

李 清, 王 英, 刘小莉, 等. 戊糖片球菌对 Caco-2 细胞的黏附及黏附素的鉴定[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 927-933.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.034

戊糖片球菌对 Caco-2 细胞的黏附及黏附素的鉴定

李 清^{1,2}, 王 英¹, 刘小莉¹, 周剑忠¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2. 许昌职业技术学院医疗卫生系, 河南 许昌 461000)

摘要: 为了研究戊糖片球菌 SR2-6 对 Caco-2 细胞的黏附作用, 采用不同的化学试剂和酶处理 SR2-6, 测定其表面成分黏附性质变化, 并提取戊糖片球菌表面的细胞黏附素, 进行成分和结构分析。同时测量了 Caco-2 细胞 *MUC3* 基因表达量的变化。结果显示, 戊糖片球菌 SR2-6 能明显上调 Caco-2 细胞 *MUC3* 基因表达; 戊糖片球菌 SR2-6 的肽聚糖参与了 Caco-2 细胞黏附的主要过程, 该肽聚糖为 α 型肽聚糖, 提取物主要由谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸组成, 总糖含量为 $(9.42 \pm 1.55)\%$, 蛋白质含量为 $(4.61 \pm 1.88)\%$ 。戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖是一种抑制性黏附素, 浓度越高, 对 SR2-6 黏附 Caco-2 细胞的抑制越强, 同时上调 *MUC3* 基因表达的作用也越强。

关键词: 戊糖片球菌; 黏附; Caco-2 细胞; *MUC3* 基因; 肽聚糖

中图分类号: TS255.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0927-07

The adhesion of *Pediococcus pentosaceus* to Caco-2 cell and identification of the adhesin

LI Qing^{1,2}, WANG Ying¹, LIU Xiao-li¹, ZHOU Jian-zhong^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Xuchang Vocational and Technical College, Xuchang 416000, China)

Abstract: To study the adhesion of *Pediococcus pentosaceus* SR2-6 to Caco-2 cells, SR2-6 was treated differently with chemical agents and enzymes. The adhesin involved in the adhesion was extracted and the components and structures were analyzed. Peptidoglycan of SR2-6 exerted a major role in the adhesion processes. The peptidoglycan, demonstrated as the α -type, was a kind of inhibitory adhesin, consisting of glutamic acid, malonic acid, aspartic acid and lysine, with total sugar content of $(9.42 \pm 1.55)\%$ and protein content of $(4.61 \pm 1.88)\%$. The higher the concentration of peptidoglycan, the stronger the inhibition against the adhesions of SR2-6 to *Salmonella* and Caco-2 cells, and the stronger the up-regulation of the *MUC3* gene.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*; adhesion; Caco-2 cell; *MUC3* gene; peptidoglycan

肠道病原菌对肠道细胞的黏附是其入侵宿主的第一步, 进而表达毒力因子, 作用于肠道感染的细胞, 使其发生病变, 从而引发人体各种疾病^[1]。乳酸菌具有致病菌侵袭肠道细胞所表现出的定殖抗

性, 通过表面的 S 层蛋白^[2-3]、多糖^[4]等特异性的黏附素与肠上皮细胞受体结合, 占据结合位点, 从而阻止病原菌与黏膜受体结合产生黏附和定殖, 发挥抑制肠道致病菌定殖和生长, 促进机体健康的作用。

戊糖片球菌作为乳酸菌的一种, 是革兰氏阳性菌, 细胞壁由多层肽聚糖 (Peptidoglycan, PGN) 组成, 脂磷壁酸、壁磷壁酸、胞外多糖、S 层蛋白及其他蛋白等镶嵌在肽聚糖层上^[5]。

有研究结果^[6]表明, 戊糖片球菌肽聚糖对戊糖

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目 [CX(13)3080]

作者简介: 李 清 (1993-), 女, 河南驻马店人, 硕士, 主要从事食品生物技术研究。(Tel) 18768823906; (E-mail) elenaliqing@126.com

