

乳酸杆菌 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵 Caco-2 细胞的拮抗作用

李鹏成, 叶小兰, 王志胜, 庾庆华, 杨倩*

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要:【目的】对嗜酸乳杆菌的 S-层蛋白(S-layer protein)进行提纯,研究嗜酸乳杆菌和 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附和入侵的拮抗作用。【方法】应用阴离子交换柱(DE52)对嗜酸乳杆菌的 S-层蛋白进行提纯,然后分别研究了嗜酸乳杆菌和 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵 Caco-2 细胞的作用。【结果】S-层蛋白能显著地抑制鼠伤寒沙门氏菌的黏附及入侵;在竞争、排斥、置换 3 种黏附试验中,S-层蛋白可显著降低鼠伤寒沙门氏菌的黏附,其相对黏附力分别为 $1.17\% \pm 5.97\%$ 、 $8.71\% \pm 1.36\%$ 、 $10.56\% \pm 0.92\%$,差异极显著($p < 0.01$),其中竞争试验效果最好;并且 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附抑制作用极显著高于嗜酸乳杆菌($p < 0.01$);此外,S-层蛋白也能显著抑制鼠伤寒沙门氏菌入侵。【结论】乳酸杆菌 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌可产生显著的拮抗作用,这可能与 S-层蛋白和鼠伤寒沙门氏菌的宿主黏附受体存在竞争作用有关;提示乳酸杆菌 S-层蛋白可用于预防和治疗鼠伤寒沙门氏菌感染,并有望成为抗生素的替代品。

关键词: 嗜酸乳杆菌; S-层蛋白; 鼠伤寒沙门氏菌; Caco-2 细胞

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1226-06

乳酸杆菌是人类和动物肠道中一种正常的优势有益菌,具有拮抗多种病原菌的作用,如致病大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌和志贺氏菌等^[1-3]。乳酸杆菌外包装一层呈晶格状排列结构的 S 层蛋白(S-layer protein)。近年来有研究报道,乳酸杆菌对病原菌的拮抗作用与 S 层蛋白密切相关^[4-5];从乳酸杆菌(*L. helveticus*, *L. crispatus* 和 *L. kefir*)分离的 S-层蛋白可直接抑制病原菌黏附在宿主小肠上皮细胞,如肠出血性大肠杆菌^[6],肠炎沙门氏菌^[7]等。

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是危害人类和动物的重要肠道致病菌^[8],如人类食源性污染引起的肠道感染和仔猪腹泻等,鼠伤寒沙门氏菌每年的感染数量约占沙门氏菌感染量的 1/5^[9]。黏附是病原菌定植宿主上皮细胞的重要阶段,是激

发肠道感染的前提条件^[10],鼠伤寒沙门氏菌通过消化道进入小肠后首先黏附和定植于小肠上皮表面,然后入侵细胞而导致宿主的一系列的病变,如腹泻、菌血症等。如果阻止病原菌在肠上皮细胞表面的黏附定植,将有效地阻止鼠伤寒沙门氏菌对宿主的感染。

由于在活体状态下,肠道复杂的内环境使病原菌与宿主的相互作用难以精确观察,因此,本试验选用 Caco-2 细胞作为体外研究模式。Caco-2 细胞是体外培养的肠上皮细胞层,细胞来源于人结肠腺癌细胞(The human colon carcinoma cell line),简称 Caco-2 细胞。Caco-2 细胞在培养条件下可自发进行上皮样分化并形成紧密连接,其结构、形态学、标志酶的功能表达及渗透特性与小肠上皮细胞类似^[11],

基金项目:国家自然科学基金项目(30871858);江苏省支撑计划(BE200830155);教育部博士点基金(B200606)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395817; Fax: +86-25-84398669; E-mail: zxybq@njau.edu.cn

