

植物乳杆菌 35 对大肠杆菌在肠上皮细胞 HT-29 上黏附及刺激产生促炎细胞因子的影响

郭远骥¹, 妥彦峰¹, 牟光庆^{1,2}, 蒋淑娟¹, 钱方¹, 刘鹏¹, 盛晓芳¹

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

(2. 东北农业大学食品安全与营养协同创新中心, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本论文采用肠上皮细胞模型 HT-29 细胞系研究 8 株植物乳杆菌在 HT-29 细胞上的黏附性, 并研究黏附性较强的菌株及其胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS) 抑制大肠杆菌 (*E. coli* ATCC25922) 在 HT-29 细胞上黏附及刺激 HT-29 细胞产生炎性因子的作用。结果表明 8 株植物乳杆菌在 HT-29 细胞上的黏附性差异较大: 黏附性最强的植物乳杆菌 35 通过取代、竞争和排阻方式抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞上黏附, 抑制黏附率分别为 30%、33% 和 59%, 其 EPS 在作用浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对大肠杆菌的抑制黏附率为 32%。植物乳杆菌 35 可抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8, 通过取代、竞争、排阻方式抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8, 抑制率分别为 3%、28% 和 40%; 其 EPS 抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8 具有浓度效应, 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率最高, 为 50%。而对于 IL-10 表达量的影响均不显著。结果表明植物乳杆菌 35 具有抑制大肠杆菌引起肠炎的潜在益生功能。

关键词: 乳酸杆菌; HT-29; 大肠杆菌; 黏附

文章编号: 1673-9078(2017)3-14-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.003

Effect of *Lactobacillus plantarum* 35 on *Escherichia coli*-induced IL-8

Production and *E. coli* Adhesion on HT-29 Cells

GUO Yuan-ji¹, TUO Yan-feng¹, MOU Guang-qing^{1,2}, JIANG Shu-juan¹, QIAN Fang¹, LIU Peng¹, SHEGN Xiao-fang¹

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

(2. The Innovation Center of Food Safety and Nutrition of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The adhesive ability of eight strains of *Lactobacillus plantarum* on the HT-29 intestinal epithelial cell line, and the inhibitory effect of the strain with the highest adhesive ability and its exopolysaccharides (EPS) on *Escherichia coli*-induced IL-8 production and *E. coli* adhesion on HT-29 cells were investigated. The results indicated that the eight *Lactobacillus* strains adhered to HT-29 cells to different degrees, and *L. plantarum* 35 had the highest adhesive ability. *L. plantarum* 35 could protect HT-29 cells from *E. coli* adhesion by displacement, competition, and exclusion, with inhibition rates of 30%, 33%, and 59%, respectively. At an active concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$, EPS could inhibit *E. coli* adhesion by 32%. *L. plantarum* 35 could inhibit *E. coli*-induced IL-8 production by HT-29 cells by displacement, competition, and exclusion with inhibition rates of 3%, 28%, and 40%, respectively. EPS could inhibit *E. coli*-induced IL-8 production by HT-29 cells in a dose dependent manner, with the highest inhibitory rate of 50% at 500 $\mu\text{g/mL}$ concentration. *L. plantarum* 35 had no effect on IL-10 production by HT-29 cells. The results showed that *L. plantarum* 35 has a potential probiotic function and may inhibit inflammatory bowel disease induced by *E. coli*.

Key words: *Lactobacillus*; HT-29 cells; *E. coli* ATCC25922; adhesion

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目 (2013BAD18B09); 国家自然科学基金项目 (31571813); 国家海洋食品工程技术研究中心项目 (2012FU125X03); 辽宁省自然科学基金项目 (2014026018) 资助

作者简介: 郭远骥 (1990-), 男, 硕士, 主要研究方向: 益生菌的特性研究。

通讯作者: 牟光庆 (1967-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 乳品加工技术; 益生菌与蛋白质资源利用。

肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*) 是一种食源性致病菌, 主要引起出血性肠炎, 该菌引起的食物中毒已成为全球性的公共卫生问题^[1]。目前报告由 *E. coli* O157:H7 引起的食源性疾病在我国乃至世界已广泛关注^[2]。感染中最重要的起始步骤就是致病菌对宿主细胞的黏附, 进而引发的一系列的炎症。只有阻止致病菌对宿主细胞的黏附, 才能从根源处阻止其感染^[3]。

