

## Caco-2 细胞与肠道菌共培养初建体外肠道共生模型

陈晓清<sup>1</sup>, 焦红<sup>2\*</sup>, 程树军<sup>3</sup>, 易敏英<sup>3</sup>, 刘静宇<sup>3</sup>, 许龙岩<sup>3</sup>, 刘超<sup>3</sup>  
(1.中山大学公共卫生学院,广东广州 510080;2.广东出入境检验检疫局,广东广州 510623;  
3.广东检验检疫技术中心食品实验室,广东广州 510623)

**摘要:**【目的】构建体外模拟肠道共生系统,用于评价食源性抗菌药及其耐药菌作用于肠道菌群时对人体健康造成的危害风险。【方法】21 d 体外培养构建 Caco-2 细胞三维肠上皮,分成无菌对照组、混合的正常菌群组、沙门菌组、混合菌群-沙门菌组 4 组,制备混悬液,各组分别单独和混合培养 4 h,荧光定量 PCR 法测试共培养前后各菌 16S rDNA 菌量变化,电阻仪测试跨膜上皮电阻 (TEER) 数量;免疫荧光染色观察紧密连接蛋白 ZO-1 变化,评价三维肠上皮屏障功能的改变。【结果】在体外共培养模型内,4 种肠道菌混合培养 4 h 后同单独培养组间比较,细菌量增长无统计学差异 ( $P > 0.05$ );需氧菌的增长速度明显高于厌氧菌 ( $P < 0.01$ ),厌氧菌:需氧菌浓度比接近 100:1,厌氧菌仍为优势菌。TEER 和 ZO-1 免疫荧光染色结果均提示混合肠道菌群对 Caco-2 细胞三维肠上皮无明显破坏,侵入性沙门氏菌可显著降低 TEER 值,并观察到模型的 ZO-1 结构受到破坏。这种破坏作用在混合肠道菌群加沙门菌组较轻。【结论】Caco-2 细胞三维肠上皮同乳双歧杆菌、植物乳酸杆菌、大肠杆菌和粪肠球菌组成的混合菌群体外共培养能建立稳定的体外肠上皮模型,并具有生物学活性;正常肠道菌群对侵入性沙门菌有拮抗作用。该模型可进一步完善作为食源性抗菌药、耐药菌与肠道系统相互作用研究模型的基础。

**关键词:** Caco-2 细胞;体外肠道模型;食源性耐药菌;16S rDNA

**中图分类号:** Q26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)01-0121-06

### Co-culture of Caco-2 Intestinal Cell and Intestinal Floras to Build an In Vitro Intestinal Model

CHEN Xiao-qing<sup>1</sup>, JIAO Hong<sup>2\*</sup>, CHENG Shu-jun<sup>3</sup>, YI Min-ying<sup>3</sup>, LIU Jing-yu<sup>3</sup>, XU Long-yan<sup>3</sup>, LIU Chao<sup>3</sup>

(1. School of Public Health of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Food Lab of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technology Center, Guangzhou 510623, China)

**Abstract:** 【Objective】 To build an in vitro intestinal model which will be used to assess the harm risk caused by foodborne antimicrobial and the resistance bacteria to human health. 【Method】 The Caco-2 intestinal epithelial models after 21 days culture was built, 4 groups were divided: negative control group, mix florals group, Salmonella group, *mix florals & Salmonella group*, the time for co-culture was 4h. The 16S rDNA fragment of each flora before and after co-culture by quantitative fluorescence PCR was quantified respectively, and the changes of Caco-2 cells intestinal integrity were evaluated by detecting Trans-epithelial electrical resistance (TEER) and the immunofluorescence staining image of tight junction protein ZO-1. 【Results】 From the 16S rDNA fragment of four intestinal florals quantified by qPCR, there were no significant changes between alone cultured and the mixed culture ( $P > 0.05$ ), the 2 aerobes grown significantly faster than the growth of the 2 anaerobes ( $P < 0.01$ ). B/E was near 100:1, showed that the aerobes were dominant bacteria. Compared with the negative control, TEER and ZO-1 distribution in mix florals group had no significant change and revealed that there were no significant damages to the integrity of Caco-2 intestinal epithelial cells, while in Salmonella group, TEER reduced significantly, and the destruction of ZO-1 structure was observed. But the damages in mix florals & Salmonella group (mixed florals pre-planted) could be some extent reduced. 【Conclusion】 This research built an primary in vitro co-culture intestinal epithelial model with Caco-2 cell and 4 intestinal florals-*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantum*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. The model showed the certain stability and biological activity. Normal intestinal flora had inhibitory effect to invasive salmonella. Furthermore, we will refine the model to lay the foundation to study the interaction of foodborne antimicrobial drug, drug resistant bacteria and intestinal system.

