

嗜酸乳杆菌 S-层蛋白对肠道细胞黏附及巨噬细胞增殖的影响

尹琼芳¹, 潘道东^{1,2}, 郭宇星², 曾小群¹, 孙杨赢¹, 曹锦轩¹

(1. 宁波大学海洋学院食品系, 浙江宁波 315211) (2. 南京师范大学食品科学与营养系, 江苏南京 210097)

摘要: 比较去除 S-层蛋白前后嗜酸乳杆菌对肠道细胞黏附及菌体自我凝集率的变化, 并探究 S-层蛋白对巨噬细胞增殖及溶酶体分泌的影响。采用 4M 氯化锂提取嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 的表层蛋白, 经透析及微孔过滤等步骤得到 S-层蛋白, SDS-PAGE 确定其分子量。利用酶标仪测定嗜酸乳杆菌在 37 °C 孵育过程中(0 h~5.5 h)自我凝集率的变化情况, 光学显微镜观察去除 S-层蛋白前后嗜酸乳杆菌对结肠癌细胞 HT-29 的黏附情况变化。将 S-层蛋白与巨噬细胞 RAW264.7 孵育 2 h 后, MTS 法测定细胞增殖情况, 并采用溶酶体荧光探针研究溶酶体分泌量的变化。结果表明: 所提蛋白为嗜酸乳杆菌 S-层蛋白(分子量 M≈46ku)。嗜酸乳杆菌自我凝集率随孵育时间的延长而呈现出上升趋势, 去除 S-层蛋白后, 菌体自我凝集率降低, 嗜酸乳杆菌对 HT-29 细胞的黏附量也明显减少, 且 S-层蛋白能促进巨噬细胞增殖及其溶酶体分泌。

关键词: S-层蛋白; 黏附; 凝集率; 细胞增殖; 溶酶体

文章编号: 1673-9078(2015)9-51-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.009

Effects of *Lactobacillus acidophilus* S-layer Protein on Adhesion to Intestinal Cells and Macrophage Proliferation

YIN Qiong-fang¹, PAN Dao-dong^{1,2}, GUO Yu-xing², ZENG Xiao-qun¹, SUN Yang-ying¹, CAO Jin-xuan¹

(1. Food Science Department of Marine Science School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(2. Food Science & Nutrition Department of Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: To investigate the autoaggregation and adherence rate to HT-29 cells of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 with or without S-layer protein as well as the influence of S-layer protein on the proliferation and lysosomal secretion of macrophages, S-layer protein of *L. acidophilus* ATCC 4356 was extracted by 4 M lithium chloride, followed by further purification using centrifugation, dialysis, and microfiltration. The molecular weight was then confirmed by SDS-PAGE. Autoaggregation rate of *L. acidophilus* at 37°C was measured by using a microplate reader during the incubation (0 to 5.5 h). Adhesion of *L. acidophilus* ATCC4356 to HT-29 cells was observed by light microscopy. After incubation of S-layer proteins with RAW 264.7 macrophages for 2 h, proliferation and changes in lysosomal secretion were evaluated by MTS and Lyso-Tracker Red, respectively. The results showed that the protein extracted was S-layer protein from *L. acidophilus* ATCC 4356 with a molecular weight of about 46 ku. *L. acidophilus* ATCC4356 autoaggregation rate and adhesion to HT-29 cells were reduced when the S-layer protein was removed. *L. acidophilus* ATCC 4356 autoaggregation rate increased as the incubation time was extended. S-layer protein could also promote macrophage proliferation and lysosomal secretion.

