

• 临床研究 •

人源性乳酸杆菌的生物学特征研究与优选*

曾朱君¹,戴小波^{1,2△},唐文志¹

(1. 广东省中医院珠海医院检验科,广东珠海 519015;2. 珠海高新技术产业开发区
人民医院检验科,广东珠海 519015)

摘 要:**目的** 探讨人源性乳酸杆菌的生物学特征,并对分离的人源性乳酸杆菌进行优选。**方法** 对 43 株产过氧化氢(H₂O₂)乳酸杆菌利用 CH-50L 细菌鉴定系统进行鉴定,测定其培养液的 pH 与 H₂O₂ 浓度,并利用培养液进行抑菌试验。**结果** 43 株细菌中,有 9 株表现出一定的抑菌活性;有抑菌活性的乳酸杆菌培养液与无抑菌活性的培养液比较,其 pH、H₂O₂ 浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 乳酸杆菌对细菌的抑制作用主要依靠细菌素等生物活性物质,而乳酸及 H₂O₂ 在抑菌活性中起到加强作用,不同菌株产生抑菌物质的种类或数量有差异。

关键词: 阴道炎; 微生态失调; 自体乳酸杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.056 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)12-1771-03

乳酸杆菌是生育年龄妇女阴道内的正常菌群的优势菌,对阴道微生态平衡有明显的调节作用。乳酸杆菌数量减少导致的阴道微生态失调是阴道炎发病的主要原因,目前临床使用的非人源性乳酸杆菌由于不能在人阴道中定植和增殖,因此远期效果不明显,为了研究人源性乳酸杆菌的生物学特征及抑菌活性,课题组从健康妇女阴道体内分离出 43 株产过氧化氢(H₂O₂)乳酸杆菌,并对它们的抑菌活性做了初步研究,现将相关结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 乳酸杆菌菌株分离自广东省中医院珠海医院妇科门诊的健康妇女阴道后穹窿分泌液标本,年龄 19~38 岁,排除各种阴道炎;标准菌株大肠埃希菌(ATCC25923)、金黄色葡萄球菌(ATCC25922)、白色念珠菌(ATCC)由广东省临检中心提供。

1.2 检测方法 利用 MRS 乳酸杆菌专用培养基(MRS 琼脂培养基中加入 0.25 g/L 四甲基联苯胺和 0.01 g/L 辣根过氧化物酶)培养分离产过氧化氢乳酸杆菌。分离后的产过氧化氢乳酸杆菌利用法国生物梅里埃 CH-50L 鉴定系统进行鉴定。利用分纯后的乳酸杆菌接种于 MRS 液体培养基,培养 48 h 后检测培养液 pH 与 H₂O₂ 浓度,pH 值使用雷磁 PH S-3E 型酸度计进行检测,H₂O₂ 浓度使用 KRK 公司提供的 H₂O₂-55 型过氧化氢检测仪检测。

1.3 抑菌活性实验 用杯碟法^[1]测定抑菌活性:融化 MH 培养基,待融化的培养基冷却至 50 ℃左右时,每 200 mL 加入敏感指示菌菌液 0.5 mL,混匀后倒入 9 cm 培养皿中,凝固后用镊子夹取牛津杯放置平皿中,在每个牛津杯中加入 250 μL 乳酸杆菌培养液,恒温箱培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对相关数据进行处理,计量资料两样本均数比较采用 *t* 检验,相关分析应用 Pearson 单因素直线相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

对金黄色葡萄球菌产生抑菌圈与未产生抑菌圈的乳酸杆菌比较,其培养液 pH、H₂O₂ 浓度比较差异无统计学意义($P=0.313\ 8>0.05$, $P=0.687\ 7>0.05$),但抑菌圈与 H₂O₂ 成负相关($r=-0.579\ 1$)与 pH 无相关性($r=0.281\ 0$);对大肠埃希菌产生抑菌圈与未生产抑菌圈的乳酸杆菌比较,其培养液 pH、H₂O₂ 浓度比较差异无统计学意义($P=0.300\ 4>0.05$; $P=0.877\ 0>0.05$),抑菌圈大小与 pH 成负相关($r=-0.643\ 7$)与 H₂O₂ 无相关性($r=0.257\ 1$);对白色念珠菌产生抑菌圈与未产生抑菌圈的乳酸杆菌比较,其培养液 pH、H₂O₂ 浓度比较差异无统计学意义($P=0.695\ 4>0.05$; $P=0.687\ 7>0.05$),抑菌圈大小与 H₂O₂ 成正相关($r=0.397\ 9$),与 pH 成负相关($r=-0.323\ 0$)。具体结果见表 1。

表 1 乳酸杆菌产 H₂O₂、产酸能力及对指示菌的抑制作用

| 菌株编号 | 细菌鉴定结果 | 产 H ₂ O ₂ 能力(mg/mL) | 产酸能力(pH) | 抑菌作用(mm) | | |
|------|----------|---|----------|----------|---------|-------|
| | | | | 大肠埃希菌 | 金黄色葡萄球菌 | 白色念珠菌 |
| 1 | 卷曲乳杆菌 | 0.59 | 3.86 | 12 | 17 | 0 |
| 2 | 嗜酸乳杆菌 2 | 0.70 | 3.83 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 嗜乳酸杆菌 2 | 0.47 | 3.95 | 13 | 11 | 16 |
| 4 | 德氏乳杆菌 | 0.17 | 3.97 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 乳酸杆菌乳亚种 | 0.67 | 3.50 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 嗜乳酸杆菌 1 | 0.39 | 3.94 | 13 | 9 | 10 |
| 7 | 卷曲乳杆菌 | 0.97 | 3.99 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.77 | 4.04 | 0 | 0 | 0 |

* 基金项目:珠海市科技计划资助项目(2010B040102045)。 △ 通讯作者,E-mail:dxzbzh@126.com。

续表 1 乳酸杆菌产 H₂O₂、产酸能力及对指示菌的抑制作用

| 菌株编号 | 细菌鉴定结果 | 产 H ₂ O ₂ 能力(mg/mL) | 产酸能力(pH) | 抑菌作用(mm) | | |
|------|----------|---|----------|----------|---------|-------|
| | | | | 大肠埃希菌 | 金黄色葡萄球菌 | 白色念珠菌 |
| 9