

# 人胃源乳杆菌耐受性及抗幽门螺杆菌活性的鉴定

黄微微<sup>1</sup>, 郭刚<sup>2</sup>, 宋阳<sup>3</sup>, 曾本华<sup>4</sup>, 张卫军<sup>2</sup>, 解庆华<sup>2</sup>, 杨致邦<sup>1</sup>

**摘要:**目的 分离自人胃粘膜的乳杆菌抗幽门螺杆菌活性的筛选,为观察乳杆菌与幽门螺杆菌相互作用寻找合适的对象。**方法** 从21例胃镜检查者的胃粘膜组织中分离鉴定出6株乳杆菌,检测其在pH 2.5~pH 4.5和含0.05%~0.2%胆盐条件下的耐受性,并结合琼脂扩散牛津杯法检测其抑制幽门螺杆菌生长的能力及通过细胞试验检测其抗幽门螺杆菌粘附人胃上皮细胞的活性。**结果** 6株乳杆菌分离株中L3产酸量最大,耐酸和高浓度胆盐,其活菌和上清液在血平板中对幽门螺杆菌作用后形成的抑菌环直径均最大,对大肠杆菌的抑菌环大于金黄色葡萄球菌的,处理液相同的两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),同时能使幽门螺杆菌粘附人胃上皮细胞的粘附率最低。**结论** 人胃粘膜来源的乳杆菌菌株L3具有较好的耐受性和抗幽门螺杆菌活性,研究结果为幽门螺杆菌感染的微生态治疗提供依据。

**关键词:**幽门螺杆菌;乳杆菌;胃粘膜;耐受性;抑制性

中图分类号:R378.99

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)06-0556-06

## Tolerance ability of *Lactobacillus* from human gastric mucosa and its antagonistic activity against *Helicobacter pylori*

HUANG Wei-wei<sup>1</sup>, GUO Gang<sup>2</sup>, SONG Yang<sup>3</sup>, ZENG Ben-hua<sup>4</sup>,  
ZHANG Wei-jun<sup>2</sup>, XIE Qing-hua<sup>2</sup>, YANG Zhi-bang<sup>1</sup>

(1. Department of Pathogen Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Science, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Department of Clinical Microbiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;

4. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**ABSTRACT:** This study aims to screen *Lactobacillus* strains with *Helicobacter pylori* antagonistic activity from human gastric mucosa and offer the best research object for the study of the interaction between *Lactobacillus* and *Helicobacter pylori*. Six *Lactobacillus* strains were isolated from the gastric mucosa of 21 people who did gastroscope inspection. The resistant ability of *Lactobacillus* with different pH (2.5~4.5) and bile salt (0.05%~0.2%) were detected. The research also combined with the determination of their antagonistic potential against *Helicobacter pylori* by oxford plate assay system and the ability inhibited *Helicobacter pylori* adhere to gastric epithelial cells. *Lactobacillus* strain L3 had the largest acid production in six strains and could tolerant high acid and high bile salts. The biggest inhibition zones formed when live bacteria and supernatant of strain L3 reacted on *Helicobacter pylori*, and certain inhibition ability to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were found, which were significantly different between any two of the same treatment liquid groups ( $P<0.05$ ). It also made the maximum decrease in *Helicobacter pylori* adhered to gastric epithelial cells. *Lactobacillus* strain L3 isolated from human gastric mucosa had strong antagonistic activity on *Helicobacter pylori*, This study provides basis for the microecological therapy of *Helicobacter pylori* related diseases.

**KEY WORDS:** *Helicobacter pylori*; *Lactobacillus*; gastric mucosa; tolerance ability; antagonistic activity

国家自然科学基金项目(No. 31070445)资助

通讯作者:杨致邦,Email:dryangfm365@sina.com

作者单位:1. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室,重庆 400016;

2. 第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038;

3. 中国人民解放军总医院微生物科,北京 100853;

4. 第三军医大学基础部实验动物学教研室,重庆 400038

Funded by the National Natural Science Foundation of China (No. 31070445)

