

# 灭活的青春双歧杆菌对人大肠癌细胞的粘附

伦永志<sup>1</sup> 黄敏<sup>2</sup> 袁杰利<sup>2</sup> 康白<sup>2</sup>

(大连大学医学院 大连 116622)<sup>1</sup>

(大连医科大学微生物学研究所 大连 116027)<sup>2</sup>

**摘要:** 针对灭活的青春双歧杆菌 DM8504 与人大肠癌 CCL-229 细胞之间的粘附现象及粘附机制进行研究。结果发现灭活的双歧杆菌具有与活菌相同的粘附定植能力, 两者粘附于体外培养的肠上皮细胞均依赖于耗尽培养上清 (SCS) 的存在。青春双歧杆菌粘附素有可能是存在于细胞壁中及分泌至 SCS 中的脂磷壁酸 (LTA)。LTA 与细菌细胞壁耐热蛋白相互粘连, 并且伸出胞壁之外。此外, 肠上皮细胞表面的粘附素受体可能为糖类或糖蛋白。

**关键词:** 双歧杆菌, 肠, 上皮, 细菌粘附

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0055-05

## ADHESION OF HEAT-KILLED BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS TO HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELL

LUN Yong-Zhi

(Medical College of Dalian University, Dalian 116622)

HUANG Min YUAN Jie-Li KANG Bai

(Research Institute of Microecology, Dalian Medical University, Dalian 116027)

**Abstract:** The assay investigated mainly the adhesion phenomenon of heat-killed *Bifidobacterium adolescentis* DM8504 to human colorectal carcinoma cell line CCL-229. Moreover, the assay discussed the adhesion mechanism of *Bifidobacterium*. Results found heat-killed bifidobacterium would be the same ability to adhere and colonize to human intestinal epithelial cells in vitro as live bifidobacterium, and their adhesion had to depend on its spent culture supernatant (SCS). The adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* was possibly lipoteichoic acid (LTA) which existed on the cell wall of bacteria and was secreted into the SCS. LTA bound to the heat-resistant proteins of cell surface of bacteria, and extended out from the cell surface. Moreover, the bifidobacterial adhesin receptor of intestinal epithelial cells was possibly saccharides or glycopolymers.

**Key words:** *Bifidobacterium*, Intestines, Epithelium, Bacterial adhesion

双歧杆菌作为人和动物肠道中最重要的生理性细菌之一, 被认为是微生物学研究的核心或重心。双歧杆菌在肠道内参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程。双歧杆菌只有粘附于肠上皮细胞, 才能对宿主产生上述生态效应和生理作用。否则, 只能是过路菌, 不能在肠道内存在<sup>[1]</sup>。因此, 双歧杆菌对粘膜或肠上皮细胞的粘附及定植是其发挥作用的前提条件。而且, 对于双歧杆菌粘附的研究也可进一步揭示正常菌群的形成和作用机制。

传统观点认为, 只有活菌才具有粘附能力, 但已有研究发现, 加热处理的死乳杆菌也具有与活菌相同的粘附能力和生物学效应<sup>[2]</sup>。

本文主要对灭活的青春双歧杆菌 DM8504 与人大肠癌 CCL-229 细胞之间的粘附现象及粘附机制进行研究, 以确定死菌的粘附作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 双歧杆菌 DM8504 菌株为大连医科大学微生态研究所保存菌种。经中国科学院微生物研究所鉴定, 该菌株属于青春型双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)。

**1.1.2 细胞:** 人类大肠癌 CCL-229 细胞引自大连医科大学卫生学教研室。

**1.1.3 主要试剂与仪器:** RPMI-1640 GIBCO 产品, 小牛血清 杭州四季青生物工程材料研究所, 胰蛋白酶 Sigma 产品, 其它试剂均为国产分析纯; PCH-100 电脑 CO<sub>2</sub> 孵育培养箱 Sheldem USA, 6 孔细胞培养板 Costar 产品, BH-2 显微照相机 OLYMPUS Japan, 其它常规设备均为国产。

