

李鹏成, 杨倩, 侯继波. 乳酸杆菌 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的协同作用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 384-388.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.023

## 乳酸杆菌 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的协同作用

李鹏成<sup>1</sup>, 杨倩<sup>2</sup>, 侯继波<sup>1</sup>

(1.江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 设计 3 种黏附试验分别研究了嗜酸乳酸杆菌和 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的影响。结果显示:在置换试验中,嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞没有影响;但在排斥试验和竞争试验中,嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白均对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞产生明显的协同作用,在排斥试验中嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白分别增加产肠毒素大肠杆菌的黏附数量  $95.23\% \pm 4.22\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $352.30\% \pm 2.26\%$  ( $P < 0.01$ ),在竞争试验中分别增加  $389.06\% \pm 3.35\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $55.57\% \pm 5.81\%$  ( $P < 0.05$ );并且 S-层蛋白在排斥试验中,对产肠毒素大肠杆菌的协同黏附作用大于竞争试验中的协同黏附作用。可见,乳酸杆菌对产肠毒素大肠杆菌的协同黏附作用关键在于 S-层蛋白,S-层蛋白可能起到“连接桥”的作用。

**关键词:** 嗜酸乳酸杆菌; S-层蛋白; 产肠毒素大肠杆菌; Caco-2 细胞; 协同作用

中图分类号: S852.61<sup>+</sup>5 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)02-0384-05

## Influence of S-layer proteins from *Lactobacillus* on enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesion to Caco-2 cells

LI Peng-cheng<sup>1</sup>, YANG Qian<sup>2</sup>, HOU Ji-bo<sup>1</sup>

(1.National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;  
2.College of Veterinary, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Three adhesive experiments were designed to investigate the effects of *Lactobacillus acidophilus* and its S-layer proteins on the adhesion of enterotoxigenic *E. coli* to Caco-2 cells. The results showed that S-layer proteins exhibited strongly synergistic effect of adhesive properties of enterotoxigenic *E. coli* in the exclusive and competitive experiments but not in the displacement experiment. In the exclusive experiments, *Lactobacillus acidophilus* and its S-layer proteins increased the number of enterotoxigenic *E. coli* adhered to Caco-2 cells by  $95.23\% \pm 4.22\%$  ( $P < 0.01$ ) and  $352.30\% \pm 2.26\%$  ( $P < 0.01$ ). In the competitive experiments, *Lactobacillus acidophilus* and its S-layer proteins increased the number of enterotoxigenic *E. coli* adhered to Caco-2 cells by  $389.06\% \pm 3.35\%$  ( $P < 0.01$ ) and  $55.57\% \pm 5.81\%$  ( $P < 0.05$ ). Furthermore,

the S-layer proteins showed a stronger effect in the exclusive experiment than that in the competitive experiment to increase enterotoxigenic *E. coli* adhesion to Caco-2 monolayers. The data indicate that S-layer proteins play a critical role on the synergistic effect of *Lactobacillus acidophilus* on the adherence ability of enterotoxigenic *E. coli*, which may be relative to the S-layer proteins-induced bridge.

收稿日期: 2016-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31502105)

作者简介: 李鹏成 (1981-), 男, 山西文水人, 博士, 助理研究员, 从事兽用生物制品工程技术研究。(E-mail) lipengcheng305@163.com

通讯作者: 杨倩, (E-mail) zxbyq@njau.edu.cn; 侯继波, (E-mail) houjibo@jaas.ac.cn

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus*; S-layer protein; enterotoxigenic *E.coli*; Caco-2 cells; synergistic effect

人和动物肠道微生物区系是一个庞大复杂的微生态系统,其中以细菌为主导。黏附是微生物与宿主相互作用的先决条件之一,是定殖的第一步,是其发挥生物学功能的基础。机体肠道正常细菌黏附于肠道黏膜上皮细胞后,可进一步定殖并形成稳定的菌群,例如乳酸杆菌。黏附同样也是病原菌定殖宿主上皮细胞的重要阶段,是激发肠道感染的前提条件<sup>[1]</sup>,例如产肠毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic E.coli*, ETEC),它通过消化道进入小肠后首先黏附和定殖于小肠上皮表面,然后产生毒素而引发宿主的一系列病变,如腹泻、菌血症等。

