

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00690

嗜酸乳杆菌耗尽培养上清液对兔离体肠平滑肌收缩的影响

罗学娅^{1*}, 刘斌², 张诚², 熊慕琚², 焦旭梅²

1. 大连大学医学院药理学教研室, 大连 116622

2. 大连大学医学院临床医学系, 大连 116622

[摘要] **目的:**观察嗜酸乳杆菌 LA14 菌株耗尽培养上清液 (spent culture supernatant, SCS) 对兔离体肠平滑肌收缩的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法:**制备兔离体回肠标本, 分别记录肠平滑肌的正常收缩频率和幅度作为给药前对照, 然后按累积剂量分别加入嗜酸乳杆菌 SCS、活菌菌液、SCS+活菌菌液。每次给药 0.3 ml, 给药间隔 6 min, 在每次给药 4 min 后开始描记收缩曲线, 记录时间 2 min。观察嗜酸乳杆菌各治疗组对离体肠平滑肌收缩的作用。另取肠段按毛果芸香碱、阿托品或 SCS、再毛果芸香碱的顺序给药, 观察嗜酸乳杆菌 SCS 对 M 型胆碱受体的作用。**结果:**按累积剂量连续给予 SCS 或 SCS+活菌菌液 0.6~1.5 ml 后, 兔离体肠平滑肌收缩频率明显降低, 与给药前比较差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其余各点与给药前比较均无统计学差异。SCS、活菌菌液、SCS+活菌菌液在 0.3~1.5 ml 剂量范围内, 仅 SCS+活菌菌液在给药达 1.5 ml 时, 兔离体肠平滑肌收缩幅度的降低与给药前比较有统计学差异 ($P<0.05$), 其余各点均无统计学差异。SCS 或阿托品可明显对抗毛果芸香碱引起的兔离体肠平滑肌收缩幅度的增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), SCS 还能使兔离体肠平滑肌收缩频率明显减少 ($P<0.01$)。**结论:**嗜酸乳杆菌 SCS 可能通过阻断 M 型胆碱受体抑制兔离体肠平滑肌蠕动。

[关键词] 嗜酸乳杆菌; 耗尽培养上清液; 肠平滑肌; M 型胆碱受体

[中图分类号] R 975.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0690-04

Spent culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* influences contraction of isolated intestinal smooth muscle of rabbits

LUO Xue-ya^{1*}, LIU Bin², ZHANG Cheng², XIONG Mu-jun², JIAO Xu-mei²

1. Department of Pharmacology, Medical College of Dalian University, Dalian 116622, China

2. Department of Clinical Medicine, Medical College of Dalian University, Dalian 116622

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of spent culture supernatant (SCS) of *Lactobacillus acidophilus* strain LA14 on the contraction of isolated intestinal smooth muscle and to discuss the related mechanism. **Methods:** The ileum samples of rabbits were prepared and the contraction frequency and amplitude of intestinal smooth muscle were observed as the normal control. Then the SCS, bacterium suspension, and SCS with bacterium suspension were added by an accumulative dose to the culture media (0.3 ml per times, at an interval of 6 min), respectively. Four minutes after each administration, the contractive curves were recorded for 2 min. The influences of various groups of *Lactobacillus acidophilus* on the contraction of isolated intestinal smooth muscle were observed. The effect of SCS on M cholinceptor was observed by adding in order pilocarpine, atropine or SCS, and pilocarpine. **Results:** After continuous administration of SCS or SCS with bacterium suspension (0.6-1.5 ml), the contraction frequency of the intestinal smooth muscle was significantly lowered compared with before administration ($P<0.05$ or $P<0.01$), and there were no significant differences between before administration and other volume groups ($P>0.05$). Within the range of 0.3-1.5 ml, the SCS, bacterium suspension, and SCS with bacterium suspension resulted in no significant difference in reducing the contraction amplitude, except for SCS with bacterium suspension at 1.5 ml ($P<0.05$). SCS or atropine significantly inhibited pilocarpine-induced increase of contraction amplitude ($P<0.05$ or $P<0.01$). SCS also reduced the contraction frequency of the intestinal smooth muscle ($P<0.01$). **Conclusion:** SCS of *Lactobacillus acidophilus* may inhibit the peristalsis of the intestinal smooth muscle of rabbits by blocking M cholinceptor.

