

乳酸杆菌对攻毒小鼠的保护作用和对肠道菌群的影响*

张和平^{1**} 张七斤² 任贵强² 包秋华¹

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018)

摘要 将含有乳酸杆菌 *Lactobacillus casei* Zhang 的悬浮液分组饲喂小鼠,然后分别用 *E. coli* O157 和 K88 攻毒观察发病情况。攻毒 4d 后取对照组和喂菌组未死亡小鼠的肠内容物,用选择性培养基分离纯化大肠杆菌和乳酸菌,提取分离到菌株的总 DNA,进行 ERIC-PCR 扩增分析。发现灌服 *L. casei* Zhang 可以降低攻毒后小鼠的死亡率,在停止饲喂乳酸菌的第 4d 从小鼠肠道内分离到 *L. casei* Zhang,从饲喂组未分离到 *E. coli* O157 和 K88,喂 *L. casei* Zhang 使小鼠肠道中大肠杆菌总数极显著低于对照组。表明所饲喂的乳杆菌可以在小鼠肠道内定殖并对小鼠起到保护作用。

关键词 乳杆菌,拮抗,致病菌

中图分类号:Q937 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0447-04

The Antagonism of *Lactobacillus casei* Zhang to Pathogenic *Escherichia coli* in Mice and the Influence on the Microbial Population in Gut*

ZHANG He-Ping^{1**} ZHANG Qi-Jin² REN Gui-Qiang² BAO Qiu-Hua¹

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education Ministry Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

(Animal Science and Veterinary College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract *L. casei* Zhang soliquoid were fed to mice, after the mice were counteracted toxic *E. coli* O157 and k88, we observed the incidence of mice. We obtained the intestinal contents of mice in control groups and feeding oral lactobacilli groups which were live at the fourth day after they were counteracted toxic *Escherichia coli* O157 and K88, *E. coli* and *Lactobacillus* which were in intestinal contents were isolated and purified by selective medium, and the total DNA of isolated bacterium was extracted, then amplified by ERIC-PCR. We found that Feeden by *L. casei* Zhang can reduce the death rate of mice which were counteracted toxic *E. coli* O157 and k88. After stop feeding lactobacilli at the fourth day, *L. casei* Zhang was isolated from intestinal tract of mice, But *E. coli* O157 and k88 wasn't isolated from groups of fed *L. casei* Zhang. The sum total of *E. coli* of fed *L. casei* Zhang compared with the sum total of *E. coli* of control groups were low significant ($P < 0.01$) very much. The results indicated that *L. casei* Zhang can adhere and grow in the gut of mice and play a part in protection to mice.

Key words :*Lactobacilli*, Antagonism, Pathogenic bacterium

由于各种抗生素广泛长期的应用,一方面使耐药菌株增加,耐药因子迅速扩散,另一方面引起肠道菌群紊乱,造成肠道功能失调。对于那些由抗生素引起的顽症和毒副作用,临床医学界主张采用生物防治方法,即以菌治菌,调整肠道微生态环境,重新建立起肠道正常菌群的平衡,保证机体正常的生理功能,达到预防和治疗的目的。大量的研究表明一些乳酸菌活菌制剂具有抑制病原菌的生长和繁

殖、调节肠道菌群等益生作用。

L. casei Zhang 是一株分离自内蒙古传统发酵酸马乳中的乳杆菌,研究证实具有耐酸、耐胆盐、降胆固醇及免疫调节作用^[1 2 3 4]。本试验从 *L. casei* Zhang 对小鼠肠道内的 *E. coli* O157 和 K88 的拮抗作用和对肠道菌群的影响进行了研究。

* 国家自然科学基金项目(No.30460009, No.30560097);

国家高科技研究发展计划(863 计划)(No.2006AA10Z345)

** 通讯作者 Tel 0471-4319940, E-mail jhepingdd@vip.sina.com

收稿日期:2006-07-13, 修回日期:2006-09-25

1 材料与方法

1.1 菌种来源及试剂

L. casei Zhang 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室分离保存;致病性 *E. coli* O157 购自中国生物药品鉴定所;致病性 *E. coli* K88 购自中国农科院兽医研究所。 *premix* Taq 酶购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 动物分组及灌服 *L. casei* Zhang

