

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/74

A61P 31/04



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96194086.7

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138551C

[22] 申请日 1996.3.25 [21] 申请号 96194086.7

[30] 优先权

[32] 1995. 3.23 [33] SE [31] 9501056 – 7

[86] 国际申请 PCT/SE96/00372 1996.3.25

[87] 国际公布 W096/29083 英 1996.9.26

[85] 进入国家阶段日期 1997.11.21

[71] 专利权人 普罗比公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 I·阿勒堡斯 S·阿尔内

B · 耶普森 M · -L · 乔汉森

G · 莫林 A · 沃尔

审查员 魏 健

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

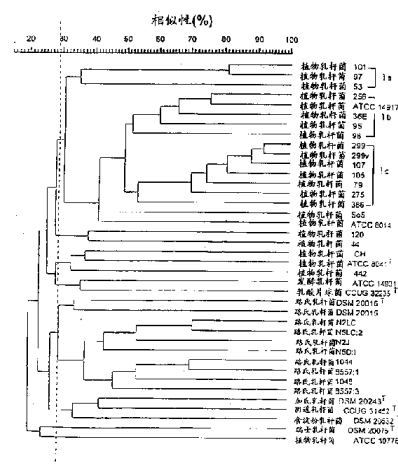
代理人 卢新华 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称 上皮粘附性乳杆菌

[57] 摘要

本发明涉及具有甘露糖特异性粘附素的植物乳杆菌在制备可抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌对上皮细胞粘附的药用组合物方面的应用。 用在本发明中的一种植物乳杆菌菌株可以与 D - 甘露糖包被的琼脂糖珠结合, 并且优选根据 REA 与植物乳杆菌 299 有 70% 以上相似性的植物乳杆菌族。 本发明还涉及上述菌株在制备用于预防和/或治疗细菌易位、胃肠炎和其它由表达甘露糖特异性粘附素的致病菌所致疾病的药用组合物方面的应用。



LSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 保藏号为 DSM9843 的植物乳杆菌 299v 在制备用于治疗表达 1 型菌毛的细菌引起的急性胃肠炎的药物中的用途，其中所述表达 1 型菌毛的细菌选自克雷伯氏菌属、肠杆菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属和大肠杆菌。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述植物乳杆菌具有粘附 D-甘露糖包被的琼脂糖珠的特性。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述药物还包括可药用载体。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述表达 1 型菌毛的细菌为表达 1 型菌毛的大肠杆菌。

5. 保藏号为 DSM9843 的植物乳杆菌 299v 在制备用于治疗由选自大肠杆菌、肠杆菌属、克雷伯氏菌属和变形杆菌属的细菌引起的泌尿道感染的药物中的用途。

上皮粘附性乳杆菌

- 本发明涉及多种乳杆菌菌株，这些乳杆菌具有与上皮细胞，尤其是人肠粘膜上皮细胞粘附的能力，可以用它们预防和/或治疗以同样方式粘附于上皮细胞的致病菌所致的菌群失调。

发明背景

- 天然微生物群是保护人或动物体免于入侵细菌定居的主要防御机制之一。免疫抑制的，抗生素治疗的和肠外喂养的病人有感染性疾病的危险，如败血症，脑膜炎或尿路感染，这些疾病是主要来自正常粪便菌群的细菌播散所致。其中一种机制是细菌易位，即来自胃肠道的活细菌进入肠系膜淋巴结或其它器官。

- 败血症或脓毒症仍旧是一种非常常见的与腹部手术相关的高死亡率外科并发症。细菌或细菌产物可渗入功能不良的肠壁并感染或引起肺、肝脏、心脏等其它远端器官的功能不良，这样可导致多器官功能障碍或所谓的强化监护疾病。目前采用抗生素和手术治疗可被定位的脓肿对这些病人进行治疗。常规在肠手术之前使用抗生素以减小手术后感染和由此所致疾病的危险。然而，抗生素治疗与正常肠道菌群的破坏和致病性更强的细菌的过度生长有关。

- 这些发现已经引起对多种微生物的兴趣增加，这些微生物可以有益地影响宿主的微生物平衡，如通过产生抗微生物成分或竞争性生长等方式。乳杆菌一直是被深入研究的菌种之一，并且在某些情况下一直被用来抵抗致病菌的增殖。

- 位于肠道内的细菌可以引起宿主生病，如腹泻，或继发性地定居于正常无菌部位，如泌尿道，引起泌尿道感染，或进入血流，引起败血症。

- 致病菌不同于那些不引起疾病的细菌在于它们含有所谓的毒性因素。一种重要的毒性因素是粘附于宿主细胞上糖类受体分子的能力。这是重要的一步，因为它可使细菌定位，并且可以使毒素和其它致炎物质紧密地传递到宿主细胞。如果毒性物质由粘附性细菌释放，它们可在局部达到比由诸如肠道内细菌等分泌时所能达到的更高的浓度。

引起泌尿道感染的细菌包括大肠杆菌，肠杆菌属，克雷伯氏杆菌属和变形菌属，这些细菌全部属于肠道菌科家族。它们大多数具有1型菌

毛, 该菌毛可使细菌有能力粘附于人阴道上皮细胞等表面的含甘露糖的受体以及泌尿道的粘液蛋白 Tamm - Horsefall 蛋白。1 型菌毛已被证实是膀胱炎的一种毒性因素, 该菌毛凭借两种情况而成为毒性因素之一, 即通过与阴道和尿道周上皮细胞结合而增加进入泌尿道的能力以及通过
5 与尿道上皮细胞结合来增加刺激效果。[这样具有 1 型菌毛的细菌单独就能够引起泌尿上皮细胞的细胞因子反应, 即炎症。]

引起腹泻的细菌包括沙门氏菌属和志贺菌属, 但肠内克雷伯氏菌属或肠杆菌属细菌的过度生长也与婴儿的腹泻有关。已经在小鼠中证明 1 型菌毛是沙门氏菌属所致腹泻病的一种毒性因素。也可能情况是 1 型
10 菌毛也可以促进其它细菌的定居并促进毒性物质靠近上皮释放, 由此引起腹泻。

现有技术

EP - A2 - 0 199 535 描述了嗜酸乳杆菌的一种生物学上纯种的培养菌, ATCC 登记号为 53 103, 它是由人粪便中分离出来的。在体外试验
15 中可以粘附于粘膜细胞。嗜酸乳杆菌很容易穿过胃肠道上部。然而, 体内的粘附情况尚未证实。