[收稿日期] 2008-09-02 **[接受日期]** 2009-01-15

[基金项目] 大连大学本科教育创新教育基金 (061520B). Supported by innovative and educational foundation for undergraduate of Dalian University (061520B).

[作者简介] 罗学娅, 硕士, 教授.

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0411-87402375, E-mail: xxylo@sina.com

[KEY WORDS] *Lactobacillus acidophilus*; spent culture supernatant(SCS); intestinal smooth muscle; M cholinceptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 690-693]

微生态制剂在治疗包括腹泻在内的多种病症中显示出良好的效果^[1-3],且具有不良反应少的优点,是目前相关研究的热点。嗜酸乳杆菌是人和动物肠道内乳酸菌家族中一种重要的有益菌,广泛分布于人和动物的消化道、阴道以及乳制品和发酵的动植物制品中。它是乳酸菌家族中极为受重视的益生菌之一,也是微生态制剂常用的主要菌种之一。嗜酸乳杆菌微生态制剂对婴幼儿及成年人急性腹泻、肠道炎症性疾病等均有良好疗效^[4-6]。我们的前期研究^[7-8]发现,嗜酸乳杆菌耗尽培养上清液(spent culture supernatant, SCS)能够调整抗生素相关性小鼠肠道菌群失调,对小鼠肠道益生菌群有明显的扶持作用,对小鼠实验性腹泻也有对抗作用,但具体机制尚不明确。为了进一步了解嗜酸乳杆菌 SCS 抗腹泻作用与抑制肠平滑肌蠕动的关联性,本研究观察了其兔离体肠平滑肌的作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 菌种培养 嗜酸乳杆菌 LA14 菌株,白色粉末状,由 Danisco 中国有限公司惠赠。将活化的嗜酸乳杆菌 LA14 菌株接种至乳酸杆菌选择性培养液(LBS)中,37℃厌氧培养 72 h。将菌悬液离心,1 500×g,10 min,分离得到 SCS。将 SCS 浓缩至 40%,备用。将菌沉淀分别用 LBS、浓缩至 40%的 SCS 重悬后制成活菌菌液、SCS+活菌菌液。菌悬液中活菌数量达到 1×10^{11} CFU/L。上述各液在动物实验开始之前配制,置于 4℃冰箱保存。

1.2 主要试剂及仪器 硝酸毛果芸香碱:上海医药采购供应站,批号 19980910;硫酸阿托品:天津金耀氨基酸有限公司,批号 0610191。HSS-1B 型离体器官恒温装置(成都仪器厂);JZJ01 型肌肉张力换能器(成都仪器厂);RM6240B 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);CO₂ 孵箱(Heraerus 公司);BD-233G 冰箱(海尔集团);VS-1300L-U 型净化工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)。

1.3 离体肠平滑肌运动试验 家兔 12 只,雌雄不限,体质量 2.5~3.0 kg,由大连大学实验动物中心提供。参照文献^[9],家兔禁食 24 h,处死后,迅速剖开腹腔,取出一段回肠,置于充气并保温(37℃)的台氏液中。沿肠壁剪去肠系膜,制成 1.5 cm 的肠段,

将肠内容物冲洗干净备用。实验时将肠段的一端固定于“L”形架的弯钩上,另一端与张力换能器相连。将“L”形架及肠段放于麦氏浴槽中并固定,同上条件保温通气。静息张力 1 g,平衡 40 min 后开始实验。

