



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20190057

数字出版日期: 2020-01-14; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20200114.1413.002.html>

## 新生儿粪便中分离的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) RZ18 提高肠道黏膜屏障完整性

李艳茹, 张腾勋, 郭聪聪, 张同存, 齐威, 王楠

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 本实验旨在研究新生儿粪便样品中乳酸菌对肠道黏膜屏障完整性的促进作用. 从健康新生儿粪便中分离出 15 株乳酸菌. 对这些乳酸菌进行耐酸、耐胆盐和细胞黏附能力的实验, 分析其定植能力. 再通过荧光素酶报告基因分析实验、实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)、酶联免疫吸附测定检测各菌发酵上清液对 HT-29 细胞中黏蛋白 2 (mucin2, MUC2) 表达的影响, 结果显示粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) RZ18 发酵上清液对 MUC2 启动子活性、转录和翻译水平均有增强作用. 并通过 Real-time PCR、免疫印迹实验检测 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液对肠道黏膜屏障中闭锁蛋白、封闭蛋白 1、闭锁小带蛋白 1 表达的影响, 发现该菌可以促进这些紧密连接蛋白的表达. 最后用牛津杯法研究发现该菌对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和大肠杆菌等多种致病菌生长具有抑制作用. 上述结果说明, 新生儿肠道早期定植的 *E. faecalis* 可能对新生儿肠道黏膜屏障完整性的发育具有促进作用, 有望应用于炎症性肠病的预防与治疗.

**关键词:** 新生儿; 粪便; 乳酸菌; 黏膜屏障; 紧密连接

中图分类号: Q939.99

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2020)03-0001-08

## Promoting Intestinal Mucosal Barrier Integrity with *Enterococcus faecalis* RZ18 Isolated from Neonatal Feces

LI Yanru, ZHANG Tengxun, GUO Congcong, ZHANG Tongcun, QI Wei, WANG Nan

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** This study was to investigate the effect of lactic acid bacteria on intestinal mucosal barrier integrity in neonatal feces. Fifteen strains of lactic acid bacteria were isolated from healthy neonatal feces. The intestinal colonization ability of the lactic acid bacteria such as their resistance to acid or bile salts and their adhesive ability to intestinal cells were evaluated. The effect of fermentation broth supernatant on the level of mucin 2 in HT-29 cells were tested with the luciferase report gene analysis experiment, Real-time PCR and enzyme linked immunosorbent assay. The results showed that the fermentation supernatant of *Enterococcus faecalis* RZ18 increased the promoter activity of MUC2 gene and upregulated the transcription and translation level of MUC2. The fermentation broth supernatant of RZ18 also enhanced the expression of tight junction proteins including occludin, claudin1 and zonula occluden-1, confirmed by Real-time PCR and Western blot test. The Oxford cup method showed that RZ18 can inhibit the growth of a variety of pathogenic bacteria, including *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The results of the research indicate that *Enterococcus faecalis* colonized in the early stage of neonatal intestinal tract could promote the development of neonatal intestinal mucosal barrier, which can be expected to be applied to the prevention and treatment of inflammatory bowel disease.

**Key words:** neonatal; stool; lactic acid bacteria; mucosal barrier; close connection

收稿日期: 2019-02-19; 修回日期: 2019-05-24

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFD0400304); 天津市高等学校创新团队培养计划资助项目(TD13-5015)

作者简介: 李艳茹(1991—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生; 通信作者: 王楠, 教授, wn929@tust.edu.cn

联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization, FAO) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 对益生菌定义为一种活的微生物, 在给予足够剂量时对宿主的健康起有益作用<sup>[1]</sup>. 益生菌仍然以乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 为主. 乳酸菌是指能发酵糖, 主要产生乳酸的一类细菌的总称. 益生菌作为对机体有益的微生物, 在预防和治疗多种肠道疾病方面广泛应用<sup>[2]</sup>, 包括腹泻、肠易激综合征、新生儿坏死性小肠结肠炎、麸质不耐症、胃肠炎和复发的慢性肠炎等<sup>[3-5]</sup>. 随着越来越多的证据表明益生菌对机体具有有益作用, 益生菌菌株已经广泛应用于各种食品中, 如酸奶、泡菜、米酒及婴幼儿益生菌产品.

婴幼儿时期是机体各项功能形成和完善的时期, 也是肠道微生态形成的重要阶段. 来自无菌动物的研究表明, 体内定植的微生物对动物早期肠道形态发育、肠上皮细胞增殖、免疫系统分化等肠道发育过程有重要影响<sup>[6-7]</sup>. 通过微生物干预, 尤其是益生菌干预, 有效地增强肠道的消化吸收能力, 促进黏膜屏障、免疫快速成熟, 进而提高机体防疫能力, 对于婴幼儿的健康发育具有重要意义. 因此, 本研究旨在从新生儿粪便中分离筛选安全、有效的益生菌, 为开发对肠道炎症疾病具有预防和治疗作用的新菌株提供实验依据.

