

益生性乳酸菌黏附性研究进展*

肖 荣, 王远亮, 李宗军*

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙, 410128)

摘 要 综述了益生性乳酸菌的功能作用, 及乳酸菌在人体肠道中的黏附、定居、抑菌等与人体肠道黏膜组成的主要化学成分的相关性。详述了近些年有关乳酸菌之所以能在人体内定居的黏附性的研究, 如黏附素、黏附受体、影响黏附素的影响因子等, 以期有助于高黏附益生性乳酸菌株的选育及其益生菌制剂制备。

关键词 益生性乳酸菌, 黏附性, 黏附素, 黏附受体

乳酸细菌是胃肠道中的优势菌群, 其中某些种类对宿主健康非常有益, 称为益生性乳酸菌。益生性乳酸菌在体内能发挥许多生理功能, 它能调节胃肠道正常菌群、维持微生态平衡, 改善胃肠道功能; 提高食物消化率和生物效价; 降低血清胆固醇, 控制内毒素; 抑制肠道内腐败菌生长; 提高机体免疫力等。显然, 对肠道的黏附是益生性乳酸菌发挥其众多生理功能的必要前提, 益生性乳酸菌通过黏附素与黏附受体进行黏附, 然后定殖以抑制病原菌的入侵, 起到益生性功能作用。然而, 其在体内生物效应的准确机制方面的研究甚少, 这样对开发新型益生性食品造成巨大障碍, 故深入研究益生性乳酸菌黏附特性很有必要。

1 不同乳酸细菌的黏附情况

不同年龄人群肠道黏膜的构成不同(如表1)^[1]。从研究4株双歧杆菌(*Bifidobacterium*)在肠黏膜的

黏着情况表明, 所有菌在老年人肠道黏膜的黏着(0.1%~1.6%)均少于年轻组(4.2%~12.3%), *Bifidobacterium*913在2月婴儿肠道黏膜的黏着(11.5%)明显高于6月婴儿(8.6%)和成年人(5.9%)。*Bifidobacterium* BF1100在2月婴儿肠道黏膜黏着(8.1%)高于成人(4.2%)。*Bifidobacterium*420, Bb12不随年龄变化表现出差异性的黏着和定植。*Bifidobacterium*913, BF1100的肠道定植受年龄的影响明显, 年龄愈大肠道定植的几率愈低, 尤以913表现明显。对于婴幼儿而言420, 913, Bb12表现出强于BF1100的定植能力, 对于成年和老年人420, Bb12在肠道定植能力要明显高于913和BF1100。总之*Bifidobacterium*在肠道黏膜的定植能力和菌的种类, 定植人的年龄密切相关, 同一菌株在不同年龄组的定植差异性和不同年龄人肠道黏膜的不同组成有关。

表1 不同年龄人群肠道黏膜的构成

膜来源	碳水化合物/%	蛋白质/%	膜/%	膜来源	碳水化合物/%	蛋白质/%	膜/%
新生儿	29.1	30.0	66.9	成年人	17.1	30.4	72.2
2月儿	15.3	49.4	71.6	老年人	40.1	13.3	63.8
6月儿	31.3	37.2	73.1				

Pirkka等^[1]研究表明, 所有菌对成年人黏膜的黏附力均高于婴儿黏膜的黏附力(0.3%~6.5%), *L. rhamnosus* GG为44.1%~6.0%, *B. lactis*为23.2%~29.9%, *L. johnsonii*介于9.4%~14.4%之间, *L. salivarium*和*L. crispatus* M247及*L. Paracasei*的黏附率为2.5%~9.7%, *L. crispatus* Mu5的黏着率最低, LGG和*B. lactis*较其他菌株无论是在婴儿还是成人黏膜上均有较高的结合, 且LGG的黏着率明显高于*B. lactis*的黏着率。

Greene等^[2]证实, 在pH6~8的生理情况下, *L. acidophilus* NCFM较其他*Lactobacilli*有更高的定植率且定植相对稳定。NCFM和其他乳杆菌菌黏附情况比较, 见表2。

