

细菌对肉鸡肠粘液的粘附作用

马玉龙^{1,2} 许梓荣^{1*} 尤 萍¹

(¹ 浙江大学动物科学学院饲料研究所 杭州 310029)

(² 宁夏大学农学院 银川 750021)

摘 要 研究两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、禽大肠杆菌 O78、大肠杆菌 ATCC 25922、鸡白痢沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌与肉鸡不同部位肠粘液糖蛋白的粘附性能,探讨两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌对所试病原菌的抗粘附作用。结果表明:在不同的肠道部位,两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、鸡白痢沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌与肠粘液糖蛋白均有不同的粘附作用,而禽大肠杆菌 O78、大肠杆菌 ATCC 25922 在各肠段粘液上的粘附性能则相近;在相同的肠道部位,所试益生菌的粘附能力大于病原菌,两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌对所试病原菌的粘附有不同的阻断作用,同时二者有时还存在互补抗粘附作用。

关键词 益生菌,病原菌,肠粘液,粘附,阻断

中图分类号 S831.7 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)03-0361-04

细菌粘附是感染致病的前提。肠道病原细菌依其粘附素与肠粘液的受体结合,然后在局部产生毒素或侵入深部组织致病^[1]。研究表明^[2-6],粘附素多为细菌菌毛,此外还有一些非菌毛性蛋白和糖类,而肠粘液细菌所粘附的受体多为糖蛋白。由于不同的细菌,其粘附素的组成成分和分子结构不同,它们识别、结合宿主肠粘液受体的能力就不同,而且在肠道的不同部位,由于受体的成分和活性位点可能有别,进而也影响细菌的粘附作用。因此,本试验研究不同细菌与不同肠段粘液糖蛋白的粘附性能,并就嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌阻断病原菌粘附的能力进行探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 50013 由浙江省疾病预防控制中心提供,二者均源于人的临床;禽大肠杆菌(avian *Escherichia coli*) O78、鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*) C79-13 由中国兽医药品监察所提供,二者均源于鸡;嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) ATCC 4356、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) AS1.1852 由中国科学院微生物研究所提供,其中嗜酸乳杆菌源于人粪便,两歧双歧杆菌

源于乳制品发酵。

1.2 主要试剂

³H-胸腺嘧啶核苷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 60Ci/mmol;MH 肉汤、MRS 肉汤和 Hanks'平衡盐溶液购自 Difco 公司;HEPES 和牛血清白蛋白购自 Sigma 公司。

1.3 细菌培养

将细菌在含 20μL/mL 的³H-胸腺嘧啶核苷的培养基中 37℃ 培养,其中大肠杆菌、沙门氏菌在 MH 肉汤中培养 24h;乳杆菌和双歧杆菌在 MRS 肉汤中厌氧培养 48h。然后 4000r/min 离心 10min,用含 0.1%(W/V)叠氮化钠的 HH 液(Hepes - Hanks' buffer:10mmol/L HEPES, pH 7.4)洗涤后,悬浮在 HH 液中。将细菌的光密度调节在约(1~2)×10⁸ cfu/mL。

1.4 肠粘液糖蛋白

参照 Rinkinen 等^[7]方法并稍加改进。分别刮取 14 日龄 AA 商品代肉鸡的十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠中部粘液,等体积加入生理盐水后匀浆,10000r/min 离心 10min。上清液经无水乙醇二次沉淀,冻干收集。然后悬浮在 HH 液中(10mg/mL)。若有杂质离心除去。-20℃ 保存,待用。

1.5 粘附实验

将含肠粘液糖蛋白的悬浮液于 4℃ 解冻。用 HH 液稀释成 0.5mg/mL 浓度。取 100μL 于 96 孔培

基金项目 浙江省科技厅重点项目(021122680)

* 通讯作者。Tel 86-571-86091821;Fax 86-571-86091820;E-mail: yulongma796@sohu.com

作者简介:马玉龙(1966-)男,宁夏银川市人,副教授,硕士生导师,在职博士生,主要从事肠道微生物研究。Tel: 86-571-86091821;Fax: 86-571-86091820;E-mail: nxyima@163.com