作者简介:李鹏成(1981-),男,山西文水人,博士研究生,主要从事动物黏膜免疫和分子免疫学研究。E-mail: lipengcheng305@163.com

收稿日期:2010-02-04;修回日期:2010-04-02

因此 Caco-2 细胞是研究细胞与细菌之间相互关系的一种很好的细胞模型,现已广泛应用于细菌入侵和粘附定植作用机制的研究。

本试验首先提纯了嗜酸乳酸杆菌的 S-层蛋白,然后应用 Caco-2 细胞作为细胞模型,研究 S-层蛋白拮抗鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵的机制,以期为乳酸杆菌 S-层蛋白预防人类食源性污染引起的肠道感染和动物感染(如仔猪腹泻)提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 (*Salmonella typhimurium*),北京大学微生物系刘树林教授馈赠;猪小肠分离的乳酸杆菌 36 株(仅鉴定到乳酸杆菌属水平),由本实验室分离;嗜酸乳杆菌 ATCC4356 (*Lactobacillus acidophilus*),购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器:Caco-2 细胞株(human colon carcinoma cell)购自 ATCC (American Type Culture Collection, USA);高糖 DMEM 培养基(Gibco)、胰蛋白酶(Gibco)购自美国英骏公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;纤维素 DE52 购自英国 Whatman 公司;BSA、青霉素、硫酸链霉素、庆大霉素均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 乳酸杆菌 S-层蛋白的提取与纯化

参考 Hein 等^[12]首先对乳酸杆菌 S-层蛋白进行粗提,并将其粗提产物冻干, -20℃ 保存备用。乳酸杆菌 S-层蛋白的纯化:本试验选取阴离子交换柱 DE 52,常规装柱,0.05 mol/L PB 缓冲液(pH 8.0)进行平衡;将粗提 S-层蛋白冻干样品用上述缓冲液重悬过柱,收集蛋白洗脱峰;为减少蛋白损失,随即用 0.5 mol/L 的 NaCl 洗脱,收集蛋白洗脱峰;最后 SDS-PAGE 分析验证提纯效果。

1.3 S-层蛋白抗血清的制备

将纯化得到的 S-层蛋白(2 g/L)与福氏完全佐剂(Sigma 公司)等体积混合,背部多点皮内注射新西兰兔(剂量为 1 mL/只)进行多次免疫,待效价大于 1:16 后心脏采血,分离血清, -20℃ 保存备用。

1.4 细菌培养

将鼠伤寒沙门氏菌接种于 LB 培养基,37℃ 振荡培养 10 h,3113 × g 离心 5 min,收集菌体,用 DMEM 培养液重悬细菌备用。嗜酸乳酸杆菌接种于 MRS 培养基,37℃ 静置培养 24 h,3113 × g 离心

5 min,收集菌体,用 DMEM 培养液重悬细菌,调整浓度后备用。

选择性培养基:SS 琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司)用于鼠伤寒沙门氏菌的选择性培养。

1.5 细胞培养

Caco-2 细胞于含有 10 % 的胎牛血清和双抗(青霉素、链霉素浓度均为 100 U/mL)的 DMEM 细胞培养液中培养(37℃、5 % CO₂)。黏附试验所用 Caco-2 细胞接种于 24 孔培养板,隔天更换培养基,细胞长成单层后使用。

1.6 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌拮抗作用

1.6.1 S-层蛋白抑制鼠伤寒沙门氏菌入侵的剂量依赖性试验:Caco-2 细胞长成单层后,无菌 PBS 冲洗 3 次,加入鼠伤寒沙门氏菌(5×10^7 CFU/孔)和不同浓度的 S-层蛋白;5 % CO₂,37℃ 作用 1 h 后,再加入庆大霉素(终浓度为 100 mg/L)作用 2 h;PBS 漂洗未黏附的细菌,无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数。每个处理设 3 个重复孔,对照组的 Caco-2 细胞中仅加入鼠伤寒沙门氏菌,不加 S-层蛋白(侵袭试验)。

1.6.2 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌的黏附及入侵抑制试验:本试验采用 3 种不同的方法^[13]:排斥试验(Exclusion assay)、竞争试验(Competition assay)和置换试验(Displacement assay)研究乳酸杆菌 S-层蛋白对病原菌的黏附及入侵抑制作用。