Elo等^[3]报道从冻干粉或不同乳制品中获得的*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)对大肠癌-2(Caco-2)细胞株具有中等至强烈结合能力。该菌的液体培养基中连续培养3~5a后, 对Caco-2细胞的黏附作用才出现降低。不过, LGG从人胃肠消化道经过, 并不改变其对Caco-2的结合作用。LGG在肠道中表现出迅速繁殖和长久滞留的特点。

第一作者: 硕士研究生(李宗军教授为通讯作者)。

* 国家863项目资助(No. 2007AA10Z347)

收稿日期: 2007-12-10

2 黏附素

黏附是细菌黏附素与宿主细胞相应受体之间的特异性结合过程。黏附素为乳酸菌表面结构成分,其

化学结构多为分泌蛋白(secreting protein)、蛋白质类物质(proteinaceous)、糖蛋白类物质(glycoprotein)、黏多糖(mucopolysaccharides)等等。

表 2 NCFM 和其他乳杆菌黏附情况

<i>L. acidophilus</i> 菌株	在黏附试验应用的细胞			黏附影响因素	参考文献
	HITHS0074	Caco-2	HT29		
<i>L. acidophilus</i> NCFM	+	+	+	蛋白	Greene 和 Klaenhammel1994
<i>L. acidophilus</i> LA	+	+	+	蛋白	Chauviere 等
<i>L. acidophilus</i> LB	-	+	+	分泌蛋白	Coconnier 等 1992
<i>L. acidophilus</i> LA1	+	+	+	分泌蛋白	
<i>L. crispatus</i> BG2FO4	+	+	+	蛋白和碳水化合物	Greene 和 Klaenhammel1994
<i>L. gasseri</i> ADH	+	+	+		Mack 等 1999
<i>L. rhamnosus</i> GG	-	+	+	碳水化合物	
<i>L. plantarum</i> 299 & 299v	-		+		Adlerberth 等 1996
<i>L. delbrueckii</i> 1489	+	+	-	甘露糖连接物	Klaenhammer1994

注: + 表示黏附, - 表示没有黏附, HT29 是指 HT29 或 HT29-MTX 细胞。

近年的一些研究表明^[3], 双歧杆菌的黏附素可能是一种细胞表面相关的或分泌到培养基上清液中的蛋白质。郑跃杰等^[4]从青春双歧杆菌中分离纯化到黏附素, 其成分基本单一, 是一种 *Mr* 16 ku 的蛋白质。Fujiwara^[5]在研究双歧杆菌对大肠杆菌黏附抑制作用时, 从双歧杆菌培养上清液中纯化出一种 *Mr* 52 ku 的蛋白质, 发现其能抑制大肠杆菌 GA1 的黏附, 可能也是双歧杆菌的黏附素。双歧杆菌对肠上皮细胞及其分泌的黏液的黏附能力已作为评定其益生作用的主要指标之一。

S 层蛋白(surface-layer protein, Slp)是细胞壁最外层的单分子亚结晶体排列蛋白, 由于大量的 S 层蛋白亚单元覆盖在整个细胞表面, 表层蛋白占据了总体细胞蛋白含量的 10%。表层蛋白作为黏附素介导乳酸菌细胞结合宿主上皮细胞和/或细胞外基质(ECM)。Jakava-Viljanen^[6]从猪小肠和粪便中分离得含有表层蛋白基因的菌株, 即德氏乳杆菌表层蛋白基因(*L. brevis* ATCC 8287 S-layer protein gene (*slpA*))。

王斌^[7]实验结果提示 *Mr* 29 000 和 *Mr* 14 000 蛋白是乳杆菌 JCM1081 的黏附素蛋白, 其不仅参与了乳杆菌与黏蛋白的黏附, 同时也参与乳杆菌与肠上皮细胞 HT-29 黏附。