Corresponding author: Yang Zhi-bang, Email:dryangfm365@sina.com

乳杆菌以其耐酸性和产酸活性渗透在生活诸多方面,且作为一类益生菌,其微生物制剂可平衡失调微生态,并具有生物拮抗、增强免疫力和促营养吸收的作用。如今人们的研究方向已从保健预防转向了疾病治疗,诸多研究已经有所探索,如胃部疾病,肠炎性疾病,肝脏损伤,肥胖等<sup>[1-4]</sup>。其中最主要的是针对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染的胃部相关疾病的治疗。

胃微生态理论为人们研究 *H. pylori* 感染提供了新思路,目前国内外针对胃部疾病的大量研究<sup>[5-7]</sup>围绕着致病 *H. pylori* 和益生乳杆菌等展开。乳杆菌能抵抗胃酸并通过降低脲酶活性来 *H. pylori* 的生长与粘附<sup>[8-9]</sup>。在研究乳杆菌与 *H. pylori* 相互作用机制时,体外研究是后期体内动物模型研究的前提,为了尽可能排除来源及体内外研究的差异,益生乳杆菌的筛选显得尤为重要。而乳杆菌来源广泛,种类繁多,选择合适菌株则更加困难。以往抗 *H. pylori* 的益生菌多分离自食物、粪便等<sup>[10-12]</sup>,选择胃粘膜来源的乳杆菌会更具胃内适应性和代表性。

随着益生菌的筛选方法逐渐成熟,本研究在检测乳杆菌抵抗胃内胃酸及肠道胆盐能力的基础上,结合抗 *H. pylori* 能力的体外抑菌和粘附试验,为筛选出抗 *H. pylori* 的乳杆菌的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细菌菌株与细胞株** 6 株从临床检查者胃粘膜分离鉴定的乳杆菌 L1、L2、L3、L4-1、L4-2、L4-3 及第三军医大学临床微生物学及免疫学教研室保存的乳杆菌标准株 ATCC4356、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、*H. pylori* (BabI/c 小鼠适应株 B<sub>0</sub>)、*H. pylori* NCTC11637、*H. pylori* ATCC26695、人胃上皮细胞(GES-1)。

**1.1.2 培养基** 乳杆菌培养基:MRS 干粉(BD)按比例配制,pH 6.3。*H. pylori* 选择性培养基:pH 7.4 的 Skirrow 血琼脂培养基,即琼脂基础培养基高压灭菌后再添加抗生素、5% 小牛血清、终浓度为 0.5% 的葡萄糖,固体培养基则另加入 5% 兔全血,*H. pylori* 琼脂扩散抑菌试验平板另加 4% 的 TTC(氯化-2, 3, 5-三苯基四氮唑)<sup>[13]</sup>。金黄色葡萄球菌:琼脂基础培养基。大肠杆菌:LB 培养基。GES-1:含 10% 胎牛血清的 F12 培养基。

**1.1.3 脲酶试剂** 7 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH

6.8,110 mmol/L 尿素,10 mg/L 酚红<sup>[14]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 乳杆菌的分离和鉴定** 采集第三军医大学附属西南医院 21 例无痛胃镜检查者胃粘膜组织标本(标本经许可后获取),以分区划线法涂布于 MRS 选择性平板,37 °C 微需氧培养箱中培养 2~5 d。挑取乳白色单个菌落,革兰染色阳性的进一步分纯培养,再对生长的菌落按《伯杰斯细菌鉴定手册》进行形态和生化反应鉴定。提取分纯细菌的基因组用乳杆菌 16SrDNA 特异性引物(F: 5'-AGCAGTAGG-GAATCTTCCA-3', R: 5'-ATTYCACCGCTA-CACATG-3')进行 PCR 扩增,目的条带为 344 bp,纯化后测序,NCBI 比对序列。

### 1.2.2 乳杆菌的耐受性试验

**1.2.2.1 光电比浊计数法制作各菌标准曲线** 6 株乳杆菌分离株及标准菌株 ATCC4356、*E. coli*、*S. aureus*、*H. pylori* 24 h 培养液,血细胞计数板的方法计数活菌数,以无菌生理盐水调整菌液至相应的浓度,测 OD<sub>595nm</sub> 值,生理盐水为空白对照。最后以每毫升细菌数为横坐标,OD<sub>595nm</sub> 值为纵坐标制作标准曲线。样本测定:每毫升原液菌数 = 标准曲线查得的每毫升菌数 × 稀释倍数。