收稿日期 2003-07-21,修回日期 2003-10-22

养板 4℃ 下 20h。轻轻吸弃上液 ,并用 200μL HH 液洗涤培养板两次 ,以除去未粘在培养板上的糖蛋白。

取 100μL 已标记的细菌 ,加入到上述培养板中。37℃ 下 1h。轻轻吸弃上液 ,用 200μL HH 液洗涤培养孔两次 ,以除去未粘附的细菌。然后加入 100μL 1% SDS - 0.1mol/L NaOH 溶液 ,60℃ 下 1.5h。再加入 150μL 闪烁液 ,在液闪仪(Wallac MicroBeta® Tri-Lux , Finland)上测定放射性强度 CPM_a。每个做 3 个重复。以牛血清白蛋白做空白对照。

细菌的粘附率 = CPM_a/CPM₀ × 100% ,其中 CPM₀ 是所加入细菌的放射性强度。

1.6 粘附阻断实验

取 100μL 0.5mg/mL 肠粘液糖蛋白液于 96 孔培养板 4℃ 下 20h。用 200μL HH 液洗涤培养板两次。(1)加入未标记嗜酸乳杆菌 100μL (2)加入未标记的两歧双歧杆菌 100μL (3)加入未标记的嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌各 50μL 37℃ 孵育 1h。轻轻吸弃上液 ,用 200μL HH 液洗涤培养孔两次。再加入 100μL 标记的病原菌 ,37℃ 孵育 1h。经 HH 液洗涤后 ,加入 1% SDS - 0.1mol/L NaOH 于 60℃ 1.5h。然后测定放射性强度 CPM_b。每个做 3 个重复。

粘附阻断率 = CPM_b/CPM_a × 100%。

1.7 数据处理

数据均以平均值 ± 标准差形式表示 ,差异显著性分析采用 SAS (6.12) 中的 *t* 检验。

2 结果

2.1 细菌的粘附率

各试验菌在肉鸡不同部位肠粘液糖蛋白上的粘附率见表 1。随着肠段的后移 ,两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌的粘附率逐渐增大。其中两歧双歧杆菌与回肠、盲肠和结肠粘液糖蛋白的粘附作用显著优于十二指肠和空肠 ,而嗜酸乳杆菌只有在结肠粘液上的粘附率显著高于其它肠段。禽大肠杆菌 O78 和大肠杆菌 ATCC 25922 与各肠段粘液糖蛋白的粘附率无显著差异性。鸡白痢沙门氏菌与盲肠和结肠粘液的粘附能力强于回肠、空肠和十二指肠 ,而鼠伤寒沙门氏菌与结肠粘液的粘附性能高于其它肠道部位。就不同菌株在同一肠段粘液上的粘附性能而言 ,两歧双歧杆菌和嗜酸乳酸杆菌的粘附能力要大于所试病原大肠杆菌和沙门氏菌 ,禽大肠杆菌 O78 的粘附性能强于大肠杆菌 ATCC 25922 ,鸡白痢沙门氏菌的粘附作用高于鼠伤寒沙门氏菌。

表 1 细菌在肉鸡肠粘液糖蛋白上的粘附率(%)

Table 1 Adhesion percentages of the bacteria to the intestinal mucus glycoproteins of broiler (%)					
Strains	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon
<i>B. bifidum</i> AS1.1852	9.15 ± 1.77 ^{Aa}	10.48 ± 4.40 ^{Aa}	19.54 ± 8.29 ^{Ba}	20.51 ± 1.87 ^{Ba}	25.00 ± 2.28 ^{Ba}
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	7.61 ± 3.45 ^{Aab}	8.21 ± 3.98 ^{Aab}	11.91 ± 2.70 ^{Ab}	11.52 ± 3.75 ^{Ab}	17.24 ± 6.49 ^{Bb}
Avian <i>E. coli</i> O78	7.34 ± 4.03 ^{Aab}	7.62 ± 2.07 ^{Aab}	7.55 ± 2.24 ^{Abc}	7.24 ± 3.25 ^{Acd}	7.60 ± 1.69 ^{Ac}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5.74 ± 0.93 ^{Aabc}	5.56 ± 2.39 ^{Abc}	5.79 ± 1.62 ^{Acd}	5.88 ± 0.86 ^{Acd}	5.74 ± 2.16 ^{Ac}
<i>S. pullorum</i> C79-13	4.01 ± 0.63 ^{Abc}	5.85 ± 0.79 ^{ABbc}	5.89 ± 2.47 ^{ABcd}	7.72 ± 2.67 ^{BCbc}	8.98 ± 2.48 ^{Cc}
<i>S. typhimurium</i> ATCC 50013	2.42 ± 0.86 ^{Ac}	3.76 ± 0.89 ^{Ac}	4.39 ± 1.34 ^{ABd}	4.64 ± 1.17 ^{ABd}	6.76 ± 1.48 ^{Bc}

Means followed by different superscript (A , B , C) within the same row are significantly different (*P* < 0.05). The same below . Means followed by different superscript (a , b , c , d) within the same column are significantly different (*P* < 0.05). The same below .