**Key words:** Caco-2 cell; in vitro intestinal model; foodborne AMRM; 16S rDNA

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1): 121-126]

收稿日期: 2011-11-15

基金项目: 广东省自然科学基金(10151062301000002)

作者简介: 陈晓清, 硕士研究生, E-mail: morrikidchen@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 焦红, 研究员, 中山大学硕士生导师, 研究方向: 食品、化妆品检验与安全评估, E-mail: jhciq1228@163.com

目前学术界普遍认为,动物食品中抗菌药残留对人肠道微生态造成的危害在于破坏正常菌群,促进耐药菌的繁殖,降低正常菌群的定植抗力等方面,观察到的主要危害是引起结肠中耐药菌株的增加。近年来动物源性食品中抗菌药残留及其耐药菌对人体肠道菌群的研究逐渐增多,WHO、FAO 等国际组织提出用体内和体外模型及其他方法来评估抗菌药在食品中残留的安全限值<sup>[1]</sup>。文献综述,用于研究抗菌药残留对人肠道菌群影响的离体和活体方法包括:抗菌药对肠道细菌的最低抑菌浓度(MIC)测定、半连续和连续流动培养系统离体恒化器模型、模拟的肠道模型、人志愿者、普通实验动物、悉生小鼠和携带人肠道菌群的啮齿动物(HFA)<sup>[2]</sup>。但是体内动物模型的方法成本高昂,难以模拟和分析人体肠道菌群受病原菌或耐药菌侵袭时的实时生物活性。本研究采取人体来源的 Caco-2 细胞,建立相对简便、实验条件容易控制的体外模型,用于进行复杂的相互作用机制研究<sup>[3]</sup>,评价食源性致病菌对肠上皮的作用及正常混合菌群对肠上皮的保护,为下一步研究食源性耐药菌作用人体肠道菌群的机理提供研究手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

Caco-2 细胞(体外人结肠腺癌细胞系,ATCC HTB-37,55~60代),赛业(广州)生物科技公司提供。大肠埃希菌(ATCC 25922)、粪肠球菌(ATCC 29219)、乳双歧杆菌(Bi-07)、植物乳酸杆菌(Lp-115),丹尼斯克公司生产,来源于人体肠道菌。鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028),均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

### 1.2 主要仪器与试剂

1.0  $\mu\text{m}$  插入式细胞培养皿(美国,Millipore,有效膜面积为 1.12  $\text{cm}^2$ );比浊计(法国 Merieux);Millicell-ERS 电压电阻表(美国,Millipore);核酸纯化系统(日本 PSS Magtration-System 12GC),PCR 仪(德国 Biometra UNOII),电泳仪(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech EPS 601),real-time PCR 仪(美国 ABI 7900HT Fast Real-time PCR System),核酸定量仪(美国 Thermo Scientific NANODROP 1000),凝胶图像分析系统(美国 Bio-rad)等。DNA 提取试剂盒(日本 PSS MagaZorb DNA Kit-200N),Ex Taq PCR 试剂盒,100bp DNA Ladder Marker,Agarose Regular(大连宝生 TaKaRa),5 × TBE(美国 Gene Base Bioscience Co.),Sybr Green I 荧光定量 PCR 试剂盒(上海生工),普通营养肉汤,MRS 琼脂(北京陆桥),血平皿(广州环凯)。H-DMEM(Gibco)、TBD 优级胎牛血清(天津灏洋);胰酶、EDTA、青霉素、链霉素(Sigma),HEPES(广州威佳,超纯级);乙酸钠,无水乙醇,NaHCO<sub>3</sub>,台盼蓝和 40 g/L 多聚甲醛(AR),无菌超纯水;ZO-1 鼠单克隆抗体,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗鼠 II 抗(美国 Invitrogen)。16S rDNA 片段特异 PCR 引物由上海生工合成(表 1)。