**1.2.2.2 乳杆菌产酸监测** 7 株乳杆菌分别接种于液体 MRS 培养基后使菌浓度为 1×10<sup>8</sup> cfu/mL,37 °C 培养,培养 4 h、8 h、12 h、24 h 后分别取样两份,测定 OD<sub>595nm</sub> 值并用 pH 计测定 pH 值,绘制吸光度与 pH 值随时间变化的曲线图。

**1.2.2.3 乳杆菌耐酸能力测定** 配置 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 的 MRS 培养基,各株乳杆菌依次接种在以上不同 pH 的培养基中使菌浓度为 1×10<sup>8</sup> cfu/mL,37 °C 培养,并于培养后 0 h、1 h、2 h、4 h 取样,无菌的液体 MRS 作空白对照,测定 OD<sub>595nm</sub> 值。

**1.2.2.4 乳杆菌耐胆盐能力测定** 配置不同胆盐浓度(0.05%、0.075%、0.1%、0.2%)的 MRS 液体培养基,各株乳杆菌接种于以上不同培养基中使菌浓度为 1×10<sup>8</sup> cfu/mL,37 °C 培养,于 0 h、4 h、8 h、12 h 4 个时间点取样,无菌的液体 MRS 作空白对照,测定 OD<sub>595nm</sub> 值。

### 1.2.3 乳杆菌对 *H. pylori* 的抑制试验

**1.2.3.1 琼脂扩散牛津杯法抑菌试验** 以 *E. coli*、*S. aureus*、B<sub>0</sub>、NCTC11637、ATCC26695 为指示菌,同 7 株乳杆菌液体增菌 24 h 后备用。准备乳杆菌活菌(*Lactobacillus*, *Lac*)用液体 MRS 调整浓度为 1.0×10<sup>8</sup> cfu/mL 及 5 mL 6000 r/min 离心 5 min 的上清液(Supernatant, Sup)备用。实验分组 *E.*

*coli*-Lac、*E. coli*-Sup、*S. aureus*-Lac、*S. aureus*-Sup、*B<sub>0</sub>*-Lac、*B<sub>0</sub>*-Sup、NCTC11637-Lac、NCTC11637-Sup、ATCC26695-Lac、ATCC26695-Sup。调整指示菌浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL, 取 200 μL 棒涂布于平板, *S. aureus* 和 *E. coli* 涂于 MRS 固体平板, *H. pylori* 涂于含 4% TTC 的 Skirrow 血平板。待无明显水滴后, 每平板内等距放置无菌牛津杯, 每只牛津杯中加入一种乳杆菌活菌悬液 240 μL, 上清液也如此, 以液体 MRS 为阴性对照, 并做两次平行实验。37 ℃ 微需氧孵箱中培养 MRS 平板 24 h, 血平板 48 h, 测量抑菌环大小。

**1.2.3.2 乳杆菌对 *H. pylori* 粘附 GES-1 细胞的脲酶法粘附抑制试验** 实验方法综合参考文献<sup>[10, 14]</sup>, 收集 7 株乳杆菌(简称 L)及 3 株 *H. pylori* 的液体培养物后 PBS 洗 3 次, 调整乳杆菌浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL, *H. pylori* 浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL。GES-1 细胞在 96 孔细胞板中培养 2 d 使其形成单层铺布, PBS 洗 3 次。按细菌加入细胞孔的先后顺序不同分为 3 组: *B<sub>0</sub>*-L 组(先加 *B<sub>0</sub>* 后加 L); L-*B<sub>0</sub>* 组(先加 L 后加 *B<sub>0</sub>*); T(Together)组(*H. pylori* 与 L 同时加入, 细分为 T-*B<sub>0</sub>*、T-NCTC11637、T-ATCC26695), *H. pylori* 与 L 各 100 μL。*B<sub>0</sub>* 或 L 单菌加入孵育 1 h 后, PBS 洗 3 次, 再加入另一菌 L 或 *B<sub>0</sub>* 孵育 1 h, PBS 洗 3 次。而 *H. pylori* 之 *B<sub>0</sub>*、NCTC11637、ATCC26695 与 L 直接共同孵育 2 h 后, PBS 洗 3 次。每反应孔均做 2 个复孔, 而后每孔中加入 100 μL 脲酶试剂反应 30 min, 酶标仪上检测 540 nm 处的吸光度, GES-1 只含 *H. pylori* 的做阳性对照, 粘附计算公式: *H. pylori* 粘附 = ( $OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{实验}}$ ) /  $OD_{\text{阳性对照}}$ <sup>[15]</sup>。