### 1.2 方法

**1.2.1 双歧杆菌培养:** 将双歧杆菌接种至 BS 肉汤培养基中, 37℃ 厌氧培养 48h, 用 pH 7.2 PBS 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将菌悬液 4,000 r/min 离心 10min, 分离得到耗尽培养上清 (Spent Culture Supernatant, SCS)。用 PBS 重悬细菌, 所得菌悬液分为活菌组和死菌组, 其中死菌组置于 65℃ 水浴 30min 灭活处理 (经 BS 肉汤检菌, 证明无活菌存在, 并且仍保持正常细菌形态)。将活、死两组菌悬液用 PBS 洗 3 次离心后, 弃 PBS 上清, 保留活、死双歧杆菌沉淀备用。

**1.2.2 CCL-229 细胞培养:** CCL-229 细胞传代培养于含 20% 小牛血清 RPMI-1640 培养液中, 将铺满培养瓶底层的 CCL-229 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞, 然后接种细胞于 6 孔培养板, 于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 恒温培养 48h 备用。

**1.2.3 灭活的双歧杆菌对肠上皮细胞的粘附:** 分别用 SCS、新鲜培养液、pH5.0 新鲜培养液重悬活、死双歧杆菌沉淀。

**1.2.4 不同温度处理双歧杆菌 SCS 对粘附的影响:** SCS 分别置于 65℃ 水浴 30min、100℃ 水浴 10min, 同时设正常对照。用上述 SCS 分别重悬活、死双歧杆菌沉淀。

**1.2.5 胰蛋白酶处理双歧杆菌菌体或其 SCS 后对粘附的影响:** 用 PBS 重悬活、死双歧杆菌沉淀, 所得菌悬液与其 SCS 分别加入 5mg/mL 胰蛋白酶, 其中 SCS 用 5.6% NaHCO<sub>3</sub> 调整 pH 值为 7.2, 两者均 37℃ 孵育 30min。菌悬液 4,000 r/min 离心 10min, 用 pH 7.2 PBS 洗 3 次, 以去除残留的胰蛋白酶, 最后用正常 SCS 重悬菌沉淀; SCS 中先加入 1% 小牛血清, 以抑制其中残留的胰蛋白酶活性<sup>[3]</sup>, 然后用处理后的 SCS 重悬菌沉淀; 为了观察小牛血清对粘附试验的影响, 正常 SCS 重悬活、死双歧杆菌沉淀后, 分别加入 1%、10% 小牛血清。

**1.2.6 双歧杆菌 SCS 中的粗提蛋白对粘附的影响:** 蛋白提取按张昌颖等方法<sup>[4]</sup>, 个别步骤略有改动。采用硫酸铵盐析法提取 SCS 中蛋白样物质, 其粗提蛋白溶液经透析脱盐 (Nessler 试剂检测, 证明无铵离子存在)。调整粗提蛋白溶液 pH 值为 5.0, 补充 PBS, 重悬活、死双歧杆菌沉淀。

**1.2.7 孵育环境中存在某些糖类对粘附的影响:** SCS 菌悬液中分别加入 D-半乳糖、D-甘露糖、D-果糖、L-鼠李糖、乳糖、D-葡萄糖, 使之浓度均达到 2%。

**1.2.8 D-甘露糖分别与细菌或细胞孵育后对粘附的影响:** SCS 中加入 2% D-甘露糖, 调整 pH 值为 5.0, 加入细胞培养板或悬浮活、死双歧杆菌沉淀, 37℃ 孵育 60min。细胞

用 PBS 清洗 3 次；菌悬液 4,000 r/min 离心 10min，PBS 洗 3 次，用正常 SCS 重悬菌沉淀。

1.2.9 粘附试验：6 孔培养板中的 CCL-229 贴壁细胞用 PBS 清洗 1 次后，分别加入上述配制好的各组菌悬液 2mL，37℃ 孵育 60min。弃掉菌悬液，各孔用 PBS 洗 3 次后，自然干燥，甲醇固定，革兰氏染色，镜下 (×1,000) 随机计数 50 个细胞各自粘附的细菌数，计算出每个细胞粘附的细菌平均数及标准差 (X±SD)，进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 灭活的双歧杆菌对肠上皮细胞的粘附

无论双歧杆菌是否灭活，均能同样粘附于 CCL-229 细胞，活菌组与死菌组比较，两者无明显差异 (P>0.05)。与新鲜培养液悬浮及 pH5.0 新鲜培养液悬浮比较；SCS 可以提高双歧杆菌的粘附力，并且酸性条件明显有利于粘附 (表 1 与图 1)。