WO 89/05849 描述了从猪胃肠道中分离出来的乳酸细菌, 它是通过体外与猪胃肠上皮细胞粘附以及能够耐受酸和胆汁的特性而被筛选出来的。该菌可被用于牛奶发酵, 然后该牛奶可喂养小猪以预防或治疗 i.a.
20 大肠杆菌腹泻。

WO 93/01823 涉及分离以下乳杆菌菌株的过程, 这些菌株能够在人体内肠粘膜表面存活, 口服后也能在那儿存留至少 10 天。该申请尤其涉及两种新乳杆菌株, 根据布达佩斯条约, 已经于 1991 年 7 月 2 日将它们保藏于 DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
25 GmbH - , Braunschweig, 德国, 即

植物乳杆菌 299

DSM 6595

鼠李糖乳杆菌 271

DSM 6594

该申请还涉及用于预防或治疗胃肠道细菌感染的由此衍生的各种变种, 尤其那些替代外科手术相关抗生素的变种。

SE 463 598 涉及一种增加细菌与胃肠道粘附的制剂, 该制剂含有从乳杆菌中获得的一种粘附促进蛋白质, 称之为粘附素 (adhesin) ,

30 WO 90/09398 涉及抑制病原菌粘附、生长和/或生存的产品。上述产

品为抑制病原菌的乳杆菌代谢产物，受抑制的病原菌包括大肠杆菌，梭状芽胞杆菌属，沙门氏菌属，弯曲杆菌属，链球菌属的菌株等。

发明陈述

目前人们惊奇地发现某些乳杆菌株能够粘附于D-甘露糖包被的琼脂糖珠，该能力与以甘露糖敏感的方式凝集红细胞的能力有关，也与以可被甲基- α -D-甘露糖苷抑制的方式粘附于人结肠上皮细胞系HT-29的能力有关。用过碘酸盐处理HT-29细胞可除去甘露糖敏感性粘附，这证实细胞结合受体的本质是糖类。蛋白酶K处理细菌也可除去粘附性，这表明粘附涉及细菌细胞表面的蛋白质结构。因此认为乳杆菌的粘附部分粘附素是与上皮细胞表面的含甘露糖的受体相结合。这种粘附特性似乎与这些细菌对抗致病菌并刺激宿主的防御机制有关。

尤其是这种粘附可减少致病菌或潜在致病菌通过完整肠上皮的易位，可抑制潜在致病菌直接粘附于上皮细胞表面，从而降低这些细菌向粘膜释放毒性或炎性物质的能力，这种粘附还可形成一种适合粘膜修复的微环境，从而减轻非特异性刺激物对肠粘膜的炎性损伤。与上皮细胞密切结合还可以增加细菌与免疫系统相互作用的能力。例如这些乳杆菌株可以触发吞噬细胞激活以及刺激抗原递呈细胞以增强免疫力。

本发明涉及具有甘露糖特异性粘附素的植物乳杆菌在制备一种药用组合物方面的应用，该组合物可抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌与上皮细胞表面结合。这样可降低致病菌侵袭或在粘膜表面释放毒性和炎性物质的能力。

多种革兰氏阴性菌中的甘露糖特异性粘附素已被描述，这些阴性菌包括大肠杆菌，克雷伯氏菌属、志贺菌属和沙门氏菌属的细菌等肠杆菌科家族的许多成员，刺状假单胞菌，霍乱弧菌和副溶血弧菌。

大肠杆菌甘露糖特异性粘附素的最适受体已被确定，已知它含有在哺乳动物糖蛋白中所见的甘露糖 α 1-4甘露糖 β 序列。其它肠杆菌属细菌的甘露糖特异性粘附素的确切受体尚未确定，植物乳杆菌菌株的甘露糖特异性粘附素的受体结构也尚未确定。然而，可以相信受体应含有甘露糖 α 1-2甘露糖序列。甘露糖特异的植物乳杆菌对细菌结合于含甘露糖受体的抑制效果与它们对细菌结合于其它受体结构的抑制效果相比较，可能具有更明显的抑制效果。

本发明尤其涉及可与D-甘露糖包被的琼脂糖珠结合的植物乳杆菌

在制备一种药用组合物方面的应用，该组合物抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌结合于上皮细胞表面。

优选的植物乳杆菌菌株是：

植物乳杆菌 299 DSM 6595

植物乳杆菌 299v DSM 9843

植物乳杆菌 79

植物乳杆菌 105

植物乳杆菌 107。

- 5 本发明还涉及具有甘露糖特异性粘附素的植物乳杆菌与常规载体组合在制备一种药用组合物方面的应用，该组合物抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌结合于上皮细胞表面，它可用于预防或治疗菌群失调。

- 对于乳杆菌发挥其生态平衡效果，两个因素似乎是关键的。首先是定居肠道的能力，即活细菌在最后一次施用后大量存活一段时间的能力。这对乳杆菌抑制致病菌的生长和增殖是重要的，但还不足够。其次是与肠上皮细胞直接结合的能力。这可能是促进定居的因素之一，但不是它的先决条件。粘附于上皮的能力不能保证菌株能够定居。

另外本发明还涉及具有甘露糖特异性的粘附素以及能够定居于人肠道粘膜的植物乳杆菌在制备抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌粘附于人肠道上皮细胞表面的药用组合物方面的应用。

- 15 表达甘露糖特异性 1 型菌毛的致病性肠道细菌尤其属于克雷伯氏菌属，肠杆菌属，变形杆菌属，沙门氏菌属和志贺氏菌属的种类，例如，肺炎克雷伯氏菌，鼠伤寒沙门氏菌，和弗氏志贺氏菌，以及大肠杆菌。

- 20 乳杆菌菌株直接与上皮细胞粘附的能力对于该菌株减少致病菌易位和减轻致病菌引起的粘膜炎症来说可能是重要的，因为乳杆菌占据了靠近上皮的生态位。与上皮密切接触也能使乳杆菌改变直接影响肠上皮细胞的微环境，因而加快刺激性物质所致损伤的修复。

本发明还涉及上述植物乳杆菌在预防和/或治疗致病菌或潜在致病菌通过完整肠上皮易位方面的应用。易位表示活细菌穿过肠上皮，结果是在肠系膜淋巴结，血液或其它器官中也能够发现该菌。

- 25 用于预防或治疗肠道菌群失调的药用组合物的常规载体例如是上述菌所发酵的生理上可接受的底物，以及各种食物原料，尤其是以淀粉或牛奶为基础的那些，另外载体还可以是惰性固体或液体，如盐或水。一

种适当的底物应该包括不能在胃肠内被吸收并且用乳杆菌发酵时能形成羧酸的液体或固体纤维。含淀粉的适当底物可以举出燕麦和小麦等谷物，玉米，土豆等食根蔬菜以及青香蕉等某些水果作为例子。

