

具有拮抗幽门螺杆菌作用的 植物乳杆菌特性研究

陈晓华, 肖苇苇, 田丰伟, 刘小鸣, 张 灏, 陈 卫*
(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘 要: 幽门螺杆菌是螺旋形或是 S 形的微需氧革兰氏阴性菌, 是慢性活动性胃炎、消化性溃疡发病的主要病因, 并与胃恶性肿瘤(胃癌、胃粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤)关系密切。本文探讨了具有拮抗幽门螺杆菌作用的植物乳杆菌的生物特性。结果表明 *L.plantarum* 18 在低酸条件下可以生长, 耐受 pH 2.5 的人工胃液, 能够抑制多种幽门螺杆菌的生长。该菌株生长比较快, 4h 进入生长对数期, 14h 后进入稳定期; 最适生长 pH 为 5~7, 最适生长温度为 30~37℃, 最适接种量为 1%~2% (V/V), 可在 0.2% 的胆盐中生长。

关键词: 幽门螺杆菌, 乳酸菌, 生物学特性

Biological characteristics of *Lactobacillus plantarum* with antagonistic activity against *Helicobacter pylori*

CHEN Xiao-hua, XIAO Wei-wei, TIAN Feng-wei, LIU Xiao-ming, ZHANG Hao, CHEN Wei*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Helicobacter pylori* is a spiral-shaped, microaerophilic and Gram negative bacillus that causes chronic gastritis, peptic ulcer diseases and is suspected to be involved in the genesis of gastric cancer. The aim was to discuss the biological characteristics of *Lactobacillus plantarum* 18 with antagonistic activity against *H. pylori*. The results showed that *L. plantarum* 18 could grow in the low acid conditions, survive in the simulated gastric juice, and inhibit the growth of *H. pylori*. Biological characteristics research of *L. plantarum* 18 showed that the logarithmic time was from 4th hour to 14th hour, the optimum growth pH was 5~7, the optimum growth temperature was 30~37℃, the optimum inoculated concentration was 1%~2% (V/V), and the tolerance level of bile salt was 0.2% (V/V).

Key words: *Helicobacter pylori*; *Lactobacillus plantarum*; biological characteristics

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)02-0195-04

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 呈螺旋形或是 S 形, 是微需氧革兰氏阴性菌。自从 1983 年澳大利亚学者 Marshall 和 Warren 从人体胃粘膜活检标本中分离出幽门螺杆菌以来, 大量研究表明, *H. pylori* 是慢性活动性胃炎、消化性溃疡发病的主要病因, 并与胃恶性肿瘤(胃癌、胃粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤)关系密切, WHO 和国际抗癌联盟将其列为 I 类致癌物。目前普遍采用国际标准三联疗法对幽门螺杆菌感染进行治疗。即将质子泵 (PPI)、阿莫西林、克拉霉素联合使用, *H. pylori* 根除率为 50%~90%。该疗法副作用大, 同时可能导致 *H. pylori* 耐药株的产生, 从而进一步增加治疗难度。另外, *H. pylori* 在抗生素和体内不利因素的诱导下可形成细胞壁缺

陷的 L 型, 这也是临床上 *H. pylori* 感染治愈后易复发的主要因素之一。此外, 长期不合理应用抗生素可引起胃肠功能紊乱及胃肠道菌群失调等不良反应。因此, 寻求天然的无毒害物质防治 *H. pylori* 引起的疾病具有十分重要的意义。近年来, 人们在研究替代抗生素治疗 *H. pylori* 感染方面做了大量的工作, 发现多种具有抗 *H. pylori* 的活性物质, 包括益生菌、生物活性蛋白以及植物提取物等。乳酸菌指发酵糖类主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏阳性细菌的总称, 大致可分为 18 个属, 共有 200 多种。绝大部分乳酸菌都是人体内必不可少的具有重要生理功能的菌群, 是功能性益生菌的主要来源, 普遍存在于发酵食品中。乳酸菌是目前益生菌中研究得比较深入的一类菌, 是少数能在胃酸环境下生存的细菌之一, 国内外研究表明, 益生菌通过代谢抗菌物质(乳酸、过氧化氢、细菌素等)、分泌 *H. pylori* 竞争性粘附受体、刺激粘蛋白的表达和稳定胃粘膜作用来增强胃肠道抑

收稿日期: 2011-02-25 * 通讯联系人

作者简介: 陈晓华 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 国家自然科学基金 (30871952, 20836003, 30901128)。