1.4 嗜酸乳杆菌各治疗组对兔离体肠平滑肌的作用 取家兔 5 只,每只按上述方法制备 1.5 cm 肠段 3 段。实验分为 SCS 组、活菌组、SCS+活菌组。分别记录肠平滑肌的正常收缩幅度和频率作为给药前对照,然后按累积剂量分别向麦氏浴槽中加入 SCS、活菌菌液、SCS+活菌菌液。每次给药 0.3 ml,给药间隔 6 min,在每次给药 4 min 后开始描记收缩曲线,记录时间 2 min。观察嗜酸乳杆菌各治疗组对离体肠平滑肌的作用。

1.5 嗜酸乳杆菌 SCS 对 M 型胆碱受体的作用 取家兔 7 只,每只按上述方法制备 1.5 cm 肠段 2 段。实验分为 SCS 组和阿托品组。分别记录肠平滑肌的正常收缩幅度和频率作为给药前对照,然后向麦氏浴槽中加入 1%硝酸毛果芸香碱溶液 0.1 ml,待作用 2 min 后分别加入 1%硫酸阿托品溶液 0.2 ml 或 SCS 1.0 ml,2 min 后再次加入 1%硝酸毛果芸香碱溶液 0.1 ml,作用 2 min。观察 SCS 对 M 型胆碱受体的作用。

1.6 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计学软件对嗜酸乳杆菌 SCS、活菌、SCS+活菌对收缩频率和收缩幅度影响的实验数据分别进行方差分析,当 $P < 0.05$ 时,各组分别进行给药后不同累积剂量组与给药前组比较的 Dunnett t 检验。对嗜酸乳杆菌 SCS 和阿托品对收缩频率和收缩幅度影响的实验数据分别进行方差分析,当 $P < 0.05$ 时,各组再分别进行两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 嗜酸乳杆菌各治疗组对兔离体肠平滑肌收缩的影响

2.1.1 收缩频率 结果(图 1、表 1)表明:在累积给予 0.6~1.5 ml 的 SCS、SCS+活菌后,兔离体肠平滑肌收缩频率明显降低,与给药前比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余各点与给药前比较均无统计学差异($P > 0.05$)。结果表明 SCS 能明显抑制离体肠管的蠕动。

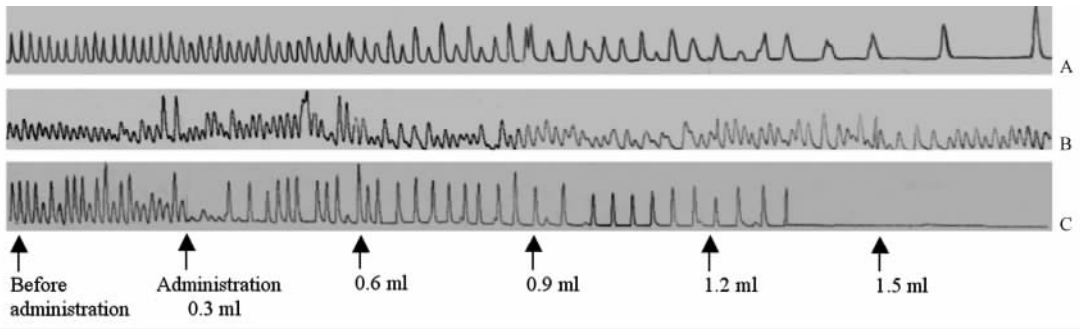


图 1 嗜酸乳杆菌各治疗组对兔离体肠平滑肌收缩频率和收缩幅度的影响图

Fig 1 Effects of various groups of *Lactobacillus acidophilus* on contraction frequency and amplitude of intestinal smooth muscle of rabbits

A: SCS group; B: Bacterium suspension; C: SCS+Bacterium suspension

表 1 嗜酸乳杆菌各治疗组对兔离体肠平滑肌收缩频率和收缩幅度的影响

Tab 1 Effects of various groups of *Lactobacillus acidophilus* on contraction frequency and amplitude of intestinal smooth muscle of rabbits