片球菌黏附肠道上皮细胞有影响,添加一定浓度的肽聚糖,对相应细菌在细胞上的黏附具有抑制作用,浓度较低时,抑制作用就会消失。

消化道黏蛋白(Mucin, MUC)是消化道屏障的主要成分。消化道MUC基因表达及其变化与消化道相关疾病发生有关^[7]。研究表明,消化道MUC基因表达受肠道微生物的影响^[8]。革兰氏阴性菌中的脂多糖可以增加MUC5AC、MUC5B的mRNA表达及MUC的释放;乳酸杆菌可以促进MUC2、MUC3的mRNA的表达,从而抑制致病菌在肠道的黏附和定殖^[9]。

本研究选用从传统发酵食品中筛选并分离鉴定的戊糖片球菌SR2-6,利用不同的化学试剂和酶处理其细胞壁表面成分,测定其黏附性质变化,分析并提取参与黏附的成分,测定戊糖片球菌SR2-6及其黏附成分对消化道肠细胞MUC基因表达的影响,进而对戊糖片球菌SR2-6的黏附素及对致病菌的黏附抑制机理进行深入的研究,为戊糖片球菌在食品中的应用和保健功能的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和细胞

菌种:戊糖片球菌SR2-6,由江苏省农业科学院农产品加工研究所食品生物工程研究室保存;细胞模型:人结肠腺癌细胞系Caco-2细胞株,购自上海博谷生物科技有限公司。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 氯化锂、盐酸胍、苯酚、高碘酸钠、三氯乙酸、考马斯亮蓝G-250为分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司;DMEM培养液、胰酶-EDTA、胎牛血清、青-链霉素、DMSO Trizol Reagent、RT mix、qPCR Master Mix、DEPC、SDS、Agarose、溶菌酶为生物纯,购自美国Gibco公司。

1.2.2 仪器 高速冷冻离心机3K15(美国Sigma公司产品),光学显微镜YS100(Nikon公司产品),漩涡混合仪WH-3(上海跃进医疗器械有限公司产品),超低温冷冻储存箱DW-HL 100(中科美菱低温科技有限公司产品),CO₂培养箱GRYSTAR(苏州净化设备有限公司产品)荧光定量PCR仪(LightCycler480, Roche公司产品),恒温水浴锅DKS26(上海双旭电子有限公司产品),紫外透射仪TVC-312R(美国Spectronics公司产品),净化工作台(上海新

苗医疗器械制造有限公司产品),DNP-9272型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司产品)。

1.3 不同处理对戊糖片球菌黏附的影响

戊糖片球菌SR2-6在MRS液体培养基中,37℃培养24~48h,至浓度为 1.0×10^8 CFU/ml,10 000 r/min离心10 min,用pH 7.2的PBS清洗2次,分别进行以下处理。

1.3.1 胃蛋白酶 将胃蛋白酶溶解于0.05 mol/L甘氨酸-HCl缓冲液(pH 2.2)中,制成400 U/ml的溶液,过滤(0.22 μm)除菌。将戊糖片球菌菌体悬浮于胃蛋白酶溶液中,37℃作用30 min。

1.3.2 胰蛋白酶 将胰蛋白酶溶于0.2 mol/L的PBS(pH 8.0)中,制成400 U/ml的溶液,过滤(0.22 μm)除菌。将戊糖片球菌菌体悬浮于胰蛋白酶溶液中,37℃作用30 min。

