔微球制剂 (layer-by-layer encapsulated LGG-loaded porous microsphere with GCS and SA, AGLPM)。体外实验证明, AGLPM 可以耐受 2 h pH 1.2 的模拟胃液及 pH 7.4 的模拟肠液, 稳定性显著强于裸 LGG。壳聚糖和海藻酸钠包裹的聚乳酸多孔微球是一种较好的益生菌剂型。

**关键词:** 益生菌; 聚乳酸; 多孔微球; 海藻酸钠; 乙二醇壳聚糖

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2025)05-1221-07

## Preparation and properties evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* polylactic acid porous microspheres

XIAO Cong-cong, SONG Meng-xiu, CHEN Bo-han, GONG Li-ming, LIU Chen-fei, FENG Jing,  
CHEN Li-qing, JIN Ming-ji, GAO Zhong-gao, HUANG Wei\*

(State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Preparations, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Oral probiotics are susceptible to the gastrointestinal environment, so the number of probiotics reaching the intestine is small and difficult to colonize, limiting the application of probiotic therapy. In this study, *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), a common probiotic, was chosen as a model, and layer-by-layer encapsulated LGG-loaded porous microspheres with glycol chitosan (GCS) and sodium alginate (SA) were prepared to investigate its *in vitro* properties. Poly-L-lactic acid porous microspheres (PLPM) were prepared by the complex milk-solvent evaporation method, with rounded morphology, uniform size, open and connected porous structure, and the average particle size of 138.5  $\mu\text{m}$ . The PLPM were co-incubated with LGG for 8 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  to obtain the LGG-loaded porous microspheres (LPM) with high bacterial loadings. The surface of the LPM were wrapped with GCS and SA layer by layer by electrostatic action to obtain the layer-by-layer encapsulated LGG-loaded porous microspheres with GCS and SA (AGLPM). *In vitro* experiments demonstrated that AGLPM could tolerate simulated gastric fluid at pH 1.2 and simulated intestinal fluid at pH 7.4 for 2 h, and its stability was significantly better than that of bare

收稿日期: 2024-08-26; 修回日期: 2024-11-27.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康创新工程重大协同创新项目 (2021-12M-1-026).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63026505, E-mail: huangwei@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0825

LGG. AGLPM was a better probiotic dosage form.

**Key words:** probiotic; poly lactic acid; porous microsphere; sodium alginate; glycol chitosan

益生菌是一种活的微生物,可以与病原体竞争生存空间、分泌抗菌物质抑制病原菌在肠道中的定植和增殖<sup>[1-3]</sup>,可以与肠上皮细胞相互作用维持肠道通透性和增强肠道屏障功能<sup>[4-6]</sup>,还可以与各种细胞相互作用来调节肠道免疫功能,包括 IEC、DC、T 细胞和 B 细胞等<sup>[7-10]</sup>,进而提高机体的免疫力,改善机体的健康<sup>[11]</sup>。肠道中定植数量充足的益生菌是益生菌发挥疗效的前提,决定益生菌口服疗效的关键是可以耐受胃肠道环境,并在肠道中有效定植。益生菌的活力决定其定植效率,口服益生菌受胃肠道恶劣环境(胃肠液 pH 1~8 变化、胆汁酸盐、各种消化酶等)的影响,导致益生菌活力降低乃至大量死亡,影响益生菌在胃肠道中的定植和增殖<sup>[12]</sup>,限制了益生菌疗法的应用。在实际应用中常常采用高频次地给与足够多数量益生菌以期提高人体胃肠道内益生菌数量,如常见益生菌片剂、益生菌粉剂等,由于其疗效一般,常常作为膳食补充剂。目前,研究人员主要通过各种递送系统(如微胶囊化技术、涂层技术等)封装益生菌或者通过基因编辑技术改造益生菌<sup>[13-15]</sup>,使其耐受胃肠道环境,以期增强益生菌定植效率。

本研究为了克服益生菌递送遇到的难题,选择生物相容性好的左旋聚乳酸 (poly-*L*-lactic acid, PLLA) 为载体材料,采用复乳-溶剂挥发法制备左旋聚乳酸多孔微球 (poly-*L*-lactic acid porous microsphere, PLPM) 并加载典型益生菌——鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, LGG), 制备鼠李糖乳杆菌多孔微球 (LGG-loaded porous microsphere, LPM), 并对 LPM 进行处方筛选与表征,进一步通过静电作用将天然高分子多糖即乙二醇壳聚糖 (glycol chitosan, GCS)-海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 封装在 LPM 表面,得到乙二醇壳聚糖-海藻酸钠包封的鼠李糖乳杆菌多孔微球 (layer-by-layer encapsulated LGG-loaded porous microsphere

