

## 乳酸菌体外粘附人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞的研究

李平兰\* 杨华 张麓

(中国农业大学食品学院, 北京 100094)

**摘要** 用实验室保存的 24 株乳酸菌菌种做了对人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞的体外粘附性试验。发现双歧杆菌的粘附能力较高, 平均在 10.5 个/细胞; 乳杆菌的粘附能力较低, 平均在 3.2 个/细胞; 球菌的粘附能力很低, 平均在 2.3 个/细胞。其中双歧杆菌中 *Bifidobacterium bifidum* 02 菌株粘附能力最好, 达到  $(18.4 \pm 2.7)$  个/细胞。乳杆菌中 *Lactobacillus acidophilus* 99101 粘附能力最好, 达到  $(10.2 \pm 1.8)$  个/细胞。同时, 同种不同株的乳酸菌粘附能力有差异, 而同属中, 来自人粪便与来自猪粪便的乳酸菌的粘附能力没有明显差异。

**关键词** 乳酸菌; 粘附; HT-29 细胞

**中图分类号** Q939.117.06

### Study on Adhesion Ability of Lactic Acid Bacteria to the Colonic Adenocarcinoma Cell Line HT-29

Li Pinglan Yang Hua Zhang Chi

(College of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** 24 strains of lactic acid bacteria, including 11 strains of *Bifidobacterium*, 10 strains of *Lactobacillus* and 3 strains of *Cocci*, were selected and their adhering abilities to colonic adenocarcinoma cell line HT-29 were tested individually *in vitro*. The results showed that the mean adhesive levels (organisms/cell) of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Cocci* to cell line HT-29 were 10.5, 3.2 and 2.3 respectively. The most highly adhering strain in *Bifidobacterium* to cell line HT-29 was *B. bifidum* 02 and the adhering level was  $18.4 \pm 2.7$ ; the most highly adhering strain in *Lactobacillus* was *L. acidophilus* 99101 and adhering level was  $10.2 \pm 1.8$ . In addition, the different strains in the same species expressed various adhering capacities, and no obvious difference in adhering abilities were observed between the lactic acid bacteria which belongs to the same genus from faeces of pig and human.

**Key words** lactic acid bacteria; adhesion; HT-29 cells

乳酸菌是一类从可发酵性碳水化合物(主要指葡萄糖)产乳酸的细菌的通称<sup>[1]</sup>, 广泛用于食品工业、轻工业、发酵工业、医药和饲料工业; 作为人和动物体内正常的生理性细菌, 在调节肠道微生态平衡方面起着非常重要的作用。近年来, 随着微生物学的深入, 微生态制剂迅猛发展起来, 而其中, 应用最多的是乳酸菌中的双歧杆菌, 其次是乳酸杆菌。乳酸杆菌中最常用的是嗜酸乳杆菌。然而乳酸菌能否在肠道内粘附定植是影响活菌制剂效果的关键因素之一。粘附是指细菌与肠上皮细胞通过生物化学作用产生的特异性的粘连<sup>[2]</sup>。粘附是定植的第一步, 不能粘附于肠上皮细胞表面的细菌, 只能是过路菌而不能在肠道内定植, 也就不能充分发挥生理功能。HT-29 细胞是一种体外易培养的人结肠腺癌细胞, 其形态、粘附能力等与肠上皮细胞类似, 能表达正常人肠细胞的形态和某些生理特性, 国外常用其作为体外粘附试验的模拟细

收稿日期: 2001-07-05

\* 李平兰, 副教授, 研究方向为乳酸菌生物学特性及应用。

胞<sup>[3]</sup>。本试验选其作为模拟细胞对实验室保存的24株乳酸菌进行了体外粘附试验,为活菌制剂的选择提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

24株实验用乳酸菌全部由食品微生物教研室提供(表1~3)。

乳酸杆菌用MRS,球菌用M17培养基培养,双歧杆菌用PTYG培养基培养<sup>[1]</sup>。

人结肠腺癌细胞系HT-29细胞由广州南方医院提供。

1640培养液由78% PRMI 1640,20%小牛血清,1%青霉素、链霉素双抗溶液,1%谷氨酰胺,0.25%胰酶-0.02% EDTA 消化液组成。

PBS缓冲液(pH7.4)由8g NaCl,0.20g KCl,1.14g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>加水定容至1000 mL配置而成。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HT-29结肠腺癌细胞系在1640细胞培养液,37℃,5%CO<sub>2</sub>-95%空气的二氧化碳培养箱中恒温培养。每天更换营养液,每周传代1次。

