

# 及其衍生物对空肠弯曲菌体外粘附抑制作用的研究\*

金安娜\*\* 王焕妞 徐鸿贞

(苏州医学院微生物学教研室)

**摘要** 本实验采用体外 CFU 法及扫描电镜技术,观察了 20 种糖类及其衍生物对空肠弯曲菌体外粘附的抑制作用。实验结果表明: D-甘露糖、L-岩藻糖、棉子糖、 $\alpha$ -甲基甘露糖、水解乳糖及 N-乙酰半乳糖胺对 CJ-S131 菌株粘附 Hep-2 细胞具有部分抑制作用。其中 D-甘露糖和 L-岩藻糖的粘附抑制率分别为 44.6% 和 38%, 在 1—20mg/ml 的糖浓度范围内,这两种糖对空弯菌粘附作用的抑制效应随糖浓度上升而提高。其余 4 种糖的粘附抑制率在 13—36% 之间。此外,本实验结果还提示,糖的分子构型与其抑制细菌粘附的能力有关。

**关键词** 空肠弯曲菌;体外粘附;糖;抑制

细菌性感染大多是从细菌粘附于宿主粘膜上皮细胞开始,然后细菌入侵或产生致病因子而引起疾病<sup>[1]</sup>。如能阻断细菌的粘附,就破坏了其致病的首要环节<sup>[2]</sup>。近年来,糖类及其衍生物对某些革兰氏阴性细菌粘附的影响作用,已引起人们的重视<sup>[3]</sup>。本试验采用体外菌落形成单位法 (Colony forming-units method in vitro, 以下简称体外 CFU 法),观察了多种糖类及其衍生物对空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*, 以下简称空弯菌) 体外粘附的抑制作用,探讨空弯菌的粘附受体的性质及抑制粘附的机理,为采用粘附受体成分或其类似物诊断和治疗细菌性感染提供实验依据。

## 材料与 方法

### (一) 细菌及培养条件

本室保存的 CJ-S131 菌株。Campy-BAP 培养基中加 5% 脱纤维羊血及三种抗菌素 (先锋霉素 I, 两性霉素 B, 多粘菌素 B)。接种细菌后,置 5% O<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub> 和 10% CO<sub>2</sub> 的微需氧环境中孵育 20—24 小时。用 pH7.2 的无菌 PBS 洗下菌苔,配成 2 × 10<sup>9</sup>CFU/ml 的细菌悬液 (Mc Farland 比浊管法),于 72-1 型分光光度计上测得 ( $\lambda = 500\text{nm}$ ) OD = 1.25, 1500 r/min 离心 15 分钟,弃上清,用 RPMI 1640 液补足至原体积,再稀释成 2 × 10<sup>7</sup>CFU/ml 菌液备用。

### (二) 细胞

本室保存的 Hep-2 细胞。营养液为 RPMI 1640 液中加入 10% 混合小牛血清,细胞计数后用营养液配成 2 × 10<sup>5</sup> 细胞/ml 的浓度,在每个培养瓶中加入 1ml 细胞悬液,置 37℃ 静置培养 18—24 小时,形成单层细胞后,用 Hank's 液洗涤 3 次备用。

### (三) 糖类及其衍生物

D-甘露糖、D-果糖、D-岩藻糖、L-岩藻糖为英格兰制品。鼠李糖为德国制品。阿拉伯胶糖和卫矛糖为日本制品。蕈糖、L-山梨糖、棉子糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、水解乳糖、木糖、菊糖、蔗糖、D-葡萄糖和半乳糖均为国产品。 $\alpha$ -甲基甘露糖和 D-甘露糖胺由中国科学院上海生物化学研究所王克夷老师惠赠。

### (四) 实验方法

1. 体外 CFU 法: 用 RPMI 1640 液将糖分别稀释成 2—40mg/ml 的溶液,取 2 × 10<sup>7</sup> CFU/ml 空弯菌悬液分别与等量的上述糖溶液混合,37℃ 作用 30 分钟后,每瓶细胞中加入 1ml 含糖细菌悬液,对照组加入 1 × 10<sup>7</sup>CFU/ml 空弯菌悬液 1ml,37℃ 作用 4 小时,弃去含糖菌液,用无菌 PBS 洗涤 8 次,加入适量 0.02% EDTA (乙二胺四乙酸) 液在室温下作

\* 国家自然科学基金会资助课题

\*\* 现在单位南京卫生学校

用 5—8 分钟后弃去,每瓶加入 1ml 无菌 PBS,吹吸混匀后取 0.1ml 细菌细胞混合液滴于 Campy-BAP 平板上,用 L 形玻棒铺匀,置 42℃ 微需氧环境中培养 48 小时后计数菌落。

2. 扫描电镜法: 将  $2 \times 10^7$  CFU/ml 的空弯菌悬液分别与 40mg/ml 的 D-甘露糖和 L-岩藻糖按 1:1 比例混匀, 37℃ 作用 30 分钟, 在装有盖玻片的细胞培养瓶中加入 1ml 含糖细菌悬液, 于 37℃ 作用 4 小时, 以 PBS 洗涤 8 次, 取出盖玻片, 用 4% 戊二醛于室温下固定 2 小时, PBS 浸洗 1 小时, 1% 锇酸固定 1 小时, 再依次在 35—100% 乙醇中脱水, 标本经干燥、真空喷金镀膜后, 在日本 S-450 扫描电镜上观察。每一样品在四个不同方位及中心部位共取 5 点, 每点观察 20 个 Hep-2 细胞, 计数有空弯菌粘附的细胞数。

### (五) 统计学分析

因菌落数遵循泊松分布, 原始数据均先经平方根转换后, 再进行单因素方差分析。

#### 1. 体外 CFU 法:

CFU/10000 细胞

$$= \frac{\text{菌落数} \times \text{细胞悬液总量(ml)} \times 10000}{\text{细胞总数} \times \text{铺平板混合悬液量(ml)}}$$

粘附指数 (AI) =  $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/10000 \text{ 细胞})$

体外 CFU 法的粘附抑制率

$$= \left(1 - \frac{\text{试验组 AI}}{\text{对照组 AI}}\right) \times 100\%$$

#### 2 扫描电镜法:

$$\text{粘附率} = \frac{\text{有空弯菌粘附的细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 100\%$$

扫描电镜法的粘附抑制率

$$= \left(1 - \frac{\text{试验组粘附率}}{\text{对照组粘附率}}\right) \times 100\%$$

## 试验结果

### (一) 体外 CFU 法

1 D-甘露糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制作用(图 1): 图 1 结果提示, 对照组与各试验

组的 AI 均有显著性差异。除浓度为 10—20 mg/ml D-甘露糖的两试验组间的 AI 无显著性差异外, 其余各试验组间的 AI 均有显著性差异。随着糖浓度的上升, 各试验组的 AI 逐渐降低, 而其粘附抑制率却随着糖浓度的上升而提高。

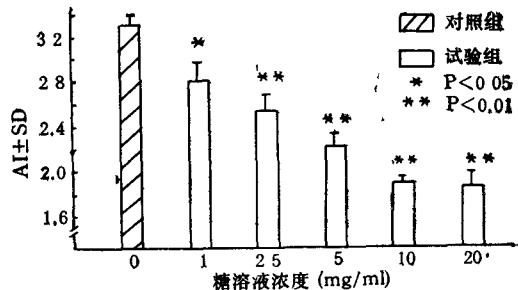


图 1 D-甘露糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制作用 (“T”标准差)

2 L-岩藻糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制作用(图 2): 图 2 结果提示, 对照组与含 L-岩藻糖 1 和 5mg/ml 浓度的两个试验组间的 AI, 无显著性差异, 与其余各试验组的 AI 有显著性差异。表 1 结果说明, D-甘露糖和 L-岩藻糖在 5—20mg/ml 的浓度范围内, 对 CJ-S131 菌株粘附的抑制效果随糖浓度的增加而增强。

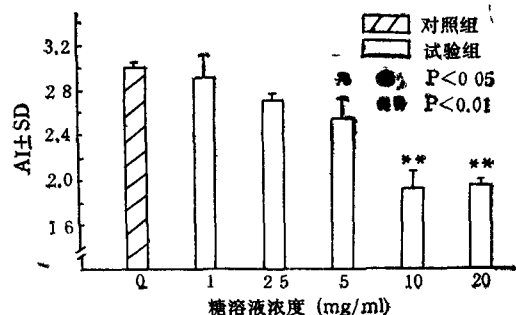


图 2 L-岩藻糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制作用

3 棉子糖、 $\alpha$ -甲基甘露糖、水解乳糖及 N-乙酰半乳糖胺对 CJ-S131 菌株粘附的抑制作用: 单因素方差分析分别提示, 上述 4 种糖在 1—5mg/ml 的浓度范围内, 对照组与试验组的 AI 均无显著性差异, 在糖浓度达 20mg/ml 时, 棉子糖、 $\alpha$ -甲基甘露糖及水解乳糖对 CJ-S131

菌粘附抑制率分别为 36%、19%、15%，N-乙酰半乳糖胺的浓度为 10mg/ml 时，对 CJ-S131 菌株的粘附抑制率为 13% (表 2)。

表 1 两种糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制率

	不同糖浓度 (mg/ml) 的粘附抑制率 (%)					
	对照组	1	2.5	5	10	20
D-甘露糖	0	15	25	34	44	44.6
L-岩藻糖	0	3	11	24	37	38

表 2 糖对 CJ-S131 菌株粘附的抑制率

糖 类	粘附抑制率 (%)
D-甘露糖	44.6
L-岩藻糖	38
棉子糖	36
α-甲基甘露糖	19
水解乳糖	15
N-乙酰半乳糖胺	13

本试验采用的其余 14 种糖类的试验组与对照组的 AI 均无显著性差异。

### (二) 扫描电镜观察

20mg/ml D-甘露糖和 L-岩藻糖的两个试验组与对照组相比 (图版 1)，粘附于 Hep-2 细胞表面的 CJ-S131 菌数明显减少。据统计学分析，上述两种糖对 CJ-S131 菌株的粘附抑制率分别为 43% 及 29%。

## 讨 论

细菌对宿主细胞的粘附是其致病的先决条件，阻断细菌的粘附则可防止感染的发生<sup>[4]</sup>。有学者报道，部分革兰氏阴性细菌对宿主细胞的专一性识别及粘附可被某些糖类抑制<sup>[5]</sup>，从而推测革兰氏阴性细菌的粘附受体与糖类有关<sup>[6]</sup>。本试验结果表明，我们采用的 20 种糖类

及其衍生物中，有 6 种具有部分抑制 CJ-S131 菌株对 Hep-2 细胞的粘附作用。其机制可能是糖类封闭了细菌的粘附素，抑制其与宿主细胞粘附受体的结合。6 种糖对 CJ-S131 菌株的粘附抑制率在 13—44.6% 之间，提示各种糖对空弯菌粘附的抑制作用强弱不等，说明不同糖类封闭空弯菌的粘附素的能力不同。这可能与细胞表面各种粘附受体的密度和特异性有关。本试验发现，D-甘露糖和 L-岩藻糖在一定的浓度范围内，其抑制空弯菌粘附的作用随糖的浓度的提高而相应增强，说明这两种糖的浓度与抑制效应有相关性。从糖类的生化分析可知，D-甘露糖和 D-葡萄糖都是六碳糖，差别仅在第二个碳原子的羟基位置不同，但 D-甘露糖对 CJ-S131 菌株的粘附有较强的抑制作用，而 D-葡萄糖则无此作用。L-岩藻糖与 D-岩藻糖的差别仅是最末一个羟基的空间位置不同，前者有抑制粘附的作用，而后者则无。这些说明糖类的空间构型可能会影响其抑制粘附的作用。有试验证实，L-岩藻糖对完整的空弯菌的粘附有部分抑制作用，但不能抑制经纯化的空弯菌的鞭毛与宿主细胞的结合<sup>[7]</sup>。由此推测，L-岩藻糖可能是空弯菌菌体表面成分的粘附受体。更确切的结论还有待深入研究。

### 参 考 文 献

- 1 Sansonetti P J et al *Infect Immun* 51(2) 461, 1986
- 2 Altridge S R & D Rowley *J Infect Immun Dis* 147 (5), 864 1983
- 3 Sharon N et al *Adhesion and Microorganism Pathogenicity* P 119—136 Pitman Medical, London, 1981
- 4 Knutton S et al *Infect Immun* 55(1) 69, 1987
- 5 邬光惠等: 中华微生物和免疫学杂志, 6(5): 276, 1986.
- 6 Enerback S et al *J Clin Microbiol* 25(2) 407, 1987
- 7 McSweeney E & R I Walker *Infect Immun* 53(1) 141, 1986

(上接封四)

- ..... Li Bo et al (241)
- Thin Layer Chromatography for Determinating of Aflatoxin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> and Ochratoxin in Forage ..... Yin Weishen et al (243)
- Studies on the Analytical Method of Chemical Composition in the Cell Wall of Actinomyces ..... Liang Rongfang et al (247)
- Study on the Method of Storage-sputum Specimens for the Culture of *Mycobacterium tuberculosis* at Room Temperature ..... Song Zhiying et al (250)