

## 乳杆菌抑制金黄色葡萄球菌对 HeLa 细胞的粘附

王江<sup>1</sup>, 张瑞芬<sup>2</sup>, 周莉<sup>3</sup>, 苏小虎<sup>3</sup>, 胡春红<sup>4</sup>, 朱宝利<sup>2</sup>, 冯涛<sup>1</sup>

1 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 惠斯康健康科技(北京)有限公司, 北京 100086

4 中国科学院大气物理研究所, 北京 100029

王江, 张瑞芬, 周莉, 等. 乳杆菌抑制金黄色葡萄球菌对 HeLa 细胞的粘附. 生物工程学报, 2012, 28(6): 715-725.

Wang J, Zhang RF, Zhou L, et al. *Lactobacillus* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 715-725.

**摘要:** 对弯曲乳杆菌 *Lactobacillus crispatus* T79-3 和 T90-1、詹氏乳杆菌 *Lactobacillus jensenii* T118-3 和 T231-1 四株乳杆菌对金黄色葡萄球菌生长的抑制效果以及抑菌成分进行了分析, 比较乳杆菌排除、竞争、置换 3 种不同作用方式对金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞的抑制作用。结果表明 4 株乳杆菌皆能抑制金黄色葡萄球菌的生长及其粘附 HeLa 细胞的能力, 分析发现 4 株乳杆菌发挥抑制作用的主要成分是有有机酸, 同时比较分析乳杆菌 3 种不同作用方式发现它们对金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞的抑制效果不同, 其中, 排除作用方式效果最好。另外, 乳杆菌对金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞的抑制作用具有浓度依赖性, 随着乳杆菌浓度增大, 抑制作用增强并逐渐达到饱和。4 株乳杆菌中, T79-3 粘附能力最强, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强, 排除作用方式抑制金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞作用效果较好, 提示乳杆菌 T79-3 有可能作为益生菌防治妇女泌尿生殖道感染。

**关键词:** 乳杆菌, 金黄色葡萄球菌, 粘附, HeLa 细胞

**Received:** October 31, 2011; **Accepted:** December 29, 2011

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB513002), Project of Beijing Municipal Science and Technology (No. D09050703570906), Open Foundation of National Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University (No. 2009KF12).

**Corresponding author:** Tao Feng. Tel: +86-23-68485627; E-mail: fengtao9\_9@yahoo.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB513002), 北京市科技计划 (No. D09050703570906), 浙江大学医学院第一附属医院传染病诊治国家重点实验室开放基金 (No. 2009KF12) 资助。

## *Lactobacillus* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells

Jiang Wang<sup>1</sup>, Ruifen Zhang<sup>2</sup>, Li Zhou<sup>3</sup>, Xiaohu Su<sup>3</sup>, Chunhong Hu<sup>4</sup>, Baoli Zhu<sup>2</sup>, and Tao Feng<sup>1</sup>

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Healskare Health Technology Co., Ltd, Beijing 100086, China

4 Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China

**Abstract:** To assess the ability of the previously selected human vaginal isolates of *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*) T79-3, T90-1 and *Lactobacillus jensenii* (*L. jensenii*) T118-3, T231-1 to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and block their adhesion to HeLa cells. The inhibitory bioactive substances produced by these *Lactobacillus* were also identified. Inhibitory substances interaction tests were carried out by using a streak-diffusion method on agar plates. Three types of interaction were performed to determine the inhibitory effect of *Lactobacillus* on adhesion of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells: Exclusion Group (*Lactobacillus* and HeLa followed by pathogens), Competition Group (*Lactobacillus*, HeLa and pathogens together) and Displacement Group (pathogens and HeLa followed by the addition of *Lactobacillus*). The number of HeLa cells adhered to *Staphylococcus aureus* was quantified by bacteria colony counts on LB plate. The results showed that lactic acids produced by the *Lactobacillus* are the main substances that can inhibit *Staphylococcus aureus* growth and there is variation among the three types of interaction regarding the inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*. The effects of *Lactobacillus* on blocking the adhesion to HeLa cells were concentration dependent. All four *Lactobacillus* isolates displayed the ability to inhibit *Staphylococcus aureus* growth and block *Staphylococcus aureus* adherence to HeLa cells. Exclusion Group was the most effective, and T79-3 showed greater capacity to block *Staphylococcus aureus* adherence compared with the other three isolates. The present study suggests the potential ability of *L. crispatus* T79-3 as probiotic for the treatment and prevention of urogenital infections in women.