而乳杆菌是人类肠道中正常存在的有益菌群,对致病细菌黏附宿主细胞有抑制作用。*Lactobacillus plantarum* CS24.2能够有效抑制致病性大肠杆菌对肠道上皮细胞的黏附作用^[4]。益生乳杆菌能干扰致病细菌的侵染,可能是基于乳杆菌能特异黏附于黏膜表面抑制致病细菌在黏膜表面黏附。乳杆菌黏附这些组织的能力和细菌细胞表面存在的黏附蛋白质有关^[5]。乳杆菌胞外多糖(EPS)则对机体的免疫调节有作用,从*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1和*L. paracasei* KB28提取EPS均能显著提高使小鼠免疫能力^[6,7]。M. Candela等人研究发现,浓度为 10^8 CFU/mL的*L. acidophilus* Bar13和*B. longum* Bar33能有效抑制TNF- α 、IL-1 β 和LPS刺激HT-29细胞产生IL-8^[8]。肠道复杂的内环境使得有益菌与有害菌之间竞争黏附的关系特性复杂。本文选用HT-29细胞作为肠上皮细胞模型,研究8株从新疆地区

发酵乳制品中分离得到的*Lactobacillus*抑制大肠杆菌黏附及抑制大肠杆菌刺激细胞产生炎症因子,以*L. rhamnosus* GG作为对照,并筛选具有缓解细菌性肠炎的潜在益生菌。

1 材料与方法

1.1 材料

8株乳杆菌为实验室保存,分离于新疆牧民自制发酵乳制品中,经过16S rDNA鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* subsp. *Plantarum*),如表1所示。大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)为实验室保存菌株。HT-29细胞来自中国科学院上海典藏细胞库(上海)。

表1 试验所用菌株情况

Table 1 Strains used in the experiment

菌株编号	菌株名称	来源
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	实验室保存菌株
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> 15	实验室保存菌株
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> 16	实验室保存菌株
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	实验室保存菌株
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	实验室保存菌株
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> 25	实验室保存菌株
33	<i>Lactobacillus plantarum</i> 33	实验室保存菌株
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> 35	实验室保存菌株
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	哈尔滨工业大学食品学院赠送

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

8株乳杆菌于MRS培养液中37℃培养至活力恢复,待用。于PBS(pH=7.3)中分别稀释成 10^8 、 10^7 和 10^6 CFU/mL的菌悬液待用。大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)活化两代接种于LB培养基中,37℃培养18h备用。在进行黏附实验时,将活力恢复的乳杆菌或大肠杆菌重悬与RPMI1640细胞培养液中,制备一定浓度的菌悬液。

1.2.2 细胞培养

HT-29细胞采用在改良型RPMI-1640培养液(HyClone)中培养,并添加10%(V/V)的胎牛血清(Gibco)。细胞置于37℃的CO₂培养箱(5% CO₂和95%空气)中培养,每24h换一次液。

1.2.3 乳杆菌EPS的提取^[9]

乳杆菌的发酵液在10000 r/min,10 min的条件下离心除菌体获得上清,将上清液浓缩至原体积的1/5,

浓缩液中加入50%的TCA沉淀蛋白12 h,在10000 r/min、4℃、30 min离心去除沉淀蛋白,获得的上清液加入2倍体积95%乙醇沉淀多糖12 h,离心(10000 r/min,4℃,10 min),弃去上清收集沉淀的多糖,并用灭菌的蒸馏水溶解,装入8000~14000 u的透析袋内透析24 h,每隔8 h换一次超纯水,至离子强度不变时,冻干获得粗多糖,采用苯酚硫酸法测定粗多糖中多糖含量。

1.2.4 8株乳杆菌对HT-29细胞的黏附作用

将消化后的HT-29细胞接到12孔细胞培养板中,每孔加入 2.5×10^5 个细胞,于CO₂培养箱(5% CO₂和95%空气)中培养,待细胞达到80%~90%融合时,进行黏附实验。将12孔板中HT-29细胞用无菌PBS(pH=7.3)清洗3次,加入100 μ L菌悬液(10^8 CFU/mL),在CO₂培养箱中37℃培养2 h,然后去除孔中菌悬液,用无菌的PBS洗涤5次,以除去未黏附的乳杆菌,然后加入500 μ L、5%(V/V) Triton \times 100,冰浴解析5 min,对解析液吹打混匀,梯度稀释后用倾

注平板法 (MRS 琼脂平板) 对粘附在细胞上的乳酸杆菌进行计数, 记为乳杆菌黏附数量。未加入细胞中进行黏附试验的菌落数记为对照组。黏附率计算方式如下:

$$\text{黏附率} \% = \frac{\text{乳杆菌黏附数量}}{\text{乳杆菌初始数量}} \times 100\%$$

1.2.5 不同浓度乳杆菌对大肠杆菌的抑制黏附作用

分别取 100 μL 的浓度为 10^8 、 10^7 和 10^6 CFU/mL 的菌悬液加入到 12 孔单层细胞中, 进行抑制 *E.coli* 的竞争黏附实验 (方法参考 1.2.6 中竞争实验), 考察乳杆菌浓度对其抑制黏附的影响。