**1.3 统计学分析** 采用 IBM SPSS Statistics19 软件, 均数比较分析用 t 检验和方差分析。

## 2 结 果

**2.1 临床标本的分离鉴定** 从临床 21 例无痛胃镜检查者胃粘膜组织标本中分离出 6 株乳杆菌, 编号为 L1、L2、L3、L4-1、L4-2、L4-3, 后 3 株是源自同一标本。经测序、NCBI 比对序列得出 L1、L2 为口腔乳杆菌, L3 为卷曲乳杆菌, L4-1 为唾液乳杆菌, L4-2 为加氏乳杆菌, L4-3 为德氏保加利亚乳杆菌。

**2.2 产酸试验** 根据各生长曲线与 pH 变化关系, 得出细菌生长至稳定期时菌株 L3 产酸量最大, 使培养基 pH 值由原来的 6.3 降至 3.8, 而多数菌株使 pH 值降至 4~4.5 之间。

**2.3 乳杆菌耐酸能力的测定** 实验取培养 4 h 的

培养液来分析比较 7 株乳杆菌的生长率, 即培养 4 h 的净生长量与最初菌量的比值。如图 1 所示, 菌株 L3 在 pH 2.5、pH 3.0 时生长率均达到了 150%; 且在 pH 4.0、pH 4.5 时保持稳定优势。其余菌株在低 pH 环境时生长受抑制, 生长率多低于 100%。不同菌株的生长趋势也不同, L2、L3 是以绝对优势呈对数生长。因此, 除标准菌株外分离菌 L3 有稳定的耐酸性。

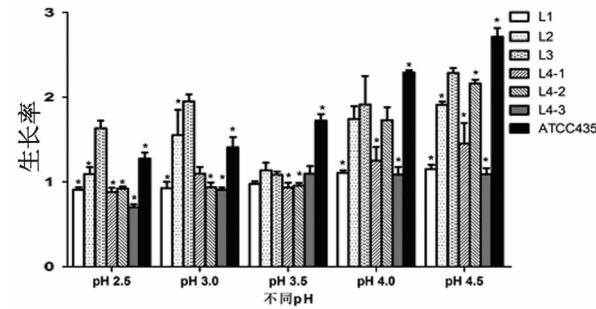


图 1 不同 pH 环境中 7 株乳杆菌生长率的比较

\*同一 pH 条件下菌株的生长率与 L3 有统计学差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 1 Comparison of growth rate of 7 *Lactobacillus* strains in different pH environment

\*The growth rate of *Lactobacillus* in different pH environment were statistically difference with stain L3 ( $P < 0.05$ )

**2.4 乳杆菌耐胆盐能力的测定** 本实验中各菌在 4 h 时生长率差异不大, 因此观察细菌 0~12 h 生长率的趋势线。如图 2 所示, 菌株 L1、L4-2 在下图 A、B 中培养 12 h 的菌量增长趋势明显高于其余菌株, 而菌株 L3 的细菌增量则保持在 2 倍左右; 图 C、D 中菌株 L1、L4-2 生长大幅减缓, 其细菌增量低于菌株 L3, 使 L3 领先至第一位; 在 D 中仅 L3 有一定生长, 其余菌株生长均受抑制。所以菌株 L3 耐高浓度胆盐并在所有环境中保持稳定的生长趋势。

**2.5 琼脂扩散牛津杯法检测乳杆菌对 *E. coli*、*S. aureus*、*H. pylori* *B<sub>0</sub>*、*H. pylori* NCTC11637、*H. pylori* ATCC26695 五种指示菌的抑制效果** 如图 3, 抑菌整体效果以指示菌为 *H. pylori* *B<sub>0</sub>* 的最佳, 通过方差分析知处理液相同的情况下不同指示菌的抑菌环大小有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。菌株 L3 在 *B<sub>0</sub>*-Lac、*B<sub>0</sub>*-Sup、NCTC11637-Lac、NCTC11637-Sup、ATCC26695-Lac、ATCC26695-Sup 各组中的抑菌效果均居首位, 并与组内其他乳杆菌的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。L3 对 *E. coli*、*S. aureus* 的抑菌结果与 ATCC4356 均无差异 ( $P > 0.05$ ), 除 *S. aureus*-Lac 组的中抑菌环 12.56 mm 小于同组