2.2 嗜酸乳杆菌的抗粘附作用

嗜酸乳杆菌对所试病原菌均有不同程度的抗粘附作用(表 2)。其中对鸡白痢沙门氏菌的抗粘附作用相对较强 ,而对大肠杆菌 ATCC 25922 则相对较弱。就同一菌株在不同肠段而言 ,鸡白痢沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌与盲肠和结肠粘液糖蛋白的粘附性能受嗜酸乳杆菌抑制的程度大于其它肠段 ,而禽大肠杆菌 O78 或大肠杆菌 ATCC 25922 在各肠段粘液上的附着受嗜酸乳酸杆菌的影响未见差异显著性 (*P* > 0.05)。

2.3 两歧双歧杆菌的抗粘附作用

由表 3 可见 ,两歧双歧杆菌对禽大肠杆菌 O78、大肠杆菌 ATCC 25922 和鸡白痢沙门氏菌在肠道各部位粘液糖蛋白上的粘附均有一定的阻断作用 ,但鼠伤寒沙门氏菌在十二指肠、空肠粘液上的粘附率未见下降。

2.4 嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌抗粘附的互补作用

表 4 可见 ,肠粘液糖蛋白经嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌同时处理后 ,对所试病原菌均有一定的抗粘附作用。

表 2 嗜酸乳酸杆菌对病原菌的抗粘附作用 (%)

Strains	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon
Avian <i>E. coli</i> O78	76.31 ± 8.53 ^{Aab}	71.04 ± 13.64 ^{Aab}	75.65 ± 8.70 ^{Aab}	66.03 ± 10.27 ^{Aab}	64.45 ± 14.57 ^{Ab}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	98.81 ± 20.80 ^{Aa}	86.67 ± 16.56 ^{Aa}	90.37 ± 17.32 ^{Aa}	90.06 ± 17.69 ^{Aa}	91.29 ± 24.21 ^{Aa}
<i>S. pullorum</i> C79-13	65.18 ± 9.89 ^{Ab}	58.72 ± 8.88 ^{Ab}	55.41 ± 17.34 ^{Ab}	40.00 ± 3.81 ^{Bc}	39.90 ± 5.40 ^{Bc}
<i>S. typhimurium</i> ATCC 50013	72.22 ± 13.94 ^{ABab}	60.00 ± 9.91 ^{BCb}	78.78 ± 12.88 ^{Aab}	55.02 ± 11.01 ^{Cbc}	49.12 ± 8.43 ^{Cbc}

表 3 两歧双歧杆菌对病原菌的抗粘附作用 (%)

Strains	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon
Avian <i>E. coli</i> O78	79.63 ± 16.20 ^{Aa}	80.47 ± 9.67 ^{Aab}	79.41 ± 11.11 ^{Aa}	81.23 ± 20.48 ^{Aa}	71.20 ± 18.46 ^{Aa}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	90.32 ± 23.11 ^{Aa}	78.33 ± 20.46 ^{Aa}	87.17 ± 20.13 ^{Aa}	79.27 ± 21.51 ^{Aa}	87.58 ± 6.65 ^{Aa}
<i>S. pullorum</i> C79-13	84.29 ± 14.33 ^{Aa}	77.95 ± 8.76 ^{Aa}	82.43 ± 10.34 ^{Aa}	72.86 ± 16.41 ^{Aa}	68.79 ± 8.87 ^{Aa}
<i>S. typhimurium</i> ATCC 50013	102.96 ± 23.33 ^{Aa}	102.04 ± 18.86 ^{Ab}	96.43 ± 20.71 ^{Aa}	91.44 ± 16.55 ^{Aa}	88.94 ± 12.69 ^{Aa}

表 4 嗜酸乳酸杆菌和两歧双歧杆菌对病原菌抗粘附的互补作用 (%)