制 *H.pylori* 定植^[1-3]。同时,益生菌可以通过粘附上皮细胞调节宿主的免疫反应,并可以通过调节抗炎因子的分泌从而降低胃的活动和发炎^[4]。另外益生菌还能刺激机体产生 IgA,对 *H.pylori* 具有免疫清除作用^[5]。但是,益生菌的免疫作用是很难归纳的。益生菌的菌株特异性产生各种各样的免疫反应,同样宿主的免疫状态也与之相关^[6]。目前国内外报道具有抑制幽门螺杆菌感染的菌株主要有嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、干酪乳杆菌、格氏乳酸杆菌、罗伊氏乳杆菌、肠球菌、枯草芽孢杆菌和双歧杆菌等。Ryan^[7]从 40 株乳酸菌中筛选到 12 株具有抑制幽门螺杆菌生长的作用,但这种能力与菌群和地域无相关性。Boyanova^[8]研究 6 株保加利亚乳杆菌对 30 株的幽门螺杆菌的抑制作用,表明所有的乳杆菌都能对部分的幽门螺杆菌具有抑制作用,其抑制力是依赖菌株特异性。因此,筛选具有抗幽门螺杆菌感染的乳酸菌仍然是一个重要的课题。本实验在前期研究的基础上探讨具有拮抗幽门螺杆菌作用的植物乳杆菌 *L.plantarum* 18 的生物学特性,为生产应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L.plantarum 18 和 *H.pylori* (SS1、43504、11637、26695、C20100707) 为本实验室菌库保存中心提供;哥伦比亚琼脂培养基、幽门螺杆菌选择性添加剂购自 OXOID 公司;无菌绵羊血 购自杭州新锐公司;MRS 液体培养基 购自青岛海博。

三气培养箱 BINDER 公司;冷冻离心机 德国 Hettich 公司;分光光度计 UV-754 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低酸条件下生长 MRS 液体培养基用盐酸调到 pH 3.0 按 1% (v/v) 的接种量把乳酸菌接到 pH 3.0 MRS 液体培养基中,37℃ 条件下培养 18h,用吸光度法测定 OD₆₀₀ 吸光值,观察乳酸菌的生长状况。

1.2.2 模拟人工胃液 乳酸菌培养液经离心 (6000r/min 5min) 收集菌体,用灭菌 PBS 离心洗涤 2 次,将其菌体悬浮于灭菌 PBS 中制成菌悬液。然后,将乳酸菌菌悬液 (10⁸ cfu/mL) 分别接种于含 9mL 过滤除菌处理的 pH 2.5 的人工胃酸试管中各 1mL,充分混匀后放置于 37℃ 恒温水浴振荡槽保温,并在 3h 后分别取样,测定其活菌数^[9-10]。

人工胃液: NaCl 0.20%、胃蛋白酶 (pepsin, sigma) 0.30% 用 HCl (1:3) 调整 pH 2.5 后,过滤除菌备用。

1.2.3 乳酸菌抑制 *H.pylori* 生长 *H.pylori* 活化两代后,用浓度为 10⁸ cfu/mL *H.pylori* 涂布到新鲜的哥伦比亚培养基,立即放入牛津杯,加入待测乳酸菌发酵液 100μL,微需氧条件下固定 1h 后,放入三气培养箱中 (O₂:CO₂:N₂ = 5:10:85, 37℃) 培养 72h 后,测量抑菌圈大小。实验重复 3 次。

1.2.4 菌株生理特性研究 取对数生长期的菌液,按不同接种量接到 pH 6.5 的 MRS 液体培养基中,37℃ 培养,培养 18h 后,用分光光度计测定 OD_{600nm} 吸

光值,以空白培养基作为对照,确定菌株生长的最佳接种量。

分别将 MRS 液体培养基调到不同的 pH,把培养到对数生长期的菌液以 1% 的接种量接种于其中,37℃ 培养 18h 后取样,以不同 pH 的 MRS 液体培养基作为对照,用分光光度计测定 OD_{600nm} 吸光值,确定菌株生长的最佳 pH。

将培养到对数生长期的菌液以 1% 的接种量在不同的温度下培养,培养 18h 后取样,以同温下不接种的空白培养基作为对照,用分光光度计测定 OD_{600nm} 吸光值,确定菌株生长的最佳生长温度。