(1)排斥试验:Caco-2 细胞长成单层后,分别将嗜酸乳酸杆菌(2×10^8 CFU/孔)和 S-层蛋白(终浓度 100 mg/L)先加入细胞单层,37℃ 培养 1 h,PBS 冲洗 3 次,再加入鼠伤寒沙门氏菌(5×10^7 CFU/孔);5 % CO₂,37℃ 作用 2 h 后;PBS 漂洗未黏附的细菌,无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数(SL1344 同时做入侵细菌计数,操作同 1.6.1 中所述)。每个处理设 3 个重复孔(粘附与侵袭)。

(2)竞争试验:将嗜酸乳酸杆菌(2×10^8 CFU/孔)和 S-层蛋白(终浓度 100 mg/L)分别与鼠伤寒沙门氏菌(5×10^7 CFU/孔)同时加入细胞单层,5 % CO₂,37℃ 作用 2 h 后;PBS 漂洗未黏附的细菌,无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数(鼠伤寒沙门氏菌同时做入侵细菌计数,操作同 1.6.1 中所述)。每个处理设 3 个重复孔(粘附与侵袭)。

(3)置换试验:先将鼠伤寒沙门氏菌(5×10^7

CFU/孔)加入细胞单层,5% CO₂,37℃培养1 h后,PBS冲洗3次,再分别加入嗜酸乳酸杆菌(2 × 10⁸ CFU/孔)和S-层蛋白(终浓度100 mg/L),继续作用2 h后;PBS漂洗未黏附的细菌,无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数(鼠伤寒沙门氏菌同时做入侵细菌计数,操作同1.6.1中所述)。每个处理设3个重复孔(粘附与侵袭)。

(4)对照试验:首先将鼠伤寒沙门氏菌加入细胞单层(5 × 10⁷ CFU/孔),然后再加各处理,分别为:S-层蛋白(终浓度100 mg/L)、S-层蛋白和S-层蛋白抗血清(1:100)、S-层蛋白和正常兔血清、牛血清白蛋白(BSA),37℃作用1 h后;再加入庆大霉素(终浓度为100 mg/L)作用2 h;PBS漂洗未黏附的细菌,然后无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数。每个处理设3个重复孔(侵袭试验)。

以上试验均设对照组,在Caco-2细胞中仅加入鼠伤寒沙门氏菌。

1.7 数据处理及分析

黏附力的计算公式为:胞内细菌数和胞外细菌数/加入孔内的细菌数(100。将对照组的黏附力设为100%,相对黏附力(%) = 各处理细菌孔黏附力/对照孔黏附力。

入侵力的计算公式为:胞内细菌数/加入孔内

的细菌数(100。将对照组的入侵力设为100%,相对入侵力(%) = 各处理细菌孔入侵力/对照孔入侵力。

数据采用SPSS(16.0)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(one way ANOVA, LSD)。所有数据均表示为平均值 ± 标准误, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 S-层蛋白的粗提及纯化

通过盐酸胍对36株乳酸杆菌进行S-层蛋白的粗提发现,本实验室所分离的所有猪源小肠乳酸杆菌均不存在S-层蛋白(数据未显示),只有嗜酸乳酸杆菌提取得到S-层蛋白。经过SDS-PAGE分析得到分子量大小为43 kDa的目的条带(图1-A),每升菌液大约可以得到8 mg的S-层蛋白粗提品。S-层蛋白粗提品经过阴离子交换柱提纯后,S-层蛋白主要存在于PB2洗脱峰中(图1-B);经SDS-PAGE显示,提纯后的S-层蛋白在43 kDa处条带清楚,如图1-C所示,每升菌液大约可以得到4 mg的S-层蛋白纯品。

