文章编号:1000-5404(2006)16-1641-03

论著

双歧杆菌培养上清对铜绿假单胞菌黏附肠上皮细胞影响的研究

陈 军[1],夏培元[2],肖光夏[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]药剂科,国家药品临床研究基地,重庆 400038)

提 要:目的 探讨双歧杆菌培养上清(spent culture supernatant, SCS)体外对铜绿假单胞菌(ATCC 27853)黏附肠上皮细胞的影响。**方法** 建立体外肠上皮细胞黏附和侵袭模型,通过噻唑蓝(MTT)实验和细胞裂解计数等技术观察双歧杆菌培养上清对铜绿假单胞菌黏附肠上皮后对细胞活力、黏附和侵入的影响。**结果** SCS能抑制铜绿假单胞菌生长,作用3 h后铜绿假单胞菌黏附数和侵入数分别降低了71%和降低约87%,肠上皮细胞损伤害也有减轻。**结论** 双歧杆菌培养上清可抑制铜绿假单胞菌对肠上皮细胞的黏附和侵袭,保护肠粘膜细胞,维护肠粘膜屏障功能的完整,双歧杆菌培养上清中存在有抑制铜绿假单胞菌生长、黏附的保护性因子,该因子的性质及作用还有待进一步深入研究。

关键词: 双歧杆菌培养上清;黏附;铜绿假单胞菌;肠上皮细胞

中图法分类号: Q939.132;R329.24;R378.991 **文献标识码:** A

Effect of Bifidobacterium spent culture supernatant on *Pseudomonas aeruginosa* adhering to intestinal epithelial cells

CHEN Jun[1], XIA Pei-yuan[2], XIAO Guang-xia[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of Bifidobacterium spent culture supernatant (SCS) on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to intestinal epithelial cells. **Methods** The intestinal epithelial cells were cultured, then divided into three groups: control, *Pseudomonas aeruginosa* adhesion group, SCS and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion group. The effects of SCS on cell viability, the number of adhering and invasive bacteria were evaluated with MTT assay and lysis-counting assay in 1, 3, 6 h. **Results** At 3 h after SCS treatment, the amount of *Pseudomonas aeruginosa* decreased significantly, and the number of adhering and invasive bacteria decreased by 71% and 87% respectively. **Conclusion** SCS could protect the intestinal epithelial cells by inhibiting the adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: bifidobacterium; adhesion; *pseudomonas aeruginosa*; IEC-6

双歧杆菌是人体肠道内的生理性细菌,它黏附于肠粘膜肠上皮细胞上,形成稳定的菌群,对于维持肠道菌群的结构及功能起主导作用。双歧杆菌与宿主细胞的黏附是其发挥生理作用的首要条件。铜绿假单胞菌是一种条件致病菌,也是肠道细菌移位的主要菌群之一[1],细菌移位的第一步是其黏附于肠粘膜上皮细胞,进而定植于肠粘膜表面,随后侵入肠系膜淋巴结,进而播及全身。本研究拟从体外黏附细胞模型入手,初步探索双歧杆菌培养上清对铜绿假单胞菌黏附肠上皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和细胞株

青春型双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis* 0926, B. ado0926)由本室分离、保存,经中国科学院微生物研究所鉴定。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853),由本室保存。大鼠肠上皮细胞株IEC-6,引自于中国科学院上海细

基金项目:全军医学科学技术研究"九五"计划指令性课题(96L042)
Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the "Ninth Five-Year Plan" of PLA (96L042)

作者简介:陈 军(1970-),男,广东省电白县人,博士,副研究员,主要从事烧伤感染及其防治方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754148-8033

收稿日期:2005-09-02;修回日期:2006-04-11

胞研究所。

1.2 培养方法

1.2.1 肠上皮细胞的培养 IEC-6 细胞接种于25 ml 的培养瓶中，加入含 10% 小牛血清和双抗（青、链霉素 100 U/ml）的 DMEM 培养液中，于 37 ℃，5% CO_2、95% 相对湿度的二氧化碳孵箱中培养，1 ~2 d 更换培养液，90% 融合时用 0.1% 胰酶-EDTA 消化传代。

1.2.2 细菌培养 BL 培养基：用于培养 B. ado0926。每升以牛肉汤为基础的液体中含有葡萄糖 10 g，多胨 10 g，L-盐酸半胱氨酸 0.5 g，可溶性淀粉 0.5 g，牛肉膏 5 g，酵母浸膏 5 g，胰酶水解物 5 g，吐温-80 1 g，氯化血红素 5 mg，加牛肉汤至 1 000 ml，以 NaOH 调 pH 值为 7.2，压力灭菌（若用固体则需加 2% 琼脂及 5% 脱脂羊血）。

普通培养基：用于培养 ATCC 27853。每升以蒸馏水基础的液体中含蛋白多胨 10 g，牛肉膏 3 g，氯化钠 5 g，以 NaOH 调 pH 值为 7.2，压力灭菌（若用固体则需加 2% 琼脂及 5% 脱脂羊血）。