ATCC4356 的 15.67 mm。在此抗 *H. pylori* 活性检测中 L3 作用最强,并同 ATCC4356 能较好的抑

制 *E. coli*、*S. aureus*。

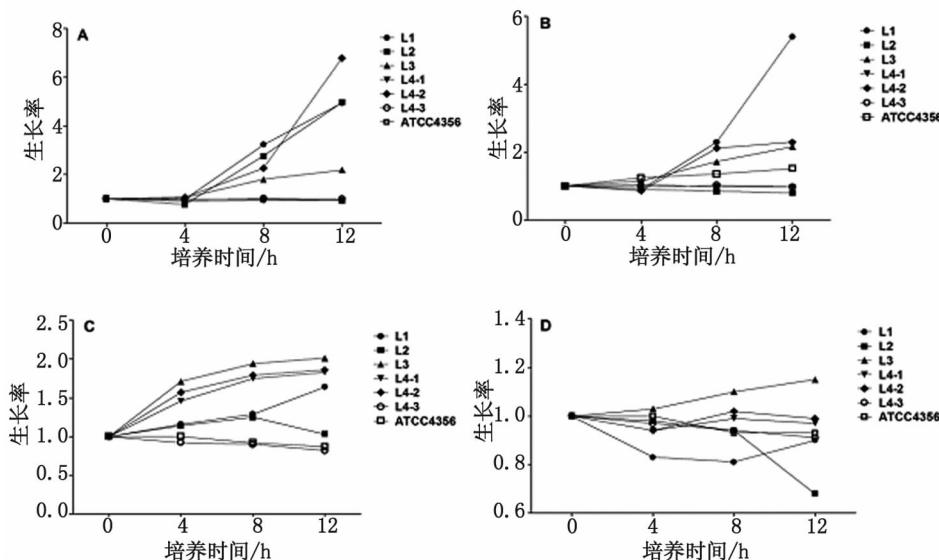


图 2 7 株乳杆菌在不同胆盐浓度环境中生长率随时间变化线图

A 为 0.05% 胆盐, B 0.075% 胆盐, C 0.1% 胆盐, D 0.2% 胆盐

Fig. 2 Line graph of 7 *Lactobacillus* strains' growth rate variation with time in different bile salts concentration environment

A: 0.05% bile salt; B: 0.075% bile salt; C: 0.1% bile salt; D: 0.2% bile salt.

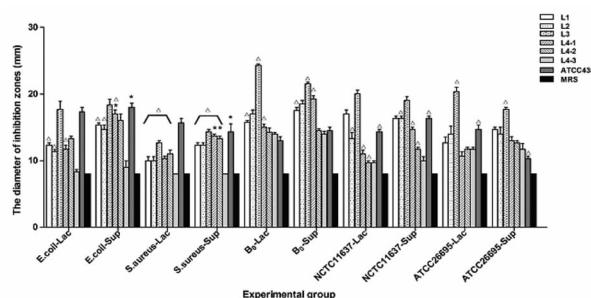


图 3 乳杆菌活菌及上清对 *E. coli*、*S. aureus*、*H. pylori* 的抑菌能力比较

*Lac* (*Lactobacillus*) 为乳杆菌活菌处理液, *Sup* (Supernatant) 为乳杆菌培养液处理后上清;

△ 为同一菌株的活菌与上清对相同指示菌的抑菌环的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); \* 为同一实验组内抑菌环与 L3 无统计学差异的菌株 ( $P > 0.05$ )

Fig. 3 Comparison of the antagonistic *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* activity of the live bacteria and supernatant of *Lactobacillus*. *Lac* (*Lactobacillus*) was live bacteria; *Sup* (Supernatant) was supernatant after the treatment of *Lactobacillus* liquid culture.

△ means different inhibition zones formed from live bacteria and supernatant of same *Lactobacillus* reacted on the same indicator had statistical significance ( $P < 0.05$ ); \* means inhibition zones of *Lactobacillus* in the same experimental group had no significant difference with strain L3 ( $P > 0.05$ ).