**Keywords:** *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, adhesion, HeLa cell

细菌性泌尿生殖道感染好发于育龄期妇女, 肠道细菌是引起泌尿生殖道感染的主要病原菌, 肠道细菌上行容易引起阴道、尿道和膀胱感染<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌 (以下简称为金葡菌) 是一种常见条件致病菌, 是引起院内感染和社区感染的主要病原菌。金葡菌与尿路感染关系密切<sup>[2]</sup>, 也是引起女性生殖道感染较为常见的一种病原菌<sup>[3]</sup>。金葡菌还能够引起关节软组织手术感染、败血症、侵袭性心内膜炎及中毒性休克综合症等局部及全身感染性疾病, 中毒性休克综合症主要发生

于育龄期妇女, 尤其是卫生棉条使用者<sup>[4-5]</sup>。由于抗生素的滥用, 泌尿生殖道病原菌 (包括金葡菌) 耐药较普遍, 许多抗生素治疗已不起作用, 抗生素治疗面临巨大挑战, 迫切需要从生物抑菌角度方面寻找一种有效的抗生素替代治疗法。

乳杆菌是健康阴道微环境中的主要菌群 ( $10^7 \sim 10^8$  CFU/g)。它能抑制病原微生物的侵入和过度生长, 调节微生态平衡, 对维护女性生殖道健康起着重要作用<sup>[6]</sup>。阴道乳杆菌通过竞争营养物质, 产生乳酸、过氧化氢和抗菌肽样等活性物

质, 调节阴道微生态平衡、抑制病原菌生长<sup>[7]</sup>。阴道乳杆菌减少或缺失直接增加阴道、尿道感染的几率。因而, 人们对乳杆菌作为益生菌开发用于维持阴道微生态平衡, 防治泌尿生殖道感染产生了浓厚兴趣<sup>[8]</sup>。目前, 乳杆菌制品在调节免疫性疾病, 降低胆固醇, 治疗风湿性关节炎、皮炎, 预防癌症等各方面都有一定疗效<sup>[9]</sup>。乳杆菌制品临床上用于预防感染性疾病有一个很好的基础理论, 而且安全性能高, 但仅少部分乳杆菌制品在临床应用中发挥作用<sup>[10]</sup>, 因此, 仍需继续寻找抑菌效果更好的菌株。

无论是益生菌发挥防御调控功能还是病原菌致病, 粘附定植是关键<sup>[11]</sup>。乳杆菌与上皮细胞粘附结合, 在细胞表面形成菌膜, 增大上皮细胞表面的空间位阻, 阻止外源菌在阴道环境中定植并释放抑菌物质, 实现其抑菌作用。于是, 我们尝试选择一株粘附性能较强的乳杆菌来抑制病原菌在上皮细胞表面粘附定植, 游离的病菌容易被抗菌物质杀死, 随阴道分泌物排出体外<sup>[12]</sup>。前期实验我们对健康育龄期妇女阴道中分离乳杆菌菌株产酸、产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力等相关性能作了相应评估<sup>[13]</sup>。该实验在此基础上, 扩大分离、筛选菌株, 并将得到的 4 株产酸、产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力较高的乳杆菌进行粘附定植以及抑制金葡菌相关方面研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和细胞

菌株 *L. crispatus* T79-3、*L. crispatus* T90-1、*L. jensenii* T118-3、*L. jensenii* T231-1 由实验室从健康育龄期妇女阴道中分离。金葡菌从北京 306 医院胃肠道疾病患者粪便中分离。HeLa 细胞由

实验室保存。阴道上皮细胞分离于健康育龄期妇女。

### 1.2 主要试剂和仪器

Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) 培养基购自美国 OXID 公司, LB 培养基、特级胎牛血清、Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) 培养基购自美国 Hyclone 公司, 革兰氏染液购自北京索莱宝科技有限公司, 0.22 μm、0.8 μm 滤膜购自美国 Millipore 公司, 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司, 离心机购自美国 Beckman 公司, 显微镜购自日本 Olympus 公司, 细胞培养箱等。

### 1.3 乳杆菌抑菌活性检测及有效成分分析

将活化过夜培养的 4 株乳杆菌按 10% 的比例分别接种于 10 mL MRS 液体培养基中并置于 37 °C 培养 8~16 h, 然后再于 37 °C、220 r/min 摇床上培养 3 h, 发酵液过滤除菌后存于 4 °C 备用。金葡菌 (*OD*<sub>600</sub>=0.208) 100 倍稀释后取 100 μL 均匀涂布于 MRS 固体平板上于 4 °C 备用。抑菌活性检测: 取 250 μL 过滤除菌的发酵液分别加入放置在涂有指示菌平板上的牛津杯中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中过夜培养。抑菌成分分析: 有机酸抑菌作用检测, 过滤除菌的发酵液用蛋白酶 K (终浓度 0.1 g/L) 和过氧化氢酶 (终浓度 0.5 g/L) 处理。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑菌作用检测, 中和发酵液 pH (pH 6.3) 并用蛋白酶 K (终浓度 0.1 g/L) 处理。细菌素样复合物抑菌作用检测, 中和发酵液 pH (pH 6.3) 并用过氧化氢酶 (终浓度 0.5 g/L) 处理。将处理好的发酵液各取 250 μL 分别加入置于涂有指示菌平板上的牛津杯中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中过夜培养, 观察照相<sup>[14]</sup>。