乳酸杆菌对诸多病原菌均有拮抗作用,如沙门氏菌、链球菌和志贺氏菌<sup>[2-4]</sup>等。近年来研究发现,乳酸杆菌 S-层蛋白(S-layer protein)发挥重要的拮抗作用,提取纯化的 S-层蛋白本身就可显著拮抗多种病原菌对宿主细胞的黏附及入侵<sup>[5]</sup>。

本试验选用 Caco-2 细胞<sup>[6]</sup>(一种肠上皮细胞系)作为体外研究模型,设计排斥、竞争和置换 3 种黏附试验,分别研究嗜酸乳酸杆菌 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的影响,以期初步探讨乳酸杆菌及其 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附宿主细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

产肠毒素大肠杆菌 K88(*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)由本实验室(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室)保存,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,嗜酸乳杆菌 S-层蛋白及其抗血清均由本实验室提取制备<sup>[7]</sup>,Caco-2 细胞株(Human colon carcinoma cell)购自美国 ATCC 公司,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,DAB、BSA、青霉素、硫酸链霉素均购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 细菌培养

将 ETEC 接种于 LB 培养基,37℃ 振荡培养 10 h,4 000 r/min 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

基,37℃ 静置培养 24 h,4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 DMEM 培养液重悬细菌备用。用麦康凯琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司产品)用于 ETEC 的选择性培养。

### 1.3 细胞培养

Caco-2 细胞于含有 10% 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% CO<sub>2</sub>)。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。

### 1.4 嗜酸乳酸杆菌 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附剂量筛选

Caco-2 细胞生长单层后,无菌 PBS 冲洗 3 次,加入 ETEC(每孔 5×10<sup>7</sup> CFU)和不同浓度的 S-层蛋白,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 下反应 2 h,PBS 漂洗未黏附的细菌,无菌蒸馏水裂解细胞,涂板计数。对照组的 Caco-2 细胞中仅加入 ETEC,不加 S-层蛋白。每个处理设 3 个重复孔,此试验在不同代次细胞间重复 3 次。

### 1.5 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附影响试验

1.5.1 排斥试验 Caco-2 细胞长成单层后,分别加入嗜酸乳酸杆菌(每孔 2×10<sup>8</sup> CFU)和 S-层蛋白(终浓度 10 μg/ml),37℃ 培养 1 h,PBS 冲洗 3 次,再加入 ETEC(每孔 5×10<sup>7</sup> CFU),5% CO<sub>2</sub>、37℃ 反应 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。对照中仅加入 ETEC,并在不同代次细胞间重复 3 次。

1.5.2 竞争试验 将嗜酸乳酸杆菌(每孔 2×10<sup>8</sup> CFU)和 S-层蛋白(终浓度 10 μg/ml)分别与 ETEC(每孔 5×10<sup>7</sup> CFU)同时加入单层 Caco-2 细胞培养板中,5% CO<sub>2</sub>、37℃ 反应 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。对照中仅加入 ETEC,并在不同代次细胞间重复 3 次。

1.5.3 置换试验 先将 ETEC(每孔 5×10<sup>7</sup> CFU)加入单层 Caco-2 细胞培养板中,5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养 1 h,PBS 冲洗 3 次,再分别加入嗜酸乳酸杆菌(每孔 2×10<sup>8</sup> CFU)和 S-层蛋白(终浓度 10 μg/ml),继续培养 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。对照中仅加入 ETEC,并在不同代次细胞间重复 3 次。

**1.5.4 阻断试验** 将嗜酸乳酸杆菌(每孔  $2 \times 10^8$  CFU)、ETEC(每孔  $5 \times 10^7$  CFU)、S-层蛋白抗血清(1:100)同时加入单层 Caco-2 细胞培养板中,5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养 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。对照中仅加入 ETEC,并在不同代次细胞间重复 3 次。另以正常兔血清作为对照。