将昆明系小白鼠随机分为 6 组,每组 18 只,自由采食,自由饮水。对照组 1 和 2 不灌服 *L. casei* Zhang 菌液;A、B、C 和 D 灌服 *L. casei* Zhang 菌液(活菌数为 2×10^8 cfu/mL),剂量为每天 10mL/kg·bw,各组的剂量随体重增加而增加灌服量,每日/次,连续灌服 15d。

1.3 *E. coli* O157 和 K88 攻击小鼠

连续饲喂 *L. casei* Zhang15d 后,对照组 1 以及 A、B 组灌服 *E. coli*O157,剂量为 0.6mL/只;对照 2 组及 C、D 组灌服 *E. coli* K88,剂量为 0.6mL/只,并且 A、C 组停止灌服 *L. casei* Zhang 菌液,B、D 组继续灌服 *L. casei* Zhang 菌液,连续 5 天观察并记录各组小鼠的发病情况。

1.4 肠道菌群的选择性计数

宰杀 A、C 组停止灌服乳酸菌液第 4d 的及对照组未发病的小鼠,每组 3 只,取肠道内容物用选择性培养基对大肠杆菌和乳酸菌计数。

1.5 ERIC-PCR(Enterobacterial Repetitive Inter-genic Consensus Sequence-PCR)扩增

根据 Versalovic J 等^[5]报道的 ERIC-PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,上游引物序列 ERIC1R:5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTCAC-3';下游引物序列 ERIC2:5'-AAGTAAGTGA CTGGG GTG AGCG-3'。采用 CTAB 法提取从各组分离纯化的大肠杆菌^[6]和乳酸菌单个菌落的基因组总 DNA,稀释后作为 PCR 扩增的模板,采用 25μL 反应体系进行 PCR 扩增;*premix* Taq 12.5μL,引物 1.5μL(各 25pmol),基因组模板 2μL(约 100ng),DEPC 水 9μL。PCR 反应条件是 95℃ 预变性 7min;90℃ 变性 30s,52℃ 退火 1min,65℃ 延伸 8min,35 个循环后 65℃ 延伸 16min。取 5μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *L. casei* Zhang 对 *E. coli*O157 及 K88 攻击小鼠的保护作用

连续饲喂 *L. casei* Zhang15d 后对照组 1 及 A、B 组用 *E. coli*O157 攻击,对照 2 组及 C、D 组用 *E. coli*K88 攻击,以及 B、D 组继续连续灌服 *L. casei* Zhang 活菌液 5d 后,各组小鼠的死亡情况见表 1。由表 1 结果可知,未灌服 *L. casei* Zhang 的小鼠用 *E. coli*O157 攻毒后在 5d 内共死亡 12 只,死亡率为 66.67%,A、B 组 5d 内的死亡率分别为 16.67% 和 5.56%,说明灌服 *L. casei* Zhang 可以大大降低因 *E. coli*O157 攻毒造成的小鼠死亡率,特别是攻毒后继续灌服 *L. casei* Zhang 可以进一步降低小鼠的死亡率。同样,灌服 *L. casei* Zhang 也可以降低由 *E. coli*K88 引起的小鼠死亡率,虽然其效果表面上看起来不像 *E. coli*O157 攻毒那样明显,这主要可能是 *E. coli*K88 菌株对小鼠的致死性不及 *E. coli*O157 强。

表 1 *E. coli*O157 及 K88 攻击后各组小鼠的死亡数(只)

Groups	Total number	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day	Total died number
Control 1	18	0	2	6	3	1	12
A	18	0	0	2	1	0	3
B	18	0	0	1	0	0	1
Control 2	18	0	0	2	1	0	3
C	18	0	0	1	0	0	1
D	18	0	0	1	0	0	1

2.2 *L. casei* Zhang 对小鼠肠道乳酸菌和大肠杆菌菌群的影响

从连续饲喂 *L. casei* Zhang15d 和攻毒后停止灌服乳酸菌液第 4d 小鼠的肠道内容物中用选择性培养基对大肠杆菌和乳酸菌进行选择计数(每组 3 只),见表 2。

