DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.055
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
478 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0478-03

母乳及婴儿食品对致病性大肠杆菌粘附的影响

王凤英[1],王玉梅[2],常 青[1],江 露[1],史常旭[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]妇产科;[2]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 比较母乳、人工婴儿食品及其喂养的婴儿粪便对致病性大肠杆菌(EPEC)粘附上皮细胞或肠粘膜的影响,以进一步阐明母乳喂养对婴儿肠道的保护作用。方法 通过细胞培养、细菌粘附实验、光镜和电镜等技术观察EPEC在含有母乳、牛奶、奶粉及母乳喂养和人工喂养的婴儿粪便滤过液的培养基中粘附HeLa细胞及肠粘膜的情况。结果 EPEC在含母乳的培养基中对HeLa细胞的粘附指数显著低于对照孔,而在含牛奶和奶粉的培养基中EPEC的粘附指数与对照孔比较无显著差别;母乳喂养婴儿粪便滤过液中的细菌粘附指数明显低于人工喂养婴儿粪便中的粘附指数。结论 母乳可能具有抑制致病性大肠杆菌粘附婴儿肠道的作用。

关键词:母乳;人工喂养;致病性大肠杆菌;细胞粘附/细菌粘附;婴儿
中图法分类号:R174.4;R378.21 文献标识码:A

Effects of breast milk and some infant foods on the adhesion of entero-pathogenic *Escherichia coli* (EPEC) to Hela cells and intestinal mucosa

WANG Feng-ying, WANG Yu-mei, CHANG Qing, JIANG Lu, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: Objective To investigate the effect of breast milk and some other kinds of infant foods on the adhesion of EPEC to Hela cells and intestinal mucosa so as to understand the possible protective mechanism of breast-feeding in the intestine of infants. Methods The adhesion of EPEC to Hela cells and intestinal mucosa were examined by cell culture, bacterial adherence test, light and electron microscopy in the mediums that contain breast milk, cow's milk and formula milk or contain ecal filtrate of the infants fed by breast milk and formula milk respectively. Results Adhesive index for EPEC to Hela cells was significantly lower in the medium containing breast milk than in control and so did in the fecal medium containing breast fed infants than artificial feeding infants. Conclusion Breast milk may inhibit the adhesion of EPEC to infant intestine.

Key words: breast milk; formula milk; EPEC; cell adhesion/bacterial adhesion; infant

已有的研究表明母乳含有大量的免疫活性物质,这些物质可能具有抑制病原菌粘附上皮细胞的作用[1,2]。但母乳进入婴儿胃肠道后这些物质的作用是否受到破坏,婴儿人工喂养食品是否也具有母乳相似的作用等问题尚不清楚。本研究通过致病性大肠杆菌(EPEC)粘附HeLa细胞及小肠粘膜的实验,比较母乳、婴儿人工喂养食品及其喂养婴儿的粪便对EPEC粘附作用的影响,进一步阐明母乳喂养对婴儿胃肠道的保护机制。

1 材料和方法

1.1 母乳及婴儿粪便的采集和处理

选取我科分娩后母乳喂养的产妇及其婴儿10对,人工喂养婴儿10例。于产后1~5 d、1、2、3、4月采集母乳(分别以colostrum, HM_1, HM_2, HM_3, HM_4表示)。方法:消毒乳头、乳房,挤2~3 ml乳汁于消毒小瓶内,置-20 ℃冰箱保存。母乳喂养及人工喂养婴儿的粪便于出生后2~5 d、1~4月采集,婴儿粪便用生理盐水稀释为20%(W/V)后,3 500 r/min离心20 min,取上清液并用0.22 μm过滤膜过滤,滤过液置-20 ℃冰箱保存备用。

1.2 EPEC粘附Hela细胞实验

参考Camara等[3]的方法,并作部分改进。将HeLa细胞(由本校免疫教研室提供)用1640培养基,于37 ℃、CO_2培养箱内培养48 h后,实验孔分别加母乳、牛乳(Cow's milk, CM)、利多精婴儿奶粉(Formula milk, FM)(双城雀巢中国有限公司产品)及婴儿粪便滤过液,对照孔仅加同样培养基。再加EPEC菌液(1408菌株为成都生物制品研究所提供,44450菌株购自中国药品生物制品检定所),培养30 min,洗掉未粘附细菌,继续培养3 h,固定、染色、封片。在油镜下计数10个视野的HeLa细胞总数及有6个以上细菌粘附的HeLa细胞数,以粘附指数表示。粘附指数为平均100个HeLa细胞中有6个以上细菌粘附的HeLa细胞数。

$$\text{粘附百分率}=\frac{\text{实验孔粘附指数}}{\text{对照孔粘附指数}}\times 100\%$$

细菌粘附抑制率=100%-粘附百分率

1.3 EPEC粘附小肠粘膜的实验方法

参考Yamamoto等[4]方法,并作部分修改。将含肉汤培养

作者简介:王凤英(1965-),女,四川省高市县人,博士研究生,副主任护师,主要从事围产期胎儿/新生儿的治疗及护理方面的研究。电话:(023)68754000-73003