1.2.6 乳杆菌干预大肠杆菌 (*E.coli* ATCC25922) 对 HT-29 细胞黏附的研究

本实验采用 3 种不同的方法: 排阻试验、竞争实验、取代试验研究乳杆菌抑制大肠杆菌在肠上皮细胞模型 HT-29 细胞上的黏附作用。HT-29 细胞在培养瓶中长成单层后, 用胰酶消化, 以 4×10^5 cell/mL 的浓度加入到 12 孔细胞培养板中, 每孔加 1 mL, 待细胞长到 80%~90% 融合成单层细胞时, 进行实验。

(1) 排阻实验-乳杆菌对大肠杆菌在 HT-29 细胞上的排阻黏附实验

将 12 孔培养板中的单层细胞用 PBS (pH=7.3) 清洗 3 次后每孔中加入 400 μL 的 RPMI1640 细胞培养液, 然后每孔加入 100 μL 乳杆菌菌悬液 (10^8 CFU/mL) 加入到 HT-29 单层细胞中, 在 CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h。然后用无菌 PBS 洗涤 3 次, 移去未黏附的乳杆菌, 加入 100 μL 大肠杆菌菌悬液 (10^8 CFU/mL), CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h。

(2) 竞争实验-乳杆菌和大肠杆菌在 HT-29 细胞上的竞争粘附实验

HT-29 单层细胞用 PBS 清洗 3 次后每孔加入 400 μL 的细胞培养液 RPMI1640 细胞培养液, 每孔同时加入 100 μL 乳杆菌菌悬液 (10^8 CFU/mL) 和 100 μL 大肠杆菌菌悬液 (10^8 CFU/mL) 加入 HT-29 单层细胞中培养 2 h。

(3) 取代实验-乳杆菌替换大肠杆菌在 HT-29 细胞上的粘附实验

单层细胞用 PBS (pH=7.3) 清洗 3 次后每孔中加入 400 μL 的 RPMI1640 细胞培养液, 然后每孔加入 100 μL 大肠杆菌 (10^8 CFU/mL) 到 HT-29 单层细胞中, 在 CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h。然后用无菌 PBS 洗涤 3 次, 移去未黏附的病原菌, 加入 100 μL 乳杆菌菌悬液 (10^8 CFU/mL), CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h。

实验结束后, 用无菌 PBS 清洗 HT-29 单层细胞 4

次, 除去未粘附的菌体, 加入 500 μL , 5% (V/V) Triton \times 100, 吹打混匀, 梯度稀释, 用伊红美蓝培养基平板计实验组和对照组中大肠杆菌菌数。对照组不经过乳杆菌处理, 只在 HT-29 单程细胞加入大肠杆菌 (100 μL , 10^8 CFU/mL) 进行黏附实验, 每个实验 3 个平行, 重复 3 次。抑制黏附率计算公式如下:

$$\text{抑制黏附率} \% = 100\% - \frac{\text{实验组黏附大肠杆菌数}}{\text{对照组黏附大肠杆菌数}} \times 100\%$$

1.2.7 乳杆菌不同浓度 EPS 抑制大肠杆菌的黏附作用

提取筛选获得的在 HT-29 细胞具有较强黏附性的乳杆菌菌株和对照菌株 LGG 的胞外多糖, 并将胞外多糖溶解于 RPMI1640 细胞培养液中, 作为胞外多糖悬液。

取 100 μL 的浓度为 500、250 和 125 $\mu\text{g/mL}$ 的 EPS 悬液加入到 12 孔单层细胞中, 进行抑制 *E.coli* 的竞争黏附实验, 考察乳酸杆菌不同浓度 EPS 对其抑制黏附的影响, 具体方法参考 1.2.6。

1.2.8 乳杆菌抑制大肠杆菌 (*E.coli* ATCC25922) 诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10 的测定

将 HT-29 细胞浓度调至 $4 \sim 5 \times 10^5$ cell/mL 接入 12 孔板中, 培养至 80~90% 融合后, 进行微生物干预 HT-29 细胞产生细胞因子 IL-8 和 IL-10 的实验, 干预结束后, 收集上清, 离心 (8000 r/min, 10 min) 后通过 Human IL-8/IL-10 试剂盒测定细胞培养液中 IL-8 和 IL-10 含量的变化。

(1) 乳杆菌和大肠杆菌诱导 HT-29 分泌 IL-8 和 IL-10

将浓度为 $4 \sim 5 \times 10^5$ cell/mL 的 HT-29 细胞接入 12 孔板中培养至单层, 用无菌 PBS 洗 3 次, 进行以下实验: 在细胞培养板中加入 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 乳杆菌 (用不含胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养液重悬), 在温度 37 $^\circ\text{C}$ 与 5% CO_2 的培养箱中培养 3 h。将 100 μL 1×10^8 CFU/mL 大肠杆菌 (用不含胎牛血清 RPMI1640 细胞培养液重悬) 加入细胞培养板中培养 3 h, 作为阳性对照。不作任何处理的细胞作为空白对照。待干预结束后, 收集上清, 测定细胞培养液中 IL-8 和 IL-10 含量的变化。

