

乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖的部分生物学活性

孟凡伦* 马桂荣 孔 健

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 对乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) SB900 胞壁肽聚糖 (简称为 LABPG) 进行了分离纯化及化学成分分析, 并测定了其部分生物学活性。结果表明, LABPG 蛋白质含量为 9.84%, NAG 0.871 $\mu\text{mol} / \text{mg}$, NAM 1.14 $\mu\text{mol} / \text{mg}$; 氨基酸分析结果表明, Ala, Glu, Asp 含量较高, 分别为 1.046、0.775、0.304 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ 。以小鼠为实验材料进行动物学实验, 对 LABPG 的生物学活性测定结果表明, LABPG 无毒、安全可靠; 腹腔注射 LABPG 后, PM Φ 数目增多, 吞噬功能明显增强, 血清溶菌酶活性增强; YC-花环实验表明, 腹腔注射 LABPG 的小鼠 PM Φ 表面 C₃b 受体活性增强, YC-花环形成率较高, 统计学分析有显著差别。说明 LABPG 对于 M Φ 有一定的激活作用, 可作为机体的免疫激活剂。

关键词 肽聚糖, 巨噬细胞, 吞噬作用, YC-花环实验

分类号 Q939.11

益生菌 (Probiotics) 作为一种新型的微生态活菌制剂有明显不同于抗生素的特性。在畜禽养殖中, 它既具有抗生素所具有的抗病、促生长作用, 又克服了抗生素应用带来的弊端^[1]。益生菌对宿主有明显的营养作用, 可提高机体的非特异性免疫力^[2]。据报道, 其生物学活性可能与细胞壁成分有关^[3], 赵予秀等研究发现乳杆菌肽聚糖能提高小鼠腹腔巨噬细胞 (Peritoneal macrophage, 缩写为 PM Φ) 的吞噬率和吞噬指数, 具有细胞免疫作用^[4,5]。本工作对益生菌生产菌—乳链球菌 SB900 细胞壁中的肽聚糖 (Peptidoglycan, 缩写为 PG) 进行了分离、纯化和化学成分分析, 并观察了其对小鼠 PM Φ 的激活作用等生物学活性, 以期为益生菌的广泛应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) SB900, 本室分离而得。

1.2 LABPG 的制备

参照 Park 等人^[6,7]的方法, 略加改进。将乳链球菌 SB900 接种于 MRS 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12h ($OD_{620} \approx 0.8$), 离心收集菌体, 生理盐水洗三次。将菌体悬浮在 10% 的 TCA 溶液中, (其 1:10 稀释液的 $OD_{620} \approx 1.0$), 沸水浴 20min, 冷却, 5000g 离心 10min, 蒸馏水洗三

* 现在山东省食品卫生监督检验所工作。

收稿日期: 1996-10-28

次。沉淀溶于 Trypsin-phosphate 缓冲液 (1mg / ml trypsin, 0.1mol / L PBS, pH7.9) 中, 37℃ 水浴振荡 3h (OD_{620} 基本不再下降), 1000g 离心 30min, 弃去沉淀, 上清液经 30000g 离心 10min, 沉淀用蒸馏水洗两次, 加入无水乙醇、乙醚脱水干燥, 保存。

1.3 化学成分分析

1.3.1 蛋白质含量的测定: 1mg 样品加入 0.5ml NaOH(2 mol / L) 溶液, 37℃ 水解 30min, 离心取上清液用 Bradford 法测定蛋白质含量^[8]。

1.3.2 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, 缩写为 NAG) 的测定: 采用本室改进的 Reissig 等人^[9,10]的方法。