Stains	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon
Avian <i>E. coli</i> O78	58.54 ± 7.71 ^{Aa}	62.66 ± 9.83 ^{Aa}	56.18 ± 16.41 ^{Aa}	67.34 ± 16.21 ^{Aab}	68.90 ± 16.96 ^{Aab}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	77.42 ± 18.49 ^{Aa}	63.33 ± 14.94 ^{Aa}	72.78 ± 10.23 ^{Aa}	78.72 ± 18.74 ^{Aa}	81.45 ± 9.63 ^{Aa}
<i>S. pullorum</i> C79-13	58.97 ± 8.53 ^{Aa}	60.26 ± 10.75 ^{Aa}	59.46 ± 14.15 ^{Aa}	40.57 ± 3.69 ^{Bb}	38.75 ± 5.56 ^{Bc}
<i>S. typhimurium</i> ATCC 50013	75.74 ± 15.70 ^{Aa}	70.71 ± 16.80 ^{Aa}	71.43 ± 11.15 ^{Aa}	51.42 ± 4.27 ^{Bab}	48.15 ± 14.01 ^{Bbc}

3 讨论

本研究表明 ,不论是益生菌还是病原菌 ,均与肉鸡肠粘液糖蛋白有一定的粘附作用 ,但其粘附能力是有差异。其中两歧双歧杆菌和嗜酸乳杆菌与各肠段粘液糖蛋白的粘附作用要大于所试病原大肠杆菌和沙门氏菌。双歧杆菌和乳杆菌均属有益菌 ,它们通过粘附作用可定殖于动物肠道粘液表面 ,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。所以 ,有益菌与肠粘液的粘附作用强于病原菌 ,正是有助于肠道的健康及其功能的正常发挥 ,满足动物正常生存的需要。在所试病原菌中 ,禽大肠杆菌 O78 和鸡白痢沙门氏菌的粘附能力较强 ,说明细菌的粘附具有宿主特异性。Willemsen 等也^[6]报道 ,大肠杆菌 K88 粘附素主要与仔猪肠道上皮及粘液的受体有很强的粘附性能。此外 ,同一菌株与不同部位肠粘液糖蛋白的粘附能力也不尽相同。其中两歧双歧杆菌或嗜酸乳杆菌在各肠段上的粘附性能相差较大 ,而禽大肠杆菌 O78 或大肠杆菌 ATCC 25922 则相差较小。这是由于不同部位肠道的结构和功能有别 ,使得肠粘液上部分糖蛋白受体的组成、分子结构和装配机制发生了变化。这种变化对一些细菌(如禽大肠杆菌 O78)的粘附性能影响较小 ,而对另一些细菌(如两歧双歧杆菌)则影响较

大。说明肠粘膜组织结构对一些细菌的粘附性能有一定的影响。

本试验表明 ,在相同肠粘液糖蛋白上 ,嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌对所试病原菌粘附的阻断作用是有差异。同时 ,就同一菌株与不同肠段的粘附而言 ,两种益生菌的抗粘附效果也不尽相同。这充分说明了益生菌抗粘附机制的复杂性 ,受多种因素的影响 ,其中肠粘液糖蛋白受体的多样性可能是影响益生菌抗粘附的重要因素之一。益生菌除粘附与其有特异性的受体之外 ,还粘附那些与病原菌也有高度附着力的非特异性受体 ,从而使病原菌的粘附作用受到抑制 ,但益生菌不能粘附那些只与病原菌有特异粘附作用的糖蛋白受体。这也就解释了为什么嗜酸乳杆菌或两歧双歧杆菌不能完全阻断大肠杆菌或沙门氏菌粘附的原因 ,也反映了益生菌用于预防和治疗肠道细菌感染的局限性。但有必要进一步研究益生菌在不同种糖及相应糖蛋白上的抗粘附作用。

Tuomola 等^[8]报道 ,乳杆菌 GG 不仅没有降低鼠伤寒沙门氏菌与肠粘液的粘附率 ,反而使其增加 ,经显微镜观察发现 ,乳杆菌 GG 与鼠伤寒沙门氏菌间有相互结合作用 ,但这种结合作用可能比较弱 ,因为细菌没有出现集聚现象。然而 ,本研究并未发现嗜酸乳杆菌有提高鼠伤寒沙门氏菌粘附率的作用 ,说明不是所有的乳杆菌株都有与鼠伤寒沙门氏菌结合