优选用于本发明组合物的底物（也赋予组合物极高的营养价值）是以燕麦粉为基础的营养液，如 WO 89/08405 所述。

根据本发明的组合物可以任何适当的途径进行用药，优选口服或直肠用药，比如以灌肠的形式。也可以经胃在肠内插管进行肠内用药或直接用于肠道。试验结果已表明如果使用麦片粥或 β -葡聚糖等形式的可食纤维，则会提高组合物的效果。治疗应当持续 1 - 2 周，每日一次或数次。

本发明还涉及上述乳杆菌在制备抑制表达甘露糖特异性粘附素的致病菌，尤其表达 1 型菌毛的大肠杆菌，粘附于人阴道和尿道上皮细胞的药用组合物方面的应用。

附图说明

图 1 中的树状图示出了所测定的乳杆菌的不同菌株之间的相似性（以 % 表示），采用以产品时间相关系数为基础的 REA - 方法和 UPGMA 对它们进行鉴定。

乳杆菌菌株的分离

已经从人的粘膜取出乳杆菌菌株的标本。通过肠镜可以在结肠的不同部位进行活检，以及在外科手术中可以切去多处小肠，即空肠和回肠，的粘膜。将粘膜标本迅速放入一种特殊的介质中（0.9 % NaCl，0.1 % 蛋白胨，0.1 % 吐温 80 和 0.02 % 胱氨酸；所有的数值是指由重量/体积所确定的百分数），超声破碎 2 分钟制成匀浆，然后在放到 Rogosa 琼脂（Difco 实验室，Detroit，密执安，美国）上之前搅拌 1 分钟。将琼脂板在 37 °C 厌氧孵育 2 天（Gas Pak 厌氧系统，BBL）。从每一琼脂板中随机挑取 1 至 3 个菌落，在 Rogosa 琼脂上单菌落培养 5 ~ 9 次，然后以高浓度在 - 80 °C 保存于冰冻缓冲液中。通过这个过程分离出植物乳杆菌菌株 299 和 299v，以及 105，275 和 386；发酵乳杆菌 8704:3；路氏乳杆菌 108，8557:1，8557:3；鼠李糖乳杆菌 271；敏捷乳杆菌 294。以相似的方法从大鼠和猪肠道内分离出乳杆菌菌株，分别是路氏乳杆菌 R2LC 和 1063，1068 和 1044。

用下述方法从尼日利亚 ogi 或 pito 中也能分离出乳杆菌菌株。将原

标本超声破碎 5 分钟，在涡旋器上混旋 2 分钟，稀释后在 Rogosa 琼脂（Difco）上于 37 °C 孵育 3 天。随机挑取菌落进行检测。通过上述过程分离出植物乳杆菌菌株 79 和 107，125，98，53，97M2，97，101，120 以及 44。

- 5 也可以从青贮饲料中分离出乳杆菌菌株，即植物乳杆菌 36E，256 和 ATCC 8014。So5 是一种从 Sockerbolaget，Arlöv 中获得的植物乳杆菌引酵物，而路氏乳杆菌 BR 是在 BRA - 牛奶中已商业化使用的菌株（Arla Ekonomisk Förening，Stockholm，瑞典）。

菌株鉴定

- 10 ATCC 14917^T 和 DSM 20016^T 分别是植物乳杆菌和路氏乳杆菌的模式菌株（type strains）。模式菌株确定了种并且应该标上^T。所有的与一种特定模式菌株有 70 % 以上 DNA: DNA 同源性的其它菌株都被认为属于该特定种。

- 在《国际系统细菌学杂志》（International Journal of Systematic Bacteriology，1995）45 卷 670 ~ 675 页，Johansson，M - L，等人描述了以全染色体 DNA 限制性内切酶分析的方法对所分离的菌株进行的分类。在所获得的“指纹图谱”中，通过比较形成了反映所有 DNA 序列相似性的遗传组或遗传族。根据这种分析方法，植物乳杆菌菌株可以分成不同的遗传组 1a，1b，1c，如图 1 所示。1c 中的菌株全部与植物乳杆菌 299 具有 50 % 以上的相似性，299v，107，105 和 79 与 299 具有 70 % 以上的相似性。

- 25 菌株 299 和 299v，都是从健康人的肠粘膜中分离出来的，已分别于 1991 年 7 月 2 日和 1995 年 3 月 16 日保藏于 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH，并且给予保藏号 DSM 6595（299）和 DSM 9843（299v）。

表型鉴定

- 30 菌株 299，299v，79，105 和 107 是革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的杆菌，能于 pH 5.5 时在 Rogosa 琼脂上生长，并且能够从葡萄糖厌氧产生乳酸。各菌株发酵不同碳水化合物的能力见表 1 所列。根据厂家说明用 API 50 CH 的方法已经进行了检测。

在表型上这些菌株可被鉴定为植物乳杆菌。

表 1

植物乳杆菌菌株299,299V,107,105,275在30℃和37℃时在API 50CH上的发酵特征

	植物乳杆菌 299		植物乳杆菌 299V		植物乳杆菌 107		植物乳杆菌 105		植物乳杆菌 79	
	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃
甘油	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
赤藓醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
核糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
核糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-甲基-木糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-山梨糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
半乳糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-甲基-D-甘露糖苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-乙酰葡萄糖胺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
苦杏仁苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
熊果苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菊粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
松三糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-蜜三糖	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
淀粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖原	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
木糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-龙胆二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-松二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-来苏糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-塔格糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-阿拉伯糖醇	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
L-阿拉伯糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-酮基-葡萄糖酸盐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-酮基-葡萄糖酸盐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

质粒图

根据 Chassy 等人所描述的关于质粒所含元件的方法对菌株进行测试。植物乳杆菌 299, 299v, 79 和 105 具有相同的质粒图, 即 4, 9, 15, 21 和 >30 MDa 的五个质粒。植物乳杆菌 107 具有 4, 15 和 21 MDa 的三个质粒。

植物乳杆菌 299 的培养

- 从 - 80 °C 冰箱中取出的细菌接种到 50 ml 乳杆菌培养基 (Lactobacillus Carring Medium, LCM, Efthymiou & Hansen, 感染性疾病杂志 (J. Infect. Dis.), 110 卷 258 ~ 267 页, 1962) 或 Rogosa 上,
- 在 37 °C 孵育大约 40 小时,
- 50 ml 培养物接种至 500 ml LCM 中,
- 在 37 °C 孵育大约 40 小时,
- 500 ml 培养物接种至 5 升中,
- 在 37 °C 时孵育大约 25 ~ 30 小时,
- 在 10000 rpm 离心 10 分钟,
- 用生理盐水冲洗一次,
- 离心沉淀菌重悬于大约 1 升生理盐水中,