2.6 乳杆菌对 *H. pylori* 粘附 GES-1 细胞的影响

以阳性对照的粘附率为 100%, 试验加入乳杆菌后, *H. pylori* 粘附率有不同程度降低, 粘附率越低, 抑制 *H. pylori* 粘附的活性越强。如表 1, 图 4, 通过两因素的方差分析知处理方法的不同和菌株的不同对 *H. pylori* 的粘附率有显著性影响 ( $P < 0.05$ )。五组中菌株 L3 作用后的 *H. pylori* 粘附率均为最低, 且不同 *H. pylori* 菌株与 L 共同孵育的组中 L3 的最强抗粘附效应一致。

### 3 讨 论

本研究从初期取材到后期筛选都旨在获得抗 *H. pylori* 的乳杆菌菌株, 为下一步体内试验提供研究对象。选择更具优势的人胃粘膜分离的乳杆菌, 用其来模拟人体胃肠道内 pH 3 左右的低酸和 0.3%~3% 浓度的低盐环境, 再以合理时间监测细菌生长趋势与耐受性的关系, 直接测定乳杆菌属性能力的强弱。并通过琼脂扩散抑制试验和细胞粘附试验直接检测乳杆菌对 *H. pylori* 抑制活性的特性。

研究通过反复实验证并筛选出各项性能综合较强的菌株 L3, 其在 6 株分离株中产酸量最大, 耐低 pH 和高浓度胆盐, 能在一定程度上抑制 *E. coli*、*S. aureus*, 同时对 *H. pylori* B<sub>0</sub>、标准菌株 NCTC11637、ATCC26695 进行抗性研究, 结果均显

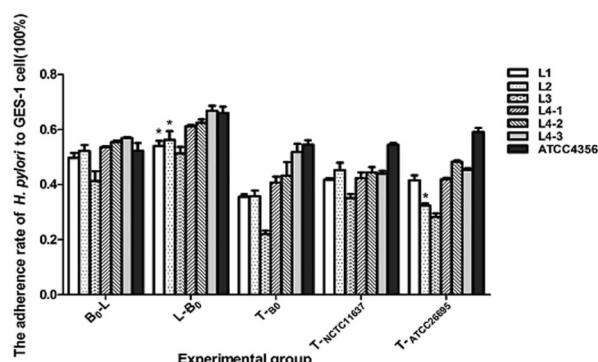
表 1 乳杆菌对 *H. pylori* 粘附 GES-1 细胞的影响【*H. pylori* 粘附率(×100%)】Tab. 1 The influence of Lactobacillus to *H. pylori* to adhere to GES-1 cell

Lactobacillus strains	Experiment group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )				
	B <sub>0</sub> -L	L-B <sub>0</sub>	T-B <sub>0</sub>	T <sub>-NCTC11637</sub>	T <sub>-ATCC26695</sub>
L1	0.4960±0.0338	0.5397±0.0337*	0.3550±0.0171	0.4167±0.0100	0.4147±0.0327
L2	0.5217±0.0379	0.5627±0.0556*	0.3558±0.0350	0.4523±0.0471	0.3233±0.0126*
L3	0.4130±0.0616	0.5123±0.0433	0.2190±0.0234	0.3507±0.0257	0.2817±0.0241
L4-1	0.5357±0.0055	0.6120±0.0070	0.4073±0.0376	0.4233±0.0354	0.4183±0.0106
L4-2	0.5543±0.0093	0.6237±0.0216	0.4323±0.0852	0.4443±0.0333	0.4827±0.0081
L4-3	0.5693±0.0045	0.6680±0.0318	0.5190±0.0505	0.4397±0.0169	0.4533±0.0097
ATCC4356	0.5230±0.0471	0.6600±0.0385	0.5450±0.0275	0.5443±0.0119	0.5907±0.0270

注: B<sub>0</sub>-L 为先加 B<sub>0</sub> (*H. pylori* 小鼠适应株) 后加 L (7 株乳杆菌总称) 组、L-B<sub>0</sub> 为先加 L 后加 B<sub>0</sub> 组; T<sub>-B0</sub>、T<sub>-NCTC11637</sub>、T<sub>-ATCC26695</sub> 为各株 *H. pylori* 与 L 同时加入组; \* 为同一处理组内 *H. pylori* 粘附率与 L3 无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