### 1.3 体外三维肠上皮模型的建立及 TEER 的测试

取传代 3 次后生长良好的 Caco-2 细胞,调节细胞悬液浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL,均匀接种于插入式培养皿顶端,每皿接种 500  $\mu\text{L}$ ,37 °C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育 5 h 后于基底端加入 1.5 mL 培养基。第 1~7 天隔日更换顶端培养基,第 8~14 天每日更换顶端培养基,隔天更换基底端培养基,第 15~21 天每天更换顶端及基底端培养基。每天测定跨膜电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER):

表 1 4 株肠道菌 PCR 合成引物信息<sup>[4-6]</sup>

Table 1 The PCR primer information of the 4 intestinal floras

Name (fragment length/ bp)	Sequences	Temperature
<i>Escherichia.coli</i> subgroup(340)	F:5'-gTT AAT ACC TTT gCT CAT TgA-3' R:5'-ACC Agg gTA TCT AAT CCT gTT-3'	60°C
<i>Enterococcus</i> spp. (140)	F:5'-CCC TTA TTg TTA gTT gCC ATC ATT-3' R:5'-ACT CgT TgT ACT TCC CAT TgT-3'	59°C
<i>Bifidobacterium lactis</i> (194)	F:5'-CCC TTT CCA Cgg gTC CC-3' R:5'-AAg ggA AAC CgT gTC TCC AC-3'	58°C
<i>Latics Plantum</i> (70)	F:5'-Agg TgT TAT CCC CCg CTT CT- 3' R:5'-TTA CAT TTg AgT gAg Tgg CgA ACT- 3'	60°C

将 Millicell-ERS 电压电阻表电极浸泡于 700 mL/L 的乙醇溶液 15 min, 风干 15 s, 用 H-DMEM 冲洗电极, 开关打开到 ON, R/V 旋至 R 位置, 将电极插入待测的插入式培养皿, 长电极在外部, 短电极在内部, 短电极不可接触到细胞表面, 按下 Measure 按钮, 测得稳定的电阻读数, 换算单位面积电阻 = 电阻  $R(\Omega)$  / 有效膜面积 ( $\text{cm}^2$ ), 连续 21 d 培养并记录 TEER。

#### 1.4 混合菌悬液的制备

实验前用 MRS 平板接种乳双歧杆菌和植物乳杆菌, 厌氧培养 37 °C 48 h; 大肠杆菌、粪肠球菌和沙门菌分别用普通肉汤培养基 37 °C 培养 24 h。各菌用 PBS 混匀,  $1\ 540 \times g \times 10\ \text{min}$  离心弃上清, 重悬于不含双抗和 FBS H-DMEM 的培养基中, 制备混合菌悬液。混合菌悬液中各菌浓度分别为乳双歧杆菌和植物乳杆菌约  $10^9\ \text{cfu/mL}$ ; 大肠杆菌和粪肠球菌约  $10^6\ \text{cfu/mL}$ 。沙门氏菌用普通肉汤培养基 37 °C 培养 24 h, 同法制备浓度为  $10^8\ \text{cfu/mL}$  沙门氏菌悬液<sup>[7]</sup>。

#### 1.5 肠道菌 16S rDNA PCR 定量

1.5.1 DNA 模板制备 分别挑取单个菌落接种于血平皿, 培养 24 h 后挑生长良好肠道菌株重悬于 PBS,  $1\ 540 \times g \times 10\ \text{min}$  离心弃上清, 再重悬于无菌超纯水, 置核酸纯化系统提取 DNA。