**1.2.2 粘附试验** 将培养好的HT-29细胞消化,制成细胞悬液(5×10<sup>4</sup>个·mL<sup>-1</sup>),向预先已放置盖玻片的24孔板每孔内加入2 mL细胞悬液,37℃,5%CO<sub>2</sub>-95%空气中培养。细胞贴壁后,吸出旧的细胞培养液,无菌PBS冲洗2次,每孔加入1 mL菌液(含菌体1×10<sup>8</sup>个·mL<sup>-1</sup>)与1 mL 1640细胞培养液的混合液,37℃,5%CO<sub>2</sub>-95%空气中培养2 h。无菌PBS冲5次,10%甲醛固定2 h。革兰氏染色,镜检,随机挑选20个视野,计数50个细胞上粘附的细菌数,再计算平均每个细胞所粘附的细菌数。

## 2 结果与分析

### 2.1 双歧杆菌对HT-29细胞的粘附

被测试的11株双歧杆菌中(表1),8株来自于人粪便,分别属于4个种;3株来自于猪粪便,未定种。粘附能力最高的是来自于人粪便的两歧双歧杆菌02菌珠,其粘附平均值为(18.4±2.7)个/细胞。粘附水平最低的是来自猪粪便的未定种双歧杆菌16-B632菌珠,其粘附平均

表1 双歧杆菌对HT-29细胞的粘附

双歧杆菌菌珠	菌种	来源	粘附菌数,个/细胞
02	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	人粪便	18.0±2.7
205	两歧双歧杆菌 <i>B. bifidum</i>	人粪便	10.8±0.9
18-2	两歧双歧杆菌 <i>B. bifidum</i>	人粪便	5.8±1.8
22-5	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	人粪便	14.6±1.0
204	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	人粪便	10.7±1.8
203	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	人粪便	8.7±1.1
S-BD	短双歧杆菌 <i>B. breve</i>	人粪便	14.9±1.1
11-4	青春双歧杆菌 <i>B. adolescentis</i>	人粪便	5.5±2.3
8-B622	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i> sp.	猪粪便	10.9±2.6
6-B634	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i> sp.	猪粪便	10.3±2.0
16-B632	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i> sp.	猪粪便	5.4±1.7

值为(5.4±1.7)个/细胞。64%被测试的双歧杆菌粘附平均值在 10.0 个/细胞以上;36%被测试的双歧杆菌粘附平均值做 5.0~10.0 个/细胞之间;被测试的双歧杆菌中,没有粘附平均值低于 5.0 个/细胞的。所有双歧杆菌的平均粘附水平为 10.5 个/细胞。

## 2.2 乳杆菌对 HT-29 细胞的粘附

10 株被测试的乳杆菌中(表 2),5 株来自于人粪便,属于 2 个不同的种;5 株为来自于猪粪便的产细菌素未定种菌株。其中来自于人粪便的嗜酸乳杆菌 99101 菌株粘附能力最强,为(10.2±1.8)个/细胞;其次是来自于猪粪便的产细菌素的 M-21-4 菌株,为(7.5±0.4)个/细胞。除这 2 株菌外,其他被测乳杆菌的粘附平均值均低于 5.0 个/细胞。其中人源于酪乳杆菌 99108 菌株以及未定种的猪源乳杆菌 R-17-3 菌株粘附水平尤其低,可近似认为无粘附。所有乳杆菌的平均粘附水平为 3.2 个/细胞。

表 2 乳杆菌对 HT-29 细胞的粘附

乳杆菌菌株	菌种	来源	粘附菌数,个/细胞
9101	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	人粪便	10.2±1.8
La	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	人粪便	3.8±1.6
A	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	人粪便	1.9±1.2
99106	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	人粪便	1.0±0.6
99108	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	人粪便	0.6±0.5
L17	卷曲乳杆菌 <i>L. crispatus</i>	猪粪便	1.6±0.6
R-21-1	乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	猪粪便	1.4±0.4
M-21-4	乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	猪粪便	7.5±0.4
R-17-3	乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	猪粪便	0.6±0.3
R-5-4	乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	猪粪便	3.6±1.3