估计该细菌量足以满足 400 ~ 500 l 燕麦粥的需要。培养基不是最优化的。Rogosa 比 LCM 更佳, 可能是因为缓冲功能更好。将 2 % 葡萄糖加入 LCM。用同样的方法可以扩增其它的乳杆菌菌株。

植物乳杆菌在体内的定居

为了估计植物乳杆菌在体内的定居能力, 12 名健康志愿者连续 10 天口服 100 ml 含 8×10^7 菌落形成单位 (CFU) /克如 WO 93/01823 所述的冻干乳杆菌菌株的流体燕麦粥。服用结束后 10 天可在肠粘膜处发现植物乳杆菌处于优势地位。

在另外的试验中检测植物乳杆菌菌株 105 和 107 的定居能力。每天 1 次吞服含每一种试验菌株 1.5×10^9 菌落形成单位的冻干制剂, 连续 8 天。口服前 1 天、口服结束后 1 天和 8 天分别从直肠处取活检组织。也从空肠取另外的活检组织。口服结束后 8 天未再从 Rogosa 琼脂板中分离出口服菌株。

血凝集试验

为了研究乳杆菌菌株的粘附素是否类似于肠杆菌科家族中针对含甘露糖受体的粘附素（如大肠杆菌中的粘附素，它与 1 型菌毛有关并且介导与结肠上皮细胞的结合），于是用不同来源的红细胞进行了血凝集试验。

- 5 将冲洗过的细菌以 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 的浓度重悬于 PBS 中，然后在显微载玻片上将 2 倍稀释的细菌悬液与等体积的溶于 PBS 或含 100 mM 甲基 - α - D - 甘露糖苷的 PBS 中的 3 % 红细胞悬液混合。每隔一定时间轻轻倾斜载玻片，15 分钟后用肉眼和光学显微镜在 250 x 放大时观察凝集情况。在 15 分钟内产生可见凝集的细菌悬液最高稀释倍数的倒数作为凝集效价。

红细胞中的膜结合糖蛋白含甘露糖，具有甘露糖特异性粘附素的大肠杆菌都能以甘露糖敏感的方式与广泛来源的红细胞发生凝集。

- 属于遗传组 1 c 的植物乳杆菌菌株能与人类、豚鼠、鸡、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、马和猪的红细胞发生凝集，但很少与绵羊或牛的红细胞发生凝集。除了绵羊和牛的红细胞之外，用甲基 - α - D - 甘露糖苷可完全抑制或大大减少凝集。在 1 b 组的某些菌株中可见甘露糖敏感的弱血凝集反应，而其它遗传组菌株的凝集反应呈阴性。

- 虽然植物乳杆菌的甘露糖敏感性血凝集反应（MSHA）在很大程度上类似于大肠杆菌的血凝反应，但也有一些差别。用植物乳杆菌时，鸡红细胞可达到最高的 MSHA 效价，而马红细胞是活性最弱的红细胞种类之一。另一方面，用大肠杆菌时，马红细胞可获得最高效价，略高于鸡红细胞。豚鼠红细胞与植物乳杆菌和大肠杆菌可显示出相当的强血凝反应活性，而对大肠杆菌来说，人红细胞与其它种类的红细胞相比，其活性较低，但与植物乳杆菌相凝集时，其活性与其它种类的红细胞相当。

- 25 与 HT - 29 细胞粘附

- 测定了不同的乳杆菌菌株与肠上皮细胞 - 人结肠癌细胞系 HT - 29 相结合的能力（方法如 Wold, A 等所述，见《感染与免疫》，（Infection and Immunity）1988 年 10 月，2531 - 2537 页）。人腺癌细胞系 HT - 29 培养于含 10 % 胎牛血清、2 mM L - 谷氨酰胺和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的 Eagle's 培养基中（Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo, 美国）。细胞汇合后数天，用含 EDTA 的缓冲液（0.54 mM）使细胞脱落，冲洗并以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度悬浮于 Hank's 平衡盐溶液（HBSS）。收获细菌，

- 冲洗并以 $5 \times 10^9/\text{ml}$ 的浓度悬浮于 HBSS (在 597 nm 时 $2 \times$ 光密度 1.5)。细胞、细菌和 HBSS 以 1: 1: 3 的比例混合, 并在 4°C 上下颠倒旋转孵育 30 分钟。细胞用冰预冷的 PBS 冲洗 1 次, 然后用中性缓冲的福尔马林固定 (Histofix, Histolab, Göteborg, 瑞典)。用干涉差显微镜 (interference contrast microscopy 500 $\times$ 放大, Nikon Optophot, 带有干涉差装置, Bergström. Instrument, Göteborg, 瑞典) 确定至少 40 个细胞的每一细胞上粘附的细菌数, 然后计算出粘附于每个细胞的平均细菌数。为了检测粘附的抑制情况, 在粘附实验中使用了不同的 1.5 % 的单糖 (葡萄糖, 甘露糖, 甲基- α -D 甘露糖苷)。结果见下面的表 2, 在表中除了菌株和遗传组之外, 其它标题如下:
- HT - 29 VH 是表示平均细菌数/细胞; 实验的次数列于括号内;
 - α - 甲基甘露糖苷, 甘露糖, 和葡萄糖分别指分别存在 α - 甲基甘露糖, 甘露糖, 和葡萄糖的情况下的平均细菌数/细胞; 实验次数列于括号内;
 - n 是指在比较存在或不存在 α - 甲基甘露糖苷时的粘附时配对值的数目。
 - d 是指有或无 α - 甲基甘露糖苷时的均数差。正数 = 甘露糖苷抑制;
 - p 是比较的 p 值; 用于配对值的 Student's T - 检验。