#### 1.4 不同酸性缓冲介质对乳杆菌粘附阴道上皮细胞的影响

PBS (pH 7.4) 缓冲介质组: 500  $\mu\text{L}$  阴道上皮细胞浓度为  $10^5$  个/mL 的 PBS 与 500  $\mu\text{L}$  乳杆菌浓度为  $10^8$  CFU/mL 的 PBS 等比例混合。Mcilvaine 缓冲液 (pH 4.4) 缓冲介质组: 500  $\mu\text{L}$  阴道上皮细胞浓度为  $10^5$  个/mL 的 Mcilvaine 缓冲液与 500  $\mu\text{L}$  乳杆菌浓度为  $10^8$  CFU/mL 的 Mcilvaine 缓冲液等比例混合。细胞与细菌混合后置于  $37^\circ\text{C}$  摇床 100 r/min 孵育 1 h, 然后用 0.8  $\mu\text{m}$  滤膜过滤清洗游离乳杆菌并将滤膜轻压于盖玻片上, 固定细胞进行革兰氏染色后油镜观察, 分别计数 20 个细胞粘附细菌数, 计算每个细胞粘附细菌数<sup>[15-16]</sup>。

#### 1.5 乳杆菌对 HeLa 细胞的粘附作用

500  $\mu\text{L}$  浓度为  $10^5$  个/mL HeLa 细胞接种于 24 孔培养板中, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中过夜培养, 将过夜培养的 HeLa 细胞用 PBS 清洗 3 次并加入 500  $\mu\text{L}$  DMEM 细胞培养基。取 500  $\mu\text{L}$ , 浓度为  $10^8$  CFU/mL 活化过夜培养的乳杆菌加入含有 500  $\mu\text{L}$  DMEM 细胞培养基的 24 孔培养板中, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  环境中孵育 2 h, 然后用 PBS 清洗 4 次, 0.25% 的胰酶消化 4~5 min, 再用 350  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基终止消化, 并吹打混匀, 取 100  $\mu\text{L}$ ,  $10^4$  倍稀释菌液涂布 MRS 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养计数。取 3 次平行测定的平均值<sup>[17]</sup>, 同时进行革兰氏染色观察。

#### 1.6 不同浓度乳杆菌对金葡菌粘附 HeLa 细胞的抑制实验

活化过夜培养的乳杆菌 *L. crispatus* T79-3、*L. crispatus* T90-1 菌液经梯度稀释后, 取

$10^6\sim 10^9$  CFU/mL 4 个浓度梯度菌液分别与活化过夜培养的金葡菌 ( $10^8$  CFU/mL) 等体积混合, 然后再将 500  $\mu\text{L}$  混合菌液加入含有 500  $\mu\text{L}$  DMEM 细胞培养基的 HeLa 细胞中,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育 2 h, 用 PBS 清洗 4 次, 0.25% 的胰酶消化 4~5 min, 再用 350  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基终止消化, 并吹打混匀, 取 100  $\mu\text{L}$ ,  $10^4$  倍稀释菌液涂布 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养计数, 取 3 次平行测定的平均值。将金葡菌直接加入 HeLa 细胞中孵育、清洗后进行革兰氏染色作对照<sup>[18]</sup>。

#### 1.7 乳杆菌不同作用方式对金葡菌粘附 HeLa 细胞的抑制实验

将活化过夜培养的乳杆菌和金葡菌离心、弃上清, 并用 PBS 清洗菌液沉淀 2 次, 再用 DMEM 溶解沉淀, 调整菌液浓度为  $10^8$  CFU/mL 备用。实验分为 4 组: 1) 空白对照组, 向 HeLa 细胞中加入 250  $\mu\text{L}$  金葡菌, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  环境中孵育 2 h; 2) 排除实验组, 向 HeLa 细胞中加入 250  $\mu\text{L}$  乳杆菌, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  环境中孵育 1 h 后加入 250  $\mu\text{L}$  金葡菌, 再孵育 1 h; 3) 竞争实验组, 乳杆菌液与金葡菌液按 1:1 比例混合后取 500  $\mu\text{L}$  加入 500  $\mu\text{L}$  由 24 孔板培养的单层 HeLa 细胞培养基中,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育条件下 2 h; 4) 置换实验组, 向 HeLa 细胞中加入 250  $\mu\text{L}$  金葡菌,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育 1 h 后加入 250  $\mu\text{L}$  乳杆菌再孵育 1 h。孵育结束后, 用 PBS 清洗细胞 4 次, 将游离细菌洗净, 滴加 150  $\mu\text{L}$  胰酶消化细胞 4~5 min, 再用 350  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基终止消化, 并吹打混匀, 取 100  $\mu\text{L}$ ,  $10^4$  倍稀释菌液涂布 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养计数, 取 3 次平行测定的平均值<sup>[19]</sup>。