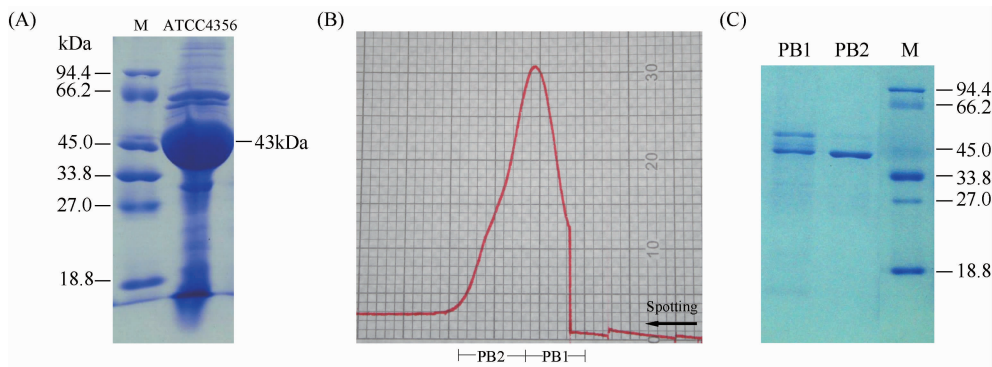


图1 S-层蛋白的提取

Fig. 1 Extraction of S-layer proteins. A: The crude S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus*. B: The purification of the S-layer proteins from *Lactobacillus acidophilus*. C: Analysis of S-layer proteins by SDS-PAGE. M: molecular weight Marker; PB1: up-spike; PB2: down-spike.

2.2 嗜酸乳酸杆菌及其S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵Caco-2细胞的影响

2.2.1 S-层蛋白剂量依赖性影响:结果显示,S-层蛋白能够显著降低鼠伤寒沙门氏菌的对Caco-2细胞的入侵,并且在一定的浓度范围内呈现剂量依赖性(图2-A),随着S-层蛋白浓度的增加,抑制鼠伤寒沙门氏菌入侵Caco-2细胞的效果就越明显,50 mg/L与100 mg/L S-层蛋白可显著减少细菌的入侵,相对入侵力分别为44.78% ± 8.27%和

41.37% ± 9.62%,与对照组相比差异极显著($p < 0.01$)。

2.2.2 S-层蛋白拮抗鼠伤寒沙门氏菌对照试验:如图2-B所示,Caco-2细胞加入鼠伤寒沙门氏菌、BSA的细胞孔与鼠伤寒沙门氏菌、S-层蛋白、S-层蛋白抗血清的细胞孔,相对入侵力分别为101.26% ± 5.77%和82.20% ± 4.80%,与Caco-2细胞单独接入鼠伤寒沙门氏菌相比,差异均不显著;但是Caco-2细胞加入鼠伤寒沙门氏菌后再加入S-层蛋白的细

胞孔与鼠伤寒沙门氏菌、S-层蛋白、正常兔血清的细胞孔的相对黏附力减少一半,分别为 $53.80\% \pm 6.07\%$ 和 $47.22\% \pm 6.43\%$,与单独加细菌孔相比,差异极显著($p < 0.01$)。

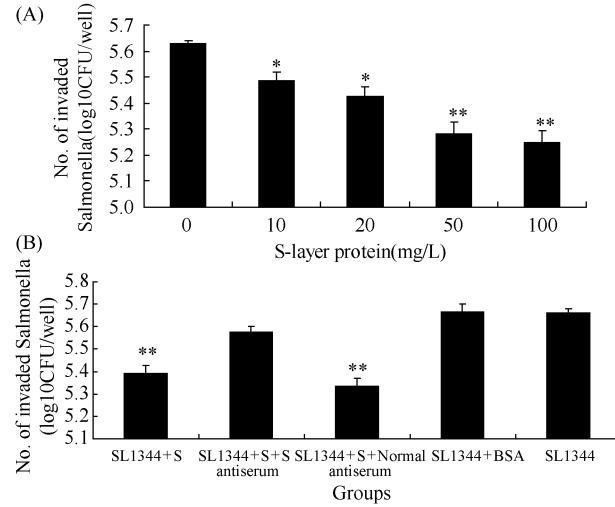


图2 S-层蛋白拮抗鼠伤寒沙门氏菌的剂量筛选与对照试验

Fig. 2 The dose screening and control experiment of S-layer proteins against *Salmonella typhimurium* invading to Caco-2 cells. A: The dose effects of S-layer proteins against *Salmonella typhimurium* invading to Caco-2 cells (to compare with 0 mg/L). B: The control experiment of S-layer proteins against *Salmonella typhimurium* invading to Caco-2 cells (to compare with SL1344). SL1344: *Salmonella typhimurium*; S: S-layer protein; BSA: Albumin of bovine serum. “*” , $p < 0.05$; “**” , $p < 0.01$.