取对数生长期的菌液以 1% 的接种量接到 pH = 6.5 的 MRS 液体培养基中,37℃ 培养,每隔 2h 取样,用分光光度计测定 OD_{600nm} 吸光值,以空白培养基作为对照,测定菌株生长曲线。

将培养到对数生长期的菌液以 1% 的接种量分别接种于牛胆汁粉添加质量分数为 0%~0.4% 的 MRS 液体培养基中,以溴甲酚紫为指示剂,培养 24h 和 48h 后观察培养液的颜色变化与菌体生长情况^[11]。

2 结果与讨论

2.1 耐酸特性

筛选具有抑制幽门螺杆菌生长的乳杆菌应该具有耐受人工胃液的能力,且在低酸环境下可以生长的能力。Ryan^[12]研究指出由于乳杆菌具有在胃中可以存活的能力,因此很有可能用于治疗胃紊乱疾病。本实验对 *L.plantarum* 18 进行耐酸特性研究,研究表明菌株在 pH 3.0 的 MRS 培养基下可以生长,ΔpH 大约在 0.549;菌在 pH 2.5 人工胃液下可存活 3h,存活率为 21.6%;并且曾研究过 pH 2.0 人工胃液下可存活 1h^[13]。

2.2 抑制幽门螺杆菌生长

通过牛津杯法抑菌实验,测定抑菌圈的大小,研究 *L.plantarum* 18 抑制幽门螺杆菌生长的能力。从图 1 可以看出,以 MRS 作为阴性对照,新鲜 MRS 培养基可以抑制 *H.pylori* 生长,抑菌圈直径大约是 13mm 左右。*L.plantarum* 18 可以抑制不同幽门螺杆菌生长,抑菌直径大约在 13~20mm 范围中。*L.plantarum* 18 抑制不同株幽门螺杆菌的生长能力不同,其中抑制 *H.pylori* SS1 的生长能力最强。研究曾发现 *L.plantarum* 18 的上清液和活菌还可以降低尿素酶的活性,但死菌无此效果^[13]。

国内外也有做过类似的乳酸菌抑制幽门螺杆菌的研究,如 Ryan 等人^[7]研究表明唾液乳杆菌具有比较强的抑制幽门螺杆菌的能力,其主要是活菌起抑制作用,而上清液没有抑菌效果,同时表明因菌株特异性而体现出抑菌作用不同。Boyanova 等^[8]也利用抑菌圈大小研究 6 株保加利亚乳杆菌对 30 株幽门螺杆菌的抑制效果,研究表明乳酸菌的抑菌特性体现菌株特异性以及在低酸环境下表现更强的抑菌效果。

2.3 菌株生理性能测定

2.3.1 不同接种量对菌株生长的影响 由图 2 可以

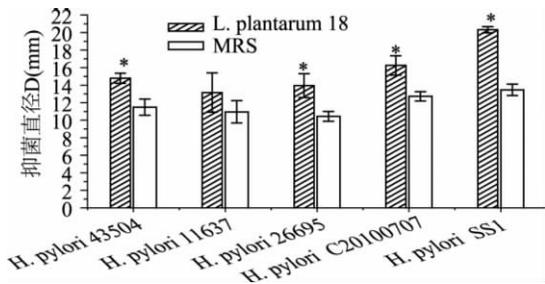


图1 *L. plantarum* 18 抑制 *H. pylori* 生长

Fig.1 *L. plantarum* 18 inhibits the growth of *H. pylori*

看出接种量对菌株 *L. plantarum* 18 生长的影响不是很大 在相应的接种量下 培养液的 pH 在 3.9 左右。以 0.5% 接种量的培养液 pH 稍高。因此菌株培养时 可选取接种量为 1%~2% 之间。

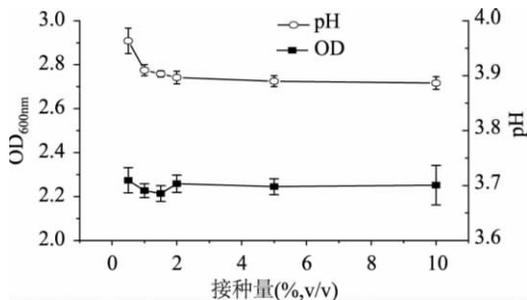


图2 不同接种量对菌株生长的影响

Fig.2 The effect of different inoculation on growth of strain

2.3.2 菌株生长的最佳 pH 不同 pH 培养基接种菌株 *L. plantarum* 18 的生长情况从图 3 可以看出 菌株生长的最适 pH 在 5~7 范围内。该菌株有很好的耐酸性 在 pH = 3 的环境中仍然可以生长。