Key words: S-layer protein, adhesion, autoaggregation, macrophage proliferation, lysosome

乳酸杆菌作为人体肠道内的功能性益生菌, 同时也是肠道黏膜生物屏障的主要成分, 它能黏附并定植于肠黏膜上皮细胞表面, 使肠细胞免受病原微生物的侵害。研究表明乳酸杆菌与宿主的相互作用

收稿日期: 2014-10-19

基金项目: 国家自然科学基金(31471598、41276121); 江苏省自然科学基金(BK20141447)

作者简介: 尹琼芳(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳品科学

通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 研究方向: 乳品科学

主要与脂磷壁酸、胞外多糖、表面蛋白^[1]、菌体表面疏水性和自凝集^[2]等有关。其中, 表面蛋白因其独特的结构及功能特性而被广泛的研究。S-层蛋白(S-layer protein)作为乳杆菌最常见的表面蛋白(SLP, Surface layer protein)之一, 是一类由蛋白质亚基组成的单层晶体结构, 为细菌较为常见的一类表层结构^[3]。S-层蛋白因其规则的晶体结构可以作为分子筛应用于材料方面, 同时, 它可以参与宿主细胞的黏附从而抑制致病菌的侵入, 也能作为抗原的

传递工具^[4]。通过高浓度氯化锂、盐酸胍溶剂破坏乳酸杆菌细胞壁表面的氢键,经凝胶过滤或离子交换层析纯化可以获得 S-层蛋白。为了更为直观的观察细胞变化,乳酸杆菌对宿主细胞的黏附及免疫多采用体外实验,目前多选用 Caco-2 及 HT-29 结肠癌细胞作为肠道细胞模型。王斌^[5]等通过 Western blot 发现乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面的两种蛋白能特异性识别 HT-29 细胞膜表面的黏附素受体,并与其结合。

Boot H J^[6]最早发现嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 具有 S-层蛋白,其分子量约为 43 ku,随后有关此蛋白氨基酸序列及基因片段的报道也越来越全面,但有关其肠道免疫功能及机理研究尚不全面。本文选用嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 作为实验菌株,研究 S-层蛋白对菌体自我凝集率、菌体黏附肠道细胞的影响,并对其免疫功能进行初步探究,为嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 S-层蛋白的功能特性提供更为完善的理论依据,为进一步探究其免疫机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜酸乳杆菌 ATCC 4356(*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356)购于中国普通微生物菌种保藏管理中心; HT-29 人结肠癌细胞、巨噬细胞 RAW264.7 购于武汉博士德生物工程有限公司; MTS 一步法细胞增殖检测试剂 promega-普洛麦格(北京)生物技术有限公司; SDS-PAGE 标准蛋白赛默飞世尔科技公司; 氯化锂,上海索莱宝生物科技有限公司; 青霉素-链霉素溶液(100X)、Lyso-Tracker Red 溶酶体红色荧光探针 碧云天生物技术研究所; 0.25%胰酶-EDTA、胎牛血清, Gibco 公司; DMEM 培养基 Hyclone 公司。

1.2 仪器与设备

立式压力灭菌器 上海申安医疗器械有限公司; 恒温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂; 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; 酶标仪 infinite 200pro TECAN 公司; 二氧化碳培养箱 MCO-18AIC 三洋株式会社; 相差倒置荧光显微镜 IX-53 奥林巴斯;

1.3 方法

1.3.1 细菌及细胞培养

细菌活化及扩大培养:取低温保存的菌株适量接种于 50 mL MRS 液体培养基中进行活化,37 °C

恒温培养至 OD₅₉₀ 约为 1.000。将活化后的菌液按 1% 的体积比接入新鲜的 MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 24 h 至稳定期。

细胞培养及传代:将细胞置于含 120 mL/L 胎牛血清和 10 mL/L 双抗(100X 青霉素-链霉素溶液)的 DMEM 细胞培养液中,37 °C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中孵育,隔天换液,4~5 d 传代一次,胰酶室温消化 3~5 min 至细胞变圆,加入培养液终止消化,吹散细胞悬液后等体积分盘。