1.3.3 氯化锂 将戊糖片球菌SR2-6菌体悬浮于经过高压灭菌的5 mol/L的氯化锂中,冰浴30 min。

1.3.4 盐酸胍 将戊糖片球菌SR2-6菌体悬浮于经过高压灭菌的4 mol/L盐酸胍中,37℃加转子于磁力搅拌器中搅拌30 min。

1.3.5 苯酚 将戊糖片球菌SR2-6菌体悬浮于饱和苯酚溶液中,65℃作用30 min后,在室温下涡旋混合30 min。

1.3.6 热处理 将戊糖片球菌SR2-6菌体在100℃处理5 min。

1.3.7 高碘酸钠 将戊糖片球菌SR2-6菌体悬浮于0.05 mol/L的高碘酸钠溶液(高碘酸钠溶解于0.1 mol/L柠檬酸-磷酸缓冲液,pH 4.5)中,在37℃的摇床(200 r/min)培养箱中培养60 min。

将经上述7种处理的戊糖片球菌SR2-6菌体离心(10 000 g,4℃,10 min),同时用pH 7.2 PBS洗涤3次后重新悬浮于PBS中,将菌体浓度调整到 1.0×10^8 CFU/ml。进行戊糖片球菌对Caco-2细胞的黏附试验,计算戊糖片球菌SR2-6的黏附数量。

1.4 不同处理下细胞黏蛋白基因表达量变化

1.4.1 细胞的培养 Caco-2细胞加冻存液保存于液氮中(-196℃)。试验时,从液氮罐中取出细胞,将冻存管迅速置于37℃水浴中复苏细胞,离心收集细胞后,加入5 ml经56℃、30 min灭活的DMEM完全培养液(含10%胎牛血清,1%双抗),于37℃、CO₂浓度为5%的培养箱中培养,待细胞生长良好(70%~80%融合)时,用0.25%胰酶-EDTA消化传

代。细胞贴壁生长,通常 2 d 更换培养液,4 d 进行传代,传代 5 次左右进行试验。

1.4.2 细胞的黏附 将细胞接种到 6 孔板中,隔天更换培养液,长至单层。PBS (pH 7.2) 清洗细胞 2 次后,将 1 ml 经不同处理后的戊糖片球菌悬液分别添加至细胞孔板中,于 37 ℃、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中孵育 2 h 后,吸去戊糖片球菌悬液,用 PBS (pH 7.2) 清洗细胞 4 次用于提取细胞 RNA。

1.4.3 细胞 RNA 的提取和转录 按照试剂盒操作程序提取细胞 RNA 并转录成 cDNA。

1.4.4 荧光定量 PCR 根据目标基因的序列设计引物(表 1),反应体系总体积 50 μl,包括 2×qPCR Master Mix 2 μl,正向引物(10 μmol/L) 1 μl,反向引物(10 μmol/L) 1 μl,模板 cDNA 2 μl,加 ddH₂O 至 50 μl。

表 1 PCR 所用引物
Table 1 Primers used for PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物 (bp)
MUC3-F	TACCTCTTCCTGGCGTCT	178
MUC3-R	CGAGTTGTCTGCGTGAT	
Actin-F	CATTCCAAATATGAGATGCGTTGT	103
Actin-R	TGTGGACTTGGGAGAGGACT	

荧光定量 PCR 的反应条件:94 ℃ 预变性 30 s; 94 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 30 s,循环 45 次;55 ℃ 退火收集荧光值。在上述扩增条件后增加 60 ℃ 变性 15 s 的溶解曲线分析步骤。分析各基因的 Ct 值,计算出标化后的 -ΔΔCt 值,利用 2^{-ΔΔCt} 法对目的基因的表达量进行评估。

1.5 肽聚糖对戊糖片球菌黏附细胞的影响

参照文献[10]方法提取戊糖片球菌 SR2-6 的肽聚糖,肽聚糖得率^[11]=(得到的肽聚糖质量)/(处理的菌体质量)×100%。将提取的戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖用 PBS (pH 7.2) 溶解为 5 mg/ml,并稀释成不同浓度:0.25 mg/ml、0.50 mg/ml、1.00 mg/ml。将戊糖片球菌 SR2-6 在 37 ℃ 培养 24~48 h(浓度为 1.0×10⁸ CFU/ml),培养液在 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,用 pH 7.2 的 PBS 清洗 2 次后重新悬浮于 PBS (pH 7.2) 中,浓度为 1.0×10⁸ CFU/ml。将 SR2-6 在细胞六孔板中单层培养,PBS (pH 7.2) 清洗细胞 2 次。以 1 ml PBS+1 ml 戊糖片球菌 SR2-6 溶液