## 1.8 统计分析

在 SPSS 中利用单因素方差分析统计方法, 比较 4 株乳杆菌粘附 HeLa 细胞的能力以及抑制金葡萄菌粘附 HeLa 细胞能力是否具有显著性差异, 同时在方差齐性的基础上两两比较, 比较排除、竞争和置换 3 种作用方式之间是否存在显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳杆菌的抑菌活性及抑菌成分分析

抑菌实验结果表明本研究中分离到的 4 株乳杆菌对金葡萄菌皆有不同程度抑制作用, 其中 T79-3、T118-3 对金葡萄菌的抑菌圈直径明显大于 T90-1 和 T231-1, 说明 T79-3、T118-3 具有较强的抑菌能力 (图 1A)。分别对 4 株乳杆菌的抑菌成分进行分析, 将乳杆菌发酵液用蛋白酶 K 和过氧化氢酶处理后, 仅保留有机酸性物质, 其抑菌效果与初始发酵液的抑菌效果几乎一致 (图 1B-a

和 1B-b), 而未用蛋白酶 K 和过氧化氢酶处理, 仅调整发酵液 pH 时乳杆菌发酵液对金葡萄菌无抑菌作用 (图 1B-c 和 1B-d), 表明 4 株乳杆菌抑制金葡萄菌生长的主要成分是有有机酸。

### 2.2 不同酸性缓冲介质对乳杆菌粘附阴道上皮细胞的影响

不同 pH 缓冲介质中乳杆菌粘附上皮细胞能力不同。PBS (pH 7.4) 缓冲介质中上皮细胞粘附细菌数为 13.6 CFU/个 (图 2A); Mcilvaine (pH 4.4) 缓冲介质中上皮细胞粘附细菌数为 59.5 CFU/个 (图 2B)。酸性环境有利于乳杆菌与阴道上皮细胞的粘附。

### 2.3 乳杆菌对 HeLa 细胞的粘附作用

粘附实验结果表明 4 株乳杆菌对 HeLa 细胞均具有一定的粘附作用 (图 3)。计数粘附细菌数进行数据统计学分析可知 4 株乳杆菌粘附 HeLa 细胞的能力具有显著性差异 ( $P=0.002<0.05$ ), 其中 *L. crispatus* T79-3 粘附能力最强, *L. jensenii*

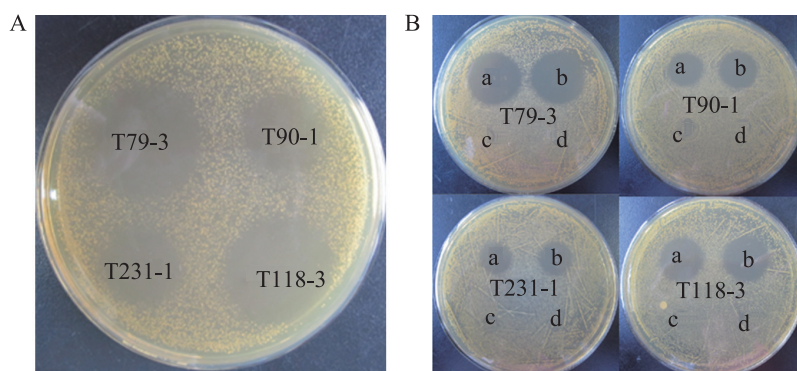


图 1 乳杆菌的抑菌活性比较及抑菌成分分析

Fig. 1 Comparison of the inhibition ability and determination of the bioactive substances of the four *Lactobacillus*. (A) Comparison of the inhibition ability of the four *Lactobacillus* to *Staphylococcus aureus*. (B) Determination of the bioactive substances of the four *Lactobacillus* that inhibit *Staphylococcus aureus*. a, b, c and d represent the cell-free supernatant activity, acids-dependent activity, bacteriocin-like compound-dependent activity and  $H_2O_2$ -dependent activity, respectively.