2.2.3 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附的影响:在 3 种黏附试验中,嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白均对鼠伤寒沙门氏菌的黏附表现出良好的抑制作用(图 3-A)。竞争试验、排斥试验和置换试验的相对黏附力分别为 $19.02\% \pm 1.86\%$ 和 $1.17\% \pm 5.97\%$ 、 $15.04\% \pm 5.30\%$ 和 $8.71\% \pm 1.36\%$ 、 $23.61\% \pm 1.90\%$ 和 $10.56\% \pm 0.92\%$,与对照组相比,差异均极显著($p < 0.01$);其中嗜酸乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的排斥试验抑制效果最好,而 S-层蛋白则是竞争试验抑制效果最好;另外,在 3 种黏附试验中,S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌的抑制效果均极显著高于嗜酸乳酸杆菌($p < 0.01$)。

2.2.4 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌入侵的影响:如图 3-B 所示,在竞争试验和排斥试验中,嗜酸乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌入侵 Caco-2 细胞的抑制效果明显,与对照组相比,差异均极显著($p < 0.01$),排斥试验的抑制效果好于竞争试验;而在置换试验中抑制作用不明显;3 种黏附试验的相对入侵力分别为 $57.50\% \pm 5.37\%$ 、 $15.10\% \pm$

4.92% 、 $100.00\% \pm 9.92\%$ 。然而,S-层蛋白则对鼠伤寒沙门氏菌入侵 Caco-2 细胞具有明显的抑制作用。竞争试验、排斥试验和置换试验的相对入侵力分别为 $3.73\% \pm 9.61\%$ 、 $13.39\% \pm 3.32\%$ 、 $24.19\% \pm 3.42\%$,与对照孔相比,差异呈极显著($p < 0.01$),其中竞争试验的抑制作用最强;此外,在竞争试验和置换试验中,S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌入侵 Caco-2 细胞的抑制作用极显著高于嗜酸乳酸杆菌($p < 0.01$)。

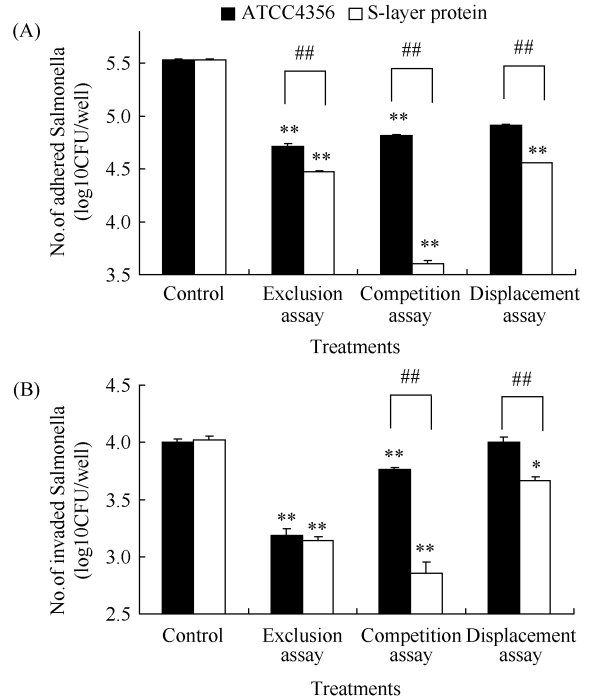


图3 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵抑制试验

Fig. 3 The inhibition assay of *Lactobacillus acidophilus* and S-layer protein against *Salmonella typhimurium* adhesion and invasion on Caco-2 cells. A: The inhibition assay of adhesion. B: The inhibition assay of invasion. ATCC4356: *Lactobacillus acidophilus*; “*” to compare with control; “#”, differences between *Lactobacillus acidophilus* and S-layer protein; “*” or “#”, $p < 0.05$; “**” or “##”, $p < 0.01$.