表 1 青春双歧杆菌对 CCL-229 细胞的粘附

组 别	细菌数/细胞 (X±SD)	
	活菌组	死菌组
SCS 悬浮	4.78±1.76*	4.80±1.80***
新鲜培养液悬浮	1.54±0.71	1.38±0.63
pH5.0 新鲜培养液悬浮	3.18±0.98+	3.34±1.15+

\* 与其它各种悬浮比较 P<0.05, \*\* 与活菌组 SCS 悬浮比较 P>0.05, + 与新鲜培养液悬浮比较 P<0.01

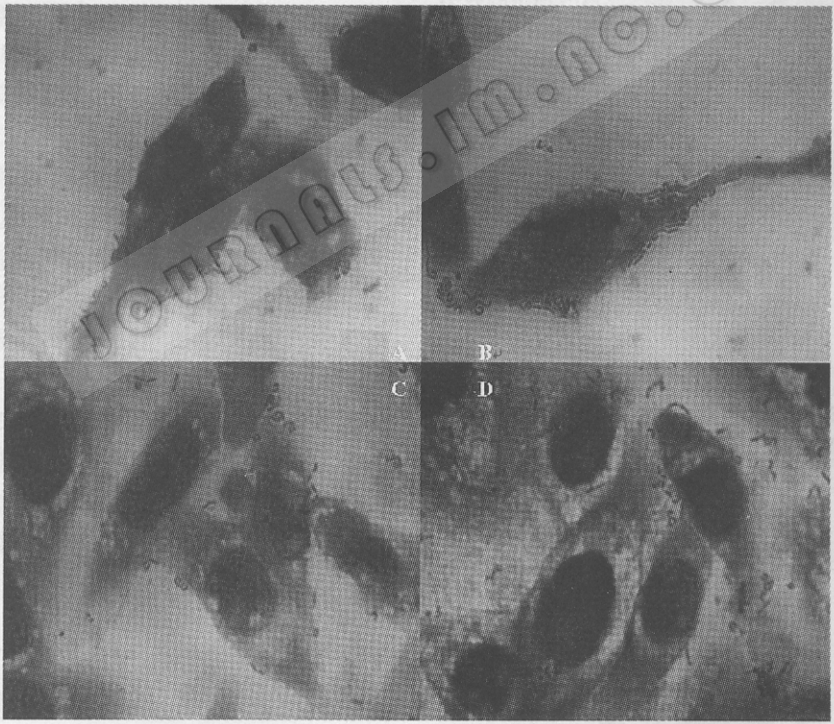


图 1-A 用 SCS 悬浮的活菌对细胞粘附的光镜下形态观察 (×1,000)  
图 1-B 用 SCS 悬浮的死菌对细胞粘附的光镜下形态观察 (×1,000)  
图 1-C 用新鲜培养液悬浮的活菌对细胞粘附的光镜下形态观察 (×1,000)  
图 1-D 用新鲜培养液悬浮的死菌对细胞粘附的光镜下形态观察 (×1,000)

2.2 不同温度处理双歧杆菌 SCS 对粘附的影响

SCS 经高温处理后，对双歧杆菌的粘附无明显影响 (表 2)。

表2 不同温度处理 SCS 对粘附的影响

组 别	细菌数/细胞 ( $\bar{X} \pm SD$ )	
	活菌组	死菌组
正常对照	4.46 $\pm$ 1.46	4.30 $\pm$ 1.47
65℃/30min 处理 SCS	4.40 $\pm$ 1.81 *	4.36 $\pm$ 1.24 *
100℃/10min 处理 SCS	4.26 $\pm$ 1.56 *	4.22 $\pm$ 1.35 *

\* 与正常对照比较  $P > 0.05$

表3 胰蛋白酶处理对粘附的影响

组 别	细菌数/细胞 ( $\bar{X} \pm SD$ )	
	活菌组	死菌组
正常对照	4.76 $\pm$ 1.06	4.68 $\pm$ 1.71
0.5%胰蛋白酶处理 SCS	4.40 $\pm$ 1.11 *	4.42 $\pm$ 1.16 *
0.5%胰蛋白酶处理菌体	ND	ND
1%小牛血清	4.70 $\pm$ 1.59 *	4.54 $\pm$ 1.46 *
10%小牛血清	1.34 $\pm$ 0.50 **	1.32 $\pm$ 0.47 **

