DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.010
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
138 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0138-04

双歧杆菌粘附大鼠肠上皮细胞相关因素的研究

陈 军,常 山,张雅萍,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 以青春型双歧杆菌粘附大鼠肠上皮细胞株IEC-6为实验模型,探讨影响粘附的相关因素。方法 采用体外定量微生物分析方法观察粘附等指标。结果 双歧杆菌粘附需要一定时间、浓度、温度的作用,且酸性环境有利于粘附,胰蛋白酶能完全抑制其粘附。结论 双歧杆菌能粘附于肠上皮细胞表面,其粘附素成分可能为细胞壁中的蛋白成分和脂磷壁酸。

关键词:青春型双歧杆菌;粘附;肠上皮细胞
中图法分类号:R322.45;R379.1 文献标识码:A

Study on factors involved in adherence of bifidobacteria to intestinal epithelial cells in rats

CHEN Jun, CHANG Shan, ZHANG Ya-ping, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To Study on factors involved in adherence of *Bifidobacterium adolescentis* to Intestinal epithelial cell (IEC-6) in rats. Methods *In vitro* model of IEC-6 cell culture and quqantitative assay were employed. Results Adherence was concentration and temperature dependent, greater under acidic condition, and became saturated after co-incubation for 3 hours. However, it was inhibited by treatment of trypsin on the bacterial surface proteins. Conclusion Bifidobacteria can adhere to the IEC-6 cells, and the proteins in the bactelial well and LTA might be two of the adhesions.

Key words: *bifidobacterium adolescentis*; adhesion; intestinal epithelial cell

双歧杆菌是人体肠道内的生理性细菌,具有益生、营养、免疫等作用,对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粘附是其发挥生理作用的首要条件,而有关其粘附的特点和机制正成为益生菌研究的热点。本研究采用青春型双歧杆菌粘附大鼠肠上皮细胞株IEC-6为实验模型,探讨粘附的相关因素及其机制。

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. ado* 0926)由本室分离、保存,经中国科学院微生物研究所鉴定。

鼠肠上皮细胞株IEC-6,引自中国科学院上海细胞研究所。

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 *B. ado* 0926用BL培养基经厌氧、37 ℃培养后,3 500 r/min离心15 min,收集细菌,用无血清无双抗的DMEM(F-DMEM)培养液悬浮细菌,调整菌浓度为1×10^7CFU/ml。

1.3 粘附实验

用灭菌PBS洗涤细胞单层两次,加入F-DMEM培养液悬浮的*B. ado* 0926,每孔2 ml,37 ℃,5%CO_2孵育3 h。用灭菌PBS洗涤玻片,除去未结合菌。4%多聚甲醛固定,革兰氏染色,油镜下计数100个细胞上粘附的细菌数,每个标本平行3孔。

1.4 观察指标和方法

1.4.1 粘附的时间曲线 取*B. ado* 0926 24 h培养物,用F-DMEM培养液调整菌浓度为10^7CFU/ml,加至单层IEC细胞中,培养0.5、1、2、3、4、5、6 h后,油镜下计数粘附细菌数。以时间为横坐标,100个细胞上粘附的细菌数为纵坐标作图,可得到双歧杆菌粘附的时间进程曲线。

1.4.2 粘附的浓度曲线 取*B. ado* 0926 24 h培养物,用F-DMEM培养液调整菌浓度分别为10^5、10^6、10^7、10^8、10^9CFU/ml,与IEC细胞培养3 h,油镜下计数粘附细菌数。以所加双歧杆菌的浓度为横坐标,100个细胞上粘附的细菌数为纵坐标作图,可得双歧杆菌粘附的菌量依赖曲线。

1.4.3 *B. ado* 0926生长曲线 接1∶10的比例接种*B. ado* 0926 24 h菌液于BLB肉汤,37 ℃厌氧培养6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 h后,离心收集细菌,用PBS洗涤后重新悬浮,在紫外可见分光光度仪上测定600 nm处的吸光度值,以培养时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制双歧杆菌生长曲线。

1.4.4 *B. ado* 0926生长阶段对粘附的影响 取*B. ado* 0926 8、16、24 h培养物,用F-DMEM培养液调整菌浓度为10^7CFU/ml,进行粘附试验并计数。