收稿日期:2000-10-15;修回日期:2001-01-10

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

基的 EPEC 菌液分为两部分, 一部分加初乳, 另一部分不加初乳作为对照。将含初乳和未含初乳的菌液分别加入装有肠粘膜的培养皿中进行孵育。加入 EPEC3310 菌株(中国药品生物制品检定所产品)菌液 1.5 ml, 1403 菌株(成都生物制品研究所产品)菌液 40 μl, 孵育时间分别为 30 min 和 3.5 h。孵育后肠粘膜用 PBS 冲洗, 3% 戊二醛固定, 离子溅金, 电镜下(3 500 倍)计数 20 个视野中粘附的细菌数。粘附指数为平均每个视野粘附的细菌个数。

1.4　统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 细菌对肠粘膜的粘附指数用 t 检验分析, 其余数据采用计算机统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　不同婴儿食品对 EPEC 粘附 HeLa 细胞的影响

在加有母乳的实验孔中, 细菌粘附指数均明显低于对照孔, 而加牛乳和利多精奶粉的实验孔与对照孔比较无明显差异。此外, 加有初乳的实验孔的细菌粘附指数明显低于加牛乳和利多精奶粉者, 见表 1、图 1。

表 1　母乳及其它婴儿食品对 EPEC 粘附指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Adherence index of EPEC to HeLa cells in the presence of human milk and other infant foods($\bar{x} \pm s$)

	Control (n=6)	CM (n=6)	FM (n=6)	Colostrum (n=10)	HM_1 (n=10)	HM_2 (n=10)	HM_3 (n=9)	HM_4 (n=10)
Strain 1408	38±12.7	26.7±6.2	26±10.5	2.1±2.6 *△	4.1±5.3 *△	10.4±6.0 *	9.1±6.5 *	7.8±4.2 *
Strain44450	24±7.3	16.8±3.5	22±11.1	2.0±2.0 *△	6.3±8.4 *	9.5±7.0	10.6±9.2	7.8±6.6

*: $P<0.05$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* BM and FM

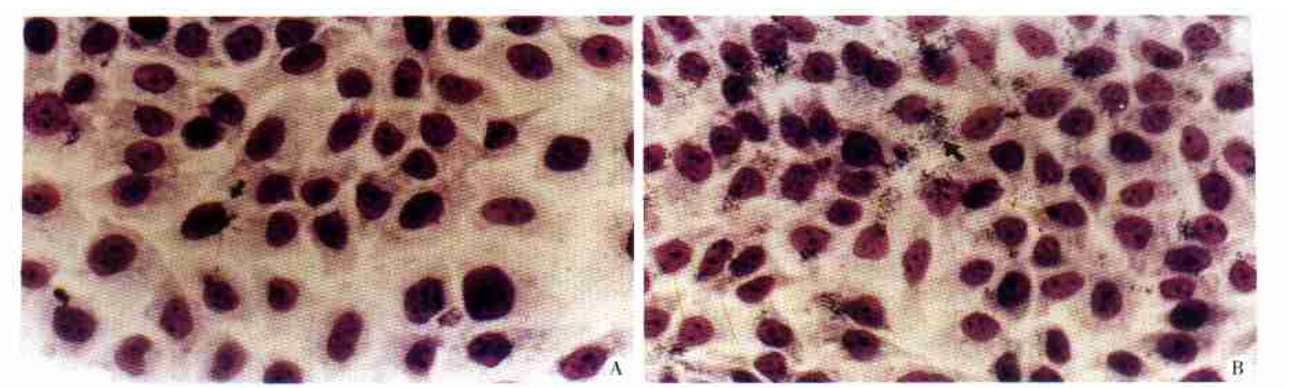


图 1　EPEC 粘附 HeLa 细胞的光镜图像　(× 400)　A: 加初乳; B: 加牛乳

Fig 1　Light micrographs of EPEC adhered to HeLa cells　(× 400)　A: Colostrum; B: Cow's milk