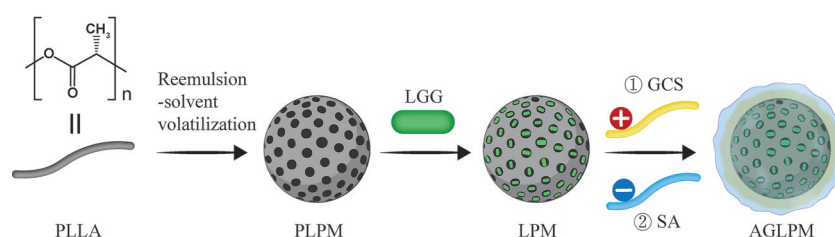
with GCS and SA, AGLPM), 构建一种益生菌递送系统(图 1),用于高效递送益生菌,最后对 LGG 及制剂的生长曲线及在胃肠模拟液稳定性进行初步评价,为益生菌制剂的研发奠定研究与实践基础。

## 材料与方法

**试剂** 鼠李糖乳杆菌 (134266, 北纳生物科技有限公司); 左旋聚乳酸 (PLLA-07、PLLA-10、PLLA-20, 山东省生物医药科学院有限公司); 二氯甲烷 (分析纯, 北京市通广精细化工公司); 聚乙烯醇 (03-88、05-88、17-88、24-88, 江西阿尔法高科药业有限公司); MRS 培养基 (20230830, 北京奥博星生物技术有限责任公司); MRS 肉汤 (027312, 广州环凯微生物科技有限公司); 乙二醇壳聚糖 (T13708, 聚合度  $\geq 400$ , 美国 Targetmol 公司); 海藻酸钠 (K2215337, 430 mPa·S, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); ATP 检测试剂盒 (S0026, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 细菌活力/毒性检测试剂盒 (EX3000, 北京索莱宝科技有限公司); 碳酸氢铵 (化学纯, 上海凯为化学科技有限公司); 戊二醛 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 其余试剂均为分析纯。

**仪器** 均质乳化机 (HR-25D, 上海沪析实业有限公司); 真空冷冻干燥机 (LGJ-10, 北京松源华兴科技发展有限公司); 激光粒度仪 (S3500, 美国 Microtrac 公司); 极高分辨场发射扫描电子显微镜 (FEI Apreo, 美国 Thermo 公司); 酶标仪 (Synergy H1, 美国 BioTek 公司); 激光粒度仪 (Malvern Nano ZSP, 英国 Malvern 公司); 冷冻高速离心机 (5417R, 德国 Eppendorf 公司); 发光检测仪 [GloMax<sup>®</sup> 20/20, 普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司]; 激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM, STELLARIS 8, 德国 Leica 公司)。

**LGG 生长曲线测定** 在 10 mL MRS 液体培养基中接入 2% LGG 菌悬液,混匀后置于 37 °C 培养,于 0~



**Figure 1** Schematic diagram of layer-by-layer encapsulated LGG-loaded porous microsphere with GCS and SA (AGLPM). PLLA: Poly-*L*-lactic acid; PLPM: Poly-*L*-lactic acid porous microsphere; LGG: *Lactobacillus rhamnosus*; LPM: LGG-loaded porous microsphere; GCS: Glycol chitosan; SA: Sodium alginate

120 h 时间段内取样, 用酶标仪测定菌液 600 nm 吸光度值, 记录数据绘制生长曲线。

**PLPM 制备** 采用复乳-溶剂挥发法制备 PLPM, 首先, 将 PLLA 溶于二氯甲烷中得到 PLLA 溶液, 加入 1% 碳酸氢铵水溶液高速剪切至初乳形成, 加入聚乙烯醇 (poly vinyl alcohol, PVA) 水溶液, 继续高速剪切制备复乳; 然后, 将上述复乳与适量纯水混合, 通过机械搅拌使微球固化并除去多余的二氯甲烷; 最后, 过滤并洗涤 3 次后, 使用  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠水溶液水解 20 min, 随后过筛并用去离子水洗 3 遍, 冷冻干燥后得到空白 PLPM。

**PLPM 处方筛选** 对 PLLA 型号、PLLA 浓度、PVA 型号、PVA 浓度、溶液体积比 (初乳:PVA)、剪切速率、剪切时间进行筛选, 考察 PLLA 型号 (PLLA-07、PLLA-10、PLLA-20)、PLLA 浓度 (wt%: 1%、1.5%、1.89%)、PVA 型号 (05-88、07-88、24-88)、PVA 浓度 (wt%: 0.1%、1%、2%)、溶液体积比 (初乳:PVA, 1:1、1:2、1:4)、剪切速率 ( $3\ 000$ 、 $4\ 000$ 、 $5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ )、剪切时间 (5、10、20 min) 对所制备多孔微球理化性质的影响。分别取制备后适量多孔微球分散于去离子水中, 通过激光衍射法 (laser diffraction, LD) 使用激光粒度仪测定多孔微球的粒径, 采用扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察多孔微球的表面及内部结构。