由表 2 可见,在攻毒后停止饲喂乳酸菌的第 4 天从小鼠肠道内仍分离到 *L. casei* Zhang 且数量很高,而且喂 *L. casei* Zhang 使小鼠肠道中大肠杆菌总数极显著低于对照组。

2.3 ERIC-PCR 对小鼠肠道乳酸菌和大肠杆菌菌群的检测

一般同种细菌的 rDNA 区域高度保守,用 ERIC-PCR 可以反映肠道内大肠杆菌、乳酸杆菌不同菌株

间的多样性^[5 7 8]。以分离到的大肠杆菌和乳酸杆菌菌株以及和标准菌株的 DNA 为模板进行 ERIC-PCR 扩增, 扩增产物的电泳图谱显示大多数分离菌株间

的 ERIC-PCR 图谱有差异, 表明 ERIC-PCR 分析可以揭示非常丰富的个体水平上的多样性。根据分离株间图谱的异同来判断是否为同一菌株。

表 2 在饲喂 *L. casei* Zhang 15d 和攻毒后停止饲喂乳酸菌第 4d 小鼠肠道菌群的选择性计数(cfu/g)

	Bacterium	Control 1	Control 2	Group A	Group C
At the 15th day after feeding	Lactobacilli	(4.61 ± 0.29) × 10 ^{6B}	(4.20 ± 0.24) × 10 ^{6B}	(3.11 ± 0.11) × 10 ^{9Aa}	(2.67 ± 0.08) × 10 ^{9Aa}
<i>L. casei</i> Zhang to mice	<i>E. coli</i>	(4.13 ± 0.37) × 10 ⁶	(3.85 ± 0.17) × 10 ⁶	(5.02 ± 0.36) × 10 ^{4b}	(3.26 ± 0.28) × 10 ^{4b}
At the 4th day after counteracting	Lactobacilli	(5.06 ± 0.23) × 10 ^{6Bb}	(5.21 ± 0.19) × 10 ^{6Bb}	(1.24 ± 0.25) × 10 ^{8Aa}	(1.68 ± 0.08) × 10 ^{8A}
toxic <i>E. coli</i> to mice	<i>E. coli</i>	(2.83 ± 0.26) × 10 ^{8a}	(1.95 ± 0.26) × 10 ^{8a}	(2.53 ± 0.20) × 10 ^{6b}	(2.17 ± 1.72) × 10 ^{6b}

注: 横向比用大写字母表示, 竖向比用小写字母表示, 字母不同表示差异极显著(*P* < 0.01)

从 A、C 组分离的乳酸杆菌以及 *L. casei* Zhang 的 ERIC-PCR 电泳结果见图 1, 将图 1 结果用 NTSYS2.1 软件聚类分析见图 2, 以相似性系数 0.8 为界可以将从 A、C 组分离的乳酸杆菌分为 6 类, 由图 2 可知菌 10 与已知菌 1(*L. casei* Zhang)为同一菌株, 所以 10 为 *L. casei* Zhang, 7 和 9 为同一菌株, 4、5、6、8、13、14、15 为未知的同一菌株, 11 与 12 为同一菌株。

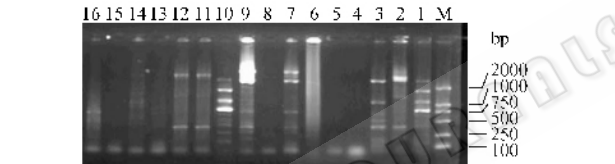


图 1 从 A、C 组分离的乳酸杆菌的 ERIC-PCR 的电泳图
M DL2000 Marker, 1 *L. casei* Zhang 2 ~ 16 从 A、C 组分离的乳酸杆菌