1.4.5 pH值对粘附的影响 用2 mol/L HCl调节PBS的pH为7.4、6.0、5.0、4.0,分别悬浮*B. ado* 0926,调整菌浓度为10^7CFU/ml,进行粘附试验并计数。

1.4.6 温度对粘附的影响 将粘附实验分别置于4 ℃,37 ℃,45 ℃进行。

1.4.7 胰蛋白酶对粘附的影响 *B. ado* 0926用0.25~5 mg/ml不同浓度的胰蛋白酶,37 ℃处理30 min,PBS洗涤后加入F-DMEM培养液,调整菌浓度为10^7 CFU/ml,进行粘附试验。

1.4.8 牛血清白蛋白对粘附的影响 *B. ado* 0926用5~40 g/L牛血清白蛋白,37 ℃处理30 min,PBS洗涤后加入F-DMEM培养液,调整菌浓度为10^7 CFU/ml,进行粘附试验。

1.5 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。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L042)
作者简介:陈 军(1970—),男,广东省电白县人,博士,助理研究员,主要从事烧伤感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754148-8028
收稿日期:2000-12-22;修回日期:2001-08-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

2.1　*B. ado* 0926 粘附的时间曲线

B. ado 0926 的粘附随着其与 IEC 细胞作用时间的延长而增加, 在 0~3 h 间对 IEC 细胞的粘附迅速增加, 3~4 h 之间粘附增加缓慢, 以后逐渐趋于稳定, 见图 1。*B. ado* 0926 对 IEC 细胞的粘附过程存在时间依赖关系。

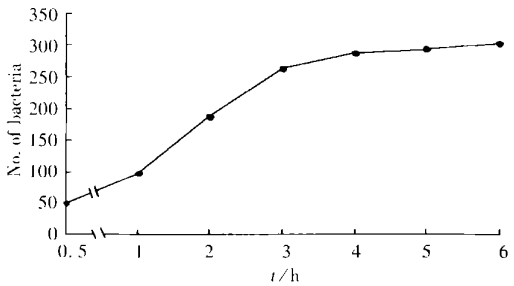


图 1　*B. ado* 0926 粘附的时间曲线

Fig 1　Time curve of *bifidobacteria* adhesion

2.2　*B. ado* 0926 粘附的浓度曲线

*B. ado*0926 粘附 IEC 细胞的菌量依赖曲线为 S 形, 当 *B. ado* 0926 菌量低时(10^5 ~ 10^6 CFU/ml), 粘附率低, 当其浓度为 10^6 ~ 10^8 CFU/ml 时, 粘附率迅速升高, 在 10^8 ~ 10^9 CFU/ml 时, 粘附趋于稳定, 见图 2。

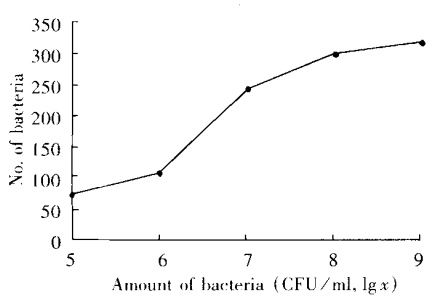


图 2　*B. ado* 0926 粘附的浓度曲线

Fig 2　Concentration curve of *bifidobacteria* adhesion

2.3　*B. ado* 0926 的生长曲线

B. ado 0926 在 BL 肉汤中厌氧培养 12 h 后, 进入对数生长期, 细菌数迅速增加, 持续到 20 h 后进入静止期, 细菌浓度趋于稳定, 见图 3。

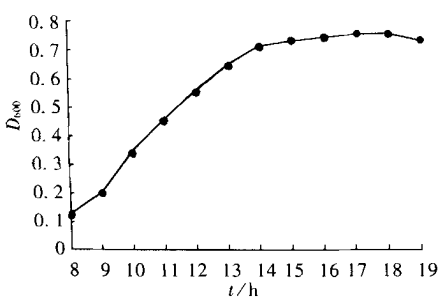


图 3　*B. ado* 0926 的生长曲线

Fig 3　Growth curve of *bifidobacteria*

2.4　生长阶段对粘附的影响

培养 16 h 的细菌与培养 8 h 细菌相比, 对 IEC 细胞的粘附略有增加, 培养 24 h 的细菌与 8 h 细菌相比, 粘附能力显著增加, 见表 1。

表 1　生长阶段对粘附的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of growth stage on *bifidobacteria* adhesion($\bar{x} \pm s$)

t/h	No. of adhesion
8	192±31 ##
16	211±29 #
24	289±36

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 24 h

2.5　pH 值对粘附的影响

随着 pH 值的降低, *B. ado* 0926 对 IEC 细胞的粘附增加, pH4.0 时粘附的细菌数是 pH 7.4 时的 2.5 倍, 可见 *B. ado* 0926 在酸性环境中粘附 IEC 细胞的能力增强, 见表 2。

