维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞形态学上趋于分化则说明氚标记苦参碱仍具有诱导白血病细胞向成熟分化的趋势，间接证明了其构象基本未变。

通过对氚标记苦参碱的质量鉴定，并结合标记物的RTA、S及RCP等指标，证明标记的产物能满足我们继续深入研究苦参碱诱导白血病细胞分化机制的需要。而且为苦参碱类化合物进行氚标记提供了一个成功的示例；为揭开苦参及其生物碱广泛的生物活性作用提供了可能性。

(致谢：诚挚感谢中国原子能科学院同位素研究所沈德存、廖玢二位老师的指导和帮助。参加本项工作者尚有何于娟、朱旦、戴碧涛、王一茹等。)

参 考 文 献

1.胡 烈.中西医结合杂志 1994;10(3):59
2.于喜水，等.中成药 1990;12(3):3
3.张燕军，等.陕西中医 1997;18(2):93
4.北京医学院，北京中医学院.中草药成分化学.人民卫生出版社 1980;133
5.刘北忠，等.重庆医科大学学报 1997;22(4):302
6.杨万清，等.沈阳药学院学报 1992;9(4):297
7.祝经平，等.中成药 1997;(3):36
8.王浩丹，等.生物医学标记示踪技术.北京：人民卫生出版社 1995;3
9.林启寿.纸上色谱及其在中草药成分分析中的应用.北京：科学技术出版社 1983;80
10.周浩忠，等.中国医院药学杂志 1995;15(2):57

(收稿日期 1998－03－25)

Matrine labeled by tritium and its identification

Xu xiangru, et.al
Department of clinical biochemistry, faculty of laboratory medicine

Matrine, a kind of alkaloids which purified from legume family, such as chinese herbs Sophora flavescences Ait. and Radix sophorae Tinkinensis, has multiple pharmaceutical effects. But the most one attractive to researchers is that matrine could induce the human leukemia cell line differentiation. In order to elucidate the mechanism by which the matrine acts, according to the structural and physi－chemical features of matrine, as well as the research objection, the matrine was labeled by tritium(^3H) through the methods of isotope catalyze exchange labeling. The results:RTA＞1.85×10^8Bq;S＝10.06×10^3Bq/μg;RCP＝95.2%. Meanwhile the ^3H matrine also identified by PC,HPLC and bio－effect determination. It indicates that the matrine labeled by tritium was successful, and the labeling product can meet the requirements for further study.

KEY WORDS Matrine; Tritium, labeling; Identify

126-129 (5)

双歧杆菌及其表面分子粘附肠上皮细胞的研究*

Q939.121
Q936

检验系 蒋 虹** 胡 宏 尹一兵 康格非

提 要 本文采用人结肠腺癌细胞株Lovo体外培养研究分叉双歧杆菌粘附的性质和机制。结果发现：分叉双歧杆菌的粘附具有时间依赖性和菌量依赖性。静止期菌粘附作用最强，酸性pH值可以促进其粘附。通过WPG、LTA、多糖阻断试验及胰酶处理发现，WPG、LTA、细胞壁蛋白都参与了分叉双歧杆菌对Lovo细胞的粘附，说明此粘附过程是多种分子共同参与的结果。

关键词 双歧杆菌；表面分子；粘附 肠上皮细胞
中图分类号 Q936

双歧杆菌是人体肠道中最重要的生理菌，它粘附于肠道上皮细胞上，形成稳定的菌群，对于维持宿主肠道微生态平衡，增强免疫功能，抗肿瘤、抗感染、抗衰老等方面发挥了重要的作用[1,8]。粘附是其

* 国家自然科学基金资助项目(39870007)
** 女，1971－07出生，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

发挥作用的基础，但目前对于双歧杆菌粘附的分子机理尚不十分清楚。为此，本文对分叉双歧杆菌及其表面分子体外粘附人肠上皮Lovo细胞的机理进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

分叉双歧杆菌(B.bif1101)由本室分离、保存，经中国科学院微生物研究所鉴定。接种于BL肉汤，37℃厌氧培养。

1.2 B.Bif的表面分子

WPG(whole peptidoglycan)：按Sekine等报道的方法[4]自制，所得产物经分析鉴定与Sekine等报道相符。

LTA(Lipoteichoic acid)：按Sutcliffe等的方法[5]自制，用非离子型去垢剂TritonX－114(Sigma)处理B.Bif1101，经DEAE Sephacel(Sigma)纯化，紫外光谱及血清学鉴定与日本Masata Nagaoka博士惠赠标准品相符。