1.3.2 嗜酸乳杆菌 S-层蛋白的提取及 SDS-PAGE

S-层蛋白提取参考范郁冰^[7]和 Kathene C^[8]的方法,稍作调整。扩大培养后的菌液培养至稳定期,离心收集菌体(5000 r/min, 15 min),0.1 M PBS 缓冲液洗净培养基(pH=7.4),收集菌体沉淀用 4 mol/L LiCl 重悬,37 °C 孵育 60 min 后,收集上清液(12000 r/min, 15 min),于 0.01 mol/L PBS (pH=7.4)中 4 °C 透析以除尽盐离子,透析内液离心(5000 r/min, 15 min),收集上清液,微孔滤膜过滤(0.22 μm),冷冻干燥后得嗜酸乳杆菌表层粗蛋白,置于-20 °C 备用。

表层粗蛋白溶解后经 Sephadex G-75 凝胶过滤层析纯化,0.025 mol/L Tris-HCL 缓冲液平衡层析柱,上样量为 1 mL。洗脱液为 0.025 mol/L Tris-HCL,280 nm 处检测吸光值,收集洗脱峰,再次透析,冷冻干燥后得到嗜酸乳杆菌 S-层蛋白,置于-20 °C 保存备用。

将 S-层蛋白溶液与 5×上样缓冲液沸水浴 5 min,采用 120 g/L 分离胶和 50 g/L 浓缩胶的不连续浓度梯度电泳,每孔上样量 10 μL,浓缩胶 80 V 恒压约 30 min,分离胶 100 V 恒压约 3.5 h,考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.3.3 嗜酸乳杆菌 S-蛋白质谱鉴定

切下 SDS-PAGE 凝胶条带,0.01 mol/L PBS (pH=7.4)洗 3 次,无菌水洗净。胰蛋白酶酶解后进行 Maldi-TOF-TOF 质谱鉴定,应用 MASCOT 软件搜索 NCBI 数据库。质谱鉴定由上海生物工程有限公司完成。

1.3.4 自我凝集实验

参考 Xueyan Chen^[9]的方法,嗜酸乳杆菌菌液培养至 OD₅₉₀ 约为 1.000 左右,收集菌液,PBS 洗净培养基,用 PBS 及 4 M 氯化锂分别重悬菌体至 OD₅₉₀ 约为 0.5,将重悬液按 3 mL 分装于多个离心管中,37 °C 恒温孵育。每隔 30 min 测 OD₅₉₀,每次测定设定五个重复,测前涡流混匀 10 s。

$$\text{凝集百分率} = \left(1 - \frac{A_n}{A_0}\right) \times 100\%$$

注: A_n 为 n 时的 OD_{590} 值, A_0 为 0 时的 OD_{590} 值。

1.3.5 嗜酸乳杆菌对结肠癌细胞 HT-29 的黏附

将培养好的 HT-29 细胞胰酶消化后传代于六孔板中, 待细胞密度接近于 80% 时进行嗜酸乳杆菌黏附实验。

嗜酸乳杆菌菌液 37 °C 恒温培养至 OD_{590} 为 1.000 左右, 收集 5 mL 菌悬液 (5000 g, 3 min), PBS 洗净培养基 (5000 g, 3 min), 收集菌体沉淀用 1 mL 新鲜的细胞培养基重悬, 六孔板中每孔加入 500 μ L 菌悬液, 对照组为未经处理的嗜酸乳杆菌, 实验组为经 4 mol/L 氯化锂处理后的嗜酸乳杆菌 (去除 S-层蛋白), 每组设置两个重复。嗜酸乳杆菌与 HT-29 细胞共同孵育 2 h (37 °C, 5% CO_2), 0.1 M PBS 洗涤六孔板 3 次, 显微镜下观察并拍照。