表 2

菌株		遗传组	HT-29 VH	α -甲基甘露糖苷	甘露糖	葡萄糖	n	d	p
299v	植物乳杆菌	1c	11.2(9)	5.9(9)	8.3(4)	11.4(6)	9	5.3	0.004
299	植物乳杆菌	1c	10.7(8)	4.9(8)	11.6(3)	10.6(5)	8	5.8	0.002
79	植物乳杆菌	1c	11.7(8)	5.7(8)	6.8(3)	10.7(5)	8	5.9	<0.0001
105	植物乳杆菌	1c	10.8(7)	7.8(7)	9.8(2)	10.3(4)	7	3.0	0.15
107	植物乳杆菌	1c	10.3(7)	6.9(7)	10.8(2)	15.3(4)	7	3.4	0.01
386	植物乳杆菌	1c	5.8(4)	4.6(4)	7.0(4)	7.6(4)	4	1.2	0.59
275	植物乳杆菌	1c	1.6(3)	1.3(3)	2.9(3)	3.1(3)	3	0.3	0.52
36E	植物乳杆菌	1b	6.0(6)	6.6(6)	7.7(2)	3.5(2)	6	-0.6	0.58
256	植物乳杆菌	1b	4.9(6)	4.5(6)	7.7(3)	9.8(6)	6	0.4	0.74
125	植物乳杆菌	1c	8.7	2.9	-	-	3	-	0.0036
ATCC14917	植物乳杆菌	1b	5.6(6)	6.2(3)	1.9(1)	9(1)	3	-0.6	0.70
So5	植物乳杆菌		1.3(1)	1.6(1)	3.5(1)	2.7(1)			
ATCC8014	植物乳杆菌		4.8 (5)	1.0(1)	5.0(1)	5.0(1)			
98	植物乳杆菌	1b	0.2(5)	0(1)					
53	植物乳杆菌	1a	0.4(5)	0(1)					
97M2	植物乳杆菌		6.4(5)	7.7(2)			2	-0.2	0.70
97	植物乳杆菌	1a	1.2(4)	6.7(1)					
101	植物乳杆菌	1a	0.3(1)	1.0(1)	4.2(1)	3.8(1)			
120	植物乳杆菌		0(4)	0(1)					
44	植物乳杆菌		3.1(1)	6.7(1)	9.7(1)	6.5(1)			
8704:3	发酵乳杆菌		2.8(3)	10.9(1)					
BR	路氏乳杆菌		5.3(4)	13.6(1)					
108	路氏乳杆菌		0.3(4)	0(1)					
1063	路氏乳杆菌		2.5(4)	12.1(1)					
1068	路氏乳杆菌		2.2(1)	3.3 (1)					
1044	路氏乳杆菌		1.7(4)	2.6(2)					
M90	路氏乳杆菌		4.0(4)	1.3(1)	2.7(1)	4.0(1)			
8557:1	路氏乳杆菌		2.0(4)	4.1(1)					
8557:3	路氏乳杆菌		0.8(4)	0.8(1)					
DSM20016T	路氏乳杆菌		5.0(3)	13.8(1)					
R2LC	路氏乳杆菌		0(3)	1.15(1)	0.3(1)	0.8(1)			
294	敏捷乳杆菌		0.7(3)	2.4(1)					
271	鼠李糖乳杆菌		0(2)						

从这些结果中可以看出,前面的5个乳杆菌菌株在体外与 HT - 29 细胞的粘附性强,该粘附受 α - 甲基甘露糖苷的抑制。

用植物乳杆菌菌株以及5种大肠杆菌菌株对粘附试验进行重复。从巴基斯坦婴儿的直肠菌群中分离出四种野生型菌株,通过生物属型分析,这些菌株被鉴定为大肠杆菌,见 Bettelheim, M.F.等人所述,《医学微生物学杂志》(J. Med. Microbiol.) 2卷 225 ~ 236 页, 1969。该大肠杆菌菌株于 37 °C 在 Luria 肉汤培养基中过夜静置培养,该肉汤培养基含有 0.1 % 的 CaCl_2 以增加具有甘露糖特异性粘附素的 1 型菌毛的表达。转化菌株大肠杆菌 506 MS 可表达 1 型菌毛和甘露糖特异性粘附素,在含 25 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的大豆胰蛋白酶琼脂中进行培养。植物乳杆菌菌株在 Rogosa 琼脂中于 37 °C 有氧培养 24 小时。

为了检测粘附的抑制性,在粘附试验中包括最终浓度为 60 mM 的下列单糖: D - 葡萄糖 (USB, Cleveland, Ohio, USA), 甲基 - α - D - 葡糖苷 (Sigma), D - 甘露糖 (Merck, USA), N - 乙酰 - 葡糖胺 (USB), N - 乙酰 - 半乳糖胺 (USB) 和 N - 乙酰 - 神经氨酸 (Sigma)。

以前已经证明植物乳杆菌菌株 299 和 299v 能够定居于人志愿者,现在证明它们能以中等强度(大约 10 个细菌/细胞)粘附于 HT - 29 细胞。除了一菌株之外,对所有的属于遗传组 1c 的其它植物乳杆菌菌株来说,这也是事实。甲基 - α - D - 甘露糖可降低这些菌株 45~73 % 的粘附。更低程度的粘附(2 ~ 5 个细菌/细胞)可见于遗传组 1b 中的菌株。它们的粘附被甲基 - α - D - 甘露糖苷降低了 33 ~ 58 %。其它不属于遗传组 1b 或 1c 的植物乳杆菌菌株的粘附数目小,并且粘附不受甲基 - α - D - 甘露糖苷的抑制。

D - 甘露糖也可以降低植物乳杆菌 299 和 299v 的粘附,但抑制程度比甲基 - α - D - 葡糖苷低。其它所用的单糖,即 D - 葡萄糖,甲基 - α - D - 葡糖苷, L - 岩藻糖,半乳糖, N - 乙酰 - 葡糖胺, N - 乙酰 - 半乳糖胺和 N - 乙酰神经氨酸,没有一个能够抑制植物乳杆菌 299 或 299v 与 HT - 29 细胞的粘附。

所检测的具有甘露糖特异性粘附素的大肠杆菌在 15 ~ 45 个细菌/细胞的水平进行粘附。大肠杆菌 506 MS 的粘附受甲基 - α - D - 甘露糖苷和 D - 甘露糖的抑制程度相似(94 %)。

在有或无 60 mM 甲基- α -D-甘露糖苷情况下孵育之后, 冲洗, 计算了 3 次实验的平均值 (对大肠杆菌 345、253、810 和 476 只有 1 次实验), 细菌与 HT-29 细胞粘附的实验结果见下面的表 3。