1.3.3 N-乙酰胞壁酸 (N-acetylmuramic acid, 缩写为 NAM) 的测定: 按照 Barker 和 Summerson 法^[11,12] 进行。

1.3.4 氨基酸分析: 样品经 6mol / L HCl 105℃ 水解 24h 后, 用日立 835 型高速氨基酸分析仪测定。

1.4 生物学活性测定

1.4.1 实验动物: 昆明种小鼠, 20 ± 2 g, 雌雄兼用, 由山东省中医药研究所动物房提供。

1.4.2 乳链球菌 SB900 PG: 自制。生理盐水配成 4mg / ml, 4℃ 浸泡 2d, 超声后经 60℃ 30min 处理, 使成均匀悬液。

1.4.3 小鼠急性毒性实验^[13]: 以 1、2、4mg 三个递增剂量的 PG, 对小鼠做腹腔注射, 观察一周。

1.4.4 小鼠 PM Φ 吞噬实验^[14]: 小鼠腹腔注射 (ip) 后第 4d, 取腹腔 M Φ 进行吞噬实验。(吞噬物面包酵母用生理盐水配成 2.81×10^8 个 / ml)。

1.4.5 PM Φ 表面 C₃b 的测定: 用酵母细胞花环方法检测^[15,16]。

1.4.6 血清溶菌酶 (LSZ) 的活力测定: 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 干粉 (自制) 为底物, 采用 Hultmark 等人^[17] 的改进方法进行。

2 结果

2.1 LABPG 的化学成分分析结果

近年来的研究发现, 胞壁肽聚糖具有包括免疫佐剂在内的多种生物学活性^[18], 应用肽聚糖作为免疫增强剂已引起人们的广泛注意。制备 PG 通常方法是先用机械方法破壁, 然后再用 TCA、蛋白酶等试剂处理而得, 用这种方法制备 PG, 步骤较多, 操作麻烦, 而且乳酸菌破壁较难, 机械破壁时间较长。因此我们采用 Park 等人的方法, 先用热 TCA 溶液直接抽提, 以除去细胞内的核酸和细胞壁上的磷壁酸, 除去这些成分后的胞内蛋白质对胰蛋白酶更加敏感, 常常可以除去 95% 以上的蛋白质^[7]。采用该方法可省去细胞破壁这一步骤, 大大简化了实验操作。

结果 (表 1, 表 2) 表明, LABPG 其蛋白含量不超过 10%, 氨基酸分析结果表明含量较高的氨基

表1 PG化学成分分析

Table 1 Analysis of chemical composition of PG

N-乙酰葡萄糖胺 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	N-乙酰胞壁酸 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	蛋白质 (%)
NAG	NAM	protein
0.871 ± 0.115	1.140 ± 0.132	9.84 ± 0.120

表2 PG氨基酸组成与含量

Table 2 Amino acid composition of PG

氨基酸 Amino acid	PG($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
Ala	1.046
Glu	0.775
Asp	0.304
Gly	0.100
Ile	0.065
Leu	0.056
Ser	0.052
Lys	0.048
Phe	0.039
Arg	0.036
Pro	0.028
Tyr	0.019
His	0.011
NH ₃	0.790

酸为Ala, Glu, Asp, 这都是乳链球菌 PG 中的特征氨基酸, 表明我们获得的确系 PG 组分。

2.2 小鼠急性毒性实验

乳酸菌按规定是国际免检菌体, 本室也早已证明 SB900 是安全可靠的。对于其 PG 的安全性观察发现, 注射 1 周后小鼠无耸毛、消瘦或厌食等现象, 且全部健康成活, 证明其 PG 也是无毒安全可靠的。

2.3 LABPG 对小鼠 PM Φ 数目及吞噬功能的影响

昆明种小鼠 14 只, 雌雄兼用, 随机分成两组。对照组腹腔注射生理盐水 0.5ml/ 只, 实验组腹腔注射 PG 溶液 (1mg/ml) 0.5ml/ 只。注射后第四天杀鼠进行测定, 结果 (表 3, 表 4) 表明, 腹腔注射 (ip) LABPG 后, PM Φ 数目、吞噬率和吞噬指数均有明显提高, t 检验差异具有极显著性。M Φ 是在种系进化过程中较早出现的免疫细胞, 在正常生理条件下, M Φ 对外来病菌及体

内的肿瘤细胞有一定的杀伤作用, 被激活后伴随许多形态、代谢功能的变化, 可充分发挥这种作用, 保持自身稳定。实验结果表明腹腔注射 (ip) LABPG, 可刺激 M Φ 增生, 促进 M Φ 中的吞噬功能, 从而提高机体的免疫功能。

