

蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞的影响

胡彩虹* 夏枚生 熊莉 许梓荣

(浙江大学动物科学学院; 浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

摘要 采用 Caco-2 细胞培养模型, 观察两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌的黏附率, 并在培养液中加入蒙脱石, 计算蒙脱石对细菌黏附的阻断率, 探讨蒙脱石对上述细菌黏附作用的影响。结果表明: 所试菌与 Caco-2 细胞均有不同程度的黏附作用; 蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞均有不同程度的阻断作用, 对病原菌黏附 Caco-2 细胞的阻断作用要明显大于其对益生菌的阻断效果, 其中对大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、嗜水气单胞菌、副溶血弧菌黏附的阻断率分别为 54.22%、48.41%、60.53%、50.64%, 而对两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌黏附的阻断率分别为 25.64% 和 21.49%。结果提示蒙脱石可有效阻断病原菌黏附, 从而防治肠道细菌感染和细菌移位。

关键词 蒙脱石; 细菌; 黏附; Caco-2 细胞

矿物药作为三大中药材之一, 逐渐受到国内外医药界的重视和关注。除传统的矿物药之外, 黏土矿物的药用价值研究已成为该领域之热点。蒙脱石作为药用矿物始载于《本草纲目拾遗》^[1], 1982 年被 WHO 列入腹泻病控制规划用药^[2]。伍晓雄等^[3]报道, 蒙脱石治疗仔猪白痢和早期断奶腹泻综合征, 其治疗总有效率高于抗菌药物。王俊侠等^[4]报道, 腹泻儿童服用思密达(主要成分为蒙脱石)5 天后双歧杆菌数较治疗前增加 158 倍, 患儿失调的肠道菌群趋向正常, 重建了肠道菌群微生态平衡, 阻止了外袭菌的定植, 达到了治愈腹泻的目的。

黏附是细菌致病的重要先决条件。细菌通过黏附素和宿主细胞表面受体结合, 然后在局部产生毒素或侵入深部组织致病。因此, 阻断病原菌黏附, 可有效防治肠道细菌感染和细菌移位^[5]。Caco-2 细胞是体外培养的肠上皮单层细胞株, 来源于人结肠腺癌细胞, 由于 Caco-2 细胞在特定培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结, 其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠上皮细胞类似, 因而被广泛应用于细菌的肠道黏附研究^[6]。本试验拟采用 Caco-2 细胞培养模型, 研究益生菌和病原菌与 Caco-2 细胞的黏附性能, 探讨蒙脱石对上述黏附作用的影响, 揭示蒙脱石的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

蒙脱石: 蒙脱石为钙基蒙脱石, 属火山沉积

岩系热液蚀变型, 矿石蒙脱石含量达 97% 以上。原矿 80 °C 干燥, 研磨至小于 300 目; 加水配制成浓度为 15% 的悬浮液, 在高速搅拌机中打浆; 沉淀除去粒度大于 1 μm 的组分, 离心, 得到的提纯蒙脱石 80 °C 干燥, 研磨至小于 300 目备用。实验用蒙脱石含量 98.5%, 化学式为 $[\text{Na}_{0.158}\text{K}_{0.082}\text{Ca}_{0.256}\text{Mg}_{0.063}][\text{Mg}_{0.376}\text{Fe}^{2+}_{0.014}\text{Fe}^{3+}_{0.136}\text{Al}_{1.474}][\text{Si}_{3.87}\text{Al}_{0.13}]\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 阳离子交换容量为 1.39 mmol/g。试验前准确称取 2.00 g 蒙脱石, 用 100 ml 无血清、无双抗 DMEM 培养液制成悬液。

菌株和细胞系: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) ATCC 14715、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 27519、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) ATCC 4356、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) ATCC 15696。Caco-2 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

主要试剂: DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、Hank's 缓冲液购自 Gibco BRL 公司, 青、链霉素、叠氮化钠购自 Sigma 公司, 培养瓶、培养板购自 Corning 公司, Tryptic Soy Broth(TSB)、MH 肉汤、MRS 肉汤购自 Difco 公司, ³H- 胸腺嘧啶核苷

收稿日期: 2005-01-25 接受日期: 2005-05-13

浙江省科技厅重点攻关项目(No.2005C22054)和国家自然科学基金资助项目(No.30471255)

* 通讯作者。Tel: 0571-86985607, Fax: 0571-86961553, E-mail: chhu@zju.edu.cn

购自中国原子能科学研究院同位素研究所, 放射性比活度为 60 Ci/mmol。

1.2 细菌培养

细菌同位素标记参照 Elina 等^[6]的方法。将细菌在含 20 $\mu\text{l/ml}$ 的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基中培养, 其中嗜水气单胞菌在 TSB 肉汤培养液中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 副溶血弧菌在含 30 g/L NaCl 的 TSB 肉汤中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 大肠杆菌、沙门氏菌在 MH 肉汤中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 乳杆菌和双歧杆菌在 MRS 肉汤中 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 48~72 h。培养完毕后, 4000 r/min 离心 15 min, 用含 1 g/L 叠氮化钠的 Hank's 液洗 2 次, 用无血清无双抗的 DMEM 培养液悬浮细菌, 调整菌液浓度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml, 备用。