Alelijung^[8]在罗伊氏乳杆菌 NCIB11951(*L. reuteri*)中发现了 2 个与 I 型胶原黏附有关的细菌表面蛋白 Cnb(Collagen binding protein, 胶原结合蛋白), Cnb 蛋白 *Mr* 29 000, 氨基酸序列分析表明含有 2 个典型的胞外受体连接区的基序 Cnb 基因上游的 1 个

开放阅读框(ORF)与 ATP 连接组分有高度同源性, 有别于 S 层蛋白家族。另 1 个 Cnb 蛋白 *Mr* 31 000, 与 *Mr* 29 000 的蛋白在抗原性方面有交叉反应, 说明是同一类型相关蛋白, 但其 N-端氨基酸序列同源性较低, 推测这可能是由于 *Mr* 31 000 蛋白由于修饰或降解, 造成了 N-端信号序列的缺失, 由此引起分子量以及 N-端氨基酸序列的不同。

Maurilia^[8]研究发现, 在 *L. fermentum* 104R 的细胞壁表面存在一种与其黏附有关的蛋白, 称之为黏蛋白黏附促进蛋白(MAPP), 这种蛋白 *Mr* 29 000, 呈二聚体或多聚体, 以非共价键连接在细菌表面, 在细菌生长进入稳定期后, 这种蛋白便可释放到培养上清中, 此蛋白可介导 *L. fermentum* 104R 与猪的小肠黏液以及猪胃黏蛋白的黏附, 其 N-端氨基酸序列与 Cnb 蛋白有一定的相似性。

植物乳杆菌(*L. plantarum*)向肠道上皮细胞的黏附性是甘露糖特异性的作用。甘露糖可以强烈地抑制 *L. plantarum*, Lp6 对黏液的黏附, 说明其对黏液的黏附与甘露糖特异性黏附素有关。黏液素中含有微量的甘露糖(<0.1%), 由于植物乳杆菌也可以结合这些甘露糖, 所以可能与一些病原菌竞争黏附位点, 从而防止细菌入侵到宿主组织内部。

此外, 部分研究者对乳杆菌细胞壁上的碳水化合物在其黏附过程作了研究: 酸性黏多糖黏附鸡嗦囊上皮细胞; 碳水化合物胶囊聚体能定植于猪小肠鳞状上皮细胞; 许多大分子复合体, 如 *L. fermentum* RI 上的蛋白质和磷壁酸复合体能定植鼠胃鳞状上皮细胞; 脂磷壁酸能黏附模拟的人尿道上皮细胞。

3 黏附受体

受体是参与细菌黏附的一类不可缺少的重要物质。它是宿主细胞表面一种能与细菌黏附素发生特异性结合的分子结构。一种宿主细胞的表面可以含有许多性质各异的受体。现将乳酸细菌的黏附受体分述如下。研究表明^[9]益生性乳酸菌对上皮细胞(epithelial cells)、黏液素(mucin)和细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)蛋白有黏附作用。

黏液素是由肠上样细胞(enterocytes)、杯状细胞(goblet cells)、内分泌细胞(endocrine cells)、潘尼氏颗粒细胞(肠腺的嗜酸性颗粒细胞, Paneth's granular cells)等共同组成黏膜而分泌的糖蛋白物质,存在于肠上皮细胞表面形成一层黏液胶层,黏液黏蛋白为进入肠道内的细菌黏附、定植提供了受体位点。有学者^[10]曾通过提取和纯化肠黏液黏蛋白,作为黏附素受体来检测益生菌与黏蛋白的黏附状况, Rojas^[9,11]等人以提纯的小肠黏蛋白作为受体,用 HRP 标记后与发酵乳杆菌 104R 的菌体表面蛋白进行 Western blot,成功鉴定了菌体表面蛋白中参与黏附的黏附素蛋白。

“微生物表面物质能识别黏附基质分子”(Microbiol Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, MSCRAMM)的观点,认为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)为生物活性组织,由大分子的复杂混合物组成,它既是机体细胞相互黏连的重要底物,又是许多细菌黏附宿主细胞的底物。所以受体往往是 ECM 中的一些成分,其中以纤维结合素(fibronectin, Fn)、胶原(collagen)、层黏连蛋白(laminin)居多。