Note: B<sub>0</sub>-L was the group which *H. pylori* strain B<sub>0</sub> was added to GES-1 cell before adding Lactobacillus; L-B<sub>0</sub> was the group which Lactobacillus was added to GES-1 cell before adding B<sub>0</sub>; T<sub>-B0</sub>, T<sub>-NCTC11637</sub>, and T<sub>-ATCC26695</sub> were groups which each *H. pylori* strain and Lactobacillus were added to GES-1 cell at the same time.

\* means the rate of *H. pylori* to adhere to GES-1 cell after reacting with Lactobacillus in the same group had no statistical significance with strain L3 ( $P>0.05$ ).

图 4 乳杆菌对 *H. pylori* 粘附 GES-1 细胞影响的比较

B<sub>0</sub>-L 为先加 B<sub>0</sub> (*H. pylori* 小鼠适应株) 后加 L (图示 7 株乳杆菌) 组、L-B<sub>0</sub> 为先加 L 后加 B<sub>0</sub> 组; T<sub>-B0</sub>、T<sub>-NCTC11637</sub>、T<sub>-ATCC26695</sub> 为各株 *H. pylori* 与 L 同时加入组; \* 为同一处理组内 *H. pylori* 粘附率与 L3 无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

Fig. 4 Comparison of the influence of Lactobacillus to *H. pylori* to adhere to GES-1 cell

B<sub>0</sub>-L was the group which *H. pylori* strain B<sub>0</sub> was added to GES-1 cell before adding Lactobacillus; L-B<sub>0</sub> was the group which Lactobacillus was added to GES-1 cell before adding B<sub>0</sub>; T<sub>-B0</sub>, T<sub>-NCTC11637</sub>, and T<sub>-ATCC26695</sub> were groups which each *H. pylori* strain and Lactobacillus were added to GES-1 cell at the same time.

\* means the rate of *H. pylori* to adhere to GES-1 cell after reacting with Lactobacillus in the same group had no statistical significance with strain L3 ( $P>0.05$ ).

示 L3 有最强的抑制性并能有效阻止 3 株 *H. pylori* 粘附 GES-1 细胞。除此之外, 研究中发现乳杆菌

各有特性, 菌株 L1、L2 亦有一定的抗 *H. pylori* 活性; 标准菌株 ATCC4356 耐酸性稳定, 对 *E. coli*、*S. aureus* 的抑制活性优于对 *H. pylori* 的作用, 对 *H. pylori* 中菌株 NCTC11637 的作用强于其余两株; 菌株 L4-1、L4-2 不耐受低 pH, L4-2 耐受低浓度胆盐, 对 *H. pylori* 的粘附抑制性弱; L4-3 各性质均不突出可能与其不易培养有关。另外, 不同乳杆菌的功效不同, 适用对象也不同。对 *E. coli*、*S. aureus* 抑制时出现某些菌株的上清液作用好于活菌液, 可能由于细菌生长产生的某些代谢物作用大于细菌本身。且抑制不同病原菌时出现此现象的有相同菌株和不同菌株, 可能是因为某些乳杆菌有抑制不同病原菌的相同成份, 而另一些则能产生特异性的抑菌成份。其次, 作用时间点的不同会影响抑制效应。当乳杆菌与 B<sub>0</sub> 同时孵育在 GES-1 细胞时, 乳杆菌抑制 B<sub>0</sub> 粘附能力比单独孵育时强, 可能是因为乳杆菌在 B<sub>0</sub> 粘附细胞的过程中起作用。而先孵育乳杆菌时 B<sub>0</sub> 仍有很高的粘附率说明乳杆菌不能通过占位来抑制 B<sub>0</sub> 粘附细胞, 提示乳杆菌抑制 *H. pylori* 粘附的机制。

不同于以往文献报道的抗 *H. pylori* 菌株的筛选, 本研究根据实验具体情况整合了多项分析指标并加以改进。在耐酸耐胆盐试验中细菌总菌量并没有固定在初始阶段, 因此没有以活菌数与初始菌量之比的存活率来比较差异, 实际上细菌仅是较正常情况下生长减缓而细菌总量仍在增加, 所以选择某一时间点的菌量与最初菌量之比的生长率来描述变