多糖：分离自B.Bif YI4007，由Dr.Masata Nagaoka Yakult Central Institute for Microbiology Research, Japan.惠赠。

1.3 细胞

人结肠腺癌细胞株Lovo，购于中科院上海细胞所。于含10％小牛血清和双抗的RPMI－1640培养液中(Gibco)，37℃5％CO_2常规培养，试验时消化细胞，按$2x10^5$细胞/孔接种于6孔培养板(内放玻片)，待玻片上细胞基本铺满后进行粘附试验。

1.4 粘附试验

用灭菌PBS洗涤细胞两次，加入无血清无双抗的1640培养液悬浮的B.bif1101 2ml/孔，37℃5％CO_2孵育。灭菌PBS洗涤玻片，除去未结合菌。甲醇固定，革兰氏染色，计数100个细胞上粘附的细菌数。

1.4.1 粘附的时间曲线

取B.bif1101 24h培养物，用1640调整菌浓度为10^8CFU/ml，与Lovo细胞培养1/2、1、2、3、4、5、6h后，计数粘附细菌数。

1.4.2 粘附的浓度曲线

取B.bif1101 24h培养物，用1640调整菌浓度为10^4、10^5、10^7、10^8、10^9CFU/ml，与Lovo细胞培养4h，计数粘附细菌数。

1.5 双歧杆菌生长阶段的影响

1.5.1 B.bif1101生长曲线

按1:10的比例接种B.bif1101 24h菌液于BL肉汤，37℃厌氧培养6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h后，离心收集细菌 用PBS洗涤后重新悬浮，O.D.600nm比色，绘制双歧杆菌生长曲线。

1.5.2 B.bif1101生长阶段对粘附的影响

取B.bif1101 10、14、24h培养物，用1640调整菌浓度为10^8CFU/ml，与Lovo细胞培养4h，计数粘附菌数。

1.6 pH值对粘附的影响

分别用pH7.4、6.0、5.0、4.0的PBS悬浮B.bif1101，调整菌浓度为10^8CFU/ml，进行粘附试验并计数。

1.7 B.bif表面WPG、LTA、多糖对其粘附的阻断作用

先用不同浓度的WPG、LTA、多糖与Lovo细胞作用1h后，PBS洗涤，加入B.bif1101 37℃5％CO_2继续培养4h，计数粘附菌数。

1.8 胰酶处理B.bif1101表面蛋白

B.bif1101用0.25％的胰酶处理30min(37℃)，PBS洗涤3次，加入含氯霉素(30μg/ml)的1640培养液，调整菌浓度为10^8CFU/ml，进行粘附试验。