1.5.2 PCR 反应体系与程序 每 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系包括: TaKaRa Ex Taq 酶 0.125  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  Ex Taq Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , Primer F、R (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 17.375  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min 结束。不同引物和 DNA 模板之间进行交叉扩增, 用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 检测引物的特异性。

1.5.3 标准系列的制备 核酸定量仪测定提纯产物中 DNA 含量, 计算 DNA 拷贝数, 经适当稀释后获得荧光定量 PCR 的标准系列<sup>[8]</sup>。

1.5.4 荧光定量 PCR 测试共培养前后各菌 16S rDNA 数量变化 每 50  $\mu\text{L}$  Real-time PCR 反应体系包括: Hotstart Fluo-PCR Mix 25  $\mu\text{L}$ , Primer F、R (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 30 s, 58 ~ 60 °C (根据不同引物选择) 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 升温至 95 °C。每次测试包括标

准系列、单独和混合培养前后的样品菌悬液, 每个样做 3 个复孔。各标准曲线分别为: 大肠杆菌  $y = -2.6545 \lg X + 32.064$  ( $R^2 = 0.9971$ ), 粪肠球菌  $y = -3.3594 \lg X + 34.738$  ( $R^2 = 0.9902$ ), 乳双歧杆菌  $y = -3.3582 \lg X + 34.316$  ( $R^2 = 0.9975$ ),  $y = -3.0938 \lg X + 32.565$  ( $R^2 = 0.9886$ )。通过双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) / 肠杆菌 (*Escherichia*) 之间的比值, 即 B/E = 乳双歧杆菌平均浓度 / 大肠杆菌平均浓度, 得出厌氧菌与需氧菌比例<sup>[9]</sup>。

#### 1.6 Caco-2 细胞与混合菌共培养

将培养 21 d 的 Caco-2 细胞三维肠上皮, 分为无菌对照组、混合菌群组、沙门菌组、混合菌群-沙门菌组 4 组。混合菌群组取用 H-DMEM 制备浓度为  $10^9\ \text{cfu/mL}$  乳双歧杆菌和植物乳酸杆菌、浓度为  $10^6\ \text{cfu/mL}$  的大肠杆菌和粪肠球菌各 0.5 mL; 沙门菌组取浓度为  $10^8\ \text{cfu/mL}$  沙门菌悬液 0.5 mL。轻柔准确地将菌悬液接种至无菌对照组、混合菌群组、沙门菌组的肠上皮模型顶侧端, 混合菌群+沙门菌组先加入混合菌群悬液孵育 2 h, 再加入沙门菌悬液<sup>[7]</sup>, 每种处理重复 3 次。

#### 1.7 共培养后肠上皮屏障功能影响测定

接种前测各组 TEER 值, 全程 37 °C 共培养 4 h。共培养结束后吸去菌悬液, 用 H-DMEM 清洗, 检测并记录共培养后 1、2、3、4 h 的 TEER 值。

移去培养基, PBS 清洗, 每个单层顶部添加 4% 多聚甲醛/PBS, 室温固定, 进行紧密连接蛋白 ZO-1 免疫组化分析, FITC 荧光显色, 荧光显微镜观察并拍照。并结合紧密连接蛋白 ZO-1 的免疫荧光染色图片评价 Caco-2 细胞三维肠上皮完整性的变化。

#### 1.8 统计分析

使用 SPSS 13.0 软件包, 两独立样本  $t$  检验比较 16S rDNA 浓度, 检验水准  $\alpha = 0.05$ ; 重复测量方差分析比较不同时间点 TEER 的差异, 球形检验水准  $\alpha = 0.10$ , 方差分析检验水准  $\alpha = 0.05$ , 进行两两比较。

## 2 结 果

### 2.1 16S rDNA 荧光定量 PCR 结果

经凝胶电泳结果验证实验设计引物特异性高, 每组引物扩增产物均未见有其它肠道菌交叉存在。

4 株肠道菌单独培养和混合培养 16S rDNA

荧光定量 PCR 结果见表 2。各菌单独培养和混合培养 4 h 前后 16S rDNA 浓度明显增长, 经  $t$  检验,  $P < 0.05$ 。4 株肠道菌在单独培养和混合培养