#### PLPM 表征

**形态观察** 取少量 PLPM, 加入适量的去离子水稀释到合适的浓度, 滴至硅片上自然风干, 喷金 30 s。随后在电压 2.0 kV 的条件下, 利用 SEM 观察多孔微球的大致形貌。

**粒径分布测定** 取适量多孔微球分散于去离子水中, 使用激光粒度仪测定多孔微球的粒径分布。

**LPM 的制备** 精密称取适量 PLPM 于离心管中, 经紫外照射 30 min 灭菌后, 加入适量对数生长期的菌悬液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  共孵育一段时间后, 即得 LPM。

**LPM 工艺摸索** 对 PLPM 的量及孵育时间进行筛选, 确定 PLPM 用量及孵育时间。分别取制备后适量 PLPM 分散于去离子水中, 通过 LD 使用激光粒度仪测定 LPM 的粒径, 采用 SEM 观察 LPM 的表面形貌。

#### LPM 表征

**形态观察** 取少量 LPM 溶液, 离心, 弃上清, 加入适量的去离子水稀释, 经冷冻干燥后, 取适量均匀撒在硅片上, 喷金 30 s。随后在电压 2.0 kV 的条件下, 利用 SEM 观察 LPM 的大致形貌。

**粒径分布测定** 取适量 LPM 分散于去离子水中, 使用激光粒度仪测定 LPM 的粒径分布。

**激光共聚焦显微镜观察** 取适量 LPM  $5\ 000\times\text{g}$  离心

15 min, 去除上清液, 加入 1 mL 0.85% NaCl 溶液重悬 LPM,  $5\ 000\times\text{g}$  离心 15 min, 去除上清液, 加入 1 mL 0.85% NaCl 溶液重悬 LPM, 重复 1 次, 加 10  $\mu\text{L}$  NucGreen 染色工作液, 充分混匀, 室温避光孵育 15 min, 染色结束后, 取 200  $\mu\text{L}$  滴加在洁净的载玻片上, 盖玻片压片后, 将样品置于 CLSM 下观察, 进行断层扫描。

**LPM 包封** 采用逐步包封法, 对 LPM 进行逐层包封, 即取适量孵育好的 LPM 溶液,  $5\ 000\times\text{g}$  离心 15 min, 去除上清液, 加入适量乙二醇壳聚糖溶液 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 涡旋 10 s, 混匀, 之后加入海藻酸钠溶液 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 涡旋 10 s, 混匀, 即得鼠李糖乳杆菌多孔微球制剂 (AGLPM)。

#### AGLPM 表征

**Zeta 电位测定** 取适量 LPM、GLPM、AGLPM 分散于去离子水中, 使用马尔文粒径对 LPM、GLPM、AGLPM 表面 zeta 电位进行检测。

**粒径分布测定** 取适量 LPM、GLPM、AGLPM 分散于去离子水中, 使用激光粒度仪测定 LPM、GLPM、AGLPM 的粒径分布。

**激光共聚焦显微镜观察** 取适量 LPM  $5\ 000\times\text{g}$  离心 15 min, 去除上清液, 加入 1 mL 0.85% NaCl 溶液重悬 LPM,  $5\ 000\times\text{g}$  离心 15 min, 去除上清液, 重复 1 次, 加适量  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GCS 溶液涡旋 10 s, 混匀, 再加入  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  SA 溶液涡旋 10 s, 混匀。之后加 10  $\mu\text{L}$  NucGreen 染色工作液, 充分混匀, 室温避光孵育 15 min, 染色结束后, 取 200  $\mu\text{L}$  滴加在洁净的载玻片上, 盖玻片压片后, 将样品置于 CLSM 下观察, 进行断层扫描。

**LGG 在制剂中的增殖活力研究** 为了评估表面多孔微球是否会影响 LGG 的生长和增殖, 测量了 LGG、LPM 和 AGLPM 的生长曲线。取 LGG、LPM 和 AGLPM 100  $\mu\text{L}$  接种于 9.9 mL 新鲜 MRS 液体培养基中, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下孵育, 分别于 1~120 h 时间段内取样, 采用菌落计数法平行测量 3 份。

#### AGLPM 对胃肠模拟液稳定性考察

**胃肠道模拟液的配制** 根据文献<sup>[16,17]</sup>报道并略加修改制备了模拟胃液 (simulated gastric fluid, SGF)、模拟肠液 (simulated intestinal fluid, SIF)。SGF: 0.2 g NaCl, 7.0 mL  $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 在去离子水中加至总体积 1.0 L (pH 1.2); SIF: 2.74 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在去离子水中加至总体积 1.0 L,  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 调节 pH 7.4。

