

酸奶中乳酸杆菌分离鉴定及其与女性生殖道感染有关的生理生化特性研究

王江¹, 李晶², 律娜², 朱宝利², 张瑞芬^{2,*}

(1. 重庆市妇产科医院遗传与生殖研究所, 重庆 400013; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要: 对国内外市售酸奶中添加的乳酸杆菌益生菌进行分离鉴定, 对其产 H_2O_2 量及与宫颈癌HeLa细胞黏附能力进行分析, 并初步判定酸奶中的乳酸杆菌是否对女性生殖道健康具有潜在的保健作用。实验共分离鉴定出10株乳酸杆菌, 其中, 嗜酸性乳杆菌5株、干酪乳杆菌1株、瑞士乳杆菌1株、鼠李糖乳杆菌1株、植物乳杆菌1株和德式乳杆菌1株。只有瑞士乳杆菌产 H_2O_2 量较高且与HeLa细胞的黏附作用较强, 其余乳酸杆菌产 H_2O_2 的能力偏低。大部分国内外市售酸奶产品中添加的益生菌不具备抑制女性生殖道感染有关的生理生化特性, 只有瑞士乳杆菌可能对女性生殖系统的健康具有保护作用。

关键词: 乳杆菌; 酸奶; 黏附; HeLa细胞; 过氧化氢

Isolation of *Lactobacillus* Species from Yogurt and Their Biochemical Characterization in Relation to Preventing Infections of the Female Reproductive Tract

WANG Jiang¹, LI Jing², LÜ Na², ZHU Bao-li², ZHANG Rui-fen^{2,*}

(1. Institute of Genetics and Reproduction, Chongqing Obstetrics and Gynecology Hospital, Chongqing 400013, China;

2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Probiotic *Lactobacillus* strains were isolated from yogurt, cultured on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar and identified according to their 16S rRNA sequences. The *Lactobacilli* strains were assessed for hydrogen peroxide (H_2O_2) production and adhesion to HeLa cells to determine their potential for preventing infections of the female reproductive tract. A total of 10 isolates were identified including 5 *L. acidophilus* strains, 1 *L. paracasei* strain, 1 *L. helveticus* strain, 1 *L. rhamnosus* strain, 1 *L. delbrueckii* strain and 1 *L. plantarum* strain. The *L. helveticus* strain was strongly adherent to HeLa cells and demonstrated high H_2O_2 production, whereas other 9 strains had a relatively low ability to produce H_2O_2 . Although most of the probiotic *Lactobacillus* strains isolated from yogurt did not have biochemical characteristics in relation to preventing infections of the female reproductive tract, the *L. helveticus* strain might have a protective effect on female urogenital health.

Key words: *Lactobacillus*; yogurt; adhesion; HeLa cell; H_2O_2

中图分类号: TS252.54; R711

文献标识码: A

文章编号: 1671-5187(2012)05-0012-03

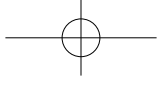
乳酸杆菌是维持育龄女性生殖道健康重要的保护因素。它是健康育龄妇女阴道的优势菌群, 并对抑制阴道致病菌或条件致病菌的侵入和生长具有重要的防御作用^[1-2]。如果阴道内乳酸杆菌数量明显减少或缺失, 则易出现各种阴道感染。通过食用含有丰富乳酸杆菌的酸奶食品, 补充体内乳酸杆菌, 可以达到防治阴道感染的目的^[3]。国内外科学研究发现口服酸奶可以防治阴道感染, 尤其是对伴有阴道感染的孕妇, 酸奶的替代疗法更有优势, 可以避免抗生素引起的危害胎儿的副作用^[4-5]。

虽然已有使用酸奶乳杆菌制剂治疗多种阴道炎的报道, 但是市售酸奶样品产品中添加的益生菌是否具有抑制女性生殖道感染有关的生理生化特性的相关研究, 还未见报道。本研究通过分析酸奶中的乳酸杆菌分离株与HeLa细胞黏附和产 H_2O_2 能力, 初步探讨哪些酸奶中的益生菌菌株可能具有与HeLa细胞黏附力和产 H_2O_2 能力, 从而初步判定市售酸奶中的乳酸杆菌具有促进育龄女性生殖道健康的潜在可能性, 为我国乳制品益生菌菌株的筛选和益生菌类乳制品的开发提供技术支持。