作为对照,1 ml PBS+1 ml 不同浓度的肽聚糖溶液+1 ml 戊糖片球菌 SR2-6 溶液于 37 ℃、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中孵育 2 h 后,吸去戊糖片球菌悬液,用 PBS (pH 7.2) 清洗细胞 5 次,以除去未黏附的细菌。然后用 1% 的 TrionX-100 裂解 10 min,梯度稀释后平板计数。

1.6 肽聚糖对细胞黏蛋白基因表达量的影响

将 SR2-6 在细胞六孔板中培养,长至单层时,PBS (pH 7.2) 清洗细胞 2 次。以 1 ml PBS 为对照,分别添加 1 ml 不同浓度的肽聚糖溶液,于 37 ℃、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中孵育 2 h 后,吸去溶液,用 PBS (pH 7.2) 清洗细胞 4 次,按照试剂盒操作程序提取细胞 RNA,反转录并进行荧光定量 PCR。

1.7 戊糖片球菌肽聚糖分析

对提取的戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖进行成分分析和结构验证。

1.7.1 溶菌酶试验^[12] 称取一定质量的肽聚糖提取物,加入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH = 6.2) 中,配置成 1 mg/ml 的溶液,加入蛋清溶菌酶至浓度为 300 μg/ml,于 37 ℃、120 r/min 摇床振荡处理 24 h,其间每隔 1 h 取样一次并 5 倍稀释,在 600 nm 处测定吸光值,检测肽聚糖溶解变化情况。

1.7.2 氨基酸组分分析 称取一定量的肽聚糖提取物,用 6 mol/L 的盐酸溶液 110 ℃ 真空水解 20 h,用日立 835-50 型氨基酸分析仪测定氨基酸组成。

1.7.3 肽聚糖总糖含量测定 按照参考文献[13]的方法以葡萄糖含量 (mg/ml) 为横坐标,光密度为纵坐标,绘制标准曲线。所得标准曲线 $Y = 13.1350x - 0.0278$, $R^2 = 0.9973$ 。称取肽聚糖样品 10 mg,用 0.5 mol/L 硫酸 100 ℃ 水解 6 h,冷却后蒸馏水定容至 100 ml 作为检测样品,按文献[14]的方法在 490 nm 下测定吸光值,利用回归方程计算总糖含量。

1.7.4 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法^[15]。以蛋白质含量为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制标准曲线,所得标准曲线 $Y = 0.0074x - 0.0240$, $R^2 = 0.9963$ 。

1.7.5 红外光谱分析 取肽聚糖提取物用 KBr 压片,采用傅里叶变换红外光谱分析仪进行红外光谱分析,扫描范围为 4 000~370 cm⁻¹。

1.8 数据统计分析

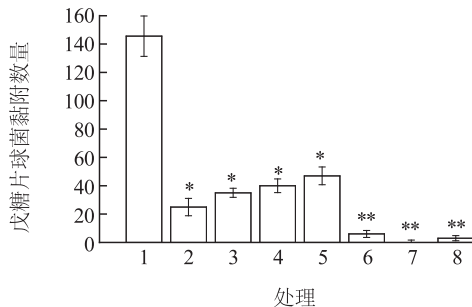
试验每处理重复 3 次,每次做 2~3 个平行。结果以平均值±标准差表示,利用 SPSS 19.0 软件进行