表 2　pH 值对粘附的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Effect of pH value on *bifidobacteria* adhesion($\bar{x} \pm s$)

pH value	No. of adhesion
7.4	298±27
6	407±30 #
5	572±36 ##
4	713±44 ##

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* pH 7.4

2.6　温度对粘附的影响

在生理温度下, 粘附数最大, 而在低温和高温下粘附数都有所减少, 见表 3。

表 3　温度对粘附的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Effect of temperature on *bifidobacteria* adhesion($\bar{x} \pm s$)

Temperature(℃)	No. of adhesion
4	162±18 ##
37	298±26
45	180±21 ##

##: $P<0.01$ *vs* 37 ℃

2.7　胰蛋白酶对粘附的影响

随着胰蛋白酶浓度的增高, *B. ado* 0926 对 IEC 细胞的粘附显著下降, 当浓度达到 4 mg/ml 时能完全阻止其粘附, 见图 4。

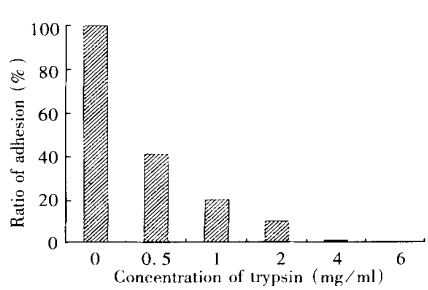


图 4　胰蛋白酶对粘附的影响

Fig 4　Effect of trypsin on *bifidobacteria* adhesion

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.8 牛血清白蛋白对粘附的影响

牛血清白蛋白(5~40 g/L)对 *B. ado* 0926 与 IEC 细胞的粘附无明显影响,见表4。

表4 牛血清白蛋白对粘附的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of bovine serum albumin on *bifidobacteria* adhesion($\bar{x}\pm s$)

	Concentration of bovine serum albumin(g/L)				
	0(Control)	5	10	20	40
No. of adhesion	298±26	281±22	278±26	276±19	264±21

3 讨论

双歧杆菌是人体肠道中一种革兰阳性、无芽胞的厌氧杆菌,具有维持肠道正常微生物群平衡、抗感染、免疫赋活、抗肿瘤、抗衰老等生理作用[1,2]。粘附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步,双歧杆菌只有粘附于宿主细胞后,进而定植、繁殖,才能发挥其维护微生态系群落结构及功能平衡,保护生物屏障作用。因此研究双歧杆菌粘附机制是认识微生态学基本规律的关键之一。

为了更系统地探讨双歧杆菌粘附机制,我们采用体外培养的大鼠肠上皮细胞株 IEC-6,观察了双歧杆菌与该细胞粘附动力学和影响因素。体外培养的细胞株因其性质稳定,可以保证实验的重复性,因此较原代培养的肠上皮细胞更适于体外研究双歧杆菌粘附及其机制[3]。

实验探讨了 *B. ado* 0926 体外粘附的动力学性质和影响因素。从 *B. ado* 0926 粘附 IEC 细胞的时间进程曲线和剂量依赖曲线发现 *B. ado* 0926 对 IEC 细胞的粘附存在着时间依赖关系和菌量依赖性,在 *B. ado* 0926 和 IEC 细胞相互作用的 0~3 h 之间,*B. ado* 0926 的粘附数迅速增加,到3 h 后粘附的 *B. ado* 0926 菌数趋于稳定。随着 *B. ado* 0926 菌量的增加,其粘附于 IEC 细胞上的细菌数量随之增加,当其菌浓度为 10^8~10^9CFU/ml 时,粘附趋于稳定。*B. ado* 0926 对 IEC 细胞的粘附存在时间和菌量依赖关系,提示粘附作用是特异的,即 *B. ado* 0926 与 IEC 细胞表面受体结合,在一定的时间和菌量条件下细菌与细胞受体的结合达到饱和,从而使粘附趋于稳定。