**AGLPM 对胃肠道模拟液稳定性** 在实验之前, 所有模拟原液都经过高压灭菌, 以灭活任何存在的微生物。采用 SGF (pH 1.2) 和 SIF (pH 7.4) 评价胃肠道模拟液对益生菌活力的影响。众所周知, 益生菌定植在结肠部位, 而口服制剂大约需要 4~6 h 到达结肠, 前

1~2 h在胃中, 2~4 h在小肠中, 因此确定考察时间为SGF内2 h, SIF内4 h。将等量的LGG同时接种, 同时孵育一段时间即得等量的LGG、LPM和AGLPM, 将等量的LGG、LPM和AGLPM分别重悬于1 mL模拟胃液中37 °C培养2 h, 之后将其转移至模拟肠液中, 37 °C培养4 h, 采用发光ATP定量测定LGG活力, 平行测量3份。

**统计学分析** 采用SPSS 25软件进行数据分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用*t*检验,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 LGG生长曲线

在120 h培养期内, LGG经历了延滞期(1~3 h)、对数生长期(3~12 h)和稳定期(12 h后)(图2A)。处于对数生长期的LGG生长繁殖速度加快, 代谢旺盛, 作为微球制剂的原料。

### 2 PLPM制备和处方

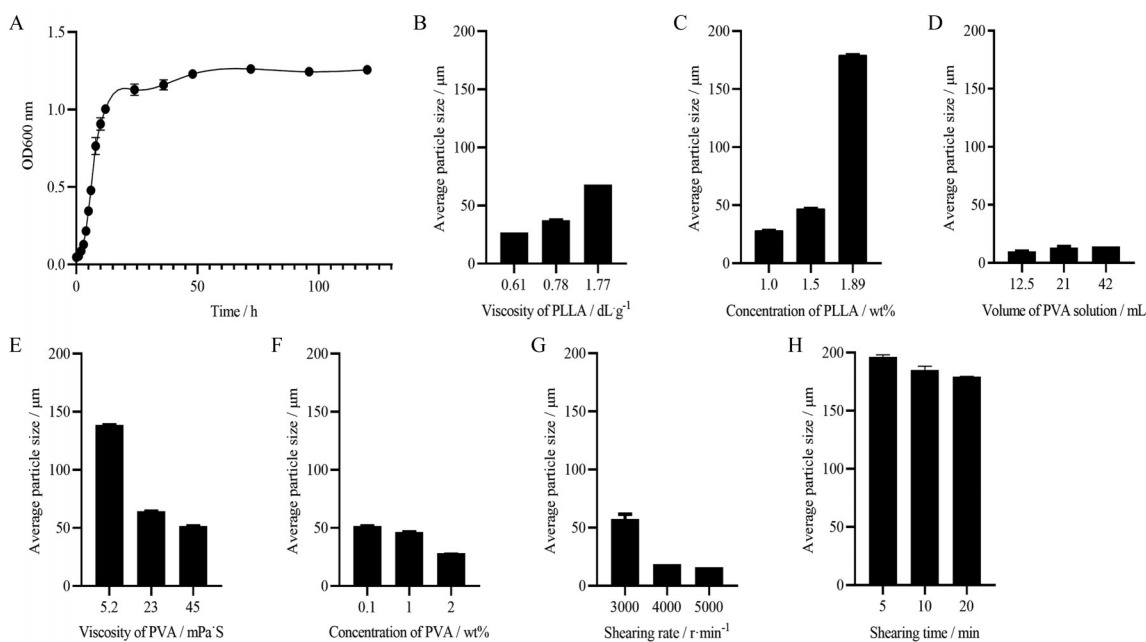
PLPM的平均粒径与PLLA特性黏度、PLLA浓度、PVA溶液体积成正比, 与PVA黏度、PVA浓度、剪切速率、剪切时间成反比(图2B~H)。PLPM的最优处方为: PLLA-20、PLLA浓度1.89% (wt)、PVA 03-88、PVA浓度0.1% (wt)、PVA溶液体积为42 mL、剪切速率为3 000 r·min<sup>-1</sup>、剪切时间为5 min。