1.3.6 S-层蛋白对巨噬细胞增殖及溶酶体分泌的影响

将巨噬细胞 RAW264.7 胰酶消化以每孔 100 μ L 的接种量置于 96 孔板中, 细胞密度约为 4×10^6 , 显微镜观察细胞密度生长约为 80% 时, 将 S-层蛋白溶解于新鲜培养基中, 浓度设定为 0、1.25、2.5、5 mg/mL, 将不同浓度的 S-层蛋白加入 96 孔板中, 每孔 200 μ L 蛋白溶液, 每个浓度组设定 5 个重复, 共同孵育 3 h 后, PBS 洗涤培养板 3 次, 弃上清。每孔加入 200 μ L 新鲜细胞培养液及 20 μ L MTS 溶液, 4 h 后终止培养, 酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光值。

Lyso-Tracker Red 按 1:20000 的比例加入细胞培养基中配制成工作液。将 S-层蛋白溶于新鲜的细胞培养液中, 蛋白终浓度为 1.25 mg/mL。在六孔板内放入洁净的盖玻片, 再将巨噬细胞 RAW264.7 以 4×10^6 细胞密度接种于六孔板中, 细胞密度生长约为 80% 时, 加入 S-层蛋白溶液与巨噬细胞共同孵育 3h (37 °C, 5% CO_2), 去除板内细胞培养液, PBS 洗 3 次, 每孔加入 3 mL 工作液, 37 °C 孵育 2 h 后去除工作液, PBS 洗涤 3 次, 制片, 并滴加抗荧光淬灭剂, 于荧光显微镜下观察拍照。

1.3.7 数据分析

菌体自我凝集率数据分析及作图采用 Origin8.0 软件, SPSS13.0 软件对细胞增殖结果进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 S-层蛋白 SDS-PAGE 及质谱鉴定

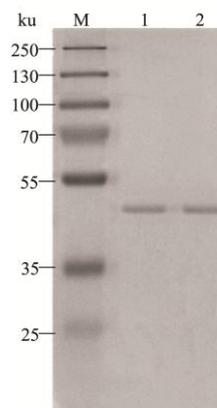


图 1 嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 的 S-层蛋白 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of S-layer protein from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

注: M: 预染的分子量标准; 1、2: 嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 S-层蛋白 (4M 氯化锂处理)。

图 1 所示 1、2 号泳道为经 4M 氯化锂处理并一定纯化后的嗜酸乳杆菌 S-层蛋白, 图示条带单一, 分子量约为 46ku 左右。采用 4M 氯化锂法提取嗜酸乳杆菌 S-层蛋白效果较好, 且蛋白纯化步骤简单, 无杂蛋白, 有利于后续免疫实验的进行。

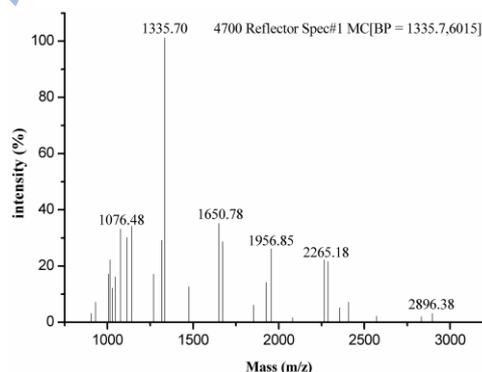


图 2 嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 S-层蛋白质谱图

Fig.2 Mass spectrum of S-layer protein from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

将图 1 中单一蛋白条带切胶回收, MALDI-TOF-TOF 对蛋白进行质谱鉴定, 图 2 为蛋白质谱图。MASCOT 软件搜索 NCBI 数据库, 比对结果显示所提蛋白为嗜酸乳杆菌 S-层蛋白, 分子量约为 46ku。