肠黏液层是抵御肠内致病菌及有害物质入侵的第一道屏障, 黏蛋白 2 (mucin2, MUC2) 是构成肠黏液层的最重要蛋白质, 其数量及结构的改变与肠黏膜屏障损伤发生发展密切相关. 肠上皮细胞紧密连接 (tight junction, TJ) 是肠黏膜屏障的重要组成部分, 一旦 TJ 受损, 肠上皮细胞间的通透性增加, 细菌内毒素和大分子物质就可通过紧密连接进入体循环, 与多种疾病的发生发展有关. 闭锁蛋白 (occludin, OCLN)、封闭蛋白 1 (claudin1, CLDN1)、闭锁小带蛋白 1 (zonula occluden-1, ZO-1) 是紧密连接中重要的 3 个蛋白<sup>[8]</sup>. 因此研究从健康婴儿粪便中分离的 LAB 对此 4 种蛋白表达的影响, 可反映该菌对促进肠道黏膜屏障完整性的作用及作用机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品、细胞和菌株

出生一个月内婴儿的粪便样品由自天津蓝海兰母婴家政服务有限公司开发区分公司提供. SW620

细胞, 徐州医科大学惠赠. HT-29 细胞, 天津科技大学滕玉鸥老师惠赠. COS-7 细胞, 购自美国菌种保藏中心 (ATCC). 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) ATCC49732、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) CMCC54002、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CMCC44102 为本实验室保藏菌种. pMUC2-luc-pGL3 质粒本实验室构建.

#### 1.1.2 试剂与仪器

MRS 肉汤, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 盐酸, 天津市江天化工技术有限公司; 牛胆盐, 广东环凯微生物科技有限公司. DMEM/F12 培养基、RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清 (FCS), 杭州四季青生物工程公司; M-MLV 逆转录酶、Trizol 试剂, 北京索莱宝科技有限公司; SYBR Green qPCR Mastermix, DBI Bioscience 公司; dNTPs, 北京康为世纪生物科技有限公司; Luciferase Assay System (E1501), Promega 公司; claudin1 (YT0942) 一抗、occludin (YN2865) 一抗、zo-1 (YN1410) 一抗、MUC2 ELISA 检测试剂盒, ImmunoWay 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗, Santa Cruz 公司; IRDye-800 标记山羊抗小鼠二抗、IRDye-800 标记山羊抗兔二抗, 美国 Li-COR 公司; TurboFect 转染试剂, Thermo 公司.

多功能酶标仪, 美国 Thermo 有限公司; 转膜仪, Bio-Rad 公司; Odyssey 双色红外荧光成像系统, 美国 LI-COR 公司; stepone plus 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司. DG 250 厌氧培养箱, 英国 Don Whitley Scientific (DWS) 公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器上海公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂.

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的分离、筛选

使用平板划线法对菌落进行纯化. 将粪便样品梯度稀释到  $10^{-6}$  涂布到添加碳酸钙的固体 MRS 培养基表面, 37 °C 培养 48 h, 挑选产生溶钙圈的菌落反复在 MRS 培养基上划线, 仔细鉴别不同菌落的形态特点并进行革兰氏染色. 同时, 将菌株用甘油管于 -80 °C 冻存. 提取基因组, 对其进行 PCR 扩增, 将扩增产物送往金唯智生物科技有限公司测序, 然后采用 BLAST 对结果进行 16S rDNA 比对.

耐酸能力测定: 菌株于 MRS 液体培养基中 37 °C 厌氧培养箱培养, 经过 3 次活化, 每次培养 12 h, 对活化后得到的菌液离心收集菌体分别重悬于 pH 为 2.0、3.0、4.0 的液体 MRS 培养基中<sup>[9]</sup>, 调整菌

体密度为  $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . 取  $100 \mu\text{L}$  菌液于 96 孔板中, 每个样液做 3 个复孔, 同时以常规 pH MRS 培养基组作为阴性对照. 置于  $37^\circ\text{C}$  厌氧培养箱中培养 4 h. 利用 MTT 法, 在  $490 \text{ nm}$  处测定吸光度 ( $A$ ), 按照式 (1) 计算存活率<sup>[10-11]</sup>.

$$\text{存活率} = \frac{A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (1)$$

耐胆盐能力测定: 菌株于 MRS 液体培养基中  $37^\circ\text{C}$  厌氧培养箱培养, 经过 3 次活化, 每次培养 12 h, 对活化后得到的菌液离心收集菌体重悬于含  $0.1\% \sim 0.3\%$  胆盐的液体 MRS 培养基中<sup>[12]</sup>, 调整菌体密度为  $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . 置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养 4 h. 按照 1.2.2 节的方法测定存活率<sup>[13]</sup>.

### 1.2.2 菌株活化、样品制备及细胞培养

将保存在  $-80^\circ\text{C}$  菌种常温下解冻, 于 2% 接种于 MRS 液体培养基中, 经过 2 次活化, 每次培养 12 h, 最终接菌于  $100 \text{ mL}$  培养基中, 同时以  $100 \text{ mL}$  空白培养基为对照组, 12 h 后离心, 取上清液,  $50^\circ\text{C}$  旋蒸 1.5 h 左右, 倒入玻璃培养皿中, 放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱 24 h, 于冻干机中冻干处理. 冻干样品重悬于细胞培养基中.