## 2.3 球菌对 HT-29 细胞的粘附

被检测的 3 株球菌(表 3),1 株来自于人粪便,2 株由猪粪便分离得来。所有被测球菌粘附的平均值在 5.0 个/细胞以下。平均粘附水平为 2.3 个/细胞。

表 3 球菌对 HT-29 细胞的粘附

球菌菌株	菌种	来源	粘附菌数,个/细胞
99203	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	人粪便	3.2±0.4
R-21-3	肠球菌 <i>Enterococcus</i> sp.	猪粪便	2.3±0.3
R-21-4	肠球菌 <i>Enterococcus</i> sp.	猪粪便	1.4±0.5

## 3 讨 论

1)目前评定细菌粘附常用 2 种方法:计数法和视觉观测法。前者计数一定细胞上的细菌数,然后再计算平均每个细胞粘附的菌数。后者是在显微镜下直接观察细菌对细胞的粘附趋势。2 种方法各有利弊,计数法直接用数值显示试验结果,有说服力,但还没有统一的标准。视觉观测法直观,但粘附与否的评定易受主观的影响。本试验在统计粘附结果时,以计数法为主,

视觉观察法为辅,即主要计入在细胞上的细菌数,对于有明显粘附趋势的乳酸菌,计入环绕在细胞周围最近一层的细菌数。

2)在做粘附试验中发现,用PBS冲洗相同次数的情况下,粘附能力低的乳酸菌不仅细胞上粘附的细菌少,而且在无细胞的区域细菌也很稀少;而粘附能力高的乳酸菌除了细胞上粘附的菌多外,没有细胞的空白处乳酸菌的残留也很多。其原因可能有2种,一是细菌发生自凝集反应造成冲洗困难,Perez已证明有粘附能力的人源双歧杆菌都能发生自动凝集反应和血凝集反应<sup>[4]</sup>。二是细菌与粘液中的粘附素受体发生特异性结合,而粘附素受体可能来自于粘液本身,也可能是细胞消化后细胞表面的粘附素受体破碎,分散到了培养液中,虽经PBS冲洗,仍有可能残留。

#### 4 结 论

本试验检测了24株乳酸菌对人结肠腺癌细胞系HT-29细胞的粘附能力,发现双歧杆菌对HT-29细胞的粘附能力普遍较高,大多数乳杆菌的粘附能力较低,所有球菌的粘附能力都很低;同种不同株的乳酸菌粘附能力有明显差异;而同一属中,来自于人或猪粪便的乳酸菌相比,粘附能力没有明显差异。该研究有关乳酸菌粘附能力的高低还有待于进一步证实。

#### 参 考 文 献

- 1 杨洁彬,郭兴华,张旒,等. 乳酸菌-生物学基础及应用. 北京:中国轻工业出版社,1996
- 2 康白编. 双歧杆菌. 大连:大连海事大学出版社,1998
- 3 Dunne C, Murphy L, Flynn S, et al. Probiotics: from myth to reality. In: Demonstration of Functionality in Animal Models of Disease and in Human Clinical Trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 76: 279~292
- 4 Perez P F, Minnaard Y, Disalvo E A, et al. Surface properties bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 21~26

#### 补 正

因作者疏忽,刊登于本学报2001年第6卷第3期程昌秀、严泰来、朱德海、张玮的论文“GIS与RS集成的高分辨率遥感影像分类技术在地类识别中的应用”,同卷同期程昌秀、严泰来、朱德海的论文“GIS辅助下的图斑地类识别方法研究——以土地利用动态监测为例”,以及2001年第6卷第5期吴连喜、严泰来、张玮的论文“基于TM、IRS融合图像对土地覆盖进行分类”三篇文章未在文章标题下注明“本研究是在《国家重点基础研究发展规划》项目(G1999045700)中的708子课题《首都北京及周边地区大气、水、土、环境污染机理与调控研究》的资助下完成的”。特此补正。

本刊编辑部