### 3 PLPM的性质

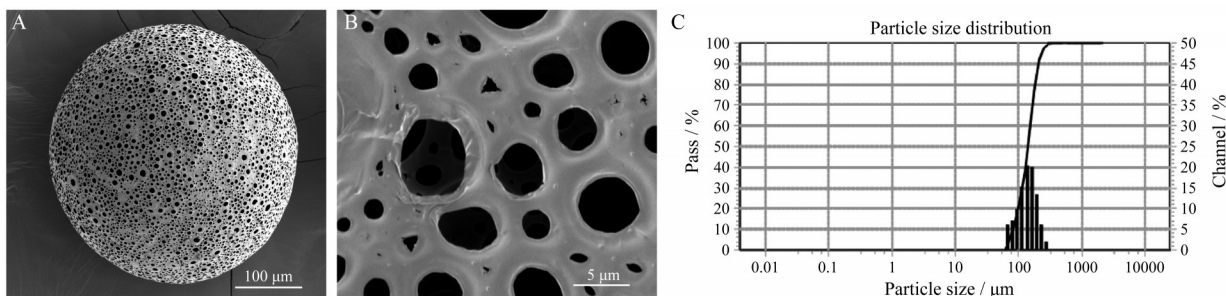
采用最优处方制备的PLPM的SEM及LD表征如图3所示, 通过SEM观察可见多孔微球形态规则, 大小均匀, 表面边孔洞分布均匀, 具有开放互联的多孔结构, 通过LD检测可见粒径分布均匀, PLPM平均粒径为138.5 μm。

### 4 LPM的制备与处方

如图4所示, 从左到右PLPM质量浓度分别为1、2、4 mg·mL<sup>-1</sup>, 液面上白色漂浮物为PLPM, 液面下的黄色液体为菌悬液。随着时间的推移, 液面上的PLPM



**Figure 2** The growth curves of LGG (A) and the different influencing factors on PLPM particle size (B-H). B: PLLA viscosity; C: PLLA concentration; D: PVA solution volume; E: PVA viscosity; F: PVA concentration; G: Shearing rate; H: Shearing time



**Figure 3** Characterization of PLPM. A: SEM image of PLPM; B: Enlarged SEM image of PLPM; C: Particle size distribution of PLPM. SEM: Scanning electron microscope

随孵育时间的延长逐渐减少, 菌悬液由澄清逐渐变为浑浊, 表明 LGG 的增殖及 LGG 进入多孔微球内部进而带动微球到达液面底部。当固定孵育时间为 8 h 时, PLPM 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的液面上的左旋聚乳酸多孔微球为最少, 因此确定孵育时间为 8 h, PLPM 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 5 LPM 的性质

LPM 的 SEM、LD、CLSM 表征如图 5A~D 所示, 通过 SEM、CLSM 观察可见多孔微球成功搭载 LGG。通过 LD 检测可见粒径分布均匀, LPM 平均粒径为

$210.1 \mu\text{m}$  (图 5C)。

### 6 LPM 的包封

通过 LD 检测 LPM 的平均粒径为  $210.1 \mu\text{m}$ , 经 GCS 包封后, 平均粒径增加至  $214.9 \mu\text{m}$ , 最后经 SA 包封后, 平均粒径增加至  $221.0 \mu\text{m}$  (图 6A); 通过 DLS 检测 LPM 的 zeta 电位为  $-16.9 \text{ mV}$ , 经 GCS 包封后, 电位增加至  $10.50 \text{ mV}$ , 最后经 SA 包封后, 电位变为  $-23.17 \text{ mV}$  (图 6B); 上述结果证实了 GCS 和 SA 在 LPM 上的成功包封。通过 CLSM 观察, 证明 AGLPM 成功搭载 LGG (图 6C)。