显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同处理条件下戊糖片球菌对 Caco-2 细胞的黏附

戊糖片球菌 SR2-6 经过胃蛋白酶、胰蛋白酶、氯化锂、盐酸胍、苯酚、热和高碘酸钠处理后,对 Caco-2 细胞的黏附均有降低(图 1),其中热处理后戊糖片球菌 SR2-6 对 Caco-2 细胞的黏附几乎为零,这是因为热处理破坏了戊糖片球菌 SR2-6 的活力,失去了对细胞的黏附能力;高碘酸钠处理过的戊糖片球菌 SR2-6 对细胞的黏附能力也较低,表明碳水化合物在戊糖片球菌 SR2-6 对 Caco-2 细胞的黏附力方面起重要作用。



1: 空白; 2: 胃蛋白酶; 3: 胰蛋白酶; 4: 氯化锂; 5: 盐酸胍; 6: 苯酚; 7: 热处理; 8: 高碘酸钠。* 和 ** 分别表示与空白相比, 差异达 0.05 和 0.01 显著水平。

图 1 不同处理条件下戊糖片球菌对 Caco-2 细胞的黏附

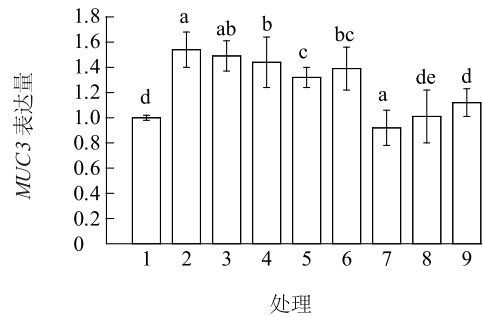
Fig.1 The adhesion of SR2-6 to Caco-2 cells affected by different treatments

2.2 不同处理条件下 Caco-2 细胞黏蛋白基因表达量变化

图 2 显示了不同处理条件下 Caco-2 细胞 *MUC3* 基因表达情况,以空白细胞的 *MUC3* 基因表达量为标准参考量 1.0,其余处理后的细胞 *MUC3* 基因表达量为相对参考量。从图 2 可见,戊糖片球菌 SR2-6 可显著促进 *MUC3* 基因表达,上调表达量。除去苯酚处理,其他不同处理的戊糖片球菌 SR2-6 与细胞作用后均能上调 *MUC3* 的表达,但上调量均比未经处理的低。其中,热处理上调 *MUC3* 表达的作用最低,其次是高碘酸钠和氯化锂处理。

2.3 肽聚糖对戊糖片球菌 SR2-6 黏附细胞的影响

图 3 显示,添加肽聚糖后 SR2-6 对细胞的黏附

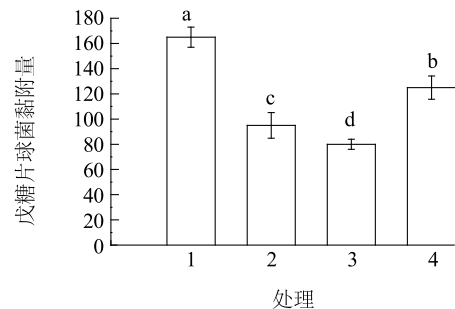


1: Caco-2 细胞; 2: 对照; 3: 胃蛋白酶; 4: 胰蛋白酶; 5: 氯化锂; 6: 盐酸胍; 7: 苯酚; 8: 热处理; 9: 高碘酸钠。不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

图 2 不同处理条件下细胞黏蛋白 *MUC3* 表达量的变化

Fig.2 The expression of *MUC3* of Caco-2 affected by different treatments

均比不添加对照的黏附数少,说明戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖是一种抑制性黏附素。其中,添加 0.25 mg/ml 肽聚糖后,SR2-6 黏附细胞的数量较其他 2 个高浓度的多,表明低浓度肽聚糖对黏附的抑制作用小于高浓度的肽聚糖。



1: SR2-6; 2: SR2-6 + 1.00 mg/ml 肽聚糖; 3: SR2-6 + 0.50 mg/ml 肽聚糖; 4: SR2-6 + 0.25 mg/ml 肽聚糖。不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