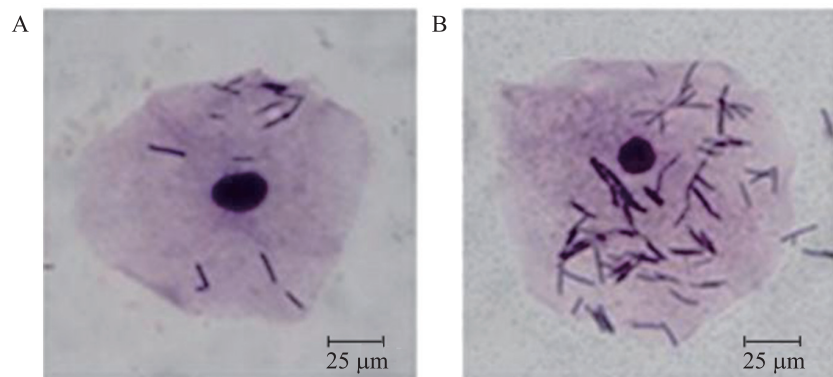


图 2 不同酸性缓冲介质对乳杆菌粘附阴道上皮细胞的影响

Fig. 2 Effect of different pH buffer on the probiotic vaginal *Lactobacillus* on *in vitro* adhesion of vaginal epithelial cells. (A) The number of adhered *Lactobacillus* to vaginal epithelial cell in PBS (pH 7.4) as observed by light microscope after Gram staining. (B) The number of adhered *Lactobacillus* to vaginal epithelial cell in McIlvaine buffer (pH 4.4) as observed by light microscope after Gram staining.

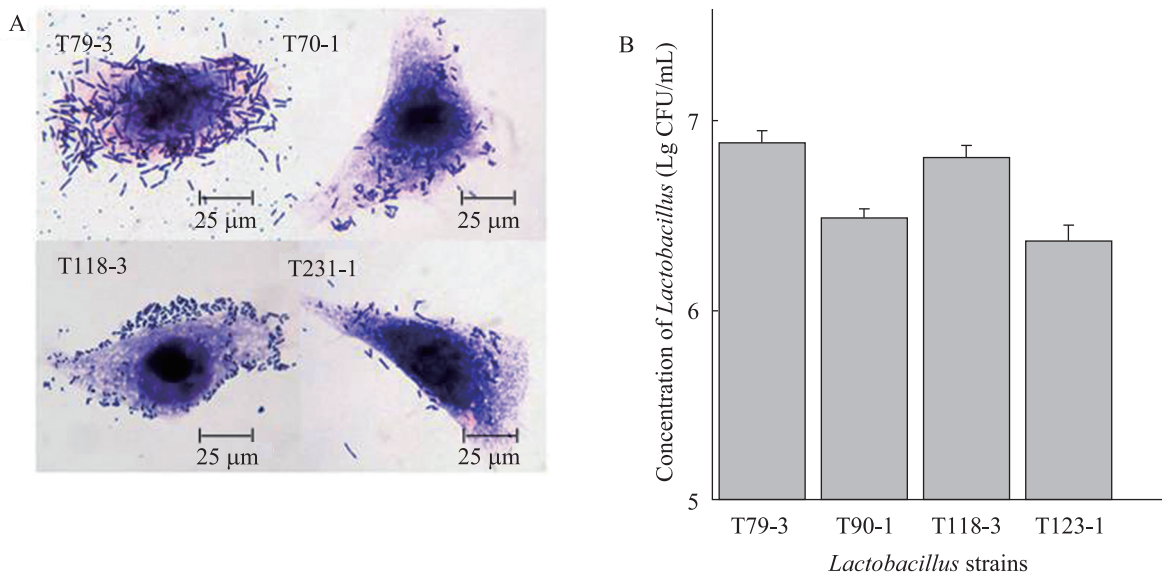


图 3 四株乳杆菌与 HeLa 细胞粘附作用比较

Fig. 3 Comparison of the adhesive ability of the four *Lactobacillus* to HeLa cells. (A) Adhered *Lactobacillus* on HeLa cell in one random microscopic field. (B) The number of bacterial cells adhered to HeLa cell.

T118-3 次之, 而 *L. crispatus* T90-1 和 *L. jensenii* T231-1 较弱。此外, 细胞形态观察表明 (图 2) *L. crispatus* T79-3 菌体较 *L. crispatus* T90-1、*L. jensenii* T231-1 大, 皆为短杆菌, 而 *L. jensenii* T118-3 菌体最小, 似球杆菌。

#### 2.4 不同浓度乳杆菌对金葡菌粘附 HeLa 细胞作用的影响

金葡菌对 HeLa 细胞有较强的粘附能力 (图 4A), 为了确定不同浓度乳杆菌对金葡菌粘附 HeLa 细胞的影响, 我们对 4 株菌中的 T97-3 和 T90-1 进行了粘附抑制实验。结果显示这 2 株乳杆菌对金葡菌粘附 HeLa 细胞的抑制作用均具有浓度依赖性 (图 4B)。随着乳杆菌浓度增加, 对金葡菌的抑制作用逐渐增强, 粘附 HeLa 细胞的金葡菌数量减少。菌株 *L. crispatus* T90-1 在浓度为  $10^8$  CFU/mL 时抑制作用达到饱和, 此时乳杆