## 1.6 Dot-blot 检测 S-层蛋白与产肠毒素大肠杆菌、Caco-2 细胞的相互作用

ETEC 培养至对数生长期,分别取 1.0 ml 和 0.5 ml 备用,将提纯的 S-层蛋白加入上述 1.0 ml 菌液中(终浓度为 0.1 mg/ml),以 0.5 ml 菌液不加 S-层蛋白作为对照,它们同时置 37 °C 中培养 1 h,13 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集菌体,PBS(pH 7.2)洗涤 3 次,收集的菌体 1.0 ml 管中加 12  $\mu\text{l}$  PBS 重悬,0.5 ml 管中加 6  $\mu\text{l}$  PBS 重悬。1 ml 管重悬液点在预先备好的 PVDF 膜上,制备 2 个点,标记为 1、2;0.5 ml 管重悬液制备 1 个点,标记为 0(以上制备的每个点均取 6  $\mu\text{l}$  重悬液)。待膜 37 °C 烘干后,用 3% 脱脂乳 37 °C 封闭 1 h,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min,0、1 点分别加 S-层蛋白抗血清(1:1 000),2 点加正常兔血清(1:1 000),37 °C 反应 1 h,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min,加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:3 000),37 °C 反应 1.5 h,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min,TBS 洗 1 次,5 min,DAB 显色,拍照,观察。

乳酸杆菌 S-层蛋白与 Caco-2 细胞相互作用检测:单层 Caco-2 细胞用胰酶消化后,2 000 g 离心收

集细胞。以下步骤同上述方法。

## 1.7 数据处理及分析

黏附力的计算公式为:黏附力=细胞单层黏附细菌数/加入孔内的细菌数 $\times 100\%$ 。相对黏附力( $\%$ )=(各处理细菌孔黏附力/对照孔黏附力) $\times 100\%$ 。

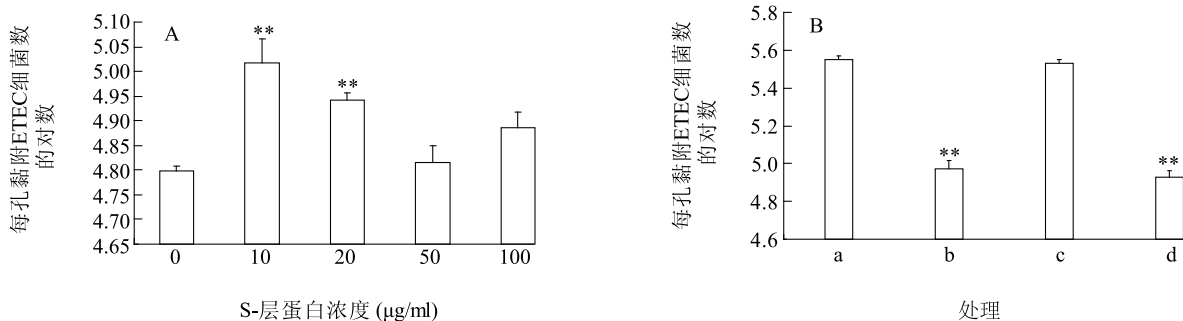
数据采用 SPSS(16.0)软件进行统计,差异显著性检验采用独立样本  $t$  检验和单因素方差分析(One way ANOVA,LSD)。

## 2 结果

### 2.1 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的影响

S-层蛋白剂量试验结果显示,在低浓度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  2 种剂量下,S-层蛋白能够显著协同产肠毒素大肠杆菌对 Caco-2 细胞的黏附,相对黏附力分别为  $165.23\% \pm 8.71\%$  和  $139.04\% \pm 2.55\%$ ,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ),而高浓度 S-层蛋白则对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞基本没有影响(图 1)。

在阻断试验中,嗜酸乳酸杆菌+产肠毒素大肠杆菌处理与嗜酸乳酸杆菌+产肠毒素大肠杆菌+S-层蛋白抗血清处理的相对黏附力分别为  $461.87\% \pm 3.12\%$  和  $109.65\% \pm 7.55\%$ ,二者差异极显著( $P < 0.01$ )(图 1)。嗜酸乳酸杆菌+产肠毒素大肠杆菌+S-层蛋白抗血清处理与单独加入产肠毒素大肠杆菌对照相比无明显差异。说明 S-层蛋白抗血清显著阻断嗜酸乳酸杆菌对产肠毒素大肠杆菌的协同黏附。