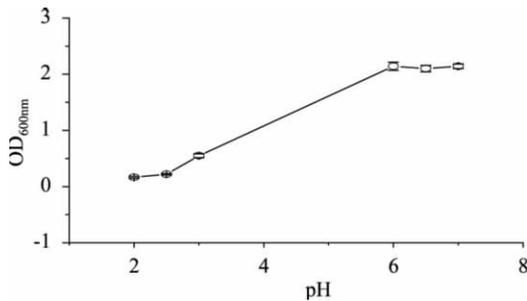


图3 不同 pH 下菌体生长情况

Fig.3 The effect of different pH on growth of strain

2.3.3 菌株生长的最佳温度 不同培养温度下菌株的生长情况由图 4 可以看出 菌株在温度为 20~42℃ 范围内均可生长 其中最适生长温度为 30~37℃。在此温度下 培养液的 pH 在 3.8 左右。

2.3.4 菌株的生长曲线 由图 5 可以看出 *L. plantarum* 18 的生长周期较短 生长速度快 培养 4h 后即进入对数生长期 培养 14h 后即进入稳定期。

2.3.5 菌株的耐胆盐性 微生物对于胆盐的耐受性是其能够在肠道中存活、生长并发挥功效的先决条件之一。消化道不同部位中胆盐的含量不同 人体小肠中胆盐的含量在 0.03%~0.3% 之间波动。胆盐对菌株的抑制作用取决于胆盐的浓度和菌株本身的特性 能够在正常生理胆盐浓度中生长和代谢的菌

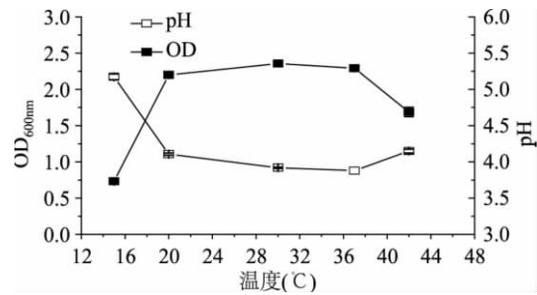


图4 不同温度下菌体生长情况

Fig.4 The effect of different temperature on growth of strain

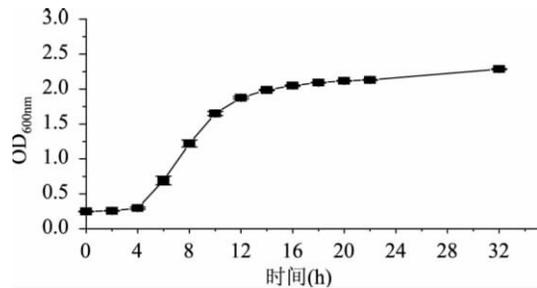


图5 菌液 OD 值随培养时间变化曲线

Fig.5 The changes of bacteria liquid OD value with culture time 株才可能在肠道中存活。由表 1 可见 *L. plantarum* 18 菌株最高能够在胆汁盐浓度为 0.2% 的培养基中生长。

表1 不同胆盐浓度的培养基中 *L. plantarum* 18 的生长情况

Table 1 The growth of *L. plantarum* 18 in culture medium with different concentration of bile salt

胆盐浓度(%)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
生长情况	++	++	+	-	-

注: ++ 为培养基在 24h 之内变色, + 为培养基在 48h 之内变色, - 为培养基不变色。

3 结论

微生态疗法是一个崭新的手段,可以解决治疗幽门螺杆菌引起疾病的传统疗法所出现的问题。乳酸菌具有耐酸性、抗菌性、安全性,是作为微生态疗法的最佳候选菌株之一。中国的传统食品中富含乳酸菌,从传统食品中筛选具有拮抗幽门螺杆菌的乳酸菌是一个非常有益的课题。本研究探讨具有拮抗幽门螺杆菌作用的植物乳杆菌 (*L. plantarum* 18) 的生物特性。该菌株的生长比较快,可以在低酸环境下生长,耐受胆盐,可作为潜在拮抗幽门螺杆菌的益生菌。

参考文献

[1] Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics [J]. Curr Opin Gastroenterol 2007 23: 679-692.
 [2] Kamiya S. *Helicobacter pylori* infection and probiotics [J]. Nippon Saikingaku Zasshi 2007 62: 271-277.
 [3] Drahoslava Lesbros-Pantoflickova In Cs-T, Andre L Blum. *Helicobacter pylori* and Probiotics [J]. The Journal of Nutrition, 2007 137: 812-818.