与固定于琼脂糖珠上的 D-甘露糖结合

- 5 根据 Sanchez 和 Jonson 的方法 (APMIS., 1990, 98 卷 353 ~ 357 页), 略改动后进行细菌与 D-甘露糖包被的琼脂糖珠结合的试验。冲洗过的以 10^{10} /ml 悬浮于 PBS 的细菌在显微载玻片上与等体积的 1:4 悬液混合, 该悬液为含共价交联 D-甘露糖的商业化琼脂糖珠 (琼脂糖-对氨基苯基- α -D-甘露吡喃糖苷, Sigma, St. Louis, USA) 或普通琼脂糖珠
- 10 (4% 珠状的琼脂糖, PL-Biochemical, Milwaukee, Wis, USA) 溶于 PBS 中。载玻片倾斜 2 分钟, 然后在干涉差显微镜 (500x 放大, Nikon Optiphot) 下观察。在没有与普通琼脂糖珠结合的情况下, 观察到细菌粘附于甘露糖包被的琼脂糖珠被认为是阳性反应。该试验结果见表 3。与甘露糖包被的琼脂糖珠评价如下:

- 15 - 与无甘露糖的对照珠比较, 结合无差别。
+ 细菌以一薄层覆盖 50% 或以上的珠表面积。
++ 细菌以一厚层覆盖珠的整个表面, 有时候表现为多层包被。

所有的与 HT-29 细胞结合并以甘露糖敏感的方式凝集红细胞的植物乳杆菌, 即所有属于组 1c 的菌株, 和组 1b 中的 ATCC 14917^T、256

20 和 36E, 均观察到与 D-甘露糖包被的琼脂糖珠的结合。大多数阳性菌株与甘露糖包被的琼脂糖珠强烈反应; 在植物乳杆菌 275 和 ATCC 14917^T 及 256 中观察到弱反应。所有甘露糖敏感性粘附为阴性的植物乳杆菌菌株与甘露糖包被珠的反应亦为阴性, 只有属于亚组 1a 的植物乳杆菌 97 例外。然而, 在其它实验中, 该菌株偶尔也表现出甘露糖敏感性粘附。

25 大肠杆菌 506 MS 的结合水平大体与强阳性植物乳杆菌菌株相同。

表 3

菌株	遗传组	粘附的细菌/细胞 (平均数 ± 标准差)			与甘露糖包 被的琼脂糖 珠结合
		HBSS	⁺ 甲基-甘露糖苷	P	
植物乳杆菌					
97	1a	1.2 ± 0.9	1.5 ± 0.9		+
101	1a	0.5 ± 0.4	1.1 ± 0.8		-
53	1a	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.9		-
ATCC 14917 ^T	1b	5.2 ± 0.8	2.2 ± 0.7	0.070	+
256	1b	3.7 ± 0.3	1.8 ± 0.5	0.020	+
36E	1b	2.4 ± 1.8	1.6 ± 1.5	0.17	++
98	1b	0.6 ± 0.6	0.4 ± 0.2		-
299 (=DSM6595)	1c	8.1 ± 1.1	3.8 ± 0.5	0.029	++
299v (=DSM9843)	1c	11.7 ± 1.4	3.4 ± 0.5	0.017	++
107	1c	11.9 ± 1.7	3.7 ± 0.5	0.020	++
105	1c	13.3 ± 5.0	3.8 ± 0.4	0.093	++
79	1c	12.1 ± 3.5	3.3 ± 0.4	0.056	++
125	1c	8.7 ± 1.6	2.9 ± 1.7	0.0036	++
275	1c	2.9 ± 0.3	1.6 ± 0.2	0.038	+
386	1c	11.6 ± 2.8	4.1 ± 0.9	0.021	++
So5		2.2 ± 0.4	4.6 ± 2.2		-
ATCC 8014 ^T		2.7 ± 1.0	4.5 ± 1.5		-
120		0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.7		-
44		1.4 ± 1.2	1.6 ± 0.2		-
大肠杆菌					
345		18.4	0.7		
253		45.4	2.7		
810		26.2	0.5		
476		16.3	1.7		
SO6 MS		34.5 ± 8.9	2.6 ± 0.9	0.020	++

细菌和 HT - 29 细胞的偏过碘酸盐氧化和酶处理

将冲洗过的细菌或 HT - 29 细胞悬浮于 0.01 M 溶解与 0.1 M 柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液的偏过碘酸盐 (Merck, USA) 溶液中, pH 为 4.5。在 37 °C 将细菌孵育 1 小时, 而 HT - 29 细胞在室温孵育 15 或 30 分钟。孵育后, 离心收集细菌或细胞, 用 PBS 冲洗 2 次, 然后重悬于 HBSS 中。用溶于上述相同缓冲液的 0.01 M 碘酸钠 (Mallinckrodt. Chemical Works, Saint Louis, Mo, USA) 或单独用缓冲液进行对照孵育。

将冲洗过的细菌或 TH - 29 细胞悬浮于含 2 mg/ml 蛋白酶 K (15 个单位/mg, Sigma) 的 PBS 中, 或仅悬浮于 PBS 中, 在 37 °C 孵育 1 小时, 冲洗后如上所述重新悬浮。

用过碘酸盐处理 HT - 29 细胞 15 或 30 分钟, 可破坏细胞; 处理后只剩下 5 ~ 10 % 的细胞, 然后进行下面的粘附试验。对已处理 15 分钟的细胞, 植物乳杆菌仍保持高水平的甘露糖敏感性粘附 (与缓冲液对照相比 $P = 0.41$), 而已处理 30 分钟的细胞不能以甘露糖敏感的方式与植物乳杆菌结合 (与缓冲液对照相比 $P = 0.033$), 过碘酸盐处理 30 分钟几乎全部破坏了粘附 (与缓冲液对照相比 $P = 0.0005$, 与碘酸盐对照相比 $P = 0.0067$)。过碘酸盐氧化细菌细胞表面的糖类对结合的影响不大。

用蛋白酶 K 处理植物乳杆菌完全破坏其与 HT - 29 细胞的粘附能力 ($P = 0.0008$, 表 5), 然而用该酶处理大肠杆菌 506 MS 后未观察到粘附性的降低。蛋白酶 K 处理 HT - 29 细胞没有明显影响与植物乳杆菌 299v 的粘附 ($P = 0.36$), 但有降低与具有 1 型菌毛的大肠杆菌粘附的倾向 ($P = 0.15$, 表 4)。

这些实验结果证实了细胞结合受体的本质是糖类, 以及与该受体的粘附涉及细菌细胞表面的一种蛋白质结构。

鼠伤寒沙门氏菌与 HT - 29 细胞的粘附

沙门氏菌是腹泻的主要致病菌。许多沙门氏菌属菌株带有 1 型菌毛, 该菌毛可通过甘露糖特异性血凝集反应进行检测。

选择从患胃肠病的病人中分离的一株沙门氏菌鼠伤寒沙门氏菌 11014 进行该粘附实验, 该菌可以甘露糖敏感性方式凝集红细胞。将该菌株与 FITC 在 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液中于冷环境中孵育过夜, 这样菌株被标上荧光探针 FITC (异硫氰酸荧光素, Sigma)。在用于粘附实验之