在出生后 2~5 d 的人工喂养儿的粪便滤过液和母乳喂养儿的粪便滤过液中, 1408 菌株的粘附指数无明显差异($P>0.05$), 但 1408 菌株和 44450 菌株在其余母乳喂养儿的粪便滤过液中的粘附指数均显著低于同时期人工喂养儿粪便滤过液中的粘附指数, 见表 2。不同婴儿食品和不同喂养方式的婴儿粪便对 EPEC 粘附的抑制率分别见表 3、4, 母乳对 EPEC 粘附 HeLa 细胞的抑制率均高于牛乳及利多精奶粉, 其中初乳的抑制率最高。此外, 母乳喂养儿的粪便滤过液对 EPEC 的抑制率也高于人工喂养儿粪便的抑制率。尽管人工喂养儿 2~5 d 的粪便对 1408 菌株表现出较高的抑制率, 但对 44450 菌株的抑制率很低, 一月后的粪便对两株细菌均无明显抑制效果。无论婴儿食品还是婴儿粪便滤过液, 对 1408 菌株的抑制率均高于 44450 菌株。

表 2　婴儿粪便滤液对 EPEC 粘附指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Adherence index of EPEC to HeLa cells in the presence of filtrate of infant feces($\bar{x} \pm s$)

	Breast-feeding group		Formula-feeding group	
	2~5 d (n=10)	1~4 month (n=10)	2~5 d (n=10)	1~4 month (n=10)
Strain 1408	7.3±3.4	10.1±6.4	10.0±5.0	28.1±9.8 *
Strain44450	4.7±3.9	9.0±2.4	21.8±9.0 *	24.8±5.9 *

*: $P<0.01$ *vs* breast-feeding group

2.2　初乳对 EPEC 粘附肠粘膜的影响

EPEC1403 菌株在有初乳和无初乳孵育的肠粘膜上的粘附指数分别为 1.3±1.7 和 7.4±4.2, 前者的细菌粘附指数明显低于后者。在 EPEC3310 菌株, 有初乳孵育的肠粘膜未见到或只见到个别可疑的细菌, 而未加初乳者, 细菌则呈密集丛状粘附于肠粘膜, 见图 2。

表 3　母乳及婴儿食品对细菌粘附的抑制率(%)

Tab 3　Percentage of inhibition of EPEC adhesion to HeLa cells by breast milk and other infant foods (%)

EPEC strain	CM	FM	Colostrum	HM_1	HM_2	HM_3	HM_4
1408	30	32	94	89	73	76	79
44450	23	8	92	74	60	56	67

表 4　婴儿粪便滤过液对细菌粘附的抑制率(%)

Tab 4　Percentage of inhibition of EPEC adherence to Hela cells by filtrate of infant feces (%)

EPEC strain	Formula-feeding		Breast-feeding	
	2~5 d (n=10)	1~4 month (n=10)	2~5 d (n=10)	1~4 month (n=10)
1408	74	26	81	80
44450	9	0	73	63

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

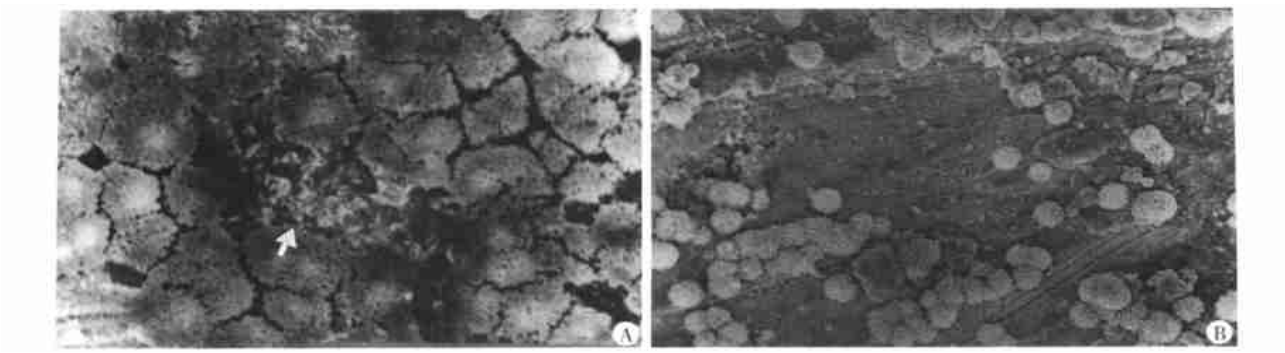


图 2 EPEC 3310 菌株粘附肠粘膜的电镜图像

A: 未加初乳的细菌呈密集丛状粘附于肠粘膜(↑, SEM×1300); B: 加初乳的肠粘膜上未见明显细菌粘附(SEM×700)

Fig 2 Scanning electron micrograph of EPEC 3310 adhering to intestinal mucosa

A: Bacteria displayed clustered on the intestinal mucosa when incubated in the absence of colostrum (SEM× 1300); B: Bacteria incubated with intestinal mucosa in the presence of colostrum, without apparently adhesion of bactreria to mucosa (SEM× 700)