收稿日期: 2012-07-11

作者简介: 王江(1986—), 女, 硕士, 主要从事益生菌功能性研究。E-mail: wangjiang0427@126.com

*通信作者: 张瑞芬(1968—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事益生菌功能性研究。E-mail: zhangrf@im.ac.cn



1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

细菌基因组DNA提取试剂盒 北京天根生化科技有限公司; MRS培养基 美国Oxoid公司; *Taq*酶 日本TaKaRa公司; 引物27F(5'-AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3')、1492r (5'-GGT TAC CTTGTT ACG ACT T-3') 生工生物工程(上海)有限公司; LB培养基、胎牛血清、DMEM培养基 美国Hyclone公司; 革兰氏染液 北京索莱宝科技有限公司。

2720 PCR扩增仪 美国Applied Biosystems公司; Power Pac Basic电泳仪 美国Bio-Rad公司; Alpha Imager HP凝胶成像仪 美国Alpha Innotech公司; Elx808酶标仪 美国Bio-Tek公司; Beckman Allgre X-22R离心机 美国Beckman公司; CX31显微镜 日本Olympus公司。

1.2 酸奶样品及菌株分离

国内酸奶样品于2011年3月间购自北京市大型超市,共选购3个厂家生产的保质期内共3种酸奶样品,国外酸奶样品于2011年4月间购自美国旧金山大型超市,共选购3个厂家生产的保质期内共3种酸奶样品,厂家在样品标签中标识的益生菌种类包括双歧杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌和保加利亚乳酸杆菌中的2、3或4种。将酸奶样品稀释后接种到MRS培养基,分离培养乳酸杆菌,37℃厌氧培养24h^[6]。每个样本随机挑选5个单菌落于2mL MRS培养基中培养增菌24h,扩增细菌用于细菌保种与DNA制备。

1.3 乳酸杆菌的鉴定

提取乳酸杆菌基因组DNA,采用27F-1492R通用引物扩增细菌16S rRNA基因保守区。25μL扩增体系包括:1×PCR反应缓冲液,200μmol/L dNTPs,上游及下游引物各0.2μmol/L,1U *Taq* DNA聚合酶,1μL乳酸杆菌基因组DNA。反应条件:94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火40s,72℃延伸30s,共25个循环;72℃延伸10min。PCR产物用1%凝胶电泳检测,阳性结果送北京诺赛公司,用27F-1492R进行双向测序。将测序结果拼接后选取中间的1400bp与NCBI数据库比对,如与参考序列一致性大于98%则将其归为该种乳酸杆菌。

1.4 H₂O₂检测

H₂O₂标准曲线制作:首先用100mmol/L哌嗪-*N,N'*-2-乙磺酸(PIPES)将30% H₂O₂(相当于9.128mol/L)储备液稀

释成1mol/L,再用100mmol/L PIPES将1mol/L H₂O₂分别稀释成0、20、40、60、80、100μmol/L工作液;然后分别取100μL上述H₂O₂工作液与100μL 20mmol/L四甲基联苯胺(TMB)、2μL 1mg/mL辣根过氧化物酶混合,16℃孵育10min,测量光密度(OD)在630nm波长处的数值。H₂O₂浓度标准曲线: $y=0.0033x+0.0496(R^2=0.992)$ 。乳杆菌液体培养H₂O₂浓度检测:挑取乳杆菌单菌落,接种1mL培养48h的菌液于10mL MRS液体培养基中,37℃静置培养21h后,转换为振荡培养3h,振速为220r/min,然后12000r/min离心2min,取100μL菌液上清检测H₂O₂,根据标准曲线,计算H₂O₂浓度^[7]。

1.5 乳杆菌对HeLa细胞的黏附作用

500μL含量为10⁵个/mL HeLa细胞接种于24孔培养板中,置于37℃、5%CO₂孵箱中过夜培养,将过夜培养的HeLa细胞用PBS清洗3遍并加入500μL DMEM细胞培养基。取500μL、含量为10⁸CFU/mL活化过夜培养的乳杆菌加入含有500μL DMEM细胞培养基的24孔培养板中,置于37℃、5% CO₂环境中孵育2h,然后用PBS清洗4次,0.25%胰酶消化4~5min,再用350μL DMEM培养基终止消化,并吹打混匀,取100μL 10⁴倍稀释菌液涂布MRS平板,37℃培养,进行革兰氏染色观察。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