2 结果

2.1 双歧杆菌的时间曲线

从图1可以看出，双歧杆菌对Lovo细胞的粘附在3h达到饱和。

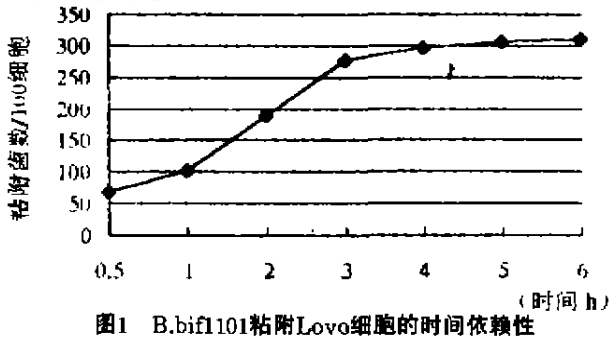


图1 B.bif1101粘附Lovo细胞的时间依赖性

2.2 双歧杆菌粘附的浓度曲线，结果见图2。

从图2可以看出双歧杆菌的粘附具有浓度依赖性，当其浓度为10^8时，粘附达到饱和状态。

2.3 双歧杆菌的生长曲线

结果见图3。

由图3可知，双歧杆菌在BL肉汤中厌氧培养10 h后，进入对数生长期，培养16h后进入静止期。

维普资讯 http://www.cqvip.com

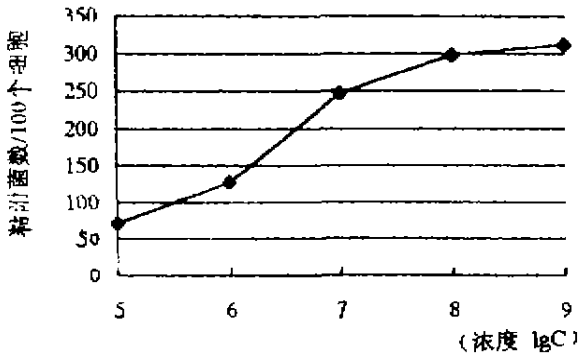


图2 B.bif1101粘附Lovo细胞的浓度依赖性

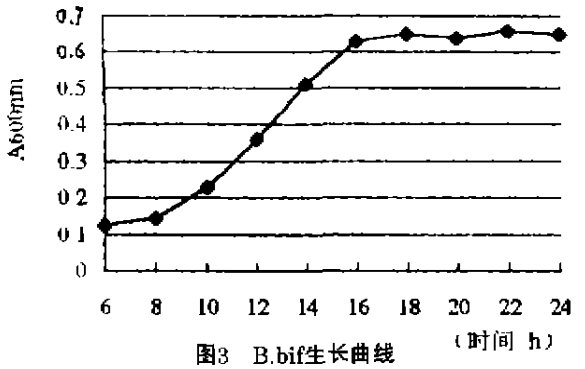


图3 B.bif生长曲线

2.4 双歧杆菌生长阶段对粘附的影响

选择双歧杆菌对数生长前期(10h)、中期(14h)、静止期(24h)菌液进行粘附试验，结果见表1。

2.5 pH值对粘附的影响，结果见表2

2.6 B.bif1101表面分子对粘附的阻断作用，结果见表3。

2.7 B.bif1101表面蛋白在粘附中的作用

用0.25%的胰酶水解B.bif 1101表面蛋白，结果发现：B.bif1101对Lovo细胞的粘附显著降低($P<0.01$)，粘附的双歧杆菌数分别为(177±15)和(296±21)/100个细胞。

表1 双歧杆菌生长阶段对其粘附的影响

培养时间	粘附的双歧杆菌数/100个细胞
10h	232±10
14h	242±12
24h	289±14

表2 pH值对双歧杆菌粘附的影响

pH值	粘附的双歧杆菌数/100个细胞
7.4	302±14
6.0	588±17**
5.0	612±15**
4.0	780±20**

注：pH7.4，**$P<0.01$(t test)

3 讨论

实验采用人结肠腺癌细胞株Lovo在体外研究双歧杆菌的定植作用。首先探讨了双歧杆菌体外粘附的一般性质和影响因素。

从实验可以看出，双歧杆菌的粘附具有时间和菌量依赖性。随着粘附时间的延长，双歧杆菌的粘附数增加，3h以后，粘附达到饱和。双歧杆菌浓度增加，粘附也随之增加，于10^8CFU/ml时达到饱和。双歧杆菌的粘附具有时间依赖性和菌量依赖性，提示双歧杆菌对Lovo细胞的粘附可能具有特异性。

不同生长阶段的细菌，表面成分的表达不同，因此有必要了解不同生长阶段双歧杆菌粘附的差异，从B.bif1101的生长曲线可以看出，在BL肉汤中培养10h后，双歧杆菌进入对数生长期，16h进入平台期。选取对数生长前期(10h)、中后期(14h)、平台期(24h)三个时点的双歧杆菌进行粘附试验，结果发现平台期双歧杆菌粘附作用最强。说明生长阶段对粘附有影响，可能是因为平台期细菌粘附分子

表3 双歧杆菌表面WPG、LTA以及多糖对粘附的抑制作用

表面分子	浓度 (μg/ml) 0	10	20	50	100
WPG	295±9	280±11	262±10*	201±14**	192±11**
LTA	289±12	220±10**	202±14**	214±11**	199±14**
多糖	286±14	284±9	286±10	271±12	274±14

*$P<0.05$ **$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表达最充分，因此粘附作用最强。