ND 表示无细菌粘附, \* 与正常对照比较  $P > 0.05$ , \*\* 与正常对照比较  $P < 0.01$

表4 SCS 粗提蛋白对粘附的影响

组 别	细菌数/细胞 ( $\bar{X} \pm SD$ )	
	活菌组	死菌组
正常对照 (SCS 悬浮)	4.52 $\pm$ 1.38	4.58 $\pm$ 1.33
pH5.0 PBS 悬浮	3.30 $\pm$ 1.26 *	3.26 $\pm$ 1.16 *
SCS 粗提蛋白溶液悬浮	3.22 $\pm$ 1.25 ***	3.20 $\pm$ 1.22 ***

\* 与正常对照比较  $P < 0.05$ , \*\* 与 pH5.0 PBS 悬浮比较  $P > 0.05$

表5 D-甘露糖与细菌或细胞孵育后对粘附的影响

组 别	细菌数/细胞 ( $\bar{X} \pm SD$ )	
	活菌组	死菌组
正常对照	4.66 $\pm$ 1.23	4.70 $\pm$ 1.31
甘露糖与细胞孵育后	1.76 $\pm$ 0.79 *	1.72 $\pm$ 0.83 *
甘露糖与细菌孵育后	4.72 $\pm$ 1.50 **	4.78 $\pm$ 1.09 **

\* 与其它两组比较  $P < 0.01$ , \*\* 与正常对照比较  $P > 0.05$

## 2.3 胰蛋白酶处理双歧杆菌菌体或其 SCS 后对粘附的影响

双歧杆菌菌体经胰蛋白酶处理后,用正常 SCS 重悬,能够完全抑制粘附。但用处理后的 SCS 重悬双歧杆菌沉淀,与正常对照比较,其粘附力没有明显改变,而且 10% 小牛血清可以显著抑制粘附 (表 3)。

## 2.4 双歧杆菌 SCS 中的粗提蛋白对粘附的影响

双歧杆菌 SCS 中的蛋白物质经硫酸铵盐析、PBS 溶解蛋白沉淀、透析脱盐后,获得的粗提蛋白溶液重悬菌沉淀,与 pH5.0 PBS 悬浮比较,发现 SCS 粗提蛋白对双歧杆菌粘附力无明显影响 (表 4)。

## 2.5 孵育环境中存在某些糖类对粘附的影响

D-甘露糖可以显著抑制双歧杆菌对 CCL-229 细胞的粘附,其它糖类对粘附的影响不明显 (图 2)。

## 2.6 D-甘露糖与细菌或细胞孵育后对粘附的影响

D-甘露糖与 CCL-229 细胞孵育后,可以显著抑制双歧杆菌粘附。然而,青春双歧杆菌与 D-甘露糖孵育后,对粘附无明显影响 (表 5)。

## 3 讨 论

双歧杆菌进入肠道后能否粘附于宿主肠道粘膜上皮细胞表面,形成稳定的菌群,是关系到其是否能发挥生态效应的重要问题<sup>[1]</sup>。由于双歧杆菌被认为是微生态学研究的核心或重心,因此研究双歧杆菌的粘附作用对认识微生态学的基本规律有着重要意义。

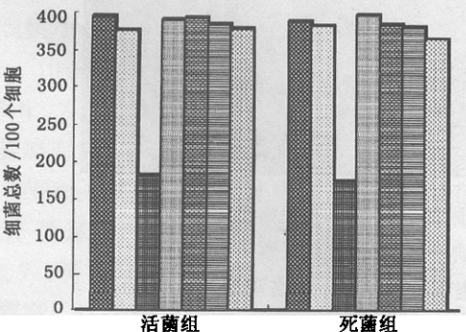


图2 某些糖类对粘附的影响

■ 正常对照, ▨ D-半乳糖, ▩ D-甘露糖, ▪ D-果糖, ▫ L-鼠李糖, ▬ D-葡萄糖, ▮ 乳糖

从试验结果可知,灭活的双歧杆菌与活菌均能粘附于肠上皮细胞周围,表明双歧杆菌作为益生菌制剂常用菌种,并非必须采用活菌。统计学处理结果表明,死菌对肠上皮细胞的粘附力丝毫不逊于活菌,这就为其广泛应用奠定了基础。