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Group	Before administration	Administration V/ml				
		0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Contraction frequency (contractions in 2 minutes)						
SCS	20.40±2.07	17.00±2.24	12.20±1.64**	9.40±2.51**	5.00±1.87**	2.60±2.70**
Bacterium suspension	20.40±3.98	19.20±5.50	18.20±4.76	15.00±3.74	15.60±5.90	13.00±4.18
SCS+bacterium suspension	22.80±3.03	17.00±3.08	13.40±2.30*	11.40±5.37**	7.00±5.52**	5.20±7.12**
Contraction amplitude l/cm						
SCS	0.49±0.24	0.40±0.31	0.45±0.30	0.40±0.27	0.33±0.27	0.38±0.70
Bacterium suspension	1.45±1.23	1.13±0.92	1.30±1.09	1.18±0.85	1.13±0.72	0.99±0.59
SCS+bacterium suspension	1.04±0.56	0.65±0.50	0.79±0.56	0.61±0.50	0.47±0.40	0.15±0.28*

* P<0.05, ** P<0.01 vs before administration

2.1.2 收缩幅度 结果(图 1、表 1)表明:在给予 0.3~1.5 ml 的 SCS、活菌、SCS+活菌后,仅 SCS+活菌组在给药达 1.5 ml 时,兔离体肠平滑肌收缩幅度的降低与给药前比较差异有统计学意义(P<0.05),其余各点均无统计学差异(P>0.05)。结果表明 SCS、活菌对兔离体肠平滑肌收缩幅度均无明显影响。

2.2 嗜酸乳杆菌 SCS 对 M 型胆碱受体的作用 结果(图 2、表 2)表明:SCS 与阿托品均可明显对抗毛果芸香碱引起的兔离体肠平滑肌收缩幅度的增加(P<0.05 或 P<0.01),而 SCS 还能使兔离体肠平滑肌收缩频率明显减少(P<0.01)。结果表明,SCS 具有拮抗毛果芸香碱的作用,可能与其阻断 M 型胆碱受体有关。

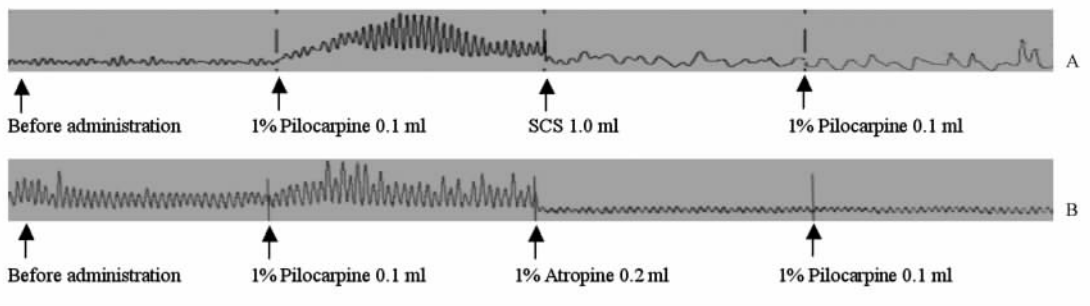


图 2 嗜酸乳杆菌 SCS(A)及阿托品(B)作用后兔离体肠平滑肌收缩图

Fig 2 Effects of SCS of *Lactobacillus acidophilus* (A) and atropine (B) on contraction of intestinal smooth muscle of rabbits

表2 嗜酸乳杆菌 SCS 对 M 型胆碱受体的作用
Tab 2 Effects of SCS of *Lactobacillus acidophilus* on M cholinceptor

(n=7, $\bar{x} \pm s$)