3 讨论

3.1 婴儿食品对EPEC粘附的抑制效果

本研究不但表明初乳和1~4月母乳均能抑制EPEC粘附HeLa细胞, 而且还首次发现初乳能够抑制EPEC对肠粘膜块的粘附, 更进一步说明母乳具有抑制外来致病菌在肠道粘附和定植的作用, 而牛乳和利多精奶粉等人工食品对EPEC无明显抑制作用。母乳抑制细菌粘附的机制除与母乳中IgA等免疫球蛋白有关外, 母乳中的寡糖、脂质及它们的结合物等也可能抑制细菌粘附[2,5]。这些成分作为病原的受体类似物, 可与毒素或细菌结合, 从而抑制毒素活性或抑制细菌对细胞的粘附。另有研究表明母乳在体内、体外均可增加细菌的相互聚集或结合, 并推测可能与其抑制细菌对上皮细胞的粘附作用有关[6]。牛奶及婴儿奶粉中的一些物质也可抑制或减少某些细菌对上皮细胞的粘附, 但其成分与母乳有一定的差异, 即使是相似的物质, 其作用也不尽相同。有人发现人乳的脂肪球能被一种具有S菌毛的大肠杆菌凝集, 而婴儿奶粉脂肪滴和人工脂肪乳不能被这种细菌凝集。此外, 母乳能促进双歧杆菌在婴儿肠道的定植和生长, 后者可产生大量有机酸, 从而降低肠道pH值, 促进肠蠕动, 有利于将外来细菌排除体外并可抑制致病菌和条件致病菌对肠道的粘附、生长及繁殖。

3.2 婴儿粪便对EPEC的抑制作用

我们发现, EPEC在母乳喂养婴儿粪便滤过液中的细菌粘附指数显著低于人工喂养儿粪便滤过液中的粘附指数, 母乳喂养儿粪便对EPEC的抑制率显著高于人工喂养婴儿, 表明母乳喂养儿的肠道对外来细菌具有较强的抑制作用, 这种作用一方面可能是由于母乳中的一些免疫成分如IgA等在婴儿肠道仍具有生物活性[7,8]之故, 另一方面也可能与母乳的其它成分在肠道的代谢产物或残渣等类似EPEC的受体有关。而人工喂养儿的食物中缺乏生物活性成分, 其蛋白质、脂质、糖类等的构成也有别于人乳, 因而不可能具有人乳同样的抑菌效果。但本研究发现, 出生后2~5 d的人工喂养儿粪便滤过液对EPEC1408菌株也有较强的抑制作用, 这是由于喂养本组新生儿的利多精奶粉在婴儿肠道的代谢产物类似于该株细菌的受体, 还是由于胎粪中某些物质的残留作用, 尚不清楚。因为曾有研究表明胎粪具有一定的抑制细菌粘附的作用[9]。由于母乳具有明显的抑制外来细菌粘附上皮细胞和肠粘膜的作用, 对于保护婴儿胃肠粘膜免受病原菌的侵袭和损害, 具有重要意义。因此应大力提倡和促进母乳喂养。

参考文献:

[1] 王凤英, 史常旭. 初乳对新生儿肠道的保护作用[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(2): 83-86.

[2] Nascimento-de-Araujo A, Giugliao L G. Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent *Escherichia Coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. Coli* (EAEC) to HeLa cells[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 184(1): 91-94.

[3] Camara L M, Carbonare S B, Scaletsky I C, *et al*. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence to Hela cells by human colostrum. Detection of specific SIgA related to EPEC outer-membrane proteins [J]. Adv Exp Med Biol, 1995, 371A: 673-676.

[4] Yamamoto T, Koyama Y, Matsumoto M, *et al*. Localized, aggregative, and diffuse adherence to Hela cell, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea[J]. J Infect Dis, 1992, 166(6): 1 295-1 310.

[5] Schroten H, Hanisch F G, Plogmann R, *et al*. Inhibiton of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction[J]. Infect Immun, 1992, 60(7): 2 893-2 899.

[6] Gordon A E, Saadi A T, Mackenzie D A, *et al*. The protective effect of breast feeding in relation to sudden infant death syndrome (SIDS): the effect of human milk and infant formula preparaions on binding of Colostridium perfringens to epithelial cells[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 25(1-2): 167-173.

[7] Carbonare S B, Silva M L, Palmeira P. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *Escherichia coli* antigens and their persistence in the feces of a breastfed infant[J]. J Diarrhoeal Dis Res, 1997, 15(2): 53-58.

[8] 王凤英, 史常旭. 早期母乳及婴儿粪便中分泌型免疫球蛋白A含量测定[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(10): 588-590.

[9] Adlerberth I, Svanborg C, Hanson L A, *et al*. Interaction of P-fimbriated *Escherichia coli* with human meconium[J]. FEMS Microbiol Let, 1991, 68(1): 57-62.

(编辑 陈聪连)

(C)1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net