[4] Gill H S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003, 17: 755-773.

[5] Vitini E, Alvarez S, Medina M, et al. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria [J]. Biocell 2000 24: 223-232.

[6] Haller D, Bode C, Hammes W P, et al. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures [J]. Gut 2000 47: 79-87.

[7] Ryan K A, Daly P, Li Y, et al. Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli [J]. J Antimicrob Chemother 2008 61: 831-834.

[8] Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report [J]. Letters in Applied Microbiology 2009 48: 579-584.

[9] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains [J]. J Dairy Sci 2005 88: 55-66.

[10] Ding W K, Shah N P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage [J]. J Food Sci 2009 74: 53-61.

[11] 吕兵, 张国农, 杨瑞欢. 嗜酸乳杆菌生物学特性及其发酵乳的研究 [J]. 中国乳品工业 2002 30(5): 37-39.

[12] Ryan K A, Jayaraman T, Daly P, et al. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach [J]. Lett Appl Microbiol 2008 47: 269-274.

[13] Chen X, Tian F, Liu X, et al. In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods [J]. J Dairy Sci 2010 93: 5627-5634.

(上接第 179 页)

三种提取方法相结合, 可以更加全面地检测出胡椒中香气物质成分。

参考文献

[1] 朱世雄, 潘煜荣. 胡椒初加工工艺改革及配套设备的探讨 [J]. 热带作物加工, 1991(2): 32-38.

[2] 李明. 我国胡椒初加工的现状与分析 [J]. 广西热带农业, 2004 90(1): 37-39.

[3] Bai Y F, Xu H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer [J]. Acta Pharmacologica Sinica 2000 (21): 357-359.

[4] Pino J, Rodriguez Feo G, Borges P, et al. Chemical and sensory properties of black pepper oil [J]. Die Nahrung 1990 34(6): 555-560.

[5] 郑品梅, 邹纲明, 李彦威, 等. 胡椒油的研究进展 [J]. 食品科技 2007(1): 25-28.

[6] 袁钟, 图娅, 彭泽邦, 等. 中医辞海: 中 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 675-677.

[7] Larson R A. The antioxidants of higher plants [J]. Phytochemistry 1988(4): 969-978.

[8] H J Damien Dorman, Peter Surai, Stanley G Deans, et al. In Vitro Antioxidant Activity of A Number of Plant Essential Oils and Phytoconstituents [J]. Journal of Essential Oil Research 2000 12(2): 241.

[9] Kapoor IPS, Singh B, Singh G, et al. Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009 57(12): 5358-5364.

[10] Menon AN, Padmakumari K. Essential oil composition of four major cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) - IV [J]. Journal of Essential Oil Research 2005 17(2): 206-208.

[11] Wang Y, Jiang ZT, Li R, et al. Composition Comparison of Essential Oils Extracted by Hydrodistillation and Microwave-

assisted Hydrodistillation from Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Grown in China [J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2009 12(3): 374-380.

[12] Rouatbi M, Duquenoy A, Giampaoli P, et al. Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam [J]. Journal of Food Engineering 2007 78(2): 708-714.

[13] 李祖光, 乔剑峰, 胡伟, 等. 固相微萃取-气相色谱/质谱法分析白胡椒粉的风味成分 [J]. 理化检验: 化学分册 2005, 41(11): 820-822.

[14] 赵丽娟, 张捷莉, 李铁纯, 等. 海南地区白胡椒挥发油成分的研究 [J]. 鞍山钢铁学院学报 2001 24(4): 245-247.

[15] Cardeal ZL, da Silva MDRG, Marriott PJ, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles [J]. Rapid Communications In Mass Spectrometry, 2008, 56(5): 1689-1696.

[16] Leopold Jirovetz, Gerhard Buchbauer, Martin Benoit Ngassoum, et al. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry [J]. Journal of Chromatography A 2002 976: 265-275.

[17] M Plessi, D Bertelli, F Miglietta, et al. Effect of microwaves on volatile compounds in white and black pepper [J]. Lebensmittel-Technol 2002 35: 260-264.

[18] JAGELLA T, GROSH W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques [J]. European Food Research and Technology 1999 209: 16-21.

[19] Menon AN, Padmakumari K. Studies on essential oil composition of cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) - V [J]. JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH 2005 17(2): 153-155.