Drug administration	Dosage V/ml	Contraction frequency (contractions in 2 minutes)	Contraction amplitude l/cm
SCS	—	25.43±7.02	0.83±0.50
1% Pilocarpine	0.1	23.57±5.38	1.52±0.81
SCS	1.0	14.00±5.89**	0.70±0.48*
1% Pilocarpine	0.1	14.00±5.77**	0.92±0.60
Atropine	—	27.83±5.42	0.94±0.66
1% Pilocarpine	0.1	26.50±6.69	1.92±1.11
1% Atropine	0.2	22.17±8.45	0.29±0.27**
1% Pilocarpine	0.1	23.33±8.82	0.74±0.62*

* P<0.05, ** P<0.01 vs first administration of pilocarpine

3 讨论

目前临床应用的微生态制剂多以活菌制剂为主,培养上清液往往被忽略。活菌制剂具有保存菌的存活率低、保质期短、活性不稳定等缺点,这些都在一定程度上限制了其应用。本研究即以此为切入点,选取嗜酸乳杆菌 LA14 菌株,从以往人们忽略的培养上清液入手,观察嗜酸乳杆菌 SCS 对兔离体肠平滑肌的作用,并初步探讨其作用机制。

本研究结果表明,嗜酸乳杆菌 SCS、SCS+活菌能明显减少兔离体肠平滑肌收缩频率,且其作用强于单纯的活菌,表明在 SCS 中应该存在着抑制肠蠕动的成分。在嗜酸乳杆菌各治疗组对兔离体肠平滑肌收缩幅度影响的结果中,可以看到 SCS 和活菌对兔离体肠平滑肌收缩幅度几乎均无明显影响。鉴于我们在前期的研究工作中观察到嗜酸乳杆菌 SCS 对小鼠实验性腹泻有对抗作用,可以认为其抗腹泻效果与抑制肠蠕动有一定的关系。

毛果芸香碱是经典的 M 型胆碱受体激动剂,本研究结果表明 SCS 同阿托品一样可明显对抗毛果芸香碱引起的兔离体肠平滑肌收缩幅度的增加,同时 SCS 还能使兔离体肠平滑肌收缩频率明显减少,这提示了 SCS 同阿托品一样具有拮抗毛果芸香碱

的作用,这一作用可能与 M 型胆碱受体阻断有关。

本实验采用的是耗尽培养上清液,可排除培养基中蛋白胨、牛肉浸膏、酵母浸膏、营养基质等多种成分对实验结果的影响。结合前期观察到的嗜酸乳杆菌 SCS 对胃肠道功能的多种作用,本研究结果进一步提示,SCS 中存在着具有胃肠道功能保护作用的活性代谢产物,值得深入研究以应用于临床。

[参考文献]

- [1] Tsai C C, Lin P P, Hsieh Y M. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro* [J]. *Anaerobe*, 2008, 14: 61-67.
- [2] Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'écuyer A, Savoie M, Franco M, et al. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Can J Gastroenterol*, 2007, 21: 732-736.
- [3] Senok A C, Ismael A Y, Botta G A. Probiotics: facts and myths [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11: 958-966.
- [4] McFarland L V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2007, 5: 97-105.
- [5] Shamir R, Makhoul I R, Etzioni A, Shehadeh N. Evaluation of a diet containing probiotics and zinc for the treatment of mild diarrheal illness in children younger than one year of age [J]. *J Am Coll Nutr*, 2005, 24: 370-375.
- [6] Chen C C, Louie S, Shi H N, Walker W A. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis [J]. *Pediatr Res*, 2005, 58: 1185-1191.
- [7] 罗学娅, 伦永志, 高卫, 胡海北, 王强, 刘莹, 等. 嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14: 1870-1873.
- [8] 罗学娅, 高卫, 贾丛伟, 齐丙迪, 王纪人, 李金红. 嗜酸性乳杆菌培养上清液对实验性腹泻的作用 [J]. *中国药理学杂志*, 2007, 42: 1908-1910.
- [9] 王冬梅, 李冬冬, 程晓馨, 裴德恺. 消化系统运动及分泌实验法 [M] // 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1311-1312.

[本文编辑] 贾泽军