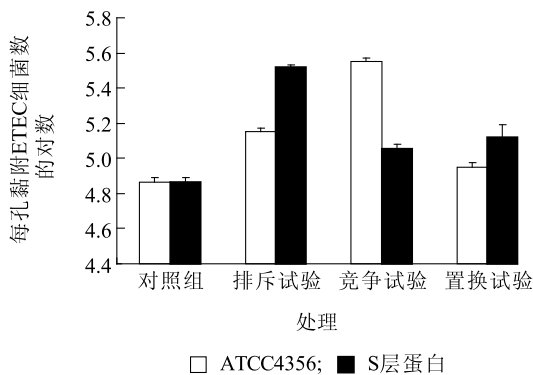


a: ETEC+ATCC4356; b: ETEC+ATCC4356+S 层抗血清; c: ETEC+ATCC4356+正常血清; d: ETEC。A: S-层蛋白剂量筛选试验, \*\* 与对照(0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )相比差异极显著( $P < 0.01$ ); B: 阻断试验, \*\* 与 ETEC+ATCC4356 处理相比差异极显著( $P < 0.01$ )。ETEC: 产肠毒素大肠杆菌; ATCC4356: 嗜酸乳酸杆菌。

图 1 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的剂量筛选与阻断试验结果

Fig.1 The results of dose screening and blocking experiments of S-layer proteins on ETEC adhesion on Caco-2 cells

在置换试验中,嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞基本没有影响;而在排斥试验和竞争试验中发现,与对照组相比,嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白均对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞产生明显的协同作用(图 2)。在排斥试验中嗜酸乳酸杆菌及 S-层蛋白分别增加产肠毒素大肠杆菌的黏附数量  $95.23\% \pm 4.22\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $352.30\% \pm 2.26\%$  ( $P < 0.01$ ),在竞争试验中分别增加  $389.06\% \pm 3.35\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $55.57\% \pm 5.81\%$  ( $P < 0.05$ )。其中嗜酸乳酸杆菌对产肠毒素大肠杆菌的协同效应在竞争试验中高于排斥试验,而 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌的协同效应则是排斥试验中高于协同试验。另外,在排斥试验中 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌的协同效应显著高于嗜酸乳酸杆菌 ( $P < 0.01$ ),在竞争试验中 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌的协同效应显著低于嗜酸乳酸杆菌 ( $P < 0.01$ )。



ETEC:产肠毒素大肠杆菌;ATCC4356:嗜酸乳酸杆菌。

图2 嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌黏附 Caco-2 细胞的影响

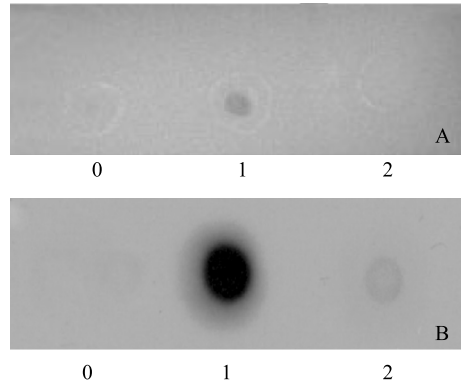
Fig.2 The effects of *Lactobacillus acidophilus* and S-layer protein on ETEC adhesion on Caco-2 cells

## 2.2 S-层蛋白与产肠毒素大肠杆菌和 Caco-2 细胞的结合特性

Dot-blot 试验结果显示:嗜酸乳酸杆菌的 S-层蛋白与产肠毒素大肠杆菌或 Caco-2 细胞共孵育后,可以被 S-层蛋白抗血清检测到(图 3),说明 S-层蛋白可以与产肠毒素大肠杆菌和 Caco-2 细胞相结合。

## 3 讨论

近年来乳酸杆菌对病原菌的拮抗作用已成为研



A: 产肠毒素大肠杆菌与 S-层蛋白结合试验;B: Caco-2 细胞与 S-层蛋白结合试验。0: 未添加 S-层蛋白+S-层蛋白抗血清试验组;1: 添加 S-层蛋白+S-层蛋白抗血清试验组;2: 添加 S-层蛋白+正常兔血清试验组。

图3 S-层蛋白与产肠毒素大肠杆菌和 Caco-2 结合特性的 Dot-blot 检测

Fig.3 Dot-blot assay to confirm the binding between S-layer protein and ETEC and Caco-2 cell