的作用。但是 本研究却发现两歧双歧杆菌未使鼠伤寒沙门氏菌在十二指肠和空肠粘液糖蛋白上的粘附率下降。笔者认为,两歧双歧杆菌与鼠伤寒沙门氏菌有双重作用,一方面,两歧双歧杆菌通过与肠粘液受体的粘附作用,阻断了鼠伤寒沙门氏菌在肠粘液上的附着;另一方面,与糖蛋白粘附的两歧双歧杆菌又和鼠伤寒沙门氏菌发生弱的结合作用。而鼠伤寒沙门氏菌与回肠、盲肠和结肠粘液的粘附性能因两歧双歧杆菌的作用而下降,是由于两歧双歧杆菌粘附的阻断作用大于其与鼠伤寒沙门氏菌的结合作用,因为两歧双歧杆菌与回肠、盲肠和结肠粘液糖蛋白的粘附率较高(表1)。当然,鼠伤寒沙门氏菌与有益菌之间的作用机理及其生物学意义还需进一步研究。

本研究表明,嗜酸乳杆菌对大肠杆菌 ATCC 25922 的抗粘附作用较弱,而两歧双歧杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的抗粘附能力较弱。但肠粘液糖蛋白经嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌同时处理后,上述两种病原菌的粘附率均有所下降,说明嗜酸乳杆菌和两歧双歧杆菌对某些细菌粘附的阻断存在互补作用。这是由于一些糖蛋白受体易与两歧双歧杆菌粘附,而另一些易与嗜酸乳杆菌发生作用,这样使多种病原菌的粘附作用均能得到有效地抑制。可见,就阻断病原菌粘附的广谱性而言,复合益生菌的抗粘附

效果要优于单一益生菌。

参考文献

- [1] Sylvester F A, Philpott D, Gold B, *et al.* Adherence to lipids and intestinal mucin by a recently recognized human pathogen, *Campylobacter upsaliensis*. *Infect Immun*, 1996 **64** :4060 – 4066.
- [2] Dozois C M, Pourbaksh S A, Fairbrother J M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Veterinary Microbiol*, 1995 **45** :297 – 309.
- [3] Korhonen T K, Lounatmaa K, Ranta H, *et al.* Characterization of type I pili of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1980 **144** :800 – 805.
- [4] Ghosh S, Mittal A, Ganguly N K. Purification and characterization of distinct type of mannose-sensitive fimbriae from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Letters*, 1994 **115** :229 – 234.
- [5] Huub J M. Interaction of Bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 1985 **47** :332 – 334.
- [6] Willemsen P T J, Graaf F K. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. *Microbiol Pathol*, 1992 **12** :367 – 375.
- [7] Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, *et al.* Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. *Veterinary Microbiol*, 2003 **92** :111 – 119.
- [8] Tuomola E M, Ouwehand A C, Salminen S J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immun Medical Microbiol*, 1999 **26** :137 – 142.

Adhesion of Some Bacteria to Broiler Intestinal Mucus

MA Yu-Long^{1,2} XU Zi-Rong^{1*} YOU Ping¹

(¹ Institute of Feed Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(² College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The objective of the study was to investigate adhesion of *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, avian *Escherichia coli* O78, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella pullorum* and *S. typhimurium*, and the effects of *B. bifidum* and *L. acidophilus* on these adhesions. The results showed that there were different adhesion properties of *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *S. pullorum* and *S. typhimurium* to mucus glycoproteins in different intestinal parts. But avian *E. coli* O78 or *E. coli* ATCC 25922 had a similar adhesion to different intestinal mucus. The adhesions of tested probiotic bacteria to the same intestinal mucus were higher than that of pathogenic bacteria. *B. bifidum* and *L. acidophilus* had different inhibition to adhesion of the tested pathogens to intestinal mucus, and sometimes they also had complementary action against pathogen adhesion.

Key words: Probiotic bacteria, Pathogenic bacteria, Intestinal mucus, Adhesion, Inhibition

Foundation item: Key Project of Science and Technology Department of Zhejiang Province (021122680)

* Corresponding author. Tel: 86-571-86091821; Fax: 86-571-86091820; E-mail: yulongma796@sohu.com

Received date: 07-21-2003