革兰氏阳性菌粘附素为细胞壁中的脂磷壁酸(Lipoteichoic Acid, LTA)。多种革兰氏阳性菌包括葡萄球菌、链球菌及乳杆菌等,不仅细胞壁中含有充足的LTA,而且在其生长发育过程中,不断地向周围环境中释放LTA<sup>[5]</sup>。一般认为,双歧杆菌也是通过LTA与肠上皮细胞结合。Camp等研究发现分叉双歧杆菌LTA能特异性地和可逆地粘附于人肠上皮细胞,白蛋白可抑制其粘附,LTA经碱处理脱脂后可丧失粘附力,提示LTA中的脂肪酸部分可能是双歧杆菌粘附于肠上皮细胞的主要介导物质<sup>[6]</sup>。但Bernet等用胰蛋白酶处理一株短双歧杆菌SCS后重悬细菌,发现双歧杆菌的粘附力显著下降;用新鲜细菌培养液或磷酸盐缓冲液替代SCS悬浮细菌,双歧杆菌的粘附力也明显降低。说明SCS中存在与粘附有关的粘附素成分,他们认为双歧杆菌粘附素可能完全是一种蛋白样物质,它存在于菌体表面,也可分泌至培养上清中<sup>[7]</sup>。蒋虹等通过细胞壁(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。说明粘附过程可能是多种分子共同参与的结果<sup>[8]</sup>。

试验结果表明,在体外条件下,双歧杆菌粘附于肠上皮细胞依赖于SCS的存在。用高温或胰蛋白酶处理后的SCS重悬活、死双歧杆菌,发现并不能影响细菌粘附力,但高浓度的小牛血清可以抑制细菌对细胞的粘附。进一步用硫酸铵盐析法提取SCS中的蛋白样物质,经过透析脱盐,重新悬浮活、死双歧杆菌,证实SCS粗提蛋白未能提高双歧杆菌粘附力。因此,青春双歧杆菌粘附素可能是存在于细菌细胞壁中及分泌至SCS中的LTA。当然双歧杆菌粘附素未必仅有一种,粘附素中到底有无蛋白样物质尚不能完全否定,还需从其它方面深入研究。其次,灭活的双歧杆菌虽无细胞活性,但其粘附力并未受影响,说明菌体上的粘附位点活性仍然存在。本研究发现胰蛋白酶处理双歧杆菌后,可以完全抑制双歧杆菌粘附,提示青春双歧杆菌粘附素LTA与细胞壁耐热蛋白相互粘连,并伸出胞壁之外。

现在已知,肠上皮细胞上存在着细菌粘附素受体,并已阐明了某些病原菌粘附素受体多为糖类或糖蛋白<sup>[9]</sup>。本研究发现甘露糖可以封闭肠上皮细胞的双歧杆菌粘附素受体,从而显著抑制细菌粘附,结果提示双歧杆菌粘附素受体可能与大多数病原菌一致,也为糖类或糖蛋白。

## 参 考 文 献

- [1] 康 白. 双歧杆菌. 大连: 大连海事大学出版社, 1998.
- [2] Coconnier M H, Bernet M F, Chauviere C, et al. J Diarrhoeal Dis Res. 1993, 11 (4): 235~242.
- [3] 鄂 征. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [4] 《生物化学》编审小组. 生物化学实验指导. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
- [5] 牟希亚. 菌毛学研究进展. 大连: 大连出版社, 1999.
- [6] Op den Camp H J M, Oosterhof A, Veerkamp J H. Infect Immun. 1985, 47 (1): 332~334.
- [7] Bernet M F, Brassart D, Neeser J R, et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (12): 4121~4128.
- [8] 蒋 虹, 胡 宏, 尹一兵, 等. 重庆医科大学学报, 1999, 24 (2): 126~129.
- [9] Cohen P S, Arruda J C, Williams T J, et al. Infect Immun, 1985, 48 (1): 139~145.