从6种国内市售酸奶样品收集30株菌,通过16S rRNA测序比对,最后确认10株乳酸杆菌,如表1所示。其中,*L. paracasei* 1株、*L. acidophilus* 4株、*L. helveticus* 1株分离自3个国外厂家酸奶;*L. acidophilus* 1株、*L. rhamnosus* 1株、*L. delbrueckii* 1株、*L. acidophilus* 1株、*L. plantarum* 1株分离自3个国内厂家酸奶。主要菌株与酸奶厂家所称含有的菌株相符。

2.2 乳酸杆菌益生作用(产H₂O₂和黏附)的比较分析

不同种类的乳酸杆菌间产H₂O₂能力存在显著差异,其中O-1 *L. helveticus*培养液上清中H₂O₂浓度高达367.2μmol/L,能力明显高于其他菌株,其余菌株产H₂O₂能力较弱,培养液上清中浓度仅为10~20μmol/L。黏附实验结果表明,*L. helveticus*和*L. delbrueckii*两株乳杆菌对HeLa细胞具有一定的黏附作用(图1)。其中,G-2 *L. delbrueckii*黏附能力最强,O-1 *L. helveticus*次之,而其余菌株黏附能力很弱。

表 1 乳杆菌分离鉴定结果
Table 1 Identification of *Lactobacillus* isolates

菌株名称	<i>L. paracasei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>
菌株编号	C-1	C-2	L-1	L-2	O-1	G-1	G-2	Y-1	Y-2	Y-3

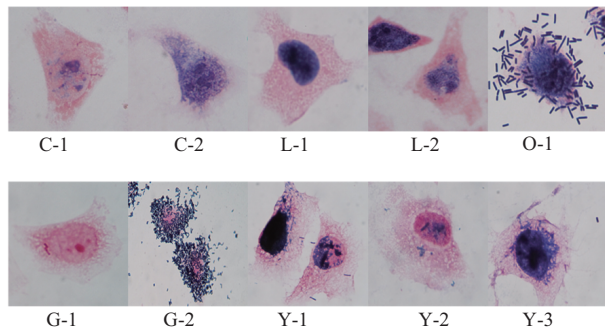


图1 酸奶中乳酸杆菌与HeLa细胞黏附
Fig.1 Adhesion to HeLa cells of *Lactobacillus* isolates

3 讨论

益生菌是可改善宿主微生态平衡且含生理性活菌的微生物制剂,具有多种生理保健功能^[8-9]。含益生菌的发酵奶产品显示出很大的市场潜力,乳酸杆菌作为一种益生菌已广泛应用于胃肠道疾病的治疗,*Lactobacillus casei rhamnosus* 乳酸杆菌通过乳酸菌素抑制致病菌的生长、调节胃肠道菌群平衡起到预防腹泻、治疗便秘的作用^[10]。但益生菌对促进女性生殖道健康的潜在益生作用的开发研究仍处于初期阶段。益生菌作用的本质是扶植正常菌群,拮抗致病菌或条件致病菌,调整和恢复微生态平衡^[11]。阴道微生态群落中的条件致病菌是阴道感染性疾病的主要来源,如大肠杆菌、类杆菌、金黄色葡萄球菌、B族链球菌、假丝酵母菌、滴虫及支原体等。益生菌的应用可达到治疗和预防合二为一的功效,从根本上恢复阴道微生态,有益于妇女健康^[12]。研究提示:产 H_2O_2 与阴道上皮细胞具有较高黏附能力是乳酸杆菌治疗阴道感染的关键因素^[13-14]。

乳酸杆菌可以分解上皮细胞内的糖原产生乳酸和过氧化氢,使阴道保持酸性环境(pH值为3.8~4.2),阴道的酸性环境和过氧化氢对拮抗致病菌的侵袭具有重要作用。有报道乳酸杆菌产酸、 H_2O_2 能力与其抑制阴道致病菌或条件致病菌的能力正相关。 H_2O_2 通过介导细菌DNA的破坏,来抑制其他细菌的生长。 H_2O_2 能力在不同种的乳酸杆菌间存在较大差别^[13],本研究表明,大部分国内外市售酸奶样品中添加的益生菌不产 H_2O_2 ,仅有O-1 *L. helveticus* 一株产 H_2O_2 能力较强;因此,此株益生菌可能对女性生殖道病原菌具有抑制作用。