(2) 乳杆菌抑制大肠杆菌诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10。

(a) 将 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 乳杆菌和大肠杆菌同时加入到 12 孔细胞培养板中, 共同培养 3 h。(b) 用 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 乳杆菌预先处理 HT-29 细胞 1 h, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 将未黏附的乳杆菌除去, 再加入 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 的 *E.coli* 培养 2 h。

(c) 先加入 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌刺激 HT-29 细胞 1 h, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 再加入 1×10^8 CFU/mL 乳杆菌培养 2 h。收集 3 类实验的上清液。存放于 -80°C 超低温冷冻冰箱中待测。

(3) 乳杆菌不同浓度 EPS 抑制大肠杆菌诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10 的测定

将冻干后的多糖, 配制成 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖溶液待用。将 100 μL 、 1×10^8 CFU/mL 大肠杆菌和 100 μL 不同浓度的多糖溶同时加入到细胞培养板中, 在温度 37°C 与 5% CO_2 的培养箱中培养 3 h。收集上清, 离心去除沉淀, 存放于 -80°C 超低温冷冻冰箱中待测。

1.2.9 数据分析

数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计, 差异显著性检验采用独立样本 t 检验和单因素方差分析 (ANOVA, LSD)。所有数据均表示为平均值 \pm 标准误差, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 8 株乳杆菌对 HT-29 细胞的黏附作用

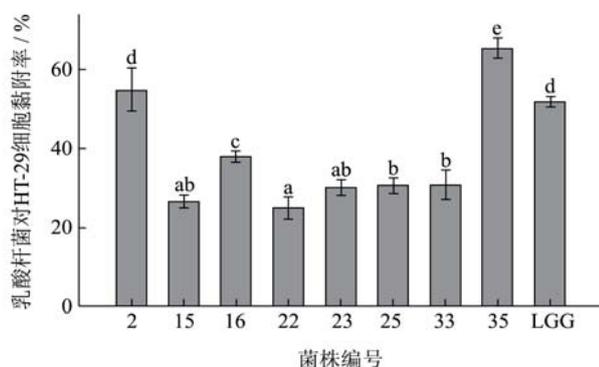


图1 8 株植物乳杆菌对 HT-29 细胞的黏附效果

Fig.1 Adhesion of the eight *Lactobacillus plantarum* strains on HT-29 cells

注: 不同字母标示差异显著 ($p < 0.05$)。

结果表明本研究中的8株乳杆菌在HT-29细胞上的黏附性, 存在较大差异。乳酸杆菌在肠道的黏附是其发挥益生功能的前提和基础, 已有一些学者研究了乳杆菌体外黏附性与抑制体内致病菌黏附能力有关^[10], 且在肠上皮细胞上的黏附性具有菌株特异性。本文应用了HT-29细胞作为模型来研究8株植物乳杆菌的黏附性。从图1的数据统计分析可以看出8株植物乳杆菌在黏附HT-29细胞的能力有显著差别, 2号、15号、16号、22号、23号、25号、33号、35号及LGG菌株平均黏附率分别为54.50%、26.50%、38%、25%、30%、30.70%、29.50%、65.20%和50.20%, 各菌株间黏附率具有显著

差异 ($p < 0.05$), 其中 *L. plantarum* 35 黏附性显著高于其他菌株。黏附率最弱为 *L. plantarum* 22。Forestier^[11] 等人研究 Lcr35 (*L. casei* subsp. *raihannosus*) 黏附 Caco-2 细胞能力, 与抑制人肠道 9 种病原菌黏附细胞有一定相关性。推测对 HT-29 细胞黏附性较强的乳杆菌, 在肠道中的黏附肠上皮细胞能力也较好, 可以更好的发挥其对宿主的益生作用。乳杆菌黏附到肠上皮细胞后, 在肠道中定植, 代谢产生有机酸, 降低肠道 pH, 形成不利于致病菌生长的微环境, 从而抑制或杀死致病菌^[12]。同时与致病菌竞争黏附位点和营养物质, 抑制致病菌在肠道中的定植和生长, 维持肠道菌群平衡, 因此菌株的黏附性是筛选益生菌的一个重要指标。本研究中 *L. plantarum* 22 对 HT-29 细胞黏附性较差, 初步认为其在肠道中的定植能力较弱, 在肠道中发挥的有益作用不如黏附性较强的 *L. plantarum* 35。

L. plantarum 35 在 HT-29 细胞模型上具有较好的黏附性, 因此选择 *L. plantarum* 35 进行后续研究。

2.2 不同浓度乳杆菌对大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 25922) 的抑制黏附作用