1.3 Caco-2 细胞培养

将 Caco-2 细胞生长在加有 10% 灭活的胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、含 L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 直到 Caco-2 细胞贴壁生长为单层细胞。用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化并计数, 然后用 DMEM 培养液调整细胞数为 1×10^5 个/ml, 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔 2 ml, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。待 Caco-2 细胞在培养板底部形成完整的类似上皮样的膜状结构时用于试验。期间每隔 1 天更换 1 次培养液。使用前细胞用 Hank's 缓冲液洗 3 次。

1.4 细菌黏附试验和阻断试验

参照 Elina 等^[6]的方法。每孔加入 100 μl 菌液, 再加入 100 μl DMEM 液(阻断试验加入 100 μl 蒙脱石悬液)。然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 1 h。吸弃上清液, 用 Hank's 液洗涤培养孔 3 次, 以除去未黏附细菌。然后加入 100 μl 0.9 mol/L NaOH 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜以裂解细胞和细菌。再加入 150 μl 闪烁液, 在液闪仪(Wallac MicroBeta[®] TriLux, Finland)上测定放射性强度。每个做 3 个重复。

细菌黏附率 %=(黏附在细胞中细菌的放射性强度/所加入细菌的放射性强度) \times 100%

黏附阻断率 %=(1- 阻断实验黏附在细胞中细菌的放射性强度/空白实验黏附在细胞中细菌的放射性强度) \times 100%

1.5 统计学处理

各处理间平均值的比较采用方差分析中的最小显著极差法(LSD), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计算程序采用 SAS(6.12)中的一般线性模式进行。

2 结果

2.1 细菌的黏附率

各试验菌在 Caco-2 细胞上的黏附率见表 1。所

表 1 所试菌与 Caco-2 细胞的黏附率

菌株	黏附率(%)
两歧双歧杆菌	16.82 \pm 5.21 ^a
嗜酸乳杆菌	13.22 \pm 4.05 ^{ab}
大肠杆菌	10.62 \pm 3.85 ^b
鼠伤寒沙门氏菌	8.72 \pm 2.76 ^{bc}
嗜水气单胞菌	6.03 \pm 1.42 ^{bc}
副溶血弧菌	4.29 \pm 1.87 ^c

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $n=3$ 。同一列中肩标字母不同者差异显著($P < 0.05$)。

表 2 蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞的阻断率

菌株	黏附阻断率(%)
两歧双歧杆菌	25.64 \pm 4.23 ^a
嗜酸乳杆菌	21.49 \pm 5.31 ^a
大肠杆菌	54.22 \pm 7.36 ^b
鼠伤寒沙门氏菌	48.41 \pm 9.64 ^b
嗜水气单胞菌	60.53 \pm 8.21 ^b
副溶血弧菌	50.64 \pm 8.60 ^b

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; $n=3$ 。同一列中肩标字母不同者差异显著($P < 0.05$)。

试菌与 Caco-2 细胞均有不同程度的黏附作用; 益生菌(两歧双歧杆菌和嗜酸乳酸杆菌)的黏附能力要大于所试病原菌, 其中两歧双歧杆菌的黏附率显著高于大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、嗜水气单胞菌和副溶血弧菌($P < 0.05$)。在病原菌中, 大肠杆菌的黏附率显著高于副溶血弧菌($P < 0.05$)。

2.2 蒙脱石对细菌黏附的阻断作用

由表 2 可见, 蒙脱石对细菌黏附 Caco-2 细胞均有不同程度的阻断作用, 其对病原菌黏附 Caco-2 细胞的阻断作用要明显大于其对益生菌的阻断效果($P < 0.05$), 其中对大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、嗜水气单胞菌和副溶血弧菌黏附的阻断率分别为 54.22%、48.41%、60.53% 和 50.64%, 而对两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌黏附的阻断率分别为 25.64% 和 21.49%。

3 讨论

3.1 细菌与 Caco-2 细胞的黏附作用

细菌黏附肠上皮细胞的强弱主要取决于细菌黏附素及肠黏膜所存在的特异性受体。不同的细菌, 其黏附素的组成成分和分子结构不同, 它们识别、结合宿主肠黏膜受体的能力不同^[5]。本研究表明, 不论是益生菌还是病原菌, 均与 Caco-2 细胞有黏附作用, 但其黏附能力有差异, 其中两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌与 Caco-2 细胞的黏附作用要大于所试病原菌。双歧杆菌和乳杆菌均属有益菌, 它们通过黏