3 讨论

国外相关报道,并不是所有的乳酸杆菌都具有 S-层蛋白^[4,14],目前已证实的具有 S-层蛋白的乳酸杆菌有嗜酸乳酸杆菌、卷曲乳酸杆菌、嗜淀粉乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌、短乳酸杆菌、瑞士乳酸杆菌、高加索乳酸杆菌、鸡乳酸杆菌、发酵乳酸杆菌九种,但同一种之间不同亚种也存在不具备 S-层蛋白的现象。本试验对乳酸杆菌 S-层蛋白菌株的筛选做了大量的工作,发现本实验室所分离的定植在猪小肠中的乳酸杆菌并不存在 S-层蛋白,而人源的嗜酸乳酸杆

菌则具有大量的 S-层蛋白, 分子量大小为 43 kDa^[12]。

乳酸杆菌的 S-蛋白与其它细菌一样, 其亚单位之间以及与支撑的细胞壁之间, 也是以非共价键连接, 因而可利用变性剂, 如尿素、盐酸胍等将其分离为单聚体。乳酸杆菌的 S-层蛋白均为碱性蛋白, 等电点为 9.35 - 10.4, 这是乳酸杆菌独有的特性^[15]; 因此本试验选取阴离子交换柱, 利用反吸附方法得到纯度较高的乳酸杆菌 S-层蛋白。

乳酸杆菌具有拮抗多种病原菌的作用, 本研究进一步证实乳酸杆菌对病原菌鼠伤寒沙门氏菌的显著抑制作用。据报道乳酸杆菌对病原菌的拮抗作用与 S-层蛋白密切相关, 我们应用提纯的嗜酸乳酸杆菌 S-层蛋白抑制鼠伤寒沙门氏菌在 Caco-2 细胞的黏附及入侵都得到了理想的效果, S-层蛋白的抑制效果极显著高于乳酸杆菌。这可能与 S-层蛋白相对于菌体而言小的多, 更容易占据沙门氏菌的粘附位点有关; 当然, 也可能与试验中加入的 S-层蛋白浓度高于接入乳酸杆菌菌量相当的 S-层蛋白有关; 但是, S-层蛋白显著的抑菌效果仍然表明 S-层蛋白在乳酸杆菌抑菌作用中占据重要地位。

有研究表明, 乳酸杆菌可能与病原菌竞争性结合肠黏膜上的黏蛋白以及肠黏膜上皮细胞受体, 从而抑制病原菌的黏附和侵袭^[16]。如果去除和破坏乳酸杆菌的 S-层蛋白, 可降低乳酸杆菌对宿主上皮细胞的黏附作用^[17]。本试验中, S-层蛋白在竞争试验中抑制鼠伤寒沙门氏菌的黏附及入侵效果最好, 进一步推断 S-层蛋白可能与鼠伤寒沙门氏菌粘附宿主细胞的受体存在竞争作用。此外, S-层蛋白在排斥、竞争和置换试验中均能有效的抑制鼠伤寒沙门氏菌的黏附及入侵, 提示我们如果在食源性感染(人类胃肠炎)和动物感染(如仔猪腹泻)的发病前后, 口服 S-层蛋白都能抑制鼠伤寒沙门氏菌的粘附和入侵, 阻止疾病的进一步的发生。

乳酸杆菌是人类和动物小肠道中的优势菌群, 对抑制病原菌的入侵与感染和维持消化道内微生物区系平衡等都具有重要意义。目前乳酸杆菌在食品和饲料工业中已较广泛应用, 但由于乳酸杆菌各种制剂效果不一、作用机制复杂, 又是活菌、难于长期保存和运输给实际应用带来一定困难。S-层蛋白易于保存和运输, 不具有耐药性, 并且来源丰富(约占菌体总蛋白的 10% 左右^[18]), 提取纯化技术也比较成熟, 因此 S-层蛋白非常有希望作为抗生素或乳酸杆菌的替代品应用于临床和饲料工业中。