图 3 肽聚糖浓度对戊糖片球菌 SR2-6 黏附细胞的影响

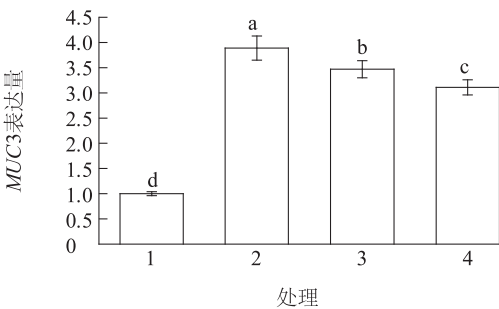
Fig.3 The adhesion of SR2-6 to Caco-2 cells affected by peptidoglycan of different concentrations

2.4 肽聚糖对 Caco-2 细胞黏蛋白基因表达量的影响

图 4 给出了不同浓度肽聚糖作用下 Caco-2 细胞 *MUC3* 基因的表达情况。添加肽聚糖后, Caco-2 细胞 *MUC3* 的表达均有显著的增加,且肽聚糖浓度越高, *MUC3* 的表达上调程度越高。

2.5 戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖成分分析

2.5.1 溶菌酶试验 由图 5 可见,随着溶菌酶水解的进行,溶液的吸光值逐渐降低,吸光值的降低主要



1: Caco-2 细胞; 2: Caco-2 + 1.00 mg/ml 肽聚糖; 3: Caco-2 + 0.50 mg/ml 肽聚糖; 4: Caco-2 + 0.25 mg/ml 肽聚糖。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

图 4 肽聚糖浓度对 Caco-2 细胞 *MUC3* 基因表达量的影响
Fig.4 The expression of *MUC3* of Caco-2 affected by different concentrations of peptidoglycan

出现在最初的 8 h, 12 h 后基本趋于稳定; 未加溶菌酶的对照组, 吸光值基本保持稳定, 说明分离物可以被溶菌酶消化降解, 证明分离物主要成分确为肽聚糖。

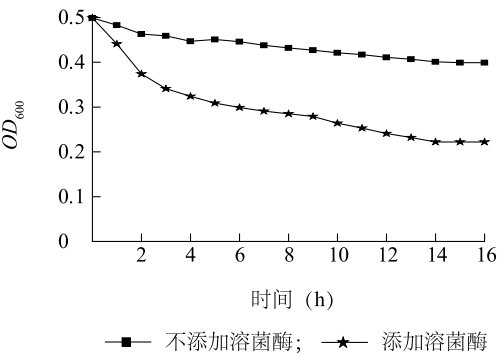


图 5 溶菌酶处理对肽聚糖提取物溶解性的影响
Fig.5 Effects of lysozyme treatment on the solubility of peptidoglycan

2.5.2 氨基酸组分分析 对从戊糖片球菌 SR2-6 中提取的肽聚糖进行氨基酸组分分析, 发现谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸的含量较高(表 1)。谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸是与肽聚糖 N-乙酰胞壁酸 C-3 位羟基相连的短肽所含的氨基酸分子, 甘氨酸为间肽桥中的氨基酸。

2.5.3 总糖含量和蛋白质含量 根据标准曲线计算出糖含量约占肽聚糖提取物的 (9.42 ± 1.55)%, 蛋白质约占 (4.61 ± 1.88)%。

表 1 氨基酸组分分析
Table 1 Analysis of amino acid composition of peptidoglycan

氨基酸	含量 (%)	氨基酸	含量 (%)
氨 NH ₃	1.786	异亮氨酸 Ile	3.223
苏氨酸 Thr	4.060	亮氨酸 Leu	4.689
丝氨酸 Ser	2.301	酪氨酸 Tyr	2.056
谷氨酸 Glu	11.564	苯丙氨酸 Phe	2.308
甘氨酸 Gly	2.635	赖氨酸 Lys	4.899
丙氨酸 Ala	9.910	天冬氨酸 Asp	7.696
胱氨酸 Cys	0	组氨酸 His	1.164
缬氨酸 Val	3.835	精氨酸 Arg	3.159
蛋氨酸 Met	6.393	脯氨酸 Pro	1.560