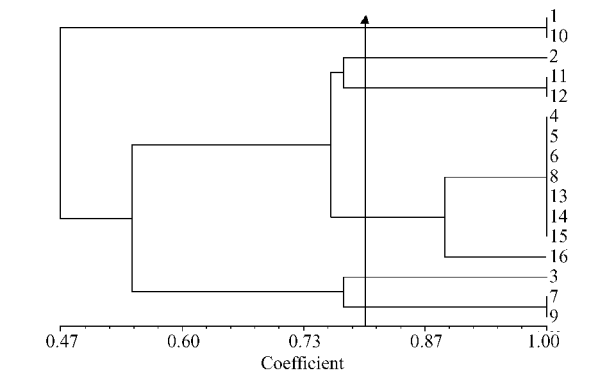


图 2 从 A、C 组分离的乳酸杆菌 NTSYS 软件聚类分析
1 *L. casei* Zhang 2 ~ 16 从 A、C 组分离的乳酸杆菌

对攻毒后的第 4d 从对照组分离的大肠杆菌以及标准菌株 *E. coli* O157 和 k88 进行 ERIC-PCR 电泳见图 3, 将图 3 结果用 NTSYS2.1 软件聚类分析见图 4, 由图 4 可以看出 1 和 2 为同一菌株, 均为

E. coli O157 3 和 14 为同一菌株, 均为 *E. coli* K88, 这表明在攻毒后的第 4d 从对照组分离到了 *E. coli* O157 和 k88。



图 3 从对照组分离的大肠杆菌 ERIC-PCR 电泳图谱
M DL2000 Marker, 1 *E. coli* O157, 3 *E. coli* k88
2、4 ~ 16 从对照组分离的大肠杆菌

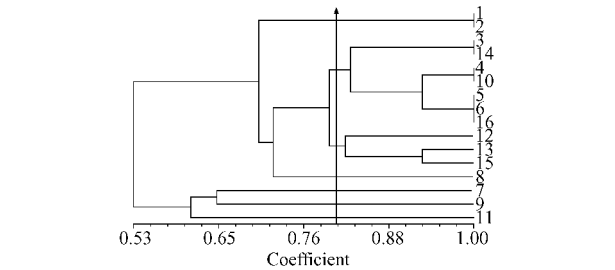


图 4 从对照组分离的大肠杆菌
NTSYS2.1 软件聚类分析

对连续灌服乳酸菌的 B、D 组分离的大肠杆菌进行 ERIC-PCR 电泳见图 5, 由图 5 可以看出 7 和 8 为同一菌株, 更重要的是没有分离到 *E. coli* O157 和 K88, 这说明 *E. coli* O157 和 K88 由于乳杆菌对其抑制从而使致病菌的数量下降。

3 结论

乳酸杆菌在预防肠道疾病及治疗腹泻方面有着重要意义。乳酸杆菌通过磷壁酸与肠粘膜上皮细胞形成一个生理屏障, 提高定殖阻力, 对致病菌

和条件致病菌的入侵有拮抗作用^[9,10]。本试验研究表明 *L. casei* Zhang 菌株能够在小鼠肠道内定殖和生长,并能起到保护肠道拮抗有害菌的作用,乳杆菌 *L. casei* Zhang 对致病菌的拮抗作用可使肠道内大肠杆菌数量下降。经连续饲喂活性乳酸杆菌的小鼠攻毒后停止饲喂乳酸杆菌,仍然可以产生保护力。



图5 从 B、D 组分离的大肠杆菌的 ERIC-PCR 电泳图谱

M DL2000 Marker, 2 *E. coli* O157, 3 *E. coli* k88

1、4~15 从 B、D 组分离的大肠杆菌

参考文献

- [1] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 中国乳品工业, 2005, 33(6): 4~9.
- [2] 孟和毕力格, 乌日娜, 王立平, 等. 中国乳品工业, 2004, 32(11): 6~11.
- [3] 云月英, 王立平, 张和平, 等. 微生物学通报, 2006, 33(3): 60~64.
- [4] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 中国乳品工业, 2006, 34(4): 4~10.
- [5] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Nucleic acids research, 1991, 19(24): 6823~6831.
- [6] 张美玲, 周志华, 赵立平. 微生物学通报, 2005, 32(2): 5~9.
- [7] Shuhaimi M, Ali A M, Saleh N M. *et al.* Biotechnology Letters, 2001, 23: 731~736.
- [8] George D D, Lidia S W, Ramon J S, *et al.* Current Microbiology, 1999, 38: 217~223.
- [9] Harshamjit S Gill, Quan Shu, Hai Lin, *et al.* Med Microbiol Immunol, 2001, 190: 97~104.