附作用可定植于动物肠黏膜细胞,这对维持宿主肠道微生态平衡,增强免疫功能起着非常重要的生理功能。可见,有益菌与Caco-2细胞的黏附作用强于病原菌,正是有助于肠道的健康及其功能的正常发挥,满足动物正常生理的需要。

3.2 蒙脱石对细菌黏附Caco-2细胞的阻断作用

细菌黏附是细菌黏附素与肠黏膜受体的特异性结合,若能抑制或阻断这种黏附,就能有效地预防和治疗肠道细菌感染。黏附阻断试验结果表明蒙脱石对所试细菌均有不同程度的抗黏附作用,其作用机制与蒙脱石对细菌的吸附作用有关^[7,8]。蒙脱石是由硅氧四面体和铝氧八面体组成的二八面体层状硅酸盐粘土矿物,铝和镁对结构中硅和铝的随机取代造成的电荷不平衡,赋予它遇水特有的膨胀、吸附、带电和离子交换特性。水化膨胀的蒙脱石是带负电的板块表面与带正电的边缘相连接,被称之为“表面-边缘”的“车厢”式悬浮物,具有“凝胶-溶胶-凝胶”的“触变性”,这种“触变性”非常有利于将细菌锁在“车厢”内,从而吸附、固定细菌^[9]。另外,蒙脱石对细菌的抗黏附作用还与蒙脱石对肠黏膜的屏障和保护作用有关^[10]。马玉龙^[11]报道,蒙脱石能促进鸡肠上皮细胞的增殖、分化及损伤后细胞的迁移,有助于损伤黏膜的快速修复,抵抗外来致病因子的侵入。

本研究还表明,蒙脱石对两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌的抗黏附作用较弱,而对所试病原菌黏附的阻断作用则相对较强。这是由于不同的细菌,因表面结构的异同,决定了它们具有不同的表面特性。由于在生理条件下,细菌细胞壁带负电荷^[12],两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌表面Zeta电位的绝对值要明显低于大肠杆菌和沙门氏菌^[11]。所以,与两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌相比,蒙脱石与大肠杆菌或沙门氏菌间的静电吸附较强,较多的病原菌被蒙脱石吸附,从而更有效地阻断病原菌与Caco-2细胞的黏附作用。蒙脱石对病原菌黏附Caco-2细胞的阻断作用大于其对益生菌的阻断效果的作用机制有待于进一步探讨。

参考文献 (References)

- [1] 翟永功等. 中草药, 2002, 33: 291
- [2] Madkour AA et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1993, 17: 176
- [3] 伍晓雄等. 湖北农学院学报, 1999, 19: 137
- [4] 王俊侠等. 中国临床药理学杂志, 1995, 11: 134
- [5] Bullitt E et al. *Nature*, 1995, 373: 164
- [6] Tuomola EM et al. *Int J Food Microbiol*, 1998, 41: 45
- [7] 李辉等. 湖北农学院学报, 2003, 23: 275
- [8] 胡秀荣等. 药学学报, 2002, 37: 718
- [9] Permien T et al. *Clay Miner*, 1994, 29: 761
- [10] Albengres E et al. *Eur J Clin Pharmacol*, 1985, 28: 601
- [11] 马玉龙. 载铜硅酸盐纳米微粒的表征及其对肉鸡应用效果的机理研究, 浙江大学博士学位论文, 2004, 55
- [12] Breen PJ et al. *J Food Sci*, 1995, 60: 1191

Effects of Montmorillonite on Bacterial Adhesion to Caco-2 Cells

Cai-Hong Hu*, Mei-Sheng Xia, Li Xiong, Zi-Rong Xu

(College of Animal Science; The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract In order to investigate the adhesion of probiotic or pathogenic strains to intestinal epithelial cells and the effects of montmorillonite (MMT) on the bacterial adhesion, Caco-2 cell line was used as an *in vitro* model for intestinal epithelium and bacterial adhesion to Caco-2 cell cultures was quantitated using radiolabelled bacteria. The results showed that the adhesion percentage of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cell was significantly higher than *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus*. The ability of MMT to inhibit adhesion of pathogenic strains to Caco-2 cells was higher than that of probiotic strains. The percentages of MMT against adhesion of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* to Caco-2 cell were 54.22%, 48.41%, 60.53% and 50.64%, respectively, while against *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* were 25.64% and 21.49%, respectively.

Key words montmorillonite; bacterium; adhesion; Caco-2 cell

Received: January 25, 2005 Accepted: May 13, 2005

This work was supported by the Zhejiang Science and Technology Office (No.2005C22054) and the National Natural Science Foundation of China (No.30471255)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86985607, Fax: 86-571-86961553, E-mail: chhu@zju.edu.cn