双歧杆菌代谢产生大量的有机酸，降低肠道pH值，对其体内抑制病原菌生长、预防结肠癌的发生等具有重要的意义[6,7]。但是pH值对双歧杆菌粘附的影响尚不清楚。试验发现，随着pH值的下降，双歧杆菌的粘附增强，pH4.0时的粘附数是pH7.4时的两倍，可见酸性环境是双歧杆菌粘附的促进因素，由此可以假设，在肠道中双歧杆菌代谢产酸，由于双歧杆菌较肠道致病菌耐酸性强，因此双歧杆菌一方面抑制肠道病原菌的生长，另一方面促进其自身的定植，考虑到肠道pH值偏碱性，以及体外细胞培养的条件，因此体外粘附试验pH值选择7.4。

双歧杆菌的细胞壁主要由肽聚糖、磷壁酸(包括脂磷壁酸LTA和壁磷壁酸TA)和细胞壁蛋白组成。Bernet等[8]用革兰氏染色法，直接研究了双歧杆菌与体外培养的人结肠腺癌细胞株Caco.2的粘附，认为双歧杆菌的粘附成分可能是细菌表面的一种不稳定的蛋白性物质，这种物质也存在于其耗尽培养液中。Op den Camp等[9]用^{14}C－油酸标记一株分叉双歧杆菌，并提取了^{14}C标记的LTA。在体外与人肠上皮细胞的粘附试验中，发现LTA的结合具有时间依赖性和菌量依赖性，并且其结合是可逆的，证明LTA是介导双歧杆菌粘附于肠上皮细胞的一种粘附分子。进一步的研究还发现LTA的粘附可以被白蛋白抑制，去乙酰化的dLTA丧失粘附性。因此认为LTA中的脂肪酸部分可能在粘附中起主要作用。本研究采用提纯的B.bif1101的WPG、LTA、多糖及胰酶处理阻断B.bif1101粘附的方法，间接反映B.bif1101表面各成分在其粘附中的作用。试验发现，除多糖外，WPG、LTA和细胞壁蛋白都有较强的抑制作用。由于WPG保持了完整菌体的形态，因此其空间位阻作用可能也是WPG抑制粘附作用较强的原因之一，LTA在10μg/ml的浓度时，其阻断粘附作用即达到最高，也提示LTA与Lovo细胞结合具有饱和性。根据试验结果可以初步认为，B.bif1101对Lovo细胞的粘附不是单一成分介导的，而可能是多种成分共同作用的结果，其中至少有WPG、LTA及某些细胞壁蛋白的参与。

粘附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步。致病菌的粘附对其侵袭及毒力因子的产生和分泌以及进一步致病都有重要的意义[10]。双歧杆菌作为人畜肠道中的生理菌，其定植不但不致病反而对宿主有益，因此研究双歧杆菌粘附机理具有非常重要的意义，为进一步阐明双歧杆菌与宿主细胞相互作用的机理，抗肿瘤、抗感染、抗衰老等机理奠定了基础。

参 考 文 献

1.Hoover DG. Food Techol 1993;47:120
2.Reddy BS, et al. Cancer Res 1993;53:3914
3.王立生，等.国外医学.临床生化与检验学分册 1998;19(1):40
4.Sekine K, et al. Cancer Res 1985;45:1300
5.Sutcliffe IC, et al. J. Microbiol. Meth 1993;17(3):215
6.Gibson GR, et al. J. Appl. Bacteriol 1994;77:412
7.Koo M, Rao AN. Nutr. Cancer 1991;16:249
8.Bernet MF, et al. Appl. Environ. Microbiol 1993;59:4121
9.Op den Camp HJM, et al. Infect. Immun 1985;47:332
10.Cotter PA, et al. Science, 1996;273:1183

(收稿日期 1998－09－21)

The study of the adhesion of Bifidobacterium bifidum 1101 and its surface molecules to cultured Lovo cell

Jiang Hong, et al
Department of medical laboratory sciences

To investigate the charaterization and mechanism of Bifidobacterial adherance, B.bif1101 was tested for its ability to attach cultured human colonic adenocarcinomas cell line Lovo. The results showed that:(1)The adhesion of B.bif1101 was time－and dose－dependent. The bacteria of static phase attached greatest.(2)The adhesion of B.bif1101 was enhanced by low pH value;(3)Inhibitory effect of WPG-LTA and trypsin showed that WPG-LTA and cell wall proteins participated in the attachment

KEY WORDS Bifidobacterium; Surface molecules; Adhesion