化。另有文献中选择4~6 h为监测时间源于食物通过胃肠道的相对时间,而在耐胆盐试验中各菌培养至6 h或更久后才表现出明显差别,所以4 h时的生长率无法筛选,从而选用0~12 h的线性变化趋势来表示。另一方面,琼脂扩散牛津杯法对*E. coli*、*S. aureus*的抑菌试验选择了都能培养大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳杆菌的MRS平板;对*H. pylori*的抑菌试验选择了能满足*H. pylori*和乳杆菌共同良好生长并能使*H. pylori*菌落显紫金色的含TTC的Skirrow血平板,可以有效改善抑菌环的观察。由于*H. pylori*的病原异质性,所以在抗*H. pylori*研究中同时选用不同的*H. pylori*菌株,以观测不同菌株间效应是否存在一致性。并且各实验均经反复验证,排除了不稳定因素,结果更具可靠性。

本研究在此次分离中获得耐性和抗*H. pylori*活性皆优的菌株L3,它将作为后期抗*H. pylori*体内试验的主要研究对象,也将被验证能否在体内继续保持抗菌性能,最终为抗*H. pylori*的乳杆菌益生菌能稳定进入临床研究提供依据,也为获得适合治疗*H. pylori*引起的胃相关疾病的益生因子提供借鉴。

## 参考文献:

- [1]Ojetti V, Bruno G, Ainora ME, et al. Impact of *Lactobacillus reuteri* supplementation on anti-*Helicobacter pylori* Levofloxacin-based second-line therapy [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 2012: 740381. DOI: 10.1155/2012/740381
- [2]von Schillde MA, Hörmannsperger G, Weiher M, et al. Lactocacin secreted by *Lactobacillus exerts* anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines [J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 11(4): 387-396. DOI: 10.1016/j.chom.2012.02.006
- [3]Wang Y, Liu Y, Sidhu A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(1): G32-41. DOI: 10.1152/ajpgi.00024.2012
- [4]Ji YS, Kim HN, Park HJ, et al. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28 [J]. *Benef Microbes*, 2012, 3(1): 13-22. DOI: 10.3920/BM2011.0046
- [5]Boonyaritichaijij S, Kuwabara K, Nagano J, et al. Long-term administration of probiotics to asymptomatic pre-school children for either the eradication or the prevention of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Helicobacter*, 2009, 14(3): 202-207. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.00675.x
- [6]Ryan KA, Daly P, Li Y. Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(4): 831-834. DOI: 10.1093/jac/dkn040
- [7]Isobe H, Nishiyama A, Takano T, et al. Reduction of overall *Helicobacter pylori* colonization levels in the stomach of Mongolian gerbil by *Lactobacillus johnsonii* La1 (LC1) and its in vitro activities against *H. pylori* motility and adherence [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(4): 850-852. DOI: 10.1271/bbb.110921
- [8]Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, et al. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(11): 4573-4580.
- [9]Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, et al. In vitro and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 518-526. DOI: 10.1128/AEM.70.1.518-526.2004
- [10]Chen X, Liu XM, Tian F, et al. Antagonistic activities of lactobacilli against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial cells [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(1): M9-14. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02498.x
- [11]Ki MR, Ghim SY, Hong IH, et al. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and of adherence of cagA-positive strains to gastric epithelial cells by *Lactobacillus paraplatanarum* KNUC25 isolated from kimchi [J]. *J Med Food*, 2010, 13(3): 629-634. DOI: 10.1089/jmf.2009.1265
- [12]Lin WH, Lin CK, Sheu SJ, et al. Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells [J]. *J Food Sci*, 2009, 74(6): M225-230. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01194.x
- [13]Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori* [J]. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(12): 2378-2379.
- [14]Rokka S, Myllykangas S, Joutsjoki V. Effect of specific colostral antibodies and selected *Lactobacilli* on the adhesion of *Helicobacter pylori* on AGS cells and the *Helicobacter*-induced IL-8 production [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 68(3): 280-286. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2008.02138.x
- [15]Shmueli H, Burger O, Neeman I, et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 50(4): 231-235. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.011