参考文献

- [1] Voravuthikunchai SP, Bilasoi S, Supamala O. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe*, 2006, 12:221 - 226.
- [2] Otero MC, Nader-Macias ME. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*, 2006, 96:35-46.
- [3] Moorthy G, Murali MR, Devaraj SN. Protective role of lactobacilli in *Shigella dysenteriae* 1 - induced diarrhea in rats. *Nutrition*, 2007, 23:424-433.
- [4] Jakava-Viljanen M, Palva A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Veterinary Microbiology*, 2007, 124:264-273.
- [5] Wang B, Wei H, Yuan J, Li Q, Li Y, Li N, Li J. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte like HT229 cells. *Current Microbiology*, 2008, 57 (1):33-38.
- [6] Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiology*, 2007, 9:356-367.
- [7] Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118(3):264-273.
- [8] Rugbjerg H, Wingstrand A, Hald T, Andersen JS, Lo Fo Wong DM, Korsgaard H. Estimating the number of undetected multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infected pig herds in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*, 2004, 14:147-171.
- [9] Helms M, Ethelberg S, Molbak K. The DT104 study group international *Salmonella typhimurium* infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11: 859-867.
- [10] Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*, 2007, 18(449):827-834.
- [11] Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon

- carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research*, 1988, 48(7):1936-1942.
- [12] Boot HJ, Kolen CP, van Noort JM, Pouwels PH. S-Layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Purification, Expression in *Escherichia coli*, and Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(19):6089-6096.
- [13] 倪学勤, Gong J, 曾东, Yu H, Si WD, 周小秋. 猪源乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 在猪肠道上皮细胞 IPEC-J2 上粘附的影响. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35(7):1072-1077.
- [14] Hagen KE, Guan LL, Tannock GW, Korver DR, Allison GE. Detection, Characterization, and In Vitro and In Vivo Expression of Genes Encoding S-Proteins in *Lactobacillus gallinarum* Strains Isolated from Chicken Crops. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11):6633-6643.
- [15] 郭兴华, 曹郁生, 东秀珠. 益生乳酸细菌: 分子生物学及生物技术. 北京: 科学出版社. 2008.
- [16] Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28: 405-440.
- [17] Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52:925-930.
- [18] Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97:55-56.

Effects of S-layer proteins from *Lactobacillus* against *Salmonella typhimurium* adhesion and invasion on Caco-2 cells

Pengcheng Li, Xiaolan Ye, Zhisheng Wang, Qinghua Yu, Qiang Yang*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [**Objective**] S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* were extracted and purified, then the effect of *Lactobacillus acidophilus* and its S-layer proteins against the adhesion and invasion of *salmonella typhimurium* to caco-2 cells were investigated. [**Methods**] S-layer proteins were purified by anion-exchange column { diethylaminoethyl (DEAE) DE52 }, and the inhibition of *Lactobacillus acidophilus* and its S-layer proteins were studied against the adhesion and invasion of *salmonella typhimurium* on Caco-2 cells. [**Results**] S-layer proteins exhibited strongly inhibitory effects of adhesive and invading properties of *Salmonella typhimurium*. In the adhesive experiments (competitive, exclusive and displacement), *Salmonella typhimurium* adhesion was reduced by S-layer proteins and the ability of adherence to Caco-2 cells were $1.17\% \pm 5.97\%$, $8.71\% \pm 1.36\%$ and $10.56\% \pm 0.92\%$, respectively ($P < 0.01$). The influence to inhibit the competitive adhesion of *Salmonella typhimurium* was optimal. Furthermore, the S-layer proteins showed a stronger effect than *Lactobacillus acidophilus* to inhibit *Salmonella typhimurium* adhesion on Caco-2 monolayers ($P < 0.01$). Moreover, invasion of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 monolayers was inhibited by S-layer proteins. [**Conclusion**] S-layer proteins inhibited adherence and invasion of *Salmonella typhimurium*. The result can merit a highlight for preventive or probiotic therapy in human or animals with disease caused by *Salmonella typhimurium*.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*; S-layer protein; *Salmonella typhimurium*; Caco-2 cells

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871858), the program of Jiangsu province in China (BE200830155) and the Grant of educational ministry China (30871858)

* Corresponding author. Tel: + 86-25-84395817; Fax: + 86-25-84398669; E-mail: zxyq@njau.edu.cn

Received: 4 February 2010/ Revised: 2 April 2010