HT-29、COS-7 细胞用含 10% FCS 的 F12 培养基 (含  $1 \times 10^5 \text{ U/L}$  青霉素和  $100 \text{ mg/L}$  链霉素), SW620 用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基 (含  $1 \times 10^5 \text{ U/L}$  青霉素和  $100 \text{ mg/L}$  链霉素), 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养, 24 h 后换液, 以后每 2、3 d 更换 1 次培养液. 细胞长满后, 用  $2.5 \text{ g/L}$  胰酶消化后传代.

### 1.2.3 结肠细胞黏附能力测定

SW620 细胞以  $10^4 \text{ mL}^{-1}$  的密度均匀铺种在 96 孔板中培养 2 d, 将已长至单层的人结肠癌细胞 SW620 用灭菌的 PBS (pH 7.4) 漂洗 2 次, 将  $100 \mu\text{L}$  乳酸菌 ( $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) 加入 96 孔细胞板中,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 1 h 后, 用灭菌的 PBS 漂洗 3 次, 以洗去未黏附的菌. 应用 MTT 法分别测定 PBS 漂洗后的益生菌 ( $A_{\text{黏附菌}}$ )、未漂洗的益生菌 ( $A_{\text{总菌}}$ ) 及未加菌空白对照 ( $A_{\text{对照}}$ ) 孔的吸光度, 按照式 (2) 计算黏附率.

$$\text{黏附率} = \frac{A_{\text{黏附菌}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{总菌}} - A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.4 酶联免疫吸附 (ELISA) 实验

HT-29 细胞以  $10^4 \text{ mL}^{-1}$  的密度均匀铺种在 6 孔板中培养 2 d, 经加入  $5 \text{ mg/mL}$  冻干的发酵液的上清

液处理 24 h 后, 收集细胞培养基上清液, 采用酶联免疫吸附法检测细胞培养基上清液中 MUC2 水平, 试剂盒采用人 MUC2 ELISA 检测试剂盒. 检测方法按说明书进行.

### 1.2.5 荧光素酶活性检测

以  $10^4 \text{ mL}^{-1}$  密度均匀铺种 COS-7 细胞于 24 孔板中, 铺种 24 h 后用 TurboFect 转染试剂对 pMUC2-luc 质粒进行转染, 转染 6 h 后换液, 并将已处理的样品以  $5 \text{ mg/mL}$  的浓度加入已转染质粒的 24 孔板培养基中. 继续培养 24 h 后, 弃去上清液, 在 24 孔板每孔加入  $100 \mu\text{L}$  的裂解液, 裂解 30 min, 再用细胞刮刀刮下细胞, 将裂解的蛋白  $50 \mu\text{L}$  加入白色 96 孔板中, 同时加入荧光素酶化学发光底物  $100 \mu\text{L}$ , 迅速放入酶标仪中进行检测其荧光值.

### 1.2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

HT-29 细胞以  $10^4 \text{ mL}^{-1}$  的密度均匀铺种在 6 孔板中培养 2 d, 经加入  $5 \text{ mg/mL}$  样品处理 24 h 后, Trizol 法提取 HT-29 细胞中 RNA, 用 M-MLV 逆转录酶逆转录  $2 \mu\text{g}$  样品. Real-time PCR 法检测 MUC2、OCLN、CLDN1、ZO-1 基因的表达. PCR 体系:  $10 \mu\text{L}$  DDW,  $7.6 \mu\text{L}$  Mix,  $0.4 \mu\text{L}$  Rox,  $0.5 \mu\text{L}$  上游引物,  $0.5 \mu\text{L}$  下游引物,  $1 \mu\text{L}$  cDNA 模板. PCR 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 2 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $60^\circ\text{C}$  退火和延伸 30 s, 共 40 个循环,  $95^\circ\text{C}$  终止反应 15 s. 所用引物见表 1.

表 1 引物

Tab. 1 Primers

基因名称	引物序列	扩增长度/bp
MUC2	F: 5'-TGCCCTTGCGTCCATAAC-3' R: 5'-CAGTGTCCGTCAAAGTCGTAG-3'	188
OCLN	F: 5'-CCTATAAATCCACGCCGGTTC-3' R: 5'-TCAAAGTTACCACCGCTGCTG-3'	103
ZO-1	F: 5'-AACAGCCCTACCCATCTCG-3' R: 5'-CGTGGAAAGTACCCTCGTT-3'	103
CLDN1	F: 5'-CGATGCTTTCTGTGGCTAA-3' R: 5'-AGTGGCTGACTTTCCTTGT-3'	222
GAPDH	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' R: 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTAG-3'	110

### 1.2.7 免疫印迹 (Western blot)

HT-29 细胞以  $10^4 \text{ mL}^{-1}$  的密度均匀铺种在 6 孔板中培养 2 d, 经加入  $5 \text{ mg/mL}$  样品处理 24 h 后, 收集总蛋白. 蛋白进行电泳、转膜, 浸入封闭液中封闭 1 h. 分别加稀释后的 ZO-1 一抗 (1:1000)、CLDN1 一抗 (1:1000)、OCLN 一抗 (1:1000) 和 GAPDH 一抗 (1:3000),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 山羊抗兔 (1:

10 000)或山羊抗鼠(1 : 10 000)二抗室温下避光孵育 1.5 h, 将 NC 膜平铺于远红外成像仪中, 设置程序扫描, 保存数据.