纤维结合素(fibronectin, Fn)受体:Fn 是一种 440ku 的大分子糖蛋白,由 2 个相似或相同分子质量的亚单位组成,在其羧基端之间由 2 个二硫键相连而成。在细胞基质中,它是非溶解的纤维多聚体,在血浆中为溶解态的二聚体。最近研究报道乳酸杆菌黏附纤维结合素并且推断在上皮细胞的黏附过程中也有纤维结合体的参与。在许多链球菌中检测到了大量的纤维结合蛋白,已发现有 *Streptococcus gordonii* 存在一种纤维结合蛋白—表面结合蛋白(FbpA)^[12]。许多细菌,特别是革兰氏阳性菌的黏附素在 Fn 分子上都有其各自的结合位点,且主要位于 Fn 分子的 N 端。已知,金黄色葡萄球菌、A 群链球菌和肺炎链球菌的 LTA 均可与 Fn 结合,但 3 者在

Fn 上的结合位点有所不同。

胶原(collagen)受体:系由原胶原分子多级聚合而成的一种纤维状蛋白质,胶原分子由 3 条肽链互相缠绕而成,分子质量 30ku。根据 α 肽链之不同,胶原有 11 种类型。它是构成机体基本支架的主要成分之一,也是多种细菌黏附的靶部位。已知金黄色葡萄球菌的胶原黏附素(collagenic adhesin, CAN)分子中 A 区的第 151~318 氨基酸残基所组成的构型,能与胶原发生特异性结合。

层黏连蛋白(laminin) LN^[13]主要存在于基膜(basal lamina)结构中,是基膜所特有的非胶原糖蛋白,相对分子质量为 820 ku,含 13%~15%的糖,有三个亚单位,即重链(α 链, 400 u)和 $\beta 1$ (215 ku)、 $\beta 2$ (205 ku) 2 条轻链。结构上呈现不对称的十字形,由一条长臂和 3 条相似的短臂构成。这 4 个臂均有棒状节段和球状的末端域。 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 短臂上有两个球形结构域, α 链上的短臂有 3 个球形结构域,其中有一个结构域同 IV 型胶原结合,第 2 个结构域同肝素结合,还有同细胞表面受体结合的结构域。正是这些独立的结合位点使 LN 作为一个桥梁分子,介导细胞同基膜结合。所以 LN 的主要功能就是作为基膜的主要结构成分对基膜的组装起关键作用,在细胞表面形成网络结构并将细胞固定在基膜上。

4 黏附影响因素

由于影响黏附过程的黏附因子多种多样,乳酸菌在对小肠的定植过程中是通过细胞表面的不同结构来完成黏附作用的,由于不同动物的小肠其化学组成中可利用的营养物质不尽相同,致使黏附作用具有宿主特异性。

根据对 *L. Plantarum* WCFS1 基因组进行分析,基因 lp-1229 编码的蛋白 Msa 是 *L. Plantarum* WCFS1 的主要甘露糖特异性黏附。这一蛋白可能也表达于 *L. plantarum* LP6 的细胞表面。蛋白酶 K 处理可以明显地消除 *L. plantarum* LP6 向黏液的黏附性,说明蛋白质参与了黏附过程。LiCl 处理可以明显降低黏附度,表明黏附素可能以非共价结合的方式存在于细胞表面。许多乳酸菌都能产生细胞外多糖(EPS),可能参与其黏附过程。有研究表明^[3],通过对 *L. plantarum* LP6 细胞进行多种处理分析了其可能的黏附因子。高碘酸处理可能降低 *L. plantarum* LP6 的黏附性,说明碳水化合物参与了黏附。在另一方面,高碘酸破坏的也可能是细胞表面