益生菌乳酸杆菌与细胞的黏附并在生殖道中保持一定的数量,是益生菌促进女性生殖道健康的重要生理特性。益生菌乳酸杆菌与阴道上皮细胞黏附及成功定植,是乳酸杆菌持续益生作用的基础。只有黏附在生殖道细胞表面的益生菌才能产生酸或过氧化氢等生物活性物质,

充分发挥益生菌对生殖道病原菌的抑制作用,促进女性生殖道健康^[14-15]。由于直接以阴道上皮细胞作为益生菌乳酸杆菌的黏附对象存在一定的困难,现普遍采用宫颈癌细胞系体外模型的方法。人宫颈癌细胞系HeLa细胞来源于生殖道,与生殖道上皮细胞关系较为密切并能在体外连续传代培养,其来源与培养比阴道上皮细胞方便容易,本实验以人宫颈癌细胞系为模型,采用显微观察的方法研究乳酸杆菌对细胞的黏附实验发现,10株酸奶乳酸杆菌分离株中,G-2 *L. delbrueckii*黏附能力最强,O-1 *L. helveticus*次之。选择促进女性生殖道健康的乳酸菌株,必须兼顾乳酸杆菌黏附定植、产 H_2O_2 能力等一些与益生作用机理相关的功能特点。因此,O-1 *L. helveticus*是一株产 H_2O_2 和黏附定植兼备的乳酸杆菌,具有促进女性生殖道健康的潜在可能性,可作为防治女性生殖道感染的有益菌株。

参考文献:

- [1] MARRAZZO J M, COOK R L, WIESENFELD H C, et al. Women's satisfaction with an intravaginal *Lactobacillus* capsule for the treatment of bacterial vaginosis[J]. Women's Health, 2006, 15(19): 1053-1060.
- [2] 林农, 张维嘉. 阴道微生态环境与生殖道感染[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29(5): 377-380.
- [3] REID G, DOLS J, MILLER W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009, 12(6): 583-587.
- [4] NERI A, SABAH G, SAMRA Z. Bacterial vaginosis in pregnancy treated with yoghurt[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1993, 72(1): 17-19.
- [5] TASDEMIR M, TASDEMIR I, TASDEMIR S, et al. Alternative treatment for bacterial vaginosis in pregnant patients; restoration of vaginal acidity and flora[J]. Arch AIDS Res, 1996, 10(4): 239-241.
- [6] 董银苹, 崔生辉, 李凤琴, 等. 北京市售酸奶中益生菌的分离鉴定及耐药性检测[J]. 卫生研究, 2010, 39(5): 552-555.
- [7] MARTIN R, SUAREZ J E. Biosynthesis and degradation of H_2O_2 by vaginal lactobacilli[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(2): 400-405.
- [8] 张源. 益生菌的功能与评价[J]. 乳业科学与技术, 2009(4): 151-154.
- [9] 张勇, 刘勇, 张和平. 世界益生菌产品研究和趋势[J]. 中国微生物学杂志, 2009, 21(2): 185-192.
- [10] PETRICEVIC L, WITT A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis[J]. BJOG, 2008, 115(11): 1369-1374.
- [11] 张丁丁, 葛克山, 任发政, 等. 益生菌抑制细菌功能研究进展[J]. 中国乳业, 2008(12): 40-42.
- [12] TUROVSKIY Y, NOLL K S, CHIKINDAS M L. The aetiology of bacterial vaginosis[J]. J Appl Microbiol, 2011; 110(5): 1105-1128.
- [13] WILKS M, WIGGINS R, WHILEY A. Identification and H_2O_2 production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4): 713-717.
- [14] MACPHEE R A, HUMMELEN R, BISANZ J E, et al. Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(18): 2985-2995.
- [15] REID G. Probiotic lactobacilli for urogenital health in women[J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42(Suppl 3): 234-236.