许多因素能作用于细菌粘附过程,从而增强或减弱细菌的粘附能力。为此我们观察了细菌的生长阶段、环境 pH 值和温度对 *B. ado* 0926 粘附 IEC 细胞的影响。

从 *B. ado* 0926 的生长曲线可以看出,在 BL 肉汤中培养 12 h 后,双歧杆菌进入对数生长期,16 h 进入静止期。选取对数生长前期(8 h),中后期(16 h),静止期(24 h)三个时间点的双歧杆菌进行粘附试验,结果随着细菌生长时间的延长,对 IEC 细胞的粘附增加,但生长中后期菌与生长前期菌粘附的差别没有显著性,而静止期菌的粘附能力显著增加。说明生长阶段对 *B. ado* 0926 粘附有影响。细菌的生长条件能影响细菌脂磷壁酸(LTA)和表面蛋白的合成[4,5]。随着细菌生长的进程 LTA 的合成增加,到静止期合成的 LTA 量最多[6],因此静止期菌粘附作用最强,可能与此有关。

pH 值对双歧杆菌粘附影响的试验发现,随着 pH 值的下降,双歧杆菌的粘附数增多,可能由于酸性 pH 值作用于单层细胞,改变了细胞上受体的某些性质,从而增强了双歧杆菌对 IEC 细胞的粘附。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,因此它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,pH 值对双歧杆菌的粘附有着重要的调节作用。Greene[7] 在研究乳杆菌体外粘附中发现,其培养乏液能促进该菌与肠上皮样细胞的粘附,但是培养乏液的 pH 值相当低,若将 pH 值调至 7.2~7.4,则对粘附的促进作用很弱,认为在培养乏液中起主要作用的是 pH 值。Bernet[8] 和郑跃杰等[9] 提出培养乏液能促进双歧杆菌的粘附,由于双歧杆菌的培养乏液 pH 值也很低,在 4.0 左右,因此不能忽视 pH 值在其中起的重要作用。考虑在体内肠道 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 值仍选择 7.4。

有关介导双歧杆菌粘附的物质,目前尚不清楚。Op den Camp 等[10] 用 ^{14}C-油酸标记一株分叉双歧杆菌细胞壁中的 LTA,然后提取 LTA,研究 LTA 与人肠上皮细胞的粘附,他们发现双歧杆菌的 LTA 与肠上皮细胞的粘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。随着细胞浓度增加,粘附的 LTA 量增加,37 ℃,60 min 粘附趋于饱和。这种粘附受白蛋白的抑制,LTA 经碱处理脱脂后丧失其粘附力,证实 LTA 中脂肪酸部分是双歧杆菌粘附于肠上皮细胞主要介导物质。90 年代初 Bernet 等[8] 首先用胰蛋白酶对双歧杆菌或其耗尽培养上清进行处理后,发现双歧杆菌的粘附力丧失;用新鲜细菌培养液或磷酸盐缓冲液代替耗尽培养液上清悬浮细菌后,双歧杆菌的粘附也有所下降,他们认为双歧杆菌的粘附素是细菌细胞壁与其耗尽培养液中某种蛋白质成分。本研究结果也表明,胰蛋白酶能完全抑制双歧杆菌对肠上皮细胞的粘附,而即使高浓度的白蛋白对粘附无明显影响,提示双歧杆菌粘附素可能是一类蛋白质。这一方面还有待于进一步深入研究。