1.2.8 抑菌能力检测

取 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> 的 *M. luteus*、*L. monocytogenes*、*S. aureus*、*E. coli* 菌悬液 50 μL 作为指示菌(菌体浓度为 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup>), 涂布于已凝固的琼脂平板上, 平衡 30 min. 无菌操作: 将 3 只无菌牛津杯(直径 8 cm)轻轻放在平板上, 杯内分别加入 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> 的 RZ18 菌悬液、MRS 培养基 30 μL. 平放 37 °C 孵箱培养 16 ~ 18 h, 观察抑菌圈的大小, 抑菌圈直径 > 8 mm, 则判断为敏感菌株, 表明有抑菌效果<sup>[14]</sup>.

1.3 统计学分析

实验数据结果以“平均值 ± 标准差”表示, 数据由 Graphpad Prism 5.0 进行统计分析, \*, \*\* 分别表示有统计学差异  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ .

2 结果与分析

2.1 LAB耐酸能力

对从新生儿粪便中分出的 15 株 LAB 的耐酸、耐胆盐及细胞黏附进行初步检测, 筛选出 5 株相对抗逆性较好的 LAB, 分别是粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) RZ18 和 RZ002、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) RZ003 和 RZ004、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) RZ005. 人体胃液 pH 通常为 2.0 左右, 随进食时间延长, 逐渐上升至 pH 5.0 左右, 胃排空时间一般为 3 ~ 4 h. 要成为食源性的益生菌, 应该具有一定的耐酸性. 对 5 株菌的耐酸能力进行检测, 结果如图 1 所示.

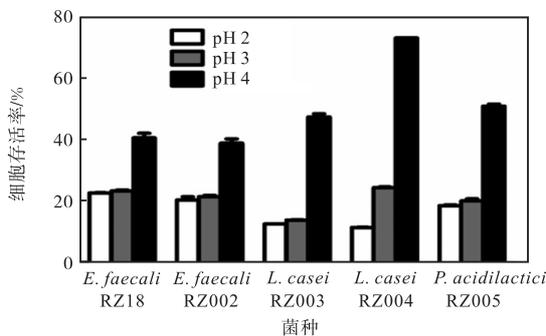


图 1 5 株乳酸菌耐酸能力分析  
Fig. 1 Acid resistance analysis of the five LAB strains

在 pH 2 时, *L. casei* RZ003 和 RZ004 存活率均较低, 分别为 (12.41 ± 0.13)% 和 (11.27 ± 0.12)%, 其他 3 种菌 *E. faecalis* RZ18、RZ002 以及 *P. acidilactici*

RZ005 存活率在 20% 左右. 在 pH 3 时, *L. casei* RZ003 存活率最低, 仅为 (13.69 ± 0.24)%, 其他 4 种菌 *E. faecalis* RZ18、RZ002 和 *L. casei* RZ004、*P. acidilactici* RZ005 存活率在 20% 左右. 在 pH 4 时, *L. casei* RZ004 存活率最高, 可达 (72.64 ± 0.11)%, 其他 4 种菌 *E. faecalis* RZ18、RZ002 和 *L. casei* RZ003、*P. acidilactici* RZ005 存活率均在 40% ~ 50%.

2.2 LAB耐胆盐能力

人体肠道内胆汁浓度是变化的, 胆盐含量总体在 0.03% ~ 0.3% 的范围内波动. 本研究中研究了 5 株 LAB 对 0.1%、0.2%、0.3% 胆盐的耐受能力进行分析. 结果如图 2 所示, 在含有 0.1% 胆盐培养基中培养 4 h 后, *E. faecalis* RZ18 和 RZ002、*P. acidilactici* RZ005 存活率在 100% 以上, 说明在 0.1% 的胆盐环境中并不会影响这 3 株菌的生长. 在含有 0.2% 胆盐培养基中培养 4 h 后, *P. acidilactici* RZ005 存活率最高, 可达 (57.2 ± 1.57)%, 其他 4 株菌均在 25% ~ 35%. 在含有 0.3% 胆盐培养基中培养 4 h 后, 各菌存活率相差不大, 均在 20% ~ 35%.

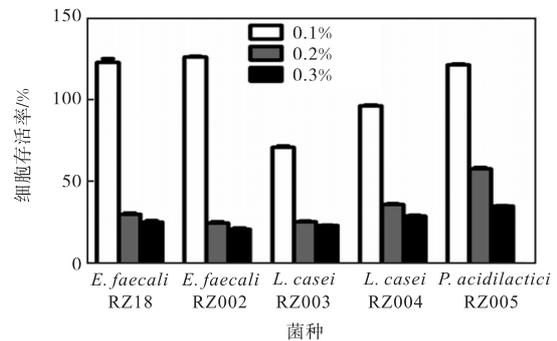


图 2 5 株乳酸菌耐胆盐能力分析  
Fig. 2 Analysis of bile salt tolerance of the 5 LAB strains

2.3 LAB黏附能力

LAB 在肠道的黏附定植部位主要发生在结肠, 因此本研究采用人结肠癌细胞 SW620 模拟肠道环境, 通过 MTT 法测定不同 LAB 对结肠细胞黏附能力的差异. 结果如图 3 所示, *E. faecalis* RZ18、RZ002 和 *P. acidilactici* RZ005 的黏附能力较强, 其中 *P. acidilactici* RZ005 最强为 (51.96 ± 9.06)%.