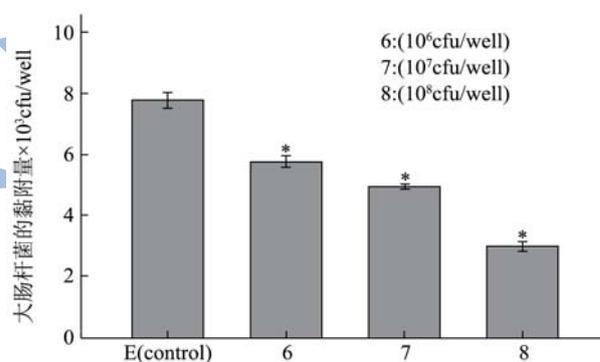


图2 不同浓度 *L. plantarum* 35 抑制 *E. coli* 对 HT-29 细胞的黏附作用

Fig.2 Inhibition of *E. coli* adhesion on HT-29 cells by different densities of *L. plantarum* 35

注: “*” 代表与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。

研究 *L. plantarum* 35 对大肠杆菌在 HT-29 细胞上黏附的影响。竞争黏附作用具有一定浓度效应, 当 *L. plantarum* 35 作用浓度为 10^8 CFU/well 的作用浓度的竞争效果最好, *L. plantarum* 35 与大肠杆菌在 HT-29 细胞上的竞争黏附效果最好, 对大肠杆菌黏附作用的抑制率为 62% (图 3), 与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。作用浓度为 10^7 CFU/well 和 10^6 CFU/well 的乳杆菌抑制效果明显降低, 抑制率为 36% 和 26%。

黏附是致病菌侵入宿主细胞而引起疾病的前提条件, 当致病菌黏附与宿主细胞后会引发一系列的致病

作用。致病菌黏附到肠上皮细胞的机制是和肠上皮细胞表面分子的受体相结合，乳杆菌（益生菌）在肠上皮细胞上与致病菌竞争黏性位点，会抑制致病菌的入侵^[13]。

2.3 乳杆菌对大肠杆菌(*E.coli* ATCC25922)黏附的抑制作用

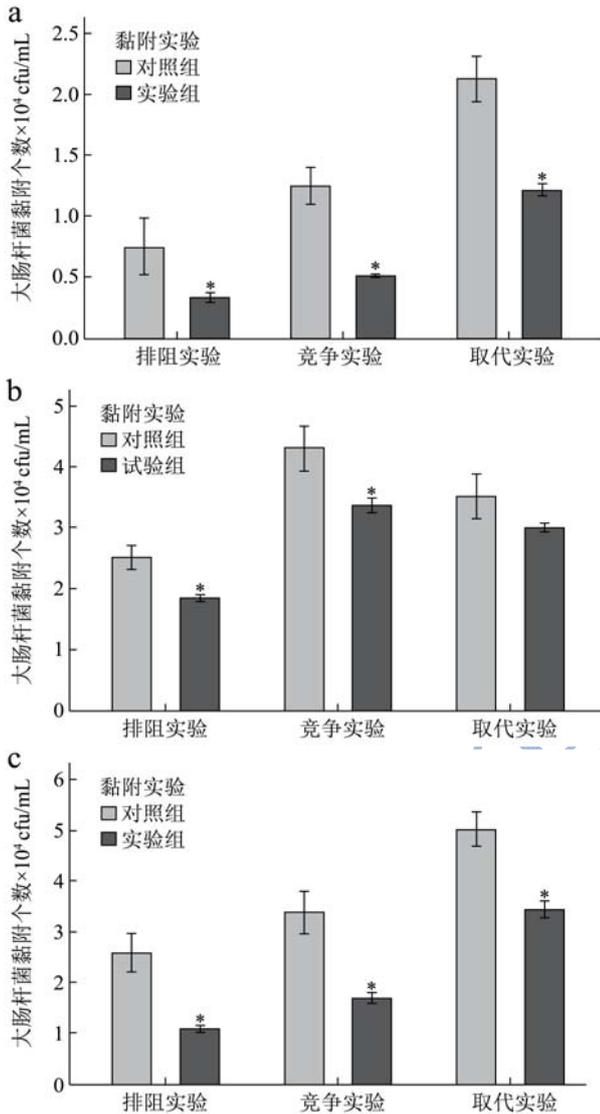


图3 3株乳酸杆菌抑制大肠杆菌对HT-29细胞黏附作用

Fig.3 Inhibition of *E. coli* adhesion on HT-29 cells by three *Lactobacillus* strains

注：a代表35号植物乳杆菌；b代表22号植物乳杆菌；c代表LGG；*代表与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。

选取在 HT-29 细胞上黏附性最弱的 *L. plantarum*22 菌株，黏附性最强的 *L. plantarum*35 菌株以及标准菌株 LGG 进行抑制大肠杆菌黏附实验。从图 3a 的数据统计分析中看出，黏附性最强 *L. plantarum* 35 在排阻实验中排阻大肠杆菌的抑制率为