2.5.4 红外光谱分析 肽聚糖提取物的红外光谱如图 6 所示。波数 3 500~3 200 cm^{-1} 处为 -OH 伸缩振动, 波数 3 000~2 800 cm^{-1} 处为 C-H 伸缩振动, 波数 1 400~1 200 cm^{-1} 处为 C-O 伸缩振动, 均为糖类物质的特征峰。波数 1 660~1 620 cm^{-1} 处有强吸收峰, 为酰胺键 C=O 伸缩振动; 波数 1 560~1 520 cm^{-1} 处为 N-H 键的变角振动; 波数 1 000~1 200 cm^{-1} 有吸收峰, 此组峰为 C-O-H 伸缩振动。对于糖苷键类型的确定为在 840 cm^{-1} 附近有 α 构型吸收峰, 在 880 cm^{-1} 附近有 β 型吸收峰^[16]。结合图 6 可知, 戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖提取物为 α 型肽聚糖。

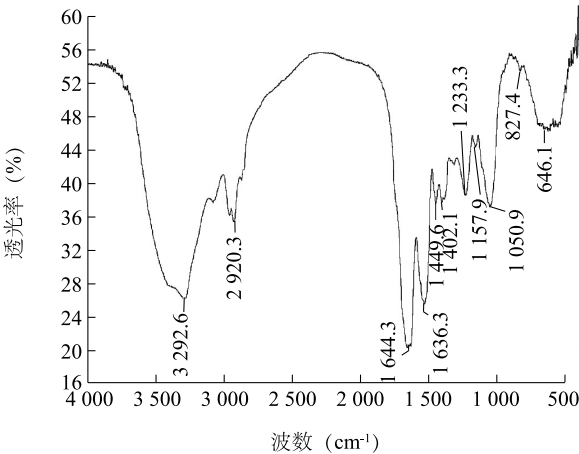


图 6 肽聚糖提取物红外光谱分析
Fig.6 FITR analysis of peptidoglycan

3 结论

细菌的黏附作用受到不同因素的影响,胃蛋白酶、胰蛋白酶可以破坏细胞壁表面的蛋白质,氯化锂、盐酸胍可以去除细胞表面通过非共价键结合的表面蛋白,苯酚可破坏细胞表面的非纤维状蛋白和磷壁酸^[8],热处理可使细胞失活,破坏细胞壁的表面蛋白、磷壁酸和碳水化合物,高碘酸钠则可破坏细胞表面碳水化合物的结构,影响其发挥作用。本研究通过不同的酶及化学成分等处理戊糖片球菌 SR2-6,发现细菌表面的碳水化合物在黏附 Caco-2 细胞的过程中起到主要作用。

肠上皮细胞和共生的微生物群落以及肠腔黏液层,共同构成了肠道的第一道生物屏障,黏蛋白是构成肠道黏液层的主要成分,起到保护肠道、预防致病菌损伤的作用。益生菌在加强肠道屏障功能方面具有重要作用,可以诱导黏蛋白分泌并上调基因表达,拮抗致病菌对肠道的黏附和侵袭。致病菌的肠道定殖也与 *Mucin* 基因表达相关。Mack 等研究发现选择性益生菌乳酸杆菌可黏附于肠道上皮细胞上,迅速诱导 *MUC3* 基因表达,抑制肠道致病菌的黏附。*MUC3* 是典型的跨膜黏蛋白之一,其 C-端结构域包含一个 174 氨基酸模块^[17],对大肠的上皮黏膜具有保护作用。Murphey 等^[18]报道 *MUC3* 蛋白在肠道黏膜防御中发挥积极的作用。戊糖片球菌 SR2-6 可以上调 *MUC3* 的表达,从而起到保护肠道细胞屏障的功能。结合戊糖片球菌 SR2-6 对 Caco-2 细胞的黏附情况,可知,碳水化合物和表面蛋白在戊糖片球菌 SR2-6 黏附细胞并提高细胞黏蛋白 *MUC3* 基因表达方面起到重要作用。