2.4 LAB 发酵上清液对 HT-29 细胞中 MUC2 蛋白表达的上调作用

黏蛋白 (MUC) 是由体内多种上皮细胞分泌的大分子糖蛋白, 包括 MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6-7、MUC1、MUC3-4、MUC13 和 MUC17 等多个亚型. MUC2 属于分泌型黏蛋白, 在肠道的表面形成黏液层发挥润滑和拮抗致病菌的肠道黏附和侵袭

的作用,是黏液屏障中重要蛋白之一. MUC2 表达量的上调表明其黏液屏障更加完善. 5 mg/mL 发酵上清液处理 HT-29 细胞 24 h 后,利用 ELISA 方法检测细胞培养基中 MUC2 的含量,结果如图 4 所示, *E. faecalis* RZ18 发酵上清液可使 MUC2 蛋白的表达量上调,与对照组相比,具有统计学意义(\* $P < 0.05$ ).

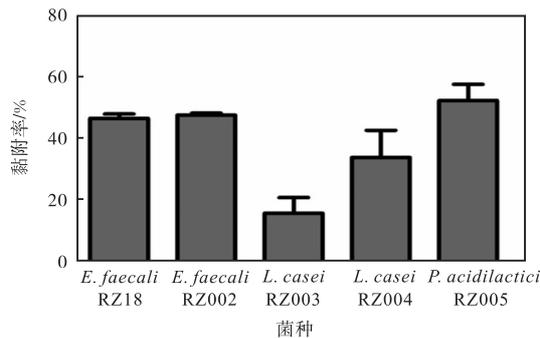


图 3 5株乳酸菌对人结肠癌细胞的黏附能力分析

Fig. 3 Adhesion analysis of the five LAB strains to human colon cancer cells

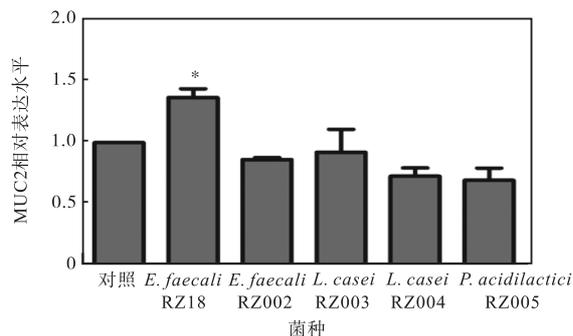


图 4 5株乳酸菌发酵上清液对 MUC2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of fermentation supernatant from the five LAB strains on MUC2 protein expression

## 2.5 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液增强 MUC2 启动子活性及转录水平

利用 *E. faecalis* RZ18 菌株发酵上清液处理 COS-7 细胞同时转染 pMUC2-luc 质粒,采用荧光素酶报告基因检测方法检测 MUC2 启动子活性,结果如图 5 所示, *E. faecalis* RZ18 发酵上清液可显著上调 MUC2 的启动子活性(\* $P < 0.05$ ).

用 *E. faecalis* RZ18 菌株发酵上清液处理 HT-29 细胞 24 h 后,Real-time PCR 方法检测 MUC2 的 mRNA 水平,结果(图 6)发现 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液能显著上调 MUC2 mRNA 的水平(\* $P < 0.05$ ). 这些结果进一步证实 *E. faecalis* RZ18 的发酵上清液可以促进 MUC2 的转录水平升高.

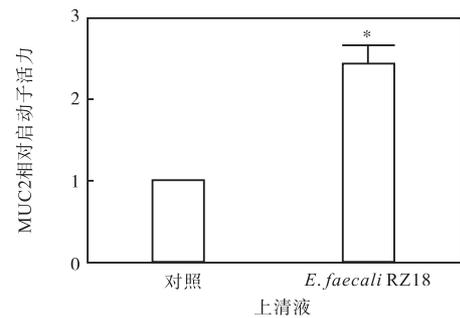


图 5 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液对 MUC2 启动子活性的影响

Fig. 5 Effect of *E. faecalis* RZ18 fermentation supernatant on the promoter activity of MUC2

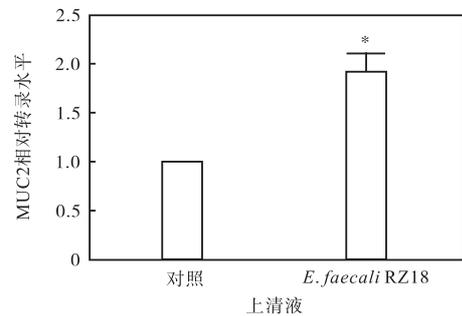


图 6 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液对 MUC2 mRNA 水平的影响

Fig. 6 Effect of *E. faecalis* RZ18 fermentation supernatant on the mRNA level of MUC2