表3 LABPG对小鼠PM Φ 数目的影响Table 3 Effect of LABPG on the number of PM Φ in mice

组别 Group	PM Φ 数目* PM Φ number	P值 P value
对照组 Control	1.85 \pm 0.53	
实验组 Test	4.69 \pm 0.69	P<0.001

* \bar{X} ±S.D. (n=7)

表4 LABPG对小鼠PM Φ 吞噬功能的影响Table 4 Effect of LABPG on phagolytic activity of PM Φ in mice

组别 Group	吞噬率* Phagocytic ratio	吞噬指数* Phagocytic index
对照组 Control	26.2 \pm 2.34	1.02 \pm 0.135
实验组 Test	43.2 \pm 4.23***	3.07 \pm 0.216***

* \bar{X} ±S.D.(n=7) ***与对照组相比P<0.001 Significantly different from controls at p<0.001

2.4 LABPG 对小鼠 PM Φ 表面 C₃b 受体的影响

大量实验证明, 单核 M Φ 表面并存 Fc 受体和 C₃b 受体, 它们在 M Φ 识别、结合、吞噬抗原颗粒及传递抗原信息中起着协同作用^[16], 在 M Φ 处于激活状态下, C₃b 受体与 C₃b 包被颗粒结合打开了介导内吞的活化枢纽。M Φ C₃b 受体可随机体的不同免疫状态而发生变化, M Φ C₃b 受体的检测可作为衡量 M Φ 功能的指标之一^[17]。根据酵母多糖 (Y) 可激活血清补

体 C_3b 旁路的原理, 将酵母菌与小鼠血清共温, 形成 YC_3b 复合物, 以此作为指示颗粒, 可与 $M\Phi C_3b$ 受体结合而成 YC 花环, 这为检测 $M\Phi$ 表面 C_3b 受体提供了简便灵敏的实验方法。结果(表 5)表明, 随血清稀释度增加, 花环形成率下降, 在血清稀释度为 1:20~1:80 之间, 实验组花环形成率较对照组有明显提高, 统计学分析有显著性差异, 镜检可见实验组 $PM\Phi$ 体积较大, 表面突起增多而伸展, 相同条件下, 每个 $M\Phi$ 粘附的酵母菌数也较对照组多。本实验结果进一步为 LABPG 激活 $M\Phi$ 的作用机理提供了实验依据。

表5 LABPG激活的 $PM\Phi$ YC花环形成率Table 5 YC-rosette forming ratio of $PM\Phi$ activated by LABPG

组别 Group	血清稀释度 ^a Degree of serum dilution		
	1: 20	1: 40	1: 80
对照组 Control	21.64±4.16	11.93±2.57	1.14±1.11
实验组 Test	32.14±3.84**	16.92±3.80**	6.14±1.63***

* $\bar{X} \pm S.D. (n = 7)$ **与对照组相比 $P < 0.05$ ***与对照组相比 $P < 0.001$

Significantly different from controls at $p < 0.05$ *Significantly different from controls at $p < 0.001$

2.5 PG 对血清 LSZ 活力的影响

LSZ 是中性粒细胞、单核吞噬细胞合成并释放的物质, 是吞噬细胞杀菌的物质基础。血清 LSZ 主要是由单核吞噬细胞释放。

Castro 等人^[19]提出, 血清 LSZ 含量的高低, 能反映 $M\Phi$ 杀伤肿瘤细胞的能力。Kokoshis 等人^[20]指出, 血清 LSZ 含量是衡量 $M\Phi$ 免疫功能的一项指标。我们在小鼠腹腔注射(ip)后第 4 天测定血清 LSZ 活性。结果(表 6)表明, LABPG 对小鼠血清溶菌酶有明显的刺激作用, 统计学分析差异具有极显著性。本实验进一步证明了 LABPG 能激活单核吞噬细胞。至于注射 LABPG 的剂量及其激活 $M\Phi$ 的持久性, 有待实验进一步研究。