存在的糖蛋白的糖基部分,或者参与黏附的是细菌细胞表面的蛋白,而这种蛋白就结合在 EPS 上。细胞表面暴露的脂磷壁酸是乳杆菌黏附作用的重要介导物。三氯乙酸可以降低细胞表面的脂磷壁酸,三氯乙酸处理后降低了 *L. plantarum* Lp6 的黏附性,说明(脂)磷壁酸与黏附有关,它可能直接参与了黏附过程,但黏附素也可能结合在(脂)磷壁酸分子,(脂)磷壁酸被破坏后也间接的引起了黏附素的释放。

脂磷壁酸(Lipoteichoic Acid) LTA 存在于许多乳酸细菌细胞壁中,能抑制葡萄状球菌、链球菌、两歧双歧杆菌、乳杆菌对肠上皮细胞的黏附。链球菌上 LTA 对哺乳动物膜的黏合是通过 LTA 先锚定于细菌表面蛋白分子上,然后通过其脂类部分与宿主细胞表面的纤维素结合蛋白(Fn)结合。Sherman 和 Savage^[14]发现乳酸菌上的 LTA 与其黏附性有着正相关的关系。这样看来 LTA 也可以成为黏附素的一种。

此外,细胞表面疏水性和自身突击^[15]等影响着乳酸细菌与宿主之间的相互作用。

5 研究前景

迄今为止,人类已经在绝大多数的病原菌中发现了各种各样的黏附素,而对益生性乳酸菌尚存很多未知或知之不多的领域,如黏附及黏附素机理的产生、黏附素与细菌毒力关系、黏附影响因子等等。利用微生物学、分子生物学、生物化学、免疫学、分子遗传学和基础兽医学的知识及其相关技术来研究其黏附性,不仅对其自身的种种特性的透彻了解十分重要,而且为人类从分子生物学水平进一步去认识它与细菌致病机理的相关性意义重大。

参 考 文 献

- 1 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 222
- 2 Green J D, Klaenhammer T R. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cell[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60, 4: 487~4 497
- 3 Ouwehand A C, Tolkko S, Kulmala J, et al. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus[J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31, 82~86
- 4 郑跃杰, 潘令嘉, 王立生. 双歧杆菌黏附素的提纯及鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(10): 1 149~1 151
- 5 Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, et al. Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to ganglioside GM1[J]. Appl Microbiol, 1999, 86, 615~621
- 6 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[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3-4): 264~273
- 7 王 斌, 魏 泓. 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(14): 1 762~1 766
- 8 Alejunga P, Shen W, Rozalska B, et al. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951[J]. Curr Microbiol, 1994, 28, 231~236
- 9 Rojas M, Ascencio F, Conway P. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68, 2: 330~2 336
- 10 Ouwehand A C, Tuomola E M, Tolkko S, et al. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 64, 119~126
- 11 Lorca G, Torino M I, Font de Valdez G, et al. *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 206, 31~37
- 12 Christie J, McNab R, Jenkinson H F. Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii* [J]. Microbiology, 2002, 148, 1 615~1 625
- 13 McGowan K A, Marinkovich M P. La minins and Human Disease[J]. Microsc Res Tech, 2000, 51, 262~279
- 14 Sherman L A, Savage D C. Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 52, 302~304
- 15 Kos B, Suskovic J, Vukovic S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92[J]. J Appl Microbiol, 2003, 94(6): 981~987

Research Development on Adhesion Properties of *Lactobacillus* as Probiotics

Xiao Rong, Wang Yuanliang, Li Zongjun

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

ABSTRACT This article summarized the functional effects of *Lactobacillus* as probiotics, and the relationship between the adherence, colonization and inhibition to other bacteria in human intestine and the main chemical components of intestinal mucosa. The advance researches on why *Lactobacillus* inhabit intestine in vivo were also reported detailed including adhesion, adherence receptor and the factors influence adhesion, etc. We think this paper may contribute to the selection of probiotics strains with high-adhesion property as well as preparation for probiotic agent.

Key words *Lactobacillus*, adhesion, adhesin, adherence receptor