1.3 培养上清（spent culture supernatant，SCS）的制备和实验分组

培养上清的制备：双歧杆菌在 BL 液体培养基中培养 48 h 后，3 000 r/min 离心 10 min，以 NaOH 调 pH 值为 7.2，得 SCS。4 ℃保存，用时复温至 37 ℃。

实验分组：①正常对照组：将 IEC-6 接种于 24 孔板，调节细胞数 2×10^5/孔，肠上皮细胞在含 10% 小牛血清 DMEM 培养中常规培养 3 d，实验当天吸除培养液，PBS 液清洗 3 次，加不含细菌 DMEM 培养液；②铜绿假单胞菌 ATCC 27853 黏附组：常规培养同上，加含铜绿假单胞菌 ATCC 27853 DMEM 培养液（10^7）；③共同作用组：常规培养同上，同时加入含 SCS 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 DMEM 培养液；以上各组均于实验后 1、3、6 h 收集样品进行检测。

1.4 SCS 对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 生长的作用

铜绿假单胞菌 ATCC 27853 在普通肉汤中 37 ℃摇动培养 18 h，调整菌浓度为 10^5 CFU/ml，取 50 μl 此菌液分别加入新鲜普通培养基、新鲜 BL 培养基、SCS 中，重复 3 管，37 ℃培养 24 h，PBS 洗涤菌液 3 次，再用 PBS 重悬铜绿假单胞菌 ATCC 27853，测定 600 nm 的光密度值。

1.5 黏附和侵袭实验

采用细胞裂解计数法进行[2]。24 孔细胞培养板中的 IEC-6 细胞单层用无菌 PBS 洗 3 遍，每孔加入 200 μl 菌液，然后置 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中孵育，3 h 后吸去菌液后，用 PBS 洗 10 遍，除去未黏附的细菌，在部分孔中加入 500 μl 含 1% Triton X-100 的 PBS，37 ℃作用 20 min，3 000 r/min 离心 15 min；沉淀悬浮于 1 ml PBS 中，按不同稀释度作活菌记数（包括黏附和侵袭数）；其余每孔加入 500 μl 含 100 μg/ml 庆大霉素、丁氨卡那霉素的 DMEM 培养液，37 ℃ 5% CO_2 培养箱中继续孵育 2 h；再用 PBS 洗 5 遍，最后每孔加入 500 μl 含 1% Triton X-100 的 PBS，37 ℃作用 20 min，3 000 r/min 离心 15 min；沉淀悬浮于 1 ml PBS 中，按不同稀释度进行细菌计数，每个样品重复 3 次。

1.6 IEC 细胞活力的检测

采用四唑盐（MTT）比色法[3,4]。各时相点弃去原培养液，加入 MTT 20 μl/孔（5 g/L），37 ℃ 5% CO_2 孵箱孵育 4 h，各孔加入 200 μl 二甲基亚砜（DMSO），室温振荡 10 min，酶联反应仪测定 490 nm 波长处光密度值[D(490)]。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用华西医科大学 PEMS 医用统计软件包作 t 检验。

2 结果

2.1 SCS 对铜绿假单胞菌生长的作用

结果显示铜绿假单胞菌 ATCC 27853 在新鲜 BL 培养基中生长优于普通培养基，但是在 SCS 的上清中，铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的生长几乎被完全抑制。

2.2 SCS 对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 与 IEC 细胞黏附、侵袭作用

结果显示铜绿假单胞菌 ATCC 27853 在相互作用的 3 h 内，黏附数也迅速增加，黏附后 1 h 在胞内即检出细菌侵入；共同孵育实验显示 SCS 能显著抑制铜绿假单胞菌 ATCC 27853 与 IEC 细胞的黏附，同时侵入的细菌数明显下降（表 1）。

表 1 SCS 作用和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 黏附 IEC 细胞

组别	1 h		3 h	
	黏附数	侵入数	黏附数	侵入数
铜绿假单胞菌组	1 786 ±89	156 ±24	58 000 ±263	890 ±67
SCS 作用组	368 ±37[a]	31 ±7[a]	27 000 ±244[a]	267 ±37[a]

a：$P<0.01$，与铜绿假单胞菌组

2.3 SCS 作用和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 黏附对 IEC 细胞活力的影响

结果表明：铜绿假单胞菌 ATCC 27853 黏附后，细胞活力迅速下降，至孵育 3 h 细胞活力明显下降；共同作用组 3 h 细胞活力也有下降，但明显高于铜绿假单胞菌 ATCC 27853 组的活性（表 2）。