## 2.6 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液上调 OCLN、CLDN1、ZO-1 蛋白的表达水平

肠黏膜通透性的变化与肠黏膜紧密连接蛋白的一系列改变有关,提高肠道 ZO-1 和 OCLN mRNA 及其蛋白水平的表达,可增强其肠道屏障功能<sup>[15]</sup>, CLDN1 表达水平下调可以作为评价肠道黏膜屏障功能是否发生障碍的重要指标<sup>[16]</sup>. 利用 RZ18 菌株发酵上清液处理 HT-29 细胞 24 h 后,利用 Real-time PCR 和 WB 方法检测 OCLN、CLDN1、ZO-1 的 mRNA 和蛋白水平,结果如图 7 和图 8 所示.

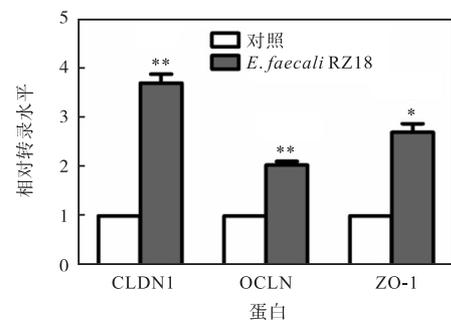


图 7 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液对 CLDN1、OCLN、ZO-1 mRNA 水平的影响

Fig. 7 Effect of *E. faecalis* RZ18 fermentation supernatant on the mRNA level of CLDN1, OCLN and ZO-1

结果表明, *E. faecalis* RZ18 发酵上清液可显著上调紧密连接蛋白 CLDN1、OCLN、ZO-1 的 mRNA 水平, 与对照组相比, 具有统计学意义 ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ )。同时, *E. faecalis* RZ18 发酵上清液可显著上调紧密连接蛋白 CLDN1 和 OCLN 的蛋白水平 ( $*P < 0.05$ ), 也可增加 ZO-1 的蛋白水平, 但与对照组相比差异不显著。

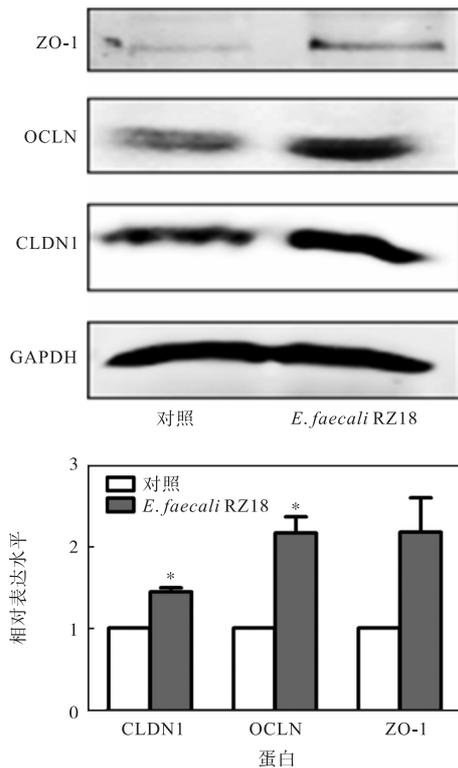


图8 *E. faecalis* RZ18 发酵上清液对 CLDN1、OCLN、ZO-1 蛋白水平的影响

Fig. 8 Effect of *E. faecalis* RZ18 fermentation supernatant on the protein level of CLDN1, OCLN and ZO-1

### 2.7 *E. faecalis* RZ18对*M. luteus*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*E. coli* 的抑制作用

利用牛津杯法检测 RZ18 对 *M. luteus*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*E. coli* 等 4 种致病菌的抑制作用, 结果表明: RZ18 对 *S. aureus*、*M. luteus*、*L. monocytogenes*、*E. coli* 有不同程度的抑制作用, 其中对 *M. luteus*、*E. coli* 抑制效果较差, 抑菌圈直径仅为  $(17 \pm 0.30)$  mm、 $(17 \pm 0.25)$  mm; 对 *L. monocytogenes* 抑菌圈直径为  $(18 \pm 0.23)$  mm; 对 *S. aureus* 抑制效果最明显, 抑菌圈直径达  $(21 \pm 0.16)$  mm. *M. luteus*、*S. aureus*、*L. monocytogenes* 是革兰氏阳性菌, *E. coli* 为革兰氏阴性菌, 因此, *E. faecalis* RZ18 对革兰氏阳性和阴性菌均有一定抑制作用。