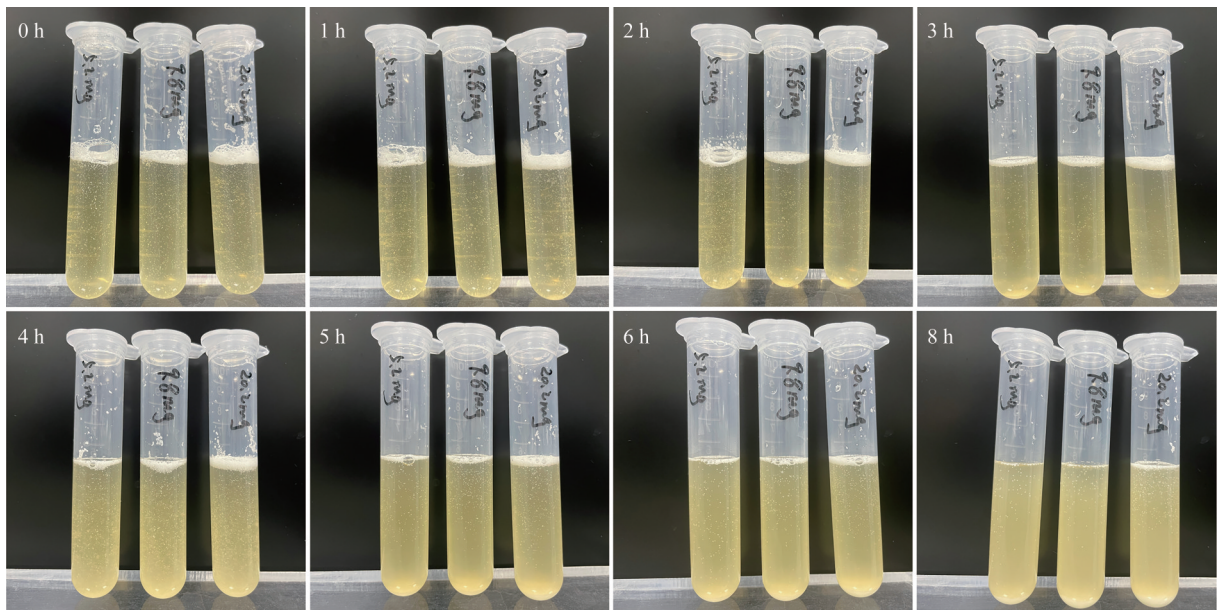


Figure 4 Actual incubation of LPM at different time

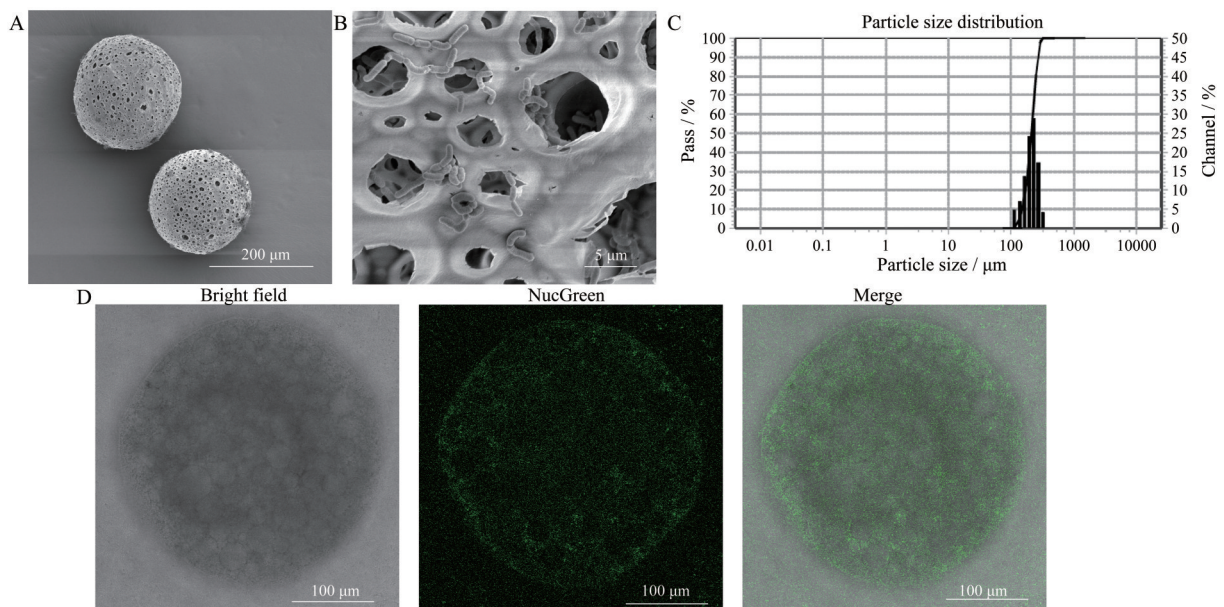
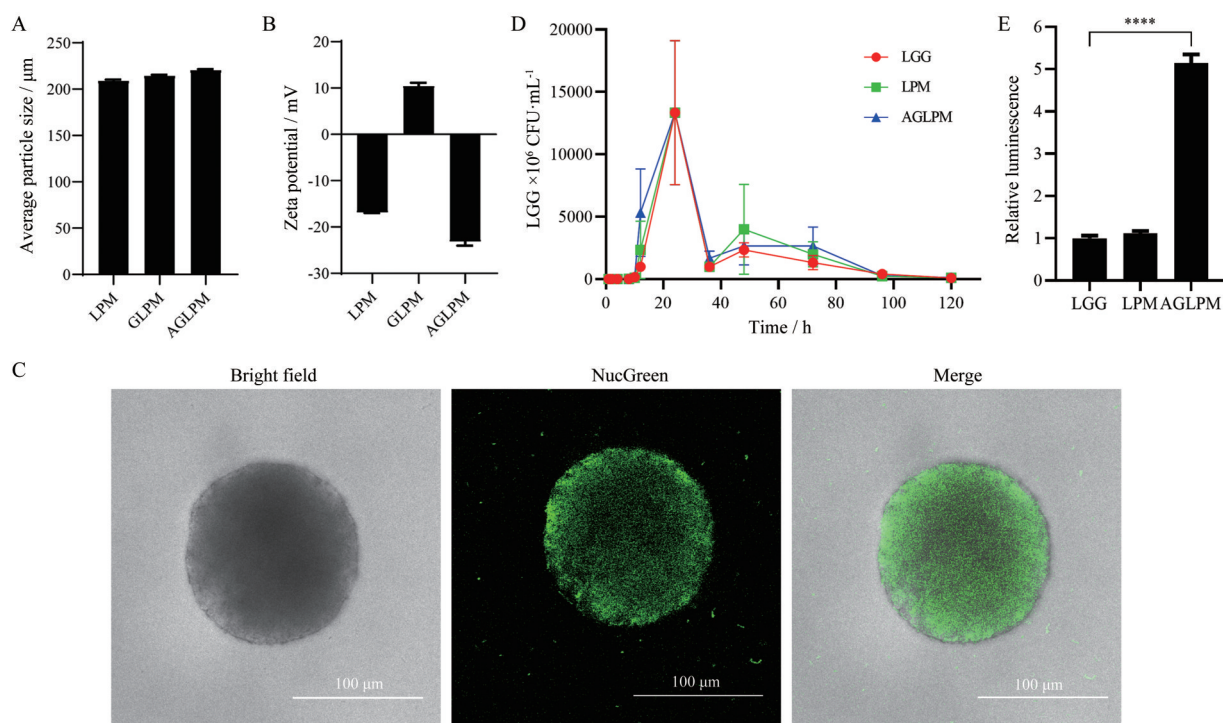