菌浓度增加, 对金葡菌的抑菌作用变化不明显。

#### 2.5 乳杆菌不同作用方式对金葡菌粘附 HeLa 细胞作用的影响

为了确证乳杆菌抑制金葡菌粘附 HeLa 细胞的最佳作用方式, 我们对排除、竞争和置换 3 种不同作用方式的效果进行了评价。结果表明 3 种不同作用方式对金葡菌粘附 HeLa 细胞抑制效果各不相同, 但无论哪种方式下, 与对照组相比, 乳杆菌对金葡菌粘附 HeLa 细胞均具有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。不同作用方式之间的比较表明, 竞争和置换两种方式间抑菌效果无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 而排除实验组抑菌效果与竞争实验组和置换实验组之间具有显著性差异 ( $P$  值分别为 0.001 和 0.011, 均小于 0.05), 其中排除实验组对金葡菌的粘附抑制能力最强, 置换实验组的抑制能力最弱。

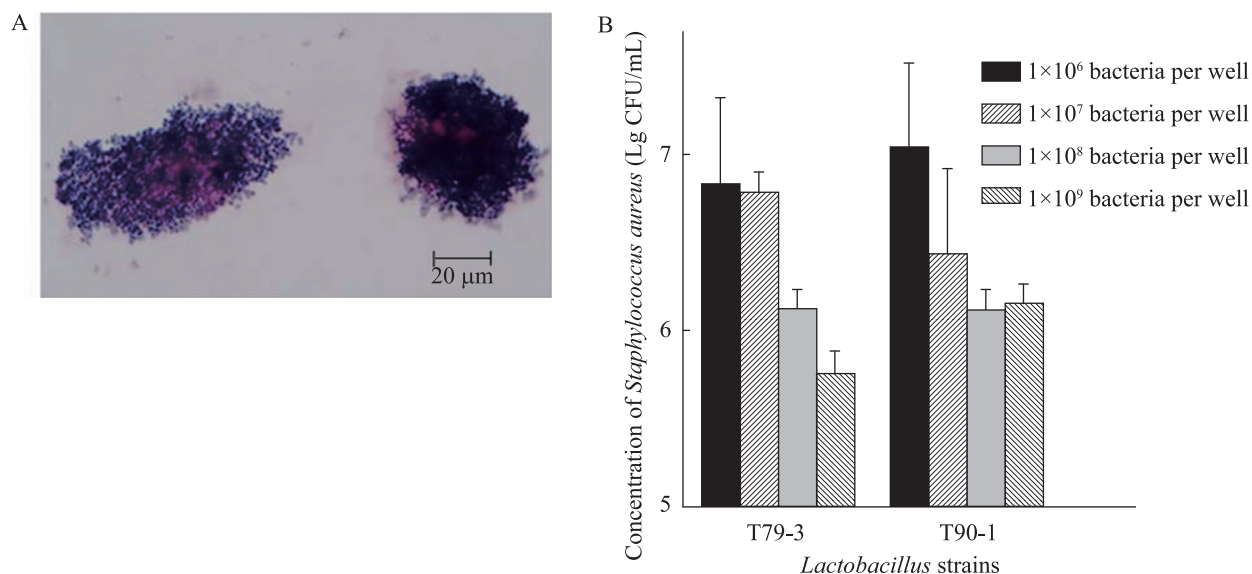


图 4 不同浓度乳杆菌对抑制金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞的影响

Fig. 4 Inhibition of adherence of *Staphylococcus aureus* to HeLa by the different concentration of *Lactobacillus*. (A) Adhered *Staphylococcus aureus* on HeLa cell in one random microscopic field. (B) Each value shown is the  $\bar{x} \pm s$  from four independent experiments.