时, 需氧菌的增长速度明显高于厌氧菌 ( $P < 0.01$ ), 培养 4 h 后, B/E 比值接近 100:1, 厌氧菌仍为优势菌。

表 2 4 株肠道菌的 16S rDNA 定量结果

Table 2 The result of 16 S rDNA qPCR

(lg copies/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

Intestinal bacteria	0 h	Cultured alone 4 h	$t$	Mixed culture 4 h	$t$
<i>E. coli</i>	5.69 ± 0.23	6.13 ± 0.66 <sup>1)</sup>	4.722	6.29 ± 0.46 <sup>2)</sup>	5.412
<i>Enterococcus faecalis</i>	5.86 ± 0.35	6.26 ± 0.36 <sup>1)</sup>	3.849	6.52 ± 0.10 <sup>2)</sup>	4.892
<i>Bifidobacterium</i>	8.08 ± 0.37	8.16 ± 0.45	1.790	8.41 ± 0.75	1.076
<i>Lactobacillus</i>	8.09 ± 0.46	8.20 ± 0.36	1.550	8.25 ± 0.75	1.649
B/E	200.33	95.63		82.66	

1)  $P < 0.05$  cultured alone 4 h vs 0 h; 2)  $P < 0.05$  Mixed culture 4 h vs 0 h

## 2.2 共培养后各组 Caco-2 细胞 TEER 变化

共培养前各组单独在 Caco-2 三维肠上皮模型达到的 TEER 为  $(305 \pm 17) \Omega/\text{cm}^2$ , 细胞间紧密连接分化成熟, 单层完整性良好, 符合实验需要。共培养 4 h 后各组 TEER 见图 1。由图 1 可见, 同 Caco-2 三维肠上皮细胞共培养 1 h 内, 无菌对照组的 TEER 下降幅度最小, 沙门菌组下降幅度最大, 混合菌组同混合菌加沙门菌组的下降一致; 在 2~4 h 的共培养过程中, 对照组的 TEER 恢复依次优于混合菌组、混合菌加沙门菌组和沙门菌组; 沙门菌组在共培养 4 h 内的 TEER 恢复不明显。

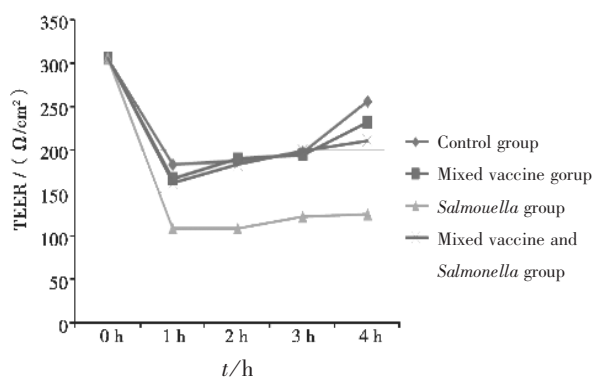


图 1 共培养结束后 TEER 恢复情况

Fig.1 The recovery of the TEER after the co-culture

各组共培养 1、2、3、4 h 内的 TEER 见表 3。在  $\alpha = 0.10$  检验水准下, 球形检验的  $P = 0.118$ , 该资料符合重复测量方差分析条件。方差分析结果提示, 不同菌群组间与不同共培养时间的 TEER 结果有极显著差异 ( $F = 34312.165, P < 0.0001$ ); 各

菌群组间的 TEER 有极显著差异 ( $F = 460.5785, P < 0.0001$ ); 共培养时间不同, 其 TEER 结果也有显著差异 ( $F = 104.987, P < 0.0001$ )。

两两比较结果表明: 无菌对照组在 1 h, 2 h 之间 TEER 下降不显著, 统计上无明显差异 ( $t = 0.895, P = 0.393$ ), 3~4 h 间差异极显著 ( $t = 11.280, P < 0.0001$ ); 同无菌对照组相比, 各组在共培养 1 h 后的 TEER 均有显著性差异; 2~3 h 间混合菌群组和混合菌-沙门菌组与无菌对照组相比差异不明显 ( $t$  分别为 0.334、1.140、0.522 和 0.251), 3~4 h 内出现明显差异 ( $t = 3.721, 5.884, P < 0.001$ )。