肽聚糖是细菌等原核生物细胞壁的特有组成成分。由于革兰氏阳性细菌表面不含具有抗原性的脂多糖结构,因此肽聚糖被认为是革兰氏阳性细菌细胞壁中能够引起机体免疫反应的主要成分^[18]。真核细胞并不含肽聚糖,但是体内含有若干肽聚糖识别分子,因此肽聚糖就成了真核生物免疫系统识别的理想靶位^[18]。本研究结果显示,戊糖片球菌 SR2-6 肽聚糖是一种抑制性黏附素,浓度越高,对 SR2-6 黏附 Caco-2 细胞的抑制作用越强,同时上调 *MUC3* 基因表达的作用也越强。表明戊糖片球菌 SR2-6 的肽聚糖对于提高人体肠道功能,预防和治疗肠道性疾病具有重要意义。

参考文献:

- [1] MCCracken V J, GASKINS H R. Probiotics and the Immune System [M] // GERALD W. Probiotics: a critical review. New Zealand: Horizon Scientific Press, 1999:85-111.
- [2] SCHACHTSIEK M, HAMMES W P, HERTEL C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001 (T) surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70 (12): 7078-7085.
- [3] CHEN X, XU J, SHUAI J, et al. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115 (3): 307-312.
- [4] RUAS-MADIEDO P, MEDRANO M, SALAZAR N, et al. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109 (6): 2079-2086.
- [5] LEBEER S, VANDERLEYDEN J, DE KEERSMAECKER S C J. Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72 (4): 728.
- [6] 任鹏飞. 乳酸菌益生效应评价体外模型建立及黏附相关机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [7] BAFNA S, KAUR S, BATRA S K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells [J]. Oncogene, 2010, 29 (20): 2893-2904.
- [8] SHEKELS L L, HO S B. Characterization of the mouse *Muc3* membrane bound intestinal mucin 5' coding and promoter regions: regulation by inflammatory cytokines [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1627 (2-3): 90-100.
- [9] 谢芸芸, 黎海芪. 消化道黏蛋白基因研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2012, 39 (1): 11-15.
- [10] 刘景圣, 蔡丹, 孙涛. 嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30 (4): 605-609.
- [11] CHRISTOPH THIEMERMANN. Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* structural and functional analysis [J]. Microbes and Infection, 2002, 4 (9): 927-935.
- [12] 朱丽, 韩德权, 张家玲, 等. 植物乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离及鉴定 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2011, 28 (1): 113-116.
- [13] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 28 (7): 167-168.
- [14] 杨媛, 潘道东, 曾小群, 等. 嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的提取及结构分析 [J]. 中国食品学报, 2014, 14 (5): 202-208.
- [15] 邓丽莉, 潘晓倩, 生吉萍, 等. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量

- 可溶性蛋白含量的条件优化[J]. 食品科学, 2012(24): 185-189.
- [16] JACQUES M, COSTERTON J W. Adhesion of group B-streptococcus to a polyethylene intrauterine contraceptive device [J]. FEMS Microbiology Letters, 1987,41(1):23-28.
- [17] MATSUI K, WIROTESANGTHONG M. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces IL-4 production from murine spleen cells via an IL-18 dependent mechanism [J]. Allergy Immunol, 2008, 146(3):262-266.
- [18] MURPHEY E D, SHERWOOD E R. Pretreatment with the Gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Critical Care Medicine, 2008,36(11):3067-3073.

(责任编辑:孙 宁)