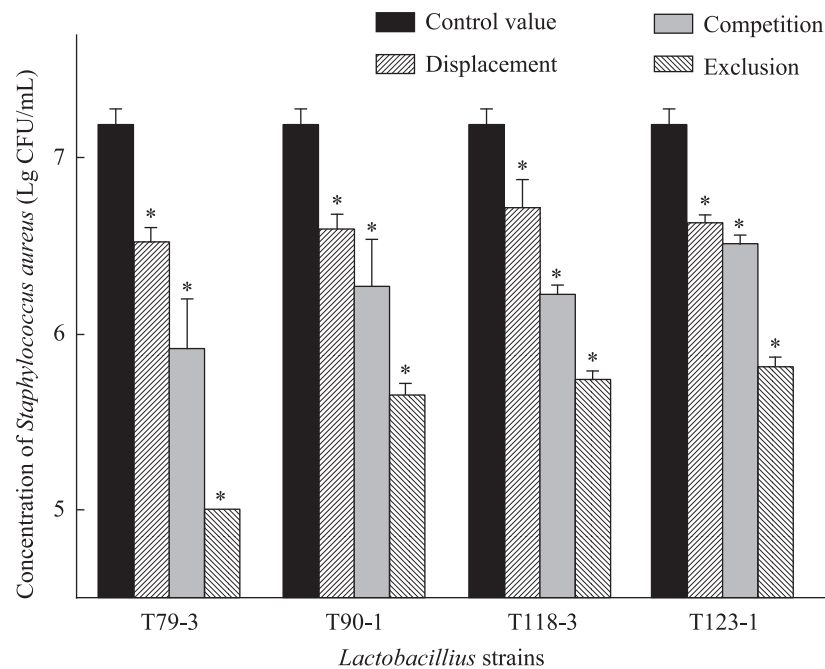


图5 四株乳杆菌不同作用方式对金葡菌粘附 HeLa 细胞的影响

Fig. 5 Influence of different interactive manners of *Lactobacillus* on adhesion of *Staphylococcus aureus* to HeLa. Inhibition of adhesion to HeLa of *Staphylococcus aureus*. \*Significantly different from the respective control ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

本研究首先验证了乳杆菌能够抑制金葡菌生长,乳酸发挥了主要抑菌作用。结合相关文献报道,乳杆菌主要通过分解环境中的碳水化合物产生乳酸,提供一个酸性环境 (pH 值 $<4.5$ ) 来抑制病原菌生长<sup>[20]</sup>。模拟酸性内环境,探讨不同 pH 值环境对乳杆菌粘附阴道上皮细胞的影响,发现在相同孵育条件下,不同 pH 环境中粘附结果不同,酸性环境有利于乳杆菌与上皮细胞结合,在该理论基础支持下本研究选择用 PBS 作缓冲介质进行乳杆菌抑制金葡菌与 HeLa 细胞粘附体外实验,对生殖道来源乳杆菌株筛选有意义。在此基础上,我们对分离筛选到的 4 株乳杆菌做

了抑制相关体外实验,简单评估了乳杆菌抑制金葡菌生长的能力,初步分析了有效抑菌成分并比较了不同作用方式乳酸杆菌抑制金黄色葡萄球菌粘附 HeLa 细胞的能力。其次,观察了乳杆菌粘附 HeLa 细胞的能力,发现这种粘附能力大小除了跟自身粘附性能相关外还受外界因素影响,如实验中涉及到的细菌浓度,于是推断出  $10^8$  CFU/mL 乳杆菌浓度用于抑制金葡菌粘附定植试验较合适。最后,比较了不同作用方式粘附抑制效果差异,采用排除抑制的方式 (即先定植乳杆菌),乳杆菌定植成功后对金葡菌的粘附抑制能力最强,而置换清除实验组 (即先定植金葡菌) 乳杆菌的抑制能力最弱。一方面可能是由于



预先成功定植的乳杆菌产生了抑菌物质,从而抑制了金葡菌的外源细菌生长,而表现出较强的抑菌效果。主要原因可能是由于在排除作用方式中乳杆菌占位结合,预先占用了 HeLa 细胞的结合位点,增大了空间位阻,从而抑制了金葡菌的粘附作用;而在置换清除方式中,金葡菌优先与 HeLa 细胞表面相关受体结合,占据了有限的细胞表面结合受体,降低了乳杆菌与细胞结合的机率,因此容易导致部分乳杆菌流失,表现为其抑菌作用减弱。这也部分解释了为什么在竞争方式下,不同的乳杆菌株表现出不同的抑制能力:即乳杆菌与金葡菌同时作用时,二者竞争结合细胞表面结合受体,而由于不同细菌表面蛋白表达具有差异性,因此导致不同细菌的粘附能力不同<sup>[19]</sup>。例如,有的乳杆菌种属细菌细胞壁能够表达 S-layer 蛋白,这是一种关键的细胞粘附蛋白,能够促进自身粘附,抑制某些病原菌的侵袭,同时还具有抑菌活性,通过调节 MAPK、ERK1/2 等信号通路介导病原菌凋亡,实现抑菌作用<sup>[20-22]</sup>。

本研究选择生殖道来源乳杆菌作为治疗预防泌尿生殖道感染菌剂产品开发的主要研究对象,是因为乳杆菌是健康阴道微环境中的优势菌群,对维持阴道微生态平衡起着重要作用<sup>[23]</sup>。乳杆菌为优势菌的阴道环境不易受到肠道来源的厌氧菌及皮肤表面的金黄色葡萄球菌的侵袭,相反,乳杆菌比例明显减少或以非乳杆菌为优势菌的阴道环境很容易感染各种致病菌,并进一步引起泌尿系统的炎症<sup>[24]</sup>。选择金葡菌作指示菌,是由于金葡菌是我们实验室常用病原指示菌,它广泛存在于自然界中,引起的细菌性感染疾病仅次