双歧杆菌在肠道内的粘附与定植对维持肠道菌群的微生态平衡起主导作用,另外,外源双歧杆菌能否在肠道中粘附和定植是评价益生菌制剂效果的主要指标之一。因此,研究双歧杆菌的粘附机制不仅对认识微生态的基本规律有重要的理论意义,而且对益生菌制剂的开发与生产具有重要的现实意义。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Vaughan E E, Mollet B. Probiotics in the new millennium[J]. Nahrung, 1999, 43(3): 148—153.
[2] Urao M, Fujimoto T, Lane G J, *et al*. Does probiotics administration decrease serum endotoxin levels in infants[J]. J Pediatr Surg, 1999, 34(2): 273—276.
[3] Haller D, Bode C, Hammes W P, *et al*. Non—pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures[J]. Gut, 2000, 47(1): 79—87.
[4] Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, *et al*. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenicEscherichia coli to gangliotetraosylceramide [J]. Appm Environ Microbiol, 1997, 63(2): 506—512.
[5] Ouwehand A C, Isolauri E, Kirjavainen P V, *et al*. Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 172(1): 61—64.
[6] Bond D R, Tsai B M, Russell J B. Physiological characterization of Streptococcus bovis mutants that can resist 2-deoxyglucose-induced lysis[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt 10): 2 977—2 985.
[7] Greene J D, Klaenhammer T R. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(12): 4 487—4 494.
[8] 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): 4 121—4 128.
[9] 郑跃杰，潘令嘉，叶桂安. 双歧杆菌对肠上皮细胞粘附的研究[J]. 中华微生物学免疫学杂志，1997，17(2)：85—87
[10] Op den Camp H J, Oosterhof A, Veerkamp J H. Phosphatidylglycerol as biosynthetic precursor for thepoly (glycerol phosphate) backbone of bifidobacteriallipoteichoic acid[J]. Biochem J, 1985, 228(3): 683—688.

（编辑 冯崇英）

文章编号：1000-5404(2002)02-0141-01

个案与短篇

足月孕胎儿脐血流检测 200 例分析

Analysis of umbilical blood stream test for 200 full-term fetuses

蒋 凤 （第三军医大学附属西南医院妇产科，重庆 400038）

胎儿脐动脉彩色多普勒血流显像，作为一种无创伤的检查方法，已越来越多用于临床，成为监护及评价胎儿发育的新手段，本研究对 200 例足月孕孕妇胎儿脐动脉血流速度比 S/D（S：心脏收缩期最大血流速度；D：舒张末期血流速度）值进行测定，现分析如下。

1 资料与方法

1.1 资料

随机选择 2000 年 6 月至 11 月间在我科住院分娩的 200 例足月孕妇进行胎儿脐动脉血流速度比值 S/D 测定。孕妇年龄 21～38 岁。平均 29.5 岁。

1.2 方法

1.2.1 仪器 采用广州三瑞公司生产的 SRFA—608 型彩色连续超声多普勒血流分析仪，超声频率为 5 MHz。

1.2.2 测定方法 受检孕妇排空膀胱，平卧于检查床上。通过产科四步扪诊判断胎方位，脐带多位于胎儿腹侧，或通过 B 超引导，于羊水池中找到脐带的位置。将超声探头置于孕妇腹部脐带位置，轻轻变动探头角度，于荧屏上出现典型的脐动脉血流波形时，冻结波形，选择 5～12 个峰值高度一致的波形，通过内储软件求得峰谷比 S/D 值。

1.3 统计学处理

用 SPSS 软件包分析资料，采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 脐动脉血流波形与新生儿窒息情况，见表 1

表 1 200 例脐血流 S/D 值与新生儿窒息情况

S/D 值	例数	新生儿窒息(Apgar 评分 1 min<7 分)
S/D<3.0	182	0
S/D>3.0	18	4(22.22%)*

*：$P<0.001$ 与 S/D<3.0 比较

2.2 脐动脉血流波形与脐带缠绕情况，见表 2

表 2 45 例脐血流检测脐带绕颈胎儿娩出时脐带情况

S/D 值	例数	胎儿娩出时脐带绕颈情况			宫内窘迫
		无绕颈	绕颈 1 周	绕颈 2 周	
S/D<3.0	35	6(17.14%)	28(80.00%)	1(2.86%)	0
S/D>3.0	10	0	8(80.00%)	2(20.00%)	7(70%)*

*：$P<0.001$ 与 S/D<3.0 比较

2.3 脐动脉血流波形与胎儿宫内发育迟缓(IuGR)的情况，见表 3

当脐血流 S/D 值大于 3 时，B 超诊断的 IuGR 者出生时体重多低于 2 500 g。

表 3 17 例 B 超诊断 IuGR 的脐血流 S/D 值与新生儿体重情况

S/D 值	例数	体重>2 500 g	体重<2 500 g
S/D<3.0	11	10(90.91%)	1(9.09%)
S/D>3.0	6	1(16.66%)	5(83.34%)

作者简介：蒋 凤(1972—)，女，重庆市人，护师，主要从事妇产科超声方面的研究。电话：(023)68754412

收稿日期：2001-07-03；修回日期：2001-11-21

（下转 145 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net