## 3 讨论

益生菌可通过调节肠道菌群、增强机械屏障、调节肠黏膜免疫功能, 从而在生物屏障、机械屏障、免疫屏障 3 个层次增强肠黏膜屏障. 婴儿时期是肠道菌群建立的关键时期, 若此时肠道菌群构造合理、代谢平衡, 那么今后机体肠道屏障发育将更加完善, 进而为机体减少各种代谢类疾病风险<sup>[17-19]</sup>. 动物研究表明, 鼠李糖乳杆菌 GG 能够增强新生小鼠肠上皮细胞的增殖、迁移、分化、屏障功能的形成<sup>[20]</sup>. 李碧莹<sup>[21]</sup>发现通过对婴幼儿口服益生菌, 能有效调节胃肠道细菌的生长及繁殖, 改善胃肠菌群失衡状况, 同时能够维持肠细胞的完整性, 修复因感染轮状病毒所致肠黏膜损伤, 加速恢复胃肠黏膜屏障正常功能, 从而提高对婴幼儿轮状病毒性腹泻的临床疗效. 由于婴幼儿肠道屏障发育与体内定植益生菌关系密切, 因此本研究选用新生儿粪便作为菌种来源, 希望可以获得更安全、能在机体定植、具有促进肠道屏障发育和完整性的新型益生菌. 本研究从新生儿粪便中分离出一株具有促进肠道黏液 MUC2 表达的菌株 *E. faecalis* RZ18.

Claudin1 是紧密连接跨膜蛋白, 对维持肠上皮细胞屏障功能和紧密连接的完整性具有重要作用, 细胞旁 Claudin 蛋白作为细胞间紧密联接通道, 具有电通道的作用. 跨膜蛋白 Occludin 可增强成纤维细胞间的黏附性, 增加跨膜电阻<sup>[22]</sup>, 调节细胞间的通透性<sup>[23]</sup>. 研究<sup>[24]</sup>表明, 肠致病菌及其毒素通过下调 Occludin 蛋白表达的途径破坏 TJ 结构. ZO-1 是构成紧密连接的重要成分之一, 能与其同源体 ZO-2、ZO-3 一起为紧密连接的许多跨膜蛋白和细胞质紧密连接蛋白搭建具有连接作用的脚手架样平台. 多数情况下只要 ZO-1 受到破坏, 紧密连接的功能大多会随之发生变化, 而 ZO-1 蛋白增加, 提示其能增强上皮组织的紧密连接以及结构的完整性, 使肠道上皮细胞组织的选择性通透性增强, 因此 ZO-1 常被用来作为观察机体内各种组织的紧密连接屏障功能和通透性功能的指标. 本研究发现粪肠球菌 RZ18 能上调 Claudin1、Occludin、ZO-1 的水平, 说明婴幼儿体内早期定植的粪肠球菌可能对于肠道屏障的完整性具有一定的促进作用。

长期的科学研究表明, 人类肠道中广泛存在的乳酸菌在膳食应用上具备良好的安全性<sup>[25]</sup>. 临床研究

最多的乳酸菌是双歧杆菌和乳酸杆菌,粪肠球菌和某些非致病性芽胞杆菌及兼性厌氧地衣芽胞杆菌也有所涉及。粪肠球菌被认为是一种条件致病菌,在人的免疫力低下或大量使用抗生素时可导致尿路感染、心内膜炎、腹膜炎、伤口感染等疾病<sup>[26]</sup>,但在一般情况下对人体和动物是没有危害的,属于人和动物体内的常在菌,并能有效抑制有害菌,增殖有益菌,可作为益生菌制剂组方发挥药理作用。目前对于粪肠球菌作为益生菌在人和动物体内的作用和应用已有一些相关报道。Tinrat 等<sup>[27]</sup>分离出一株具有较好的抑菌效果的粪肠球菌 MTC1032,该菌株通过产酸和细菌素有效抑制了多种病原菌,具有抑菌性,并能够在酸性条件下生存。在安全性评价中,MTC1032 能够黏附于宿主上皮细胞,并能明显抑制病原细菌黏附。Zheng 等<sup>[28]</sup>研究采用含婴儿双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和蜡芽杆菌的益生菌组合,通过高通量测序监测血液指标和微生物多样性,减少胃切除术引起的生理障碍。他们认为益生菌联合用药通过改变肠道菌群,显著增强患者的免疫应答,减轻炎症的严重程度。薛胜平等<sup>[29]</sup>用酪酸菌、肠膜芽胞杆菌和粪肠球菌组方制备益生菌制剂,药理作用是调节肠道菌群,增殖有益菌如双歧杆菌、乳杆菌等,抑制有害菌,从而有整肠作用。甘利平等<sup>[30]</sup>在鸡的饲料中添加粪肠球菌虽对肉仔鸡的生长性能没有显著影响,但可改善肠道健康,尤其对早期鸡只肠道的健康生长起到促进作用。董正林<sup>[31]</sup>研究发现日粮中添加微囊化粪肠球菌显著提高了一定日龄肉鸡平均体质量,并显著增加肉鸡肝脏指数及肉鸡血清 IgA、IgM 含量,且显著增加肉鸡盲肠乳酸杆菌数量和降低肉鸡盲肠大肠杆菌数量。魏清甜<sup>[32]</sup>研究发现,添加 200 g/t 的粪肠球菌能够显著改善试验仔猪保育前期平均日增质量、料重比、腹泻率和保育后期的平均日采食量,能够增强体液免疫性能,明显提高保育仔猪对饲料中粗蛋白和粗脂肪的表观消化率,并对仔猪的肠道发育有一定的促进作用,可降低空肠中 *E. coli* 的数量,促进仔猪盲肠微生态的平衡。