于大肠杆菌,而且金葡菌容易产生不同程度的耐药性,为抗生素的临床治疗带来了极大的挑战,因此研究生殖道来源乳杆菌对金葡菌粘附定植的影响显得更有意义。此外,HeLa 细胞来源于生殖道,与生殖道上皮细胞关系较为密切并能在体外连续传代培养,其来源与培养比阴道上皮细胞方便容易,为乳杆菌与病原菌相互关系的体外研究带来方便,同时为体内试验奠定了基础。

宿主自身免疫系统具有调节微生态平衡的功能,它与微生物之间的相互调控功能机制还不明确<sup>[25]</sup>,我们有必要将乳杆菌与宿主免疫相关性作一些相应的机制研究,这有利于我们更好地筛选与人体依存性较好的菌株。总之,本研究对分离自女性生殖道的 4 株乳杆菌进行了抑菌活性检测、抑菌成分分析,对 HeLa 细胞的黏附作用和金黄色葡萄球菌黏附 HeLa 细胞的抑制作用等进行了实验验证。结果表明,我们筛选到的 4 株乳杆菌能够有效抑制金葡菌生长及粘附定植,乳杆菌对金葡菌粘附抑制可能是二者竞争、空间位阻和抑菌等共同作用的结果。粘附定植是乳杆菌实现生物调控的关键步骤,而实验菌株 T79-3 粘附能力及对金黄色葡萄球菌的抑制作用较强,因此,初步判定 T79-3 可作为防治女性泌尿道生殖道感染的候选有益菌。

## REFERENCES

- [1] Zarate G, Santos V, Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2007, 2007:

- 48358–48363.
- [2] Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, et al. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *J Hosp Infect*, 2008, 68: 32–38.
- [3] Reid G, Burton J, Hammond JA, et al. Nucleic acid-based diagnosis of bacterial vaginosis and improved management using probiotic *Lactobacilli*. *J Med Food*, 2004, 7: 223–228.
- [4] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998, 339(8): 520–532.
- [5] Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, et al. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(1):225–229.
- [6] Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol*, 2002, 92(3): 451–459.
- [7] Matu MN, Orinda GO, Njagi ENM, et al. *In vitro* inhibitory activity of human vaginal *Lactobacilli* against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Anaerobe*, 2010, 16(3): 210–215.
- [8] Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, et al. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*, 2004, 104(2): 267–272.
- [9] Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect*, 2002, 4(3): 319–324.
- [10] Abad CL, Safdar N. The role of *Lactobacillus* probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections—a systematic review. *J Chemotherapy*, 2009, 21(3): 243–252.
- [11] Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, et al. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*, 2010, 156(2): 392–399.
- [12] Spurbeck RR, Arvidson CG. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun*, 2010, 78(7): 3103–3111.
- [13] Wang J, Zhang RF, Zhou L, et al. Selection and genotyping of *Lactobacillus* with potential preventive effect by repetitive element sequence-based PCR analysis. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 817–823.  
王江, 张瑞芬, 周莉, 等. 应用 rep-PCR 分型技术筛选潜在治疗性乳杆菌. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 817–823.
- [14] Kaewsrichan J, Peeyanjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic *Lactobacilli* producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, 48(1): 75–83.
- [15] Chick S, Harbbr MJ, Mackbnzie R, et al. Modified method for studying bacterial adhesion to isolated uroepithelial cells and uromucoid. *Infect Immun*, 1984, 34 (1): 256–261.
- [16] Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, et al. Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J Infect Dis*, 1995, 171(5):1237–1243.
- [17] Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, et al. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol*, 2002, 93(5): 884–893.
- [18] Atassi F, Brassart D, Grob P, et al. *In vitro* antibacterial activity of *Lactobacillus helveticus* strain KS300 against diarrhoeagenic, uropathogenic and vaginosis-associated bacteria. *J Appl Microbiol*, 2006, 101(3): 647–654.
- [19] Zárte G, Nader-Macias ME. Influence of probiotic vaginal *Lactobacilli* on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett*

- Appl Microbiol, 2006, 43(2): 174–180.
- [20] Jakava-Vijanen M, Palva A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. Vet Microbiol, 2007, 124(4): 264–273.
- [21] Wang B, Wei H, Yuan J, et al. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. Curr Microbiol, 2008, 57(1): 33–38.
- [22] Li PC, Yu QH, Ye XL, et al. *Lactobacillus* S-layer protein inhibition of *Salmonella*-induced reorganization of the cytoskeleton and activation of MAPK signalling pathways in Caco-2 cells. Microbiology, 2011, 157(Pt9): 2639–2646.
- [23] Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch Gynecol Obstet. 2010, 281(1): 589–600.
- [24] Ruiz FO, Gerbaldo G, Asurmendi P, et al. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. Curr Microbiol, 2009, 59(5): 497–501.
- [25] Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. Anaerobe, 2011, 17(4): 369–637.