表6 LABPG对小鼠血清LSZ活力的影响

Table 6 Effect of LABPG on serum LSZ activity in mice

组别 Group	血清溶菌酶活力 ^a Serum lysozyme activity (U/ml)	P值 P value
对照组 Control	1.24±0.15	
实验组 Test	2.09±0.23	$P < 0.001$

* $\bar{X} \pm S.D. (n=7)$

3 讨论

应用 PG 作为免疫增强剂已越来越引起人们的广泛注意。我们采用 Park 等人的方法提取 PG, 结果表明该法比常规提取法简便易行, 大大简化了实验操作。

对 LABPG 的生物学活性测定结果表明, LABPG 对小鼠单核吞噬细胞具有一定的激活作用, 这为将益生菌制剂作为生物制品药物的应用研究提供了线索。但有待实验进一步确定其是否具有双向免疫调节作用, 以确定其发挥作用的合适剂量及最佳免疫途径。

参 考 文 献

[1] Lyons T P. *News and Information*, 1987, 8(2):157~160.

- [2] Fuller R. *J Appl Bacteriol*, 1989, **66**:365~378.
- [3] Sekine K, Toida T, Saito M *et al. Cancer Research*, 1985, **45**(3):1300.
- [4] 赵子秀, 彭虹, 左秀勤等. 上海免疫学杂志, 1988, **8**(1): 1~4.
- [5] 郭庆福, 彭虹, 赵子秀. 上海免疫学杂志, 1988, **8**(1): 5~7.
- [6] Park J T, Hancock R. *J Gen Microbiol*, 1960, **22**:249~258.
- [7] Schleifer K H, Kandler O. *Bacteriological Review*, 1972, **36**(4):407~477.
- [8] Marion M B. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**:248~254.
- [9] Reissig J L, Strominger J L, Leloir L F. *J Biol Chem*, 1955, **217**:959~966.
- [10] Ghuysen J M, Bricas E, Lache M *et al. Biochemistry*, 1968, **7**:1450~1460.
- [11] Booker S B, Summerson W H. *J Biol Chem*, 1941, **138**:535.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 281.
- [13] 赵子秀, 彭虹, 左秀勤等. 上海免疫学杂志, 1988, **8**(1): 1~4.
- [14] 林清华. 微生物学通报, 1988, **15**: 127.
- [15] Rivero I. *Scand J Immunol*, 1979, **9**: 9.
- [16] 朱云凤, 郭寿延. 上海免疫学杂志, 1988, **3**(5): 262~265.
- [17] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al. Eur J Biochem*, 1980, **106**:7~16.
- [18] Saiki I, Kamisango K, Tanio Y *et al. Infect Immun*, 1982, **38**:58~66.
- [19] Castro J E. *Immunological Aspects of Cancer*. New York, 1978:132.
- [20] Kokoshis D L. *J Reticuloendothel Soc*, 1979, **25**:85.

PART OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEPTIDOGLYCAN FROM *STREPTOCOCCUS LACTIS* SB900

Meng Fanlun Ma Guirong Kong Jian

(State Key Laboratory of Microbil Technology Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Peptidoglycan of *Streptococcus lactis* SB900(LABPG) was isolated. It's chemical composition was analyzed and part of biological activity was examined. The PG contained 9.84% protein, 0.871 μ mol / mg NAG, 1.14 μ mol / mg NAM. The amino acids of relatively high concentrations were Ala, Glu, Asp and their concentrations were 1.046, 0.775, 0.304 μ mol / mg respectively. Using mice as subject, the animal experiment confirmed that LABPG was non-toxic and safe. Effect of ip LABPG 0.5mg / mouse on the phagocytic function were studied. It was suggested that the phagocytic activity of PM Φ had markedly enhanced, the activity of serum lysozyme was increased significantly. YC-Rosette experiment suggested that the activity of C₃b receptors of PM Φ were increased and the YC-Rosette forming ratio were higher than controls. The difference was significant by statistical analysis. Therefore, it is considered that LABPG was able to activate M Φ and improve immune function in mice.

Key words Peptidoglycan, Macrophage, Phagocytic action, YC-Rosette test