表 2 SCS 作用和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 黏附对 IEC 细胞活力的影响

组别	1 h	3 h
对照组	0.57 ±0.09	0.55 ±0.08
铜绿假单胞菌组	0.46 ±0.05[a]	0.36 ±0.07[b]
SCS 作用组	0.49 ±0.04	0.46 ±0.05[ac]

a：$P<0.05$；b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与铜绿假单胞菌组比较

3　讨论

双歧杆菌定植于肠上皮细胞表面后,与其他厌氧菌一起构成膜菌群,一方面,起生物占位性保护作用,保护肠粘膜免受病原菌的黏附入侵;另一方面,通过产生有机酸、过氧化氢、或细菌素抑制病原菌的生长繁殖,从而发挥生物学屏障作用。培养上清主要由双歧杆菌代谢产物组成,包括其代谢产生的有机酸、细菌素以及细胞本身的结构物质[5]。

实验表明 SCS 能抑制铜绿假单胞菌 ATCC 27853 生长,同时研究了在黏附体系加入 SCS 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853,观察 IEC 细胞的变化及黏附抑制作用,结果显示共同作用 3 h 后铜绿假单胞菌黏附数和侵入数分别降低了 71% 和降低约 87%,说明 B. ado 0926 培养上清能显著抑制铜绿假单胞菌 ATCC 27853 对 IEC 细胞的黏附、定植和侵袭;提示 SCS 可能通过竞争性结合 IEC 细胞上的受体,抑制铜绿假单胞菌的对 IEC 细胞的黏附、从而减少了铜绿假单胞菌的侵入机会。Wang 等[6]用共培养实验观察到双歧杆菌可产生具有广谱抗微生物活性的物质及大量有机酸,可以抑制大肠埃希菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌、李斯特菌、弯曲菌、志贺氏菌和霍乱弧菌生长。

目前的研究认为双歧杆菌细胞壁中的脂磷壁酸(LTA)和细胞壁蛋白(PR)可能是双歧杆菌的黏附素[7-9]。LTA 类物质为两性分子,疏水端通过脂肪酸链与细胞膜连结,亲水端穿过细胞壁肽聚糖层网络延伸到菌体表面[10]。Op-den-Camp 等[11]研究 LTA 与人肠上皮细胞的黏附,他们发现双歧杆菌的 LTA 与肠上皮细胞的黏附是特异的和可逆的,并且具有肠上皮细胞浓度及时间依赖性。LTA 经碱处理脱脂后丧失其黏附力,证实 LTA 中脂肪酸部分是双歧杆菌黏附于肠上皮细胞主要介导物质[11]。LTA 与宿主细胞上受体的结合对于细菌的黏附和定植都有重要的意义。黏附是双歧杆菌发挥其生理作用的前提,双歧杆菌与宿主细胞的受体结合后,封闭了致病菌的黏附位点,发挥生物占位性保护作用,从而减少了致病菌感染的机会。而双歧杆菌代谢产生大量的有机酸——乙酸,对肠道致病菌构成了化学屏障,同时也构成了抑制肠道致病菌乃至条件致病菌生长的物质基础,在一定程度上维护了肠粘膜的功能和结构的完整性。

综上,我们发现双歧杆菌培养上清中存在有抑制铜绿假单胞菌 ATCC 27853 生长、黏附的保护性因子,这些因子的性质及作用还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] YU P, MARTIN C M. Increased gut permeability and bacterial translocation in *Pseudomonas pneumonia*-induced sepsis[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2573 - 2577.

[2] JANDA J M, ABBOTT S L, OSHIRO L S. Penetration and replication of Edwardsiella spp. in Hep-2 cells[J]. Infect Immun, 1991, 59(1): 154 - 161.

[3] HIDA T, UEDA R, TAKAHASHI T, *et al*. Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) hybrid assay[J]. Cancer Res, 1989, 49(17): 4785 - 4790.

[4] PLUMB J A, MILROY R, KAYE S B. Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay[J]. Cancer Res, 1989, 49(16): 4435 - 4440.

[5] 陈　军,夏培元,常　山,等. 铜绿假单细胞菌体外粘附肠上皮细胞对其细胞膜生物特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(6): 495 - 497.

[6] WANG X, GIBSON G R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine [J]. J Appl Bacteriol, 1993, 75(4): 373 - 380.

[7] BIBLIONI R, SARMIENTO P L, DE-ANTONI G L. An electron microscopy study of the adherence of Bifidobacterium bifidum to human intestinal Caco-2 cells *in vitro*[J]. Scanning, 1998, 20(3): 242 - 243.

[8] FUJIWARA S, HASHIBA H, HIROTA T, *et al*. Proteinaceous factor (s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(2): 506 - 512.

[9] BERNET M F, BRASSART D, NEESER J R, *et al*. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(12): 4121 - 4128.

[10] 何　梅,刘永芳,黄贤惠,等. 烧伤创面铜绿假单胞菌细胞表面疏水性和粘附性的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(16): 1433, 1437.

[11] OP-DEN-CAMP H J, OOSTERHOF A, VEERKAMP J H. Phosphatidylglycerol as biosynthetic precursor for the poly(glycerol phosphate) backbone of bifidobacterial lipoteichoic acid[J]. Biochem J, 1985, 228(3): 683 - 688.

(编辑　薛国文)