前将细菌冲洗三次。

- 为了使细菌与细胞粘附，将 0.1 ml HT - 29 细胞 ($5 \times 10^6/\text{ml}$) 与 5×10^8 荧光标记的沙门氏菌和 5×10^8 未标记的植物乳杆菌 299 和/或 299v 混合。混合物在冷环境中上下颠倒孵育 30 分钟。冲洗细胞后，在荧光显微镜下计数粘附的细菌数。结果见下表。

表 4：与 HT - 29 细胞的粘附

	细菌数/细胞
鼠伤寒沙门氏菌 11014	25
鼠伤寒沙门氏菌 11014 + 2.5 % 甲基 - α - D - 甘露糖苷	1
鼠伤寒沙门氏菌 11014 + 植物乳杆菌 299	7
鼠伤寒沙门氏菌 11014 + 植物乳杆菌 299v	12

- 从表格中可明显看出，沙门氏菌株以甘露糖特异性方式与人结肠细胞，即 HT - 29 细胞发生粘附。该甘露糖敏感性粘附可被植物乳杆菌高水平地阻断。等量的细菌同时存在。

可能的情况是，如果乳杆菌菌株在致病菌株之前加入，乳杆菌将占据带有甘露糖特异性粘附素的致病菌的结合位点，因而使致病菌不可能定居并引起疾病。

- 急性肝功能衰竭的死亡率高，并且败血症的高发生率是很大一部分死亡的原因。在患严重疾病或免疫功能低下的病人中，大多数感染是由病人自身的微生物菌群引起，并且许多死于败血症或多器官衰竭的病人都有未发现化脓病灶的肠道细菌，表明这些感染可能起源于肠道。由于在暴发性肝功能衰竭中高发临床症状严重的细菌性败血症，所有进行预防性治疗的可能性已经被提出。在急性肝功衰竭或重大肝脏手术之后，细菌从肠道易位的机会增加，这可解释一部分在这些疾病中所见到的感染性并发症。为了阐明机制以及发现可能的预防措施，于是设计了以下实验模型。

大鼠试验

在急性肝损伤衰竭中补充乳杆菌的效果

本实验目的是研究在急性肝损伤模型中直肠补充不同的乳杆菌菌株对细菌易位程度的影响。同时也研究了这样的服用方式对结肠和盲肠中肠杆菌科细菌数目的影响。

- 5 体重在 200 ~ 300 克之间的雄性 Sprague - Dawley 大鼠被分成 7 组, 每组 6 只动物: 正常组, 急性肝损伤对照组 (ALI), 补充路氏乳杆菌组 (SR), 补充鼠李糖乳杆菌 271 组 (SS), 补充植物乳杆菌 299v 组 (SP), 补充发酵乳杆菌 8704: 3 组 (SF), 以及补充路氏乳杆菌 108 组 (ST)。在整个实验过程中所有动物都可随意获得正常的大鼠食物 (R₃, Lactamin AB, Stockholm) 和水, 并且被饲养在 22 °C 室温和 12 小时光照/12 小时黑暗循环的环境中。每天一次直肠给予不同的植物乳杆菌菌株, 连续 8 天。每天乳杆菌菌株的补充量是每只动物大约 3×10^9 菌落形成单位 (CFU), 悬浮于 3 ml 中。在第 8 天通过腹腔注射 D - 半乳糖胺 (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) 诱发急性肝损伤, 注射量是 1.1 克/千克体重, 它可使肠道内细菌到远处器官的易位增加。在急性肝损伤对照组, 每日补充生理盐水, 连续 8 天, 然后在第 8 天诱导肝脏损伤。诱发肝脏损伤后 24 小时收集标本。在乙醚麻醉并且无菌条件下切开中线进行剖腹手术。收集门静脉和主动脉血进行细菌学试验。从肝脏尾叶和肠系膜淋巴结 (MLN) 取标本进行细菌学研究; 盲肠和结肠内容物用于细菌计数。

- 20 在细菌学分析中, 将组织标本放在 5 ml 无菌转运液中。将标本超声破碎 5 分钟并且在 Chiltern (Terma - Glas, Sweden) 上旋转 2 分钟。将 1.0 ml 标本放在脑心混合琼脂 BHI (Oxoid) 上进行所有有氧培养板的计数。培养板在 37 °C 孵育 3 天。将标本放在 BHI 上并且在无氧条件下孵育后进行所有无氧培养板的计数。3 天后计数在每一培养板上所形成的菌落数并且考虑最初组织的重量而调整数字。组织标本以每克组织的方式表示。所有数值都写成平均数 $\pm$ SEM 的形式。用未配对的 Student t 实验对结果进行统计学分析。小于 0.05 的概率水平被认为有意义 ($P < 0.05$)。

表 5 细菌向肝脏和肠系膜淋巴结的易位

组别	肝脏, CFU/g	肠系膜淋巴结, CFU/g
ALI	5300 ± 1750	4940 ± 2060
SR	880 ± 530 *	-
SS	1460 ± 990 *	180 ± 40 *
SP	20 ± 10 **	-
SF	160 ± 80 **	70 ± 30 *
ST	930 ± 850 *	20 ± 5 *

*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$

5 用植物乳杆菌 299v 预处理大鼠可明显降低细菌从肠道的易位并且改善肝脏功能状态。

从盲肠和结肠内容物中取标本进行细菌群的研究, 取出的标本立即放入 5 ml 无菌转运液中, 然后按前面所述超声破碎并在 Chiltern 上旋转混匀。将紫红-胆汁-葡萄糖琼脂 VRBG (Oxoid) 在 37 °C 有氧条件下

10 孵育 24 小时, 可从琼脂板上获得肠杆菌科的活菌数。

表 6 在结肠和盲肠中的肠杆菌科细菌计数

组别	结肠中的 CFU/g	盲肠中的 CFU/g
正常	4.1 ± 1.7	6.5 ± 0.3
ALI	6.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1
SR	6.7 ± 0.2	5.1 ± 0.2
SS	5.1 ± 1.1	3.5 ± 1.1
SP	4.7 ± 1.0 *	4.3 ± 0.2
SF	1.9 ± 1.2 **	5.5 ± 0.2
ST	3.0 ± 1.4	4.3 ± 0.1