混合菌群组和混合菌-沙门菌组在共培养全程 4 h 内, 2~3 h 和 3~4 h 间的 TEER 下降明显, 自身比较统计上有显著差异 ( $t$  分别为 3.169, 5.564, 11.602, 4.362, 6.277 和 6.677;  $P < 0.001$ )。

沙门氏菌组同其他 3 组相比, 1 h 时间段内的 TEER 下降幅度差异极其显著 ( $t$  值依次为 17.837, 10.817, 21.366,  $P < 0.0001$ ), 远高于其余 3 组。而在 2~3~4 h 的 3 个时间段内, 沙门菌组自身的 TEER 恢复不显著。

## 2.3 ZO-1 免疫荧光染色形态学变化

各组免疫荧光染色结果见图 2。由图 2A 可见, 无菌对照组 ZO-1 染色在细胞边缘分布均匀, 细胞排列紧密呈铺路石状; 图 2B 沙门菌组 ZO-1 染色分布不均匀, 亮度暗且细胞间隙增多; 图 2C 混合菌群组 ZO-1 染色分布与无菌对照组相近, 细胞间未见明显间隙; 图 2D 混合菌群-沙门菌组的形态学变化介于混合菌群组和沙门菌组之间, 细胞间隙较沙门菌组少。

表 3 各组不同共培养时间段的 TEER 结果

Table 3 The TEER result of different groups

( $\bar{x} \pm s, \Omega/\text{cm}^2$ )

Groups	1 h	2 h	3 h	4 h
Sterile control group	123 ± 9	118 ± 7	109 ± 10 <sup>3)</sup>	50 ± 11 <sup>4)</sup>
Mixed vaccine group	139 ± 9 <sup>1)</sup>	116 ± 14 <sup>3)</sup>	112 ± 7 <sup>4)</sup>	74 ± 9 <sup>2)4)</sup>
<i>Salmonella</i> group	197 ± 4 <sup>2)</sup>	197 ± 7 <sup>2)</sup>	183 ± 12 <sup>2)4)</sup>	180 ± 8 <sup>2)4)</sup>
The mixed vaccine and <i>Salmonella</i> group	144 ± 10 <sup>2)</sup>	122 ± 4 <sup>3)</sup>	107 ± 8 <sup>4)</sup>	95 ± 13 <sup>2)4)</sup>

1) Compared to sterile control group at the same time point,  $P < 0.05$ ; 2) Compared to sterile control group at the same time point,  $P < 0.01$ ; 3) Compared to the decline value at the first time point,  $P < 0.05$ ; 4) Compared to the decline value at the first time point,  $P < 0.01$ .