Figure 5 Characterization of LPM. A: SEM image of LPM; B: Enlarged SEM image of LPM; C: Particle size distribution of LPM; D: CLSM images of LPM (Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ ; Bright field, fluorescence image and merged photo of LPM was shown from left to right). CLSM: Confocal laser scanning microscope



**Figure 6** Characterization of LGG, LPM and AGLPM. A: Particle size; B: Zeta potential; C: CLSM images of AGLPM (Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; Bright field, fluorescence image and merged photo of LPM was shown from left to right); D: The growth curves of LGG, LPM, AGLPM; E: Stability of LGG, LPM and AGLPM in gastrointestinal simulated fluid.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*\* $P < 0.0001$

## 7 LGG制剂的增殖活力

由图6D可知, LGG、LPM、AGLPM生长曲线接近一致, 此结果证实了PLPM、GCS、SA的存在并不影响LGG的增殖及活力。

## 8 AGLPM在胃肠模拟液中的稳定性考察

本研究通过发光ATP定量法测定LGG在胃肠模拟液中的活力。如图6E所示, 以对照组LGG做归一化处理, 与对照组LGG相比, 在抵达结肠时, AGLPM表现出更大的活力, AGLPM对于LGG的保护作用明显优于无防护的LGG、LPM。这是因为当AGLPM暴露在胃中时, GCS在胃酸作用下被质子化, 带更多的正电荷, SA呈负电荷, 两者之间产生更为紧密的离子交联, 进而保护LGG免受胃酸侵蚀<sup>[18,19]</sup>。

## 讨论

肠道菌群与人体健康存在非常密切的关系, 影响人体多种疾病的发生与发展, 特别是胃肠道疾病(如溃疡性结肠炎、克罗恩病、结肠癌等)与其有直接关系。益生菌以几乎忽略不计的不良副作用通过多种机制(如恢复肠道稳态、产生抗炎或抗癌化合物、调节宿主免疫反应等<sup>[1,20,21]</sup>)直接或间接调节肠道菌群, 维持肠道平衡, 促进疾病痊愈, 因而基于益生菌研发治疗佐剂获得了前所未有的关注和发展<sup>[22]</sup>。口服益生菌极易

受到人体胃肠道的恶劣环境破坏, 严重影响益生菌在胃肠道中的定植和增殖, 进而影响其药效的发挥, 因此如何提高益生菌在体内复杂环境中的定植效率已经成为众多研究者关心的方向之一。

益生菌包埋策略是保护和促进益生菌成功口服到目标部位的有前途的方法, 典型的包封材料是食品级聚合物, 主要来源于多糖、蛋白质和脂质<sup>[13]</sup>, 本研究以生物相容性好、机械性能高的PLPM为载体, 巧妙结合益生菌, 以水溶性更好的乙二醇壳聚糖和海藻酸钠包封LPM<sup>[23]</sup>, 开发了一种克服胃肠道恶劣环境的益生菌递送系统, 用于高效递送益生菌, 并在体外初步证明AGLPM中的LGG具有较高活性和抵抗胃肠道恶劣环境的能力。但AGLPM的研发还面临许多研究问题: ①经文献<sup>[24,25]</sup>报道, PLPM可通过物理吸附(如范德华力、静电相互作用等)和生物相互作用(如蛋白质相互作用等)加载细胞或细菌, PLPM加载鼠李糖乳杆菌机制有待研究; ②AGLPM在体内的行为、安全性研究, 及肠道定植效果, 是否和体外研究结果一致; ③AGLPM质量控制及质量管理规范的建立; AGLPM如何在流通、储存等环节中保持益生菌活力等。还需要在后续实验中调研相关资料, 完善研究方法, 以期为其他益生菌制剂的研发奠定研究与实践基础。