*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$

15 以上表格表明, 在所有补充了乳杆菌的实验组中, 在结肠以及盲肠中的肠杆菌科细菌数都降低了。

临床试验

将 Pro Viva (rose hip 汤, 以植物乳杆菌 299v 发酵过的燕麦为基础, Skånemejerierna Ekonomisk Förening, Malmö, Sweden) 给予 26 名患急性胃肠炎的儿童, 这些儿童住在波兰的 Szezecin 医院, 平均住院期是 5.5 天。每天给患儿 400 ml 该成品; 上午 200 ml 晚上 200 ml。

- 5 治疗前所有患儿每天 3 ~ 9 次稀便, 治疗后大便次数降低到每天 1 ~ 2 次。治疗前 6 名患儿的大便培养出致病菌, 3 名患儿中为沙门氏菌属细菌, 2 名患儿中为肠道致病菌大肠杆菌, 1 名患儿中为 *Enterobacter aeromonas* 和兰氏贾第鞭毛虫。治疗后大便中培养不出所有这些致病菌。除了兰氏贾第鞭毛虫之外, 已知所有这些致病菌都有 I 型菌毛并且能通过甘露糖特异性机制粘附于肠上皮细胞。植物乳杆菌 299v 能够与致病菌竞争在上皮细胞或粘液层上含甘露糖的糖蛋白上的结合部位, 可能是该能力与服用植物乳杆菌后大便培养物中的这些致病菌消失有关。
- 10

结论

- 在居于肠道中的革兰氏阴性菌中广泛存在甘露糖特异性的粘附素, 这提示这些粘附素对肠道细菌定居是重要的。以前从未在革兰氏阳性的细菌, 如植物乳杆菌中鉴定出甘露糖特异性粘附素。可以推测, 对该菌明显的定居能力来说, 粘附于含甘露糖受体的能力具有重要意义。然而, 缺乏粘附于粘膜受体能力的细菌也能很好地定居于肠道, 比如菌株 271, 它不能与肠上皮细胞粘附。
- 15

- 20 与上皮细胞上含甘露糖受体结合的能力可能为植物乳杆菌提供了对抗致病菌的致病效应的特殊能力。首先, 它是很好的肠道定居者。第二, 它能与致病菌竞争受体位点, 即含甘露糖的粘膜受体, 这些位点对致病菌的定居能力是重要的, 第三, 通过与肠上皮细胞上的受体结合, 植物乳杆菌能够影响上皮细胞周围的微环境。因此, 与乳杆菌居于更远离上皮的部位时相比, 这种情况下由乳杆菌所引起的微环境变化将更可能对上皮细胞有影响。第四, 通过与上皮细胞上的含甘露糖的受体结合, 植物乳杆菌将能够阻碍致病菌的粘附, 因而降低致病菌直接向上皮细胞释放毒素或其它刺激性物质的能力, 该能力常是这些细菌致病的先决条件。
- 25

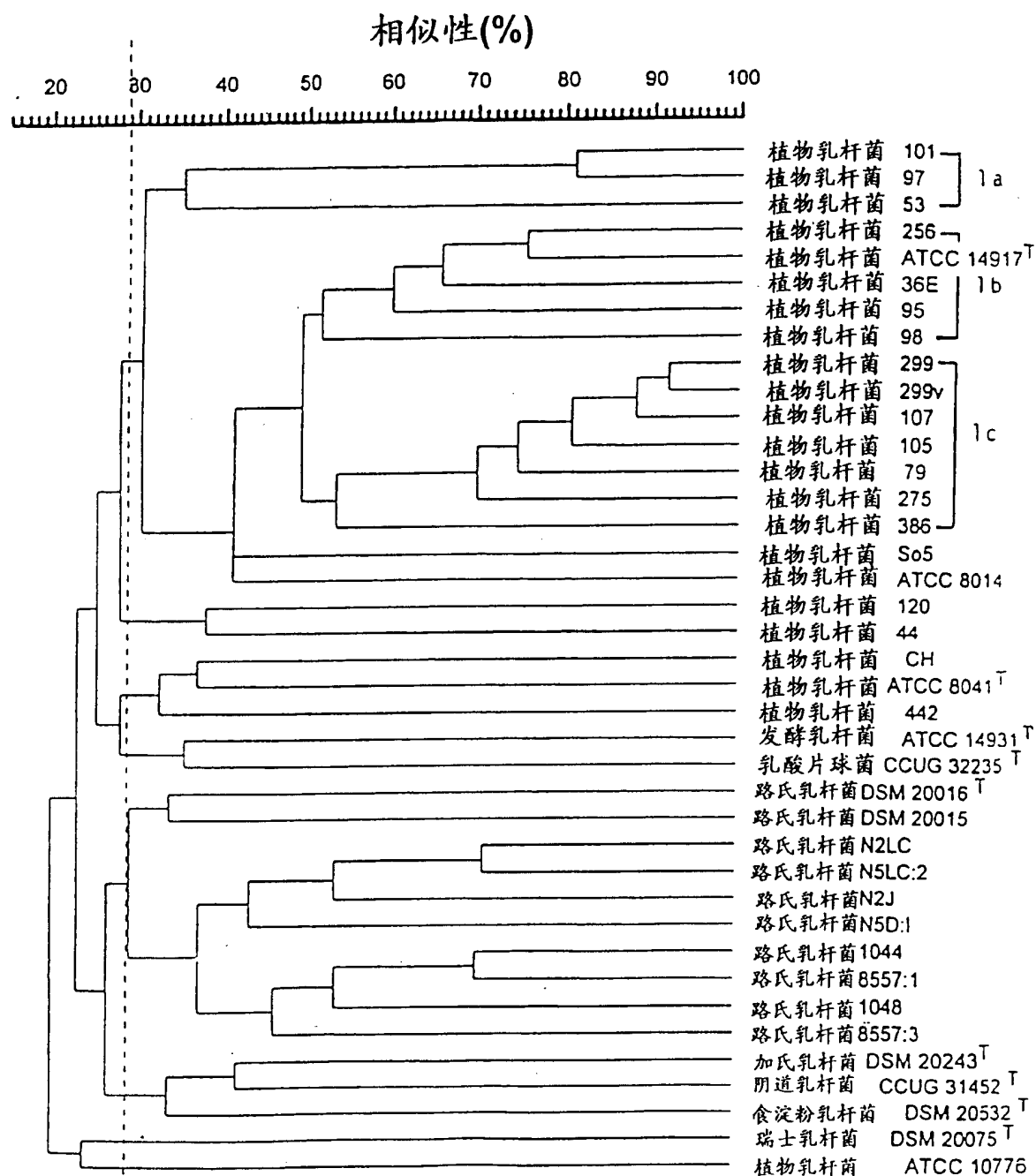


图1