究的热点,但作用机制还不是很清楚。诸多研究者认为,乳酸杆菌与病原菌竞争性黏附是拮抗机制的重要组成部分<sup>[8]</sup>,其中 S-层蛋白发挥关键作用<sup>[5]</sup>。从乳酸杆菌 (*L. helveticus*, *L. crispatus* 和 *L. kefir*) 中分离的 S-层蛋白对肠出血性大肠杆菌<sup>[9]</sup>、肠炎沙门氏菌<sup>[10]</sup>等均具有拮抗作用。本实验室研究证实<sup>[7]</sup>,嗜酸乳酸杆菌及其 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌均存在显著拮抗作用。S-层蛋白在竞争试验中拮抗鼠伤寒沙门氏菌的黏附及入侵效果最好,说明 S-层蛋白可能与鼠伤寒沙门氏菌在黏附宿主细胞受体时存在竞争作用。

本研究首次发现嗜酸乳酸杆菌对产肠毒素大肠杆菌具有协同黏附作用,其 S-层蛋白可能发挥至关重要作用。我们推断这可能与产肠毒素大肠杆菌本身特性有关。产肠毒素大肠杆菌对宿主细胞的黏附主要由 K88 受体介导<sup>[11]</sup>。但是热不稳定性毒素 (Heat-labile toxin LT) 对该细菌的黏附同样起重要作用<sup>[12-13]</sup>,细菌可以全毒素的形式介导与宿主细胞 LT 受体的结合。LT 可以同时与宿主上皮细胞受体和细菌 LPS 相结合,有人称之为“LT 介导桥”(LT-induced bridge),也充分说明了 LT 介导黏附的功能<sup>[14-15]</sup>。本研究中,当 S-层蛋白提前加入单层 Caco-2 细胞培养板后再感染细菌(排斥试验),其细菌的黏附数量极显著高于 S-层蛋白与细菌共孵育时



的细菌黏附数量(竞争试验)。说明 S-层蛋白和细菌都能与宿主细胞结合,因此 S-层蛋白很可能起类似“LT 介导桥”的作用,介导协同黏附,但具体作用机制有待深入研究。

乳酸杆菌是人类和动物小肠道中的优势菌群,对拮抗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。大量研究结果表明乳酸杆菌对病原菌具有拮抗作用,但是本研究却发现乳酸杆菌及其 S-层蛋白对产肠毒素大肠杆菌具有协同黏附作用。其他病原菌是否也存在该现象,还有待进一步证实。本研究结果让我们重新认识了乳酸杆菌对病原菌黏附宿主细胞的影响。

### 参考文献:

- [1] BHAVSAR A P, GUTTMAN J A, FINLAY B B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 827-834.
- [2] MOORTHY G, MURALI M R, DEVARAJ S N. Protective role of lactobacilli in *Shigella dysenteriae* 1-induced diarrhea in rats[J]. *Nutrition*, 2007, 23(5): 424-433.
- [3] OTERO M C, NADER-MACIAS M E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle[J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 96(1/2): 35-46.
- [4] VORAVUTHIKUNCHAI S P, BILASOI S, SUPAMALA O. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli[J]. *Anaerobe*, 2006, 12(5/6): 221-226.
- [5] HYNONEN U, PALVA A. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(12): 5225-5243.
- [6] CHANTRET I, BARBAT A, DUSSAULX E, et al. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells; a survey of twenty cell lines[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(7): 1936-1942.
- [7] 李鹏成,叶小兰,王志胜,等. 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[J]. *微生物学报*, 2010, 50(9): 1226-1231.
- [8] SERVIN A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28(4): 405-440.
- [9] JOHNSON-HENRY K C, HAGEN K E, GORDONPOUR M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(2): 356-367.
- [10] GOLOWCZYK M A, MOBILI P, GARROTE G L, et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis[J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 118(3): 264-273.
- [11] GONZALEZ-ORTIZ G, HERMES R G, JIMENEZ-DIAZ R, et al. Screening of extracts from natural feed ingredients for their ability to reduce enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 adhesion to porcine intestinal epithelial cell-line IPEC-J2[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 167(3/4): 494-499.
- [12] JOHNSON A M, KAUSHIK R S, FRANCIS D H, et al. Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells[J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(1): 178-186.
- [13] WIJEMANNE P, MOXLEY R A. Glucose significantly enhances enterotoxigenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells through its effects on heat-labile enterotoxin production[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113230.
- [14] FLECKENSTEIN J M, MUNSON G M, RASKO D A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Orchestrated host engagement[J]. *Gut Microbes*, 2013, 4(5): 392-396.
- [15] HORSTMAN A L, KUEHN M J. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 32538-32545.

(责任编辑:张震林)