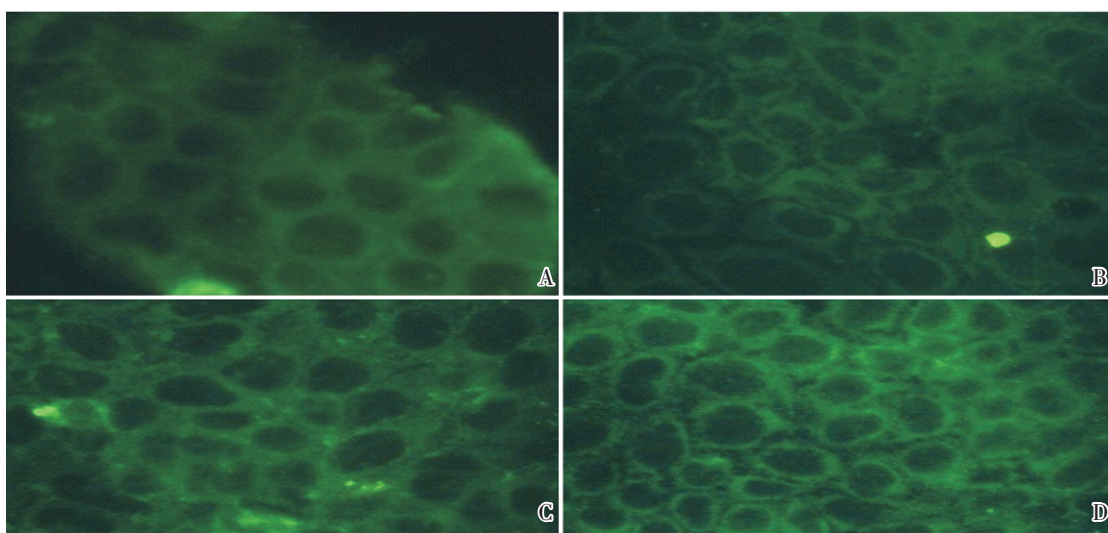


图 2 不同实验组 ZO-1 免疫荧光染色图比较

Fig.2 The ZO-1 immunofluorescence staining of different group

A: Sterile control group; B: *Salmonella* group; C: Mixed vaccine group; D: The mixed vaccine and *Salmonella* group,  $\times 200$

### 3 讨 论

目前学术界认为, 人体长期摄入抗菌药物残留的动物性产品, 可诱导及促进肠道菌丛耐药菌的增长、加速细菌间耐药基因的转移扩散、破坏肠道菌丛的定植抗力、导致外源病原菌定植或内源性机会致病菌的过度生长, 改变肠道菌丛的代谢活性等<sup>[10]</sup>。但是动物源性食品中抗生素残留以及残留量水平导致耐药菌增加的机理和剂量效应关系目前仍不十分清楚。发达国家已将抗菌药物残留对人体肠道菌群的影响列为动物源性食品安全评价的重要内容, 而我国关于这方面的研究报道不多。国内学者陈杖榴、刘建华等<sup>[11]</sup>利用离体肠道模型研究了低剂量恩诺沙星对人肠道细菌数量、菌群结构、定植抗力和耐药性的影响, 并采用变性梯度凝胶(DGGE)法分析低剂量抗菌药物对肠道

菌群多态性影响, 为我国抗菌药物残留微生物学安全评价模型的建立奠定了一定基础。建立抗菌药残留微生物学安全性评价模型和体外评价方法, 对开展重要抗菌药物残留对人体肠道菌群影响的基础研究, 评价抗菌药物残留对人体健康的危险性, 应对动物性食品出口贸易中的技术壁垒, 为我国动物源性食品中抗菌药物残留最高限量标准的制定提供科学依据, 提高我国食源性动物产品的国际竞争力, 有着十分重要的意义。

人类肠道菌群含有的细菌种类超过 500 种, 形成一层生物保护膜来保护肠道上皮细胞, 主要优势菌群有双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌、肠球菌等, 厌氧菌与需氧菌的数量比例约为 100:1~1 000:1, 当这些优势菌群比例发生变化时可能影响肠道功能, 若这种变化达到一定程度则出现肠道菌群紊乱或失调, 导致相应肠道疾病的发生<sup>[9]</sup>。本研究初步选择的 4 株人肠道正常菌群, 代表了人体肠

道菌群中的双歧杆菌、乳酸杆菌、肠杆菌和肠球菌 4 大主类,且根据中国健康人群肠道正常菌群参考范围<sup>[8]</sup>设置浓度比例,与人体真实肠道菌群情况接近,可以初步模拟人体肠道屏障中的菌群屏障即生物屏障。本实验通过双歧杆菌与大肠杆菌的浓度比(B/E 值)来反映厌氧菌和需氧菌的比例变化。16S rDNA 的定量结果显示了 4 株肠道菌单独培养与混合培养 4 h 后需氧菌虽较厌氧菌生长快,但厌氧菌仍为优势菌,与肠道实际情况相近<sup>[4]</sup>。