本研究从新生儿粪便中分离出一株粪肠球菌 *E. faecalis* RZ18,其对多种致病菌有一定的抑制作用,并且对肠道黏膜屏障中重要的蛋白 MUC2、CLDN1、OCLN、ZO-1 表达有上调作用,有望应用于小儿或成人炎症性肠病的预防与治疗。同时,研究证实婴幼儿体内早期定植的粪肠球菌可能对婴儿肠道黏膜屏障完整性的发育有促进作用,这为开发相应益

生菌制剂及功能食品提供了参考依据。

#### 参考文献:

- [1] 吴蜀豫,冉陆. FAO/WHO 食品益生菌评价指南[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(4):377-379.
- [2] Zocco M A, Zileri D V L, Cremonini F, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2006,23(11):1567-1574.
- [3] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food[R]. Food and Agriculture Organization in the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002.
- [4] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, et al. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000,84(3):197-215.
- [5] Nagpal R, Kumar A, Kumar M, et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012,334(1):1-15.
- [6] Hollister E B, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health[J]. *Gastroenterology*, 2014,146(6):1449-1458.
- [7] Collado M C, Cernada M, B  ierl C, et al. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages[J]. *Gut Microbes*, 2012,3(4):352-365.
- [8] 王海燕,张文远. 益生菌对肠黏膜屏障紧密连接蛋白保护作用的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2012,32(5):284-286.
- [9] 陈欣,潘素华,胡黎黎,等. 人源乳酸杆菌耐酸耐胆盐能力的测定和鉴定[J]. *现代预防医学*, 2006,33(3):278-279.
- [10] Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, et al. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *International Journal of Tuberculosis & Lung Disease*, 2002,6(12):1118-1122.
- [11] 郝冉,罗学刚,贾玮,等. 六株乳杆菌胃肠道定植能力分析[J]. *中国生化药物杂志*, 2012,33(5):555-558.
- [12] 赵瑞香,孙俊良,李元瑞. 嗜酸乳杆菌抗酸抗胆汁盐能力的研究[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2004,32(2):57-60.
- [13] Gu X, Luo X, Wang C X, et al. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum*

- CGMCC No. 8198[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(5): 975–983.
- [14] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 210–219.
- [15] Zhang B, Guo Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets[J]. *British Journal of Nutrition*, 2009, 102(5): 687–693.
- [16] 夏天. 紧密连接蛋白 Claudin-1 在大肠杆菌性腹泻仔猪胃肠组织中的表达及意义[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [17] Marko K, Carmen C M, Seppo S, et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 87(3): 534–538.
- [18] Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health[J]. *Trends Microbiology*, 2013, 21(4): 167–173.
- [19] Aggarwal J, Swami G, Kumar M. Probiotics and their effects on metabolic diseases: An update[J]. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 2013, 7(1): 173–177.
- [20] Yan F, Liu L, Cao H, et al. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood[J]. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(1): 117–127.
- [21] 李碧莹. 益生菌对婴幼儿轮状病毒性腹泻肠道屏障功能及肠道菌群的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(12): 871–873.
- [22] VanItallie C M, Anderson J M. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts[J]. *Journal of Cell Science*, 1997, 110(9): 1113–1121.
- [23] Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 30(6): G1054–G1064.
- [24] Chen M L, Ge Z, Fox J G, et al. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6581–6589.
- [25] 孙雯娟, 张波, 李大魁, 等. 益生菌制剂的发展现状与临床应用进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 39(9): 850–857.
- [26] Franz C M A P, Holzapfel W H, Stiles M E. *Enterococci* at the crossroads of food safety[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 47(1/2): 1–24.
- [27] Tinrat S, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, et al. In vitro assessment of *Enterococcus faecalis* MTC 1032 as the potential probiotic in food supplements[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(7): 2384–2394.
- [28] Zheng C, Chen T, Wang Y, et al. A randomised trial of probiotics to reduce severity of physiological and microbial disorders induced by partial gastrectomy for patients with gastric cancer[J]. *Journal of Cancer*, 2019, 10(3): 568–576.
- [29] 薛胜平, 杜连祥, 路福平. 酪酸菌、肠膜芽胞杆菌、粪肠球菌三联菌益生特性研究[C]//杜连祥, 张克旭, 路福平. 工业微生物进展: 2005年中国工业微生物学术研讨会论文集. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 148–152.
- [30] 甘利平, 李追, 郭双双, 等. 饲喂复合脂肪酸酯及粪肠球菌对改善肉鸡早期肠道健康的影响[J]. *饲料研究*, 2016(23): 5–12.
- [31] 董正林. 微囊化粪肠球菌和油茶籽提取物对肉鸡生长性能、免疫性能与肠道黏膜屏障功能的影响[D]. 武汉: 武汉轻工业大学, 2016.
- [32] 魏清甜. 粪肠球菌替代饲用抗生素对保育仔猪生产、免疫、肠道发育及肠道微生物的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

责任编辑: 郎婧