作者贡献: 肖聪聪是本研究的实验设计者和实验研究的

执行人,完成数据分析、论文初稿的撰写;宋孟修、陈波翰、龚黎明、刘陈霏、冯靖指导并参与实验设计和结果分析;陈丽青、金明姬、高钟镐、黄伟指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, et al. Mechanisms of action of probiotics [J]. *Adv Nutr*, 2019, 10: S49-S66.
- [2] Solanki SS, Singh P, Kashyap P, et al. Promising role of defensins peptides as therapeutics to combat against viral infection [J]. *Microb Pathog*, 2021, 155: 104930.
- [3] Li J, Sung CYJ, Lee N, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 1306-1315.
- [4] Van Zyl WF, Deane SM, Dicks LMT. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria [J]. *Gut Microbes*, 2020, 12: 1831339.
- [5] Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, et al. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 6463-6472.
- [6] Liu Q, Yu ZM, Tian FW, et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 23.
- [7] Maldonado Galdeano C, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, et al. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system [J]. *Ann Nutr Metab*, 2019, 74: 115-124.
- [8] Kang HJ, Im SH. Probiotics as an immune modulator [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2015, 61: S103-S105.
- [9] Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA, Castañón-Alonso SL, et al. Probiotic *Lactobacillus strains* stimulate the inflammatory response and activate human macrophages [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 4607491.
- [10] Rinaldi E, Consonni A, Guidesi E, et al. Gut microbiota and probiotics: novel immune system modulators in myasthenia gravis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1413: 49-58.
- [11] Araya M, Morelli L, Reid G, et al. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food [R]. Geneva: WHO, 2002.
- [12] Kim J, Hlaing SP, Lee J, et al. Exfoliated bentonite/alginate nanocomposite hydrogel enhances intestinal delivery of probiotics by resistance to gastric pH and on-demand disintegration [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 272: 18462.
- [13] Luo Y, De Souza C, Ramachandran M, et al. Precise oral delivery systems for probiotics: a review [J]. *J Control Release*, 2022, 352: 371-384.
- [14] Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery [J]. *J Control Release*, 2012, 162: 56-67.
- [15] Drolia R, Amalaradjou MAR, Ryan V, et al. Receptor-targeted engineered probiotics mitigate lethal *Listeria* infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 6344.
- [16] Shen MY, Liu TI, Yu TW, et al. Hierarchically targetable polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles as an oral chemo/thermotherapy delivery system for local treatment of colon cancer [J]. *Biomaterials*, 2019, 197: 86-100.
- [17] Du HL, Liu MR, Yang XY, et al. The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20: 1004-1011.
- [18] Jin X, Wei CX, Wu CW, et al. Gastric fluid-induced double network hydrogel with high swelling ratio and long-term mechanical stability [J]. *Compos B Eng*, 2022, 236: 109816.
- [19] Rajpoot K, Jain SK. Oral delivery of pH-responsive alginate microbeads incorporating folic acid-grafted solid lipid nanoparticles exhibits enhanced targeting effect against colorectal cancer: a dual-targeted approach [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 830-844.
- [20] Collado MC, Sanz Y. Probiotics: Benefits in Human Health and Bacterial Disease Management [M]. Weinheim: Wiley-Blackwell Press, 2009: 275-295.
- [21] Jiang Z, Li M, McClements DJ, et al. Recent advances in the design and fabrication of probiotic delivery systems to target intestinal inflammation [J]. *Food Hydrocoll*, 2022, 125: 107438.
- [22] Zhao RN, Yu T, Li JH, et al. Single-cell encapsulation systems for probiotic delivery: armor probiotics [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2024, 332: 103270.
- [23] Hsu SC, Hsu SH, Chang SW. Effect of pH on molecular structures and network of glycol chitosan [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6: 298-307.
- [24] Polak M, Berniak K, Szewczyk PK, et al. PLLA scaffolds with controlled surface potential and piezoelectricity for enhancing cell adhesion in tissue engineering [J]. *Appl Surf Sci*, 2023, 621: 156835.
- [25] Jiang XL, Zhang TZ, He SY, et al. Bacterial adhesion on honeycomb-structured poly(L-lactic acid) surface with Ag nanoparticles [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8: 791-799.