2.2 嗜酸乳杆菌自我凝集

图 3 为嗜酸乳杆菌凝集率随孵育时间的变化情况, 随着孵育时间的增加菌体自我凝集率整体呈现出

上升的趋势, 4 M 氯化锂去除 S-层蛋白后, 嗜酸乳杆菌的自我凝集率均低于未处理组。

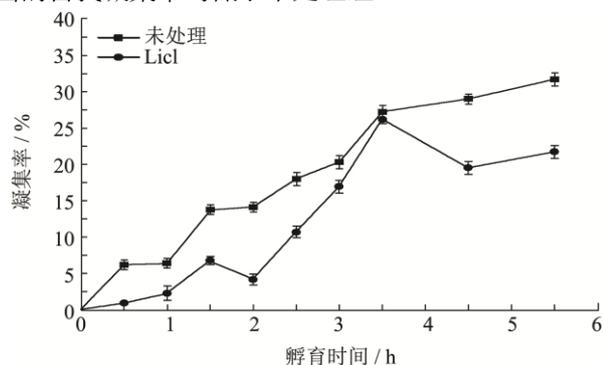


图 3 S-层蛋白及孵育时间对嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 凝集率的影响

Fig.3 Effect of S-layer protein and incubation time on *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 autoaggregation

结果表明 4 M 氯化锂处理嗜酸乳杆菌, 去除 S-层蛋白后, 菌体自我凝集率降低。

2.3 嗜酸乳杆菌对 HT-29 细胞的黏附

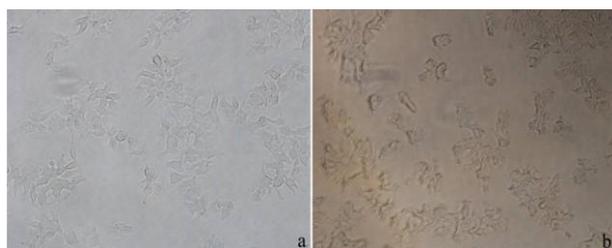


图 4 嗜酸乳杆菌与结肠癌细胞 HT-29 黏附图

Fig.4 Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 to HT-29 cells

注: a: 去除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌与 HT-29; b: 未去除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌与 HT-29 放大倍数 100 \times 。

图 4 中 a 图为去除 S-层蛋白后的嗜酸乳杆菌与结肠癌细胞 HT-29 共同孵育 2h 后的黏附情况, 细胞周围可见的乳酸杆菌较少。b 图为正常未经处理的嗜酸乳杆菌与 HT-29 细胞的黏附情况, 菌体多黏附在细胞周围, 明显可见。

比较 a、b 两图, 去除 S-层蛋白后, 嗜酸乳杆菌对肠细胞的黏附量明显降低。表明 S-层蛋白参与了乳酸杆菌对肠细胞的黏附, 并在黏附过程中起到关键作用。

2.4 巨噬细胞溶酶体荧光

图 5 为巨噬细胞 RAW264.7 经 Lyso-Tracker Red 荧光探针染色后的结果, 活细胞溶酶体能发出明亮的红色荧光。图 a 为巨噬细胞 RAW264.7 形态图, 放大倍数为 400 \times , 其形态正常。比较 b、c、d 三图, 加入 S-层蛋白后, 图 c 与图 d 荧光强度较图 b 明显

增加, 荧光面积增大。嗜酸乳杆菌 S-层蛋白能促进巨噬细胞溶酶体分泌, 从而增强细胞自身免疫能力。

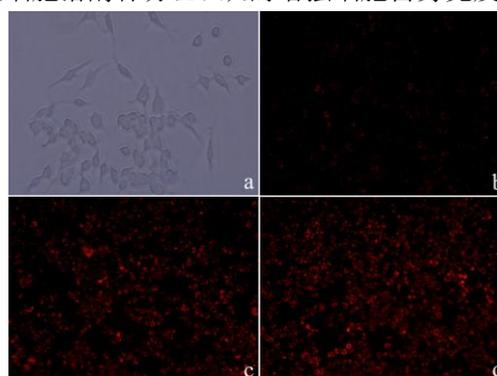


图 5 巨噬细胞 RAW 264.7 的溶酶体荧光图

Fig.5 Lysosomal fluorescence of macrophages RAW 264.7

注: a: RAW264.7 细胞; b: 未加 S-层蛋白; c: 加入 S-层蛋白(1.25mg/mL); d: 加入 S-层蛋白(2.5mg/mL); a 图放大倍数为 400 \times ; b、c、d 图放大倍数均为 100 \times 。

2.5 S-层蛋白对巨噬细胞增殖的影响

表 1 S-层蛋白对巨噬细胞增殖情况的影响

Table 1 Effect of S-layer protein on macrophage proliferation

巨噬细胞	MTS 测定吸光值(490nm)			
	未处理	S-层蛋白浓度/(mg/mL)		
		1.25	2.50	5.00
均值 \pm 标准差	1.26 \pm 0.026	1.84 \pm 0.080	1.87 \pm 0.063	1.89 \pm 0.040

表 2 统计学均数比较结果

Table 2 Analysis of compared means

检验方法	蛋白浓度分组	P 值	平均差
LSD	1 2	0.31	0.038
	1 3	0.17	0.052
	2 3	0.70	0.014
Dunnett t	1 4	0.00	0.58
	2 4	0.00	0.62
	3 4	0.00	0.63

注: S-层蛋白浓度分组为 1-1.25 mg/mL, 2-2.50 mg/mL, 3-5.00 mg/mL, 4-未处理组。

采用 SPSS13.0 软件对 MTS 测定结果进行统计学分析, 进行如下操作: 分析-均值比较-One Way ANOVA。均数比较结果表明加入 S-层蛋白后, 巨噬细胞 490nm 处的吸光值与对照组差异显著。

随着蛋白浓度的增加, 吸光度也随之增大, 表明细胞增殖增多增快, 未产生细胞毒性。S-层蛋白能促进巨噬细胞 RAW264.7 的增殖, 一定浓度范围内, S-层蛋白的浓度增加, 巨噬细胞的增殖能力也随之增加。

3 结论

3.1 目前, S-层蛋白的提取多选用氯化锂或盐酸胍等高浓度溶剂。实验用 4M 氯化锂法处理乳杆菌, 经过一定纯化步骤可以得到乳酸杆菌 S-层蛋白, 若结合层析或液相色谱对提取所得蛋白进行分离, 也可以获得较高纯度的 S-层蛋白条带。

3.2 Xueyan Chen^[9]用氯化锂溶剂处理发酵乳杆菌 ZJ001 及嗜酸乳杆菌 ATCC4356, 发现菌株对 Hela 细胞的黏附量降低, 且菌体的自我凝集率(4 h)也显著降低。对上述方法稍作改进测定 0 h~5.5 h 内嗜酸乳杆菌的自我凝集率, 结果表明 37 °C 条件下, 随着孵育时间的延长, 菌体自我凝集率呈现明显的上升趋势, 4 M 氯化锂去除乳酸杆菌 S-层蛋白后, 菌体自我凝集率降低。

3.3 相关研究表明乳酸杆菌能定植在肠道黏膜层上, 保护宿主细胞免受病原菌的侵袭^[10], 从而发挥相应的免疫功能。Dayong Ren^[11]选用唾液乳杆菌及植物乳杆菌黏附 Caco-2 细胞, 并探究影响黏附的因素, 结果表明加热及 LiCl 处理作为主要的影响因素能使乳杆菌的黏附能力显著降低。HT-29 与 Caco-2 细胞一样, 均为常见的肠道细胞模型, 故本文选用 HT-29 作为细胞模型。实验表明嗜酸乳杆菌能大量的黏附在 HT-29 结肠癌细胞周围, 氯化锂处理嗜酸乳杆菌, 去除 S-层蛋白后, 细菌的黏附量明显降低。S-层蛋白作为嗜酸乳杆菌的主要黏附成分之一, 能增进菌体的自我凝集率及肠道细胞黏附力, 在维持肠道微生物稳态及益生功能方面也必将发挥重要作用。

3.4 S-层蛋白能对宿主细胞免疫调控起到影响作用。研究发现嗜酸乳杆菌 S-层蛋白通过降低 caspase-3 酶活性, 从而抑制由沙门氏菌引起的 Caco-2 细胞凋亡^[12]。艰难梭状芽胞杆菌 SLPs 能引起相关炎症因子的产生并使巨噬细胞迁移率降低^[13]。将 S-层蛋白与巨噬细胞 RAW264.7 共同孵育, MTS 测定结果发现加入 S-层蛋白后细胞吸光度值显著高于未处理组, 随着 S-层蛋白浓度的升高, 细胞增殖加快加大, 且溶酶体荧光结果表明 S-层蛋白能促进巨噬细胞溶酶体的分泌。表明 S-层蛋白在一定程度上能增进巨噬细胞免疫能力, 与相关研究结论相一致。

3.5 S-层蛋白的功能较多, 主要包括维持菌体形态、黏附肠道细胞、抑制致病菌感染宿主细胞等功能^[14], 并因其单层晶体分子结构也可应用于材料方面, 随着相关研究的深入, S-层蛋白的应用前景也将更加广阔。

参考文献

- [1] 刘志华,沈通一,秦环龙.乳酸杆菌表面蛋白结构和生物学功能的研究进展[J].肠外与肠内营养,2009,16(6):368-372
LIU Zhi-hua, SHEN Tong-yi, QIN Huan-long. Research Progress of Lactobacillus Surface Layer Protein and Biological Function [J]. Parenteral and Enteral Nutrition, 2009, 16(6): 368-372
- [2] Kos B, Suskovi J, Vukovi S, et al. Adhension and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 981-987
- [3] Sleytr U B, Beveridge T J. Bacterial S-layers [J]. Trends in Microbiology, 2000, 7(6): 859-868
- [4] Jakava-Viljanen 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 [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3): 264-273
- [5] 王斌,魏泓.乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定[J].世界华人消化杂志,2005,13(14):1762-1766
WANG Bin, WEI Hong. Extraction and identification of *Lactobacillus* cell-wall surface adhesion-associated protein [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2005, 13(14): 1762-1766
- [6] Boot H J, Kolen C P A M., Van Noort J M, et al. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(19): 6089-6096
- [7] 肖荣,范郁冰,张丽丽,等.乳源短乳杆菌 M8 S-层蛋白的提纯及其生物学特征分析[J].食品科学,2012,33(7): 172-175
XIAO Rong, FAN Yu-bing, ZHANG Li-li, et al. Purification and biological characteristics analysis of milk-derived *Lactobacillus brevis* M8 S-layer protein [J]. Food Science, 2012, 33(7): 172-175
- [8] Johnson-Henry K C, Hagen K E, Gordonpour M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells [J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(2): 356-367
- [9] Xueyan Chen. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115: 307-312

- [10] 俞涵丽,妥彦峰,艾连中,等.乳杆菌抑菌和粘附性能的研究 [J].现代食品科技,2013,6:1247-1251
YU Han-li, TUO Yan-feng, AI Lian-zhong, et al. Antimicrobial and adhesion properties of four Lactobacillus strains [J]. Mordern Food Science & Technology, 2013, 6: 1247-1251
- [11] Dayong Ren, Chang Li, Yanqing Qin, et al. Inhibition of Staphylococcus aureus adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment [J]. Anaerobe, 2012, 18:508-515
- [12] Pengcheng Li, Yinyan Yin, Qinghua Yu, et al. Lactobacillus acidophilus S-layer protein-mediated inhibition of Salmonella-induced apoptosis in Caco-2 cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 409: 142-147
- [13] E. Collins L, Lynch M, Marszalowska I, et al. Surface layer proteins isolated from Clostridium difficile induce clearance responses in macrophages [J]. Microbas and Infection, 2014, 2(1): 1-10
- [14] Sara M, Sleytr U B.S-Layer Proteins [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(4): 859-868