65%，竞争实验中竞争率达到 60%，取代实验的数据统计分析中可以看出，取代率是 44%。从以上的个实验的结果来看，*L. plantarum* 35 排阻大肠杆菌在 HT-29 细胞上的黏附作用效果最好。图 3b 数据得出 22 号植物乳杆菌抑制大肠杆菌黏附的排阻率、竞争率和取代率分别为 27%、22%和 15%。图 3c 数据标准菌株 LGG 抑制大肠黏附的排阻率、竞争率和取代率分别为 51.2%、51.8%和 31.4%。以上数据表明乳酸杆菌在 HT-29 细胞上的粘附性与抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞黏附效果具有一定的相关性。

致病菌黏附宿主细胞是感染细菌性疾病的前提，抑制致病菌黏附可有效地控制细胞被致病菌干扰。LGG^[14]是一株被人们深入认知的最有益的菌株之一，它能有效地治疗由感染而引起的肠道疾病。本实验以 LGG 作为标准对照菌株，所用的 *L. plantarum* 35 在排阻实验、竞争实验、取代实验对抑制大肠杆菌黏附 HT-29 细胞有较强的作用。Ramiah^[15]等利用 Caco-2 细胞研究表明，*L. plantarum* 423 对 *Clostridium sporogenes* 和 *Enterococcus faecalis* 黏附 Caco-2 细胞的抑制率为 74%和 62%。Chen^[16]等利用 Hela 细胞研究表明，*Lactobacillus crispatus* ZJ001 能够抑制 *S. typhimurium* 和 *E. coli* 对 Hela 细胞的黏附作用，抑制率分别为 35%和 39%。Akhilesh^[4]等利用 HT-29 细胞研究表明，*Lactobacillus plantarum* CS24.2 抑制大肠杆菌黏附细胞的抑制率为 41.7%。综上所述，乳杆菌黏附细胞能力越强，竞争细胞表层竞争位点越多，从而导致致病菌无法定植，致病菌黏附率下降大大减少了炎症的产生。乳杆菌对致病菌在宿主细胞黏附，有一定抑制作用，抑制效果与所利用细胞模型、乳杆菌菌株种类以及致病菌种类有密切的关系。

2.4 乳杆菌不同浓度 EPS 对 *E.coli* 的抑制黏附

作用

EPS 主要起到空间排阻的作用，通过屏蔽细胞表面黏附因子对黏附形成间接影响，从而抑制致病菌的黏附。Ruas-Madiedo^[17]等研究也发现 EPS 具有抑制致病菌黏附肠道的作用。EPS 在通过与致病菌竞争肠上皮细胞上的黏性位点，在抑菌黏附中起主要作用。

如图4所示，当 *L. plantarum* 35 及 LGG 菌株 EPS 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，可显著抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞上黏附，抑制黏附率分别为 32.20%和 41.20% ($p < 0.05$)。当 2 株菌 EPS 浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 时，与对照相比，不能抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞上黏附，抑制大肠杆菌黏附效果不显著 ($p > 0.05$)。以上数据数据表明不同浓度 EPS 对抑制 *E. coli* 黏附细胞具有一定相关性。

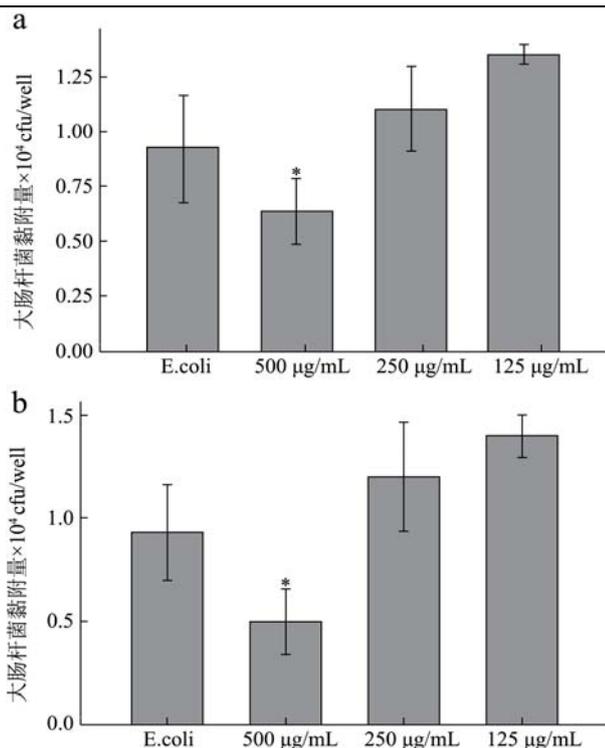


图4 2株乳酸杆菌不同浓度EPS抑制大肠杆菌对HT-29细胞黏附作用

Fig.4 Inhibition of *E. coli* adhesion on HT-29 cells by different concentrations of *Lactobacillus* EPS

注: a代表35号植物乳杆菌, EPS; b代表LGG, EPS; *代表与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。

2.5 乳杆菌抑制大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)

诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10

据报道致病菌作用于细胞, 会破坏细胞组织结构及上皮细胞的免疫系统, 进而导致炎症反应, 这种炎症反应就会产生一些炎症细胞因子, 例如IL-8和IL-1 β 。一些研究表明, 乳杆菌能够阻止致病菌诱导上皮细胞产生炎症因子IL-8, 从而抑制炎症的产生^[18]。而IL-10是一种抗炎因子, 主要功能是维护上皮细胞的屏障功能。一些研究表明, 乳杆菌能够阻止致病菌导致上皮细胞产生炎症因子IL-8, 减轻其对上皮细胞的破坏, 同时还能刺激上皮细胞产生抗炎因子IL-10和粘液蛋白等发挥其对上皮细胞屏障功能的保护作用。

由表2和表3的统计分析结果可以看出, 大肠杆菌刺激HT-29细胞产生大量的IL-8, 与对照组差异显著 ($p < 0.05$)。而*L. plantarum* 35, 能够抑制HT-29细胞产生IL-8, 虽然与对照组相比差异不显著, 但是其刺激HT-29细胞产生IL-8的量比对照组减少了13.47 pg/mL。LGG对刺激HT-29细胞产生IL-8没有减少的作用。*L. plantarum* 35和LGG在抑制大肠杆菌刺激HT-29细胞产

生IL-8的排阻、竞争、取代实验中, *L. plantarum* 35通过排阻、竞争抑制产生IL-8的效果显著 ($p < 0.05$), 在取代试验中抑制效果不显著 ($p > 0.05$)。LGG在3种作用方式中, 抑制产生IL-8效果均显著 ($p < 0.05$)。与对照组相比, *L. plantarum* 35和LGG, 不能刺激HT-29细胞产生大量的IL-10 ($p > 0.05$), 同时大肠杆菌单独作用组中的IL-10的含量与对照组相比也没有变化 ($p > 0.05$)。*L. plantarum* 35和LGG与大肠杆菌的三种实验作用方式中, 刺激细胞IL-10的分泌量没有显著的变化 ($p > 0.05$)。Roselli^[19]研究中提示*L. sobrius*不仅能够抑制*E. coli* K88刺激上皮细胞产生IL-8, 阻碍了IL-8对上皮细胞屏障功能的破坏, 同时还能刺激上皮细胞产生大量的IL-10, 对上皮细胞的功能起到了保护作用, 但本实验测定的两株乳杆菌都没有刺激机体产生IL-10的功能, 推测与菌株的特性有关系。

表2 *L. plantarum*35 抑制 *E. coli* 刺激细胞产生 IL-8 和 IL-10

Table 2 Strain 35 inhibits *E. coli*-induced IL-8 and IL-10 production

实验组	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)
Control	59.23±8.37 ^d	54.81±4.03 ^a
35	45.76±13.51 ^d	52.63±1.46 ^a
<i>E. coli</i>	1890.21±90.00 ^a	50.06±2.16 ^a
35/ <i>E. coli</i>	1144.11±22 ^c	49.27±3.83 ^a
35+ <i>E. coli</i>	1343.33±22.55 ^b	55.52±4.71 ^a
<i>E. coli</i> /35	1827.30±51.39 ^a	52.19±3.66 ^a

注: 同一列数据右上角标示不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

表3 LGG 抑制 *E. coli* 刺激细胞产生 IL-8 和 IL-10

Table 3 LGG inhibits *E. coli*-induced IL-8 and IL-10 production

实验组	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)
Control	55.50±5.27 ^c	54.81±4.03 ^a
LGG	80.04±13.53 ^c	49.98±1.99 ^a
<i>E. coli</i>	1890.43±90.11 ^a	49.60±1.49 ^a
LGG/ <i>E. coli</i>	1160.33±51.50 ^b	50.19±0.37 ^a
LGG+ <i>E. coli</i>	1183.50±190.50 ^b	51.13±2.06 ^a
<i>E. coli</i> /LGG	1328.11±52.46 ^b	50.99±3.29 ^a

注: 同一列数据右上角标示不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6 乳杆菌 EPS 抑制大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10

由表 4 和表 5 的统计分析结果可以看出 *L. plantarum*35 和 LGG 所提取的不同浓度的 EPS 对

E.coli 刺激 HT-29 细胞产生 IL-8 有明显的抑制作用, 与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。随着 EPS 浓度梯度的降低, 大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生的 IL-8 逐渐增多。浓度越高的 EPS 抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8 的能力越强。表 4 表 5 中对照组 HT-29 细胞产生的 IL-10 量为 (56.37 ± 1.84) pg/mL, 与 *L. plantarum* 35 和 LGG 的不同浓度多糖和大肠杆菌刺激 HT-29 细胞分泌 IL-10 量没有显著差别 ($p > 0.05$)。实验测定两株乳酸杆菌的 EPS 没有刺激机细胞产生 IL-10 的功能。表 4 *L. plantarum* 35 不同浓度 EPS 抑制 *E. coli* 刺激细胞产生 IL-8 和 IL-10

Table 4 Various concentrations of EPS from strain 35 inhibit *E. coli*-induced IL-8 and IL-10 production

实验组	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)
Control	56.37 ± 2.75^d	52.35 ± 1.84^a
<i>E.coli</i>	1662.19 ± 54.83^a	49.77 ± 1.38^a
500 $\mu\text{g/mL}$	830.24 ± 10.47^c	48.53 ± 0.49^a
250 $\mu\text{g/mL}$	855.58 ± 12.12^c	49.07 ± 1.02^a
125 $\mu\text{g/mL}$	1039.96 ± 43.11^b	55.44 ± 3.23^a

注: 同一列数据右上角标示不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

表 5 LGG 不同浓度 EPS 抑制 *E. coli* 刺激细胞产生 IL-8 和 IL-10

Table 5 Various concentrations of EPS from LGG inhibit *E. coli* induced IL-8 and IL-10 production

实验组	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)
Control	54.26 ± 2.24^d	51.50 ± 0.77^a
<i>E.coli</i>	1672.18 ± 64.18^a	49.26 ± 0.62^a
500 $\mu\text{g/mL}$	908.58 ± 12.74^c	47.35 ± 0.60^a
250 $\mu\text{g/mL}$	938.59 ± 4.90^c	46.54 ± 1.06^a
125 $\mu\text{g/mL}$	1094.59 ± 19.60^b	56.60 ± 1.10^a

注: 同一列数据右上角标示不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

本研究从 8 株植物乳, 杆菌中筛选出一株植物乳杆菌 35, 在肠上皮细胞模型 HT-29 细胞上具有较强黏附性; 其活菌体及 EPS 均能有效抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞黏附, 并且能抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8。植物乳杆菌 35 是一株具有潜在益生功能的菌株, 还需进一步研究该菌株对肠上皮细胞屏障功能的影响, 以及安全性。

参考文献

[1] Griffin P M, Tauxe R B. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia Coli* O157:H7, other enterohemorrhagic

gic.E.coli, and the associated hemolytic uremic syndrome [J]. Epidemiol Rev., 1991, 13(1): 60-98

- [2] Chapman P A, Siddons C A, Gerdan Malo AT, et al. A 1-year study of *Escherichiacoli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry [J]. Epidemiol Infect., 1997, 119(2): 245-250
- [3] Finlay B B, Caparon M. Bacterial adherence to cell surfaces and extracellular matrix [J]. Cellular Microbiology, 2000: 67-80
- [4] Dhanani A S, Bagchi T. *Lactobacillus plantarum* CS24. 2 prevents *Escherichia coli* adhesion to HT-29 cells and also down-regulates enteropathogen-induced tumor necrosis factor- α and interleukin-8 expression [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 57(4): 309-315
- [5] Argyri A A, Zoumpopoulou G, Karatzas K A G, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests [J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282-291
- [6] Nishimura-Uemura J, Kitazawa H, Kawai Y, et al. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus OLL1073R-1 [J]. Food Microbiology, 2003, 20(3): 267-273
- [7] Kang H, Choi H S, Kim J E, et al. Exopolysaccharide-overproducing *Lactobacillus paracasei* KB28 induces cytokines in mouse peritoneal macrophages via modulation of NF- κ B and MAPKs [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(11): 1174-1178
- [8] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 286-292
- [9] Hamet M F, Piermaria J A, Abraham A G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 129-135
- [10] Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006, 43(2): 197-204
- [11] Forestier C D, Champs C, Vatoux C. Probiotic activities of *Lactobacillus caseirhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties [J]. Research in

- Microbiology, 2001, 152(2): 167-173
- [12] Servin A L. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(4): 405-440
- [13] 张英春,韩雪,单毓娟,等. 益生菌抑制致病菌作用的机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1306-1313
ZHANG Ying-chun, HAN Xue, SHAN Yu-juan, et al. Recent advances in mechanism on probiotic bacteria inhibition of pathogens [J]. Microbiology China, 2012, 39(9): 1306-1313
- [14] Doron S, Snyderman D R, Gorbach S L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications [J]. Gastroenterol Clin. North Am., 2005, 34(3): 483-498
- [15] Ramiah K, van Reenen C A, Dicks L M T. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis* [J]. Research in Microbiology, 2008, 159(6): 470-475
- [16] Bernet M F, Brassart D, Neeser J R, et al. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria [J]. Gut, 1994, 35(4): 483-489
- [17] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, et al. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(8): 2011-2015
- [18] Sansonetti P J, Tran Van Nhieu G, Egile C. Rupture of the intestinal epithelial barrier and mucosal invasion by *Shigella flexneri* [J]. Clinical Infectious Diseases, 1999, 28(3): 466-475
- [19] Seth A, Yan F, Polk D B, et al. Probiotics ameliorate hydrogen peroxide induced epithelial barrier disruption by PKC and MAP kinase-dependent mechanism [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2008, 294(4): G1060-G1069