Caco-2 细胞在体外培养条件下分化为具有紧密连接的有尖刷状缘肠细胞的三维肠上皮,紧密连接组成了肠道屏障中的机械屏障。当外来致病菌(鼠伤寒沙门菌)入侵正常肠道系统时,将会以粘附等形式对肠上皮的完整性产生影响。跨上皮电阻 TEER 和紧密连接蛋白 ZO-1 是评价肠上皮的完整性,即:评价肠细胞紧密连接分化成熟的标志<sup>[7]</sup>。本实验选择共培养后恢复 TEER 值和紧密连接蛋白 ZO-1 作为判断肠上皮是否受到影响的指标,来模拟正常肠道菌群的保护作用。当鼠伤寒沙门菌加入后,引起了 Caco-2 三维肠上皮 TEER 显著下降并难以恢复;而混合菌群加沙门菌组的 TEER 值下降与无菌对照组接近,且 2 h 后 TEER 下降趋势显著减弱。Caco-2 三维肠上皮 ZO-1 免疫荧光染色发现,沙门菌组细胞间隙增多,部分地方出现空泡,证明入侵的沙门菌破坏了 Caco-2 三维肠上皮中紧密连接蛋白的正常分布;而混合菌群组虽也出现细胞间隙增多,但比沙门菌组分布均匀,与无菌对照组接近。说明模拟肠道菌群中的混合菌群对沙门氏菌的入侵产生了抗力,肠道正常菌群对 Caco-2 三维肠上皮完整性有一定的保护作用,从而保护正常肠上皮黏膜<sup>[12]</sup>。本实验证明初步建立的模拟肠道共生系统具有一定的生物活性和稳定性,且活性作用维持时间在 4h 之内。

但是人类肠道微生态系统终究是一个多种微生物相互依赖和作用的复杂系统,本模型仍处于初步建立阶段,实验需按照接近人体肠道正常菌群的数量和种类加以完善,提供一个研究耐药沙门菌入侵后影响肠上皮生理生化改变的体外模拟肠道共生系统,用于评价食源性抗菌药及其耐药菌作用于肠道菌群时对人体健康造成的风险。

#### 参考文献:

[1] 焦红,李荀,陈晓清,等.食源性抗菌药耐药微生物

风险评估国际研究进展[J].医学综述,2009,15(24):3770-3773.

- [2] 刘健华,陈杖榴.动物性食品中抗菌药残留对人体肠道菌群的影响及其研究模型与方法[J].动物医学进展,2003,4(2):37-40,48.
- [3] Wagner RD, Johnson SJ, Cerniglia CE. In vitro model of colonization resistance by the dnteric microbiota: effects of antimicrobial agents used in food-producing Animals[J]. J Antimicrob Agents CH, 2008, 52(4): 1230-1237.
- [4] Malinen E, Kassinen A, Rinttila T, et al. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria[J]. Microbiology, 2003, 149(9): 269-277.
- [5] Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, et al. Development of an extensive set of 16SrDNA-targeted primer for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. Appl Microbiol, 2004, 97(9): 1166-1177.
- [6] Klocke M, Mundt K, Idler C, et al. Erratum to "Monitoring Lactobacillus plantarum in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays", Systemat[J]. Appl Microbiol, 2006, 29(1): 9-58.
- [7] Nicola J, Mary HP, Philip MS, 等. 细菌与宿主上皮在体外的相互作用//上皮细胞培养指南 [M]. 北京:科学出版社, 2005: 275, 279, 288.
- [8] 杨美芬,王玉明,黄永坤,等.用细菌 16S rRNA 荧光定量 PCR 法检测肠道菌群的变化[J].中国微生态学杂志,2006,18(4):266-269.
- [9] 熊德鑫,伍丽萍.注意菌群失调检测的方法[J].中华医学杂志,2005,85:2746,2748.
- [10] Cerniglia CE, Kotarski S. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora [J]. Vet Pharmacol Ther, 2005, 28(2): 3-20.
- [11] 刘健华,陈杖榴,等.低浓度恩诺沙星在离体肠道模拟系统中对人体肠道菌群的影响 [J]. 中国兽医杂志,2003,39(7):38-41.
- [12] Jos FJGK, Peter CJT, Joshua JM. Probiotic bacteria induced improvement of the mucosal integrity of enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to Salmonella enteritidis [J]. Functional Foods, 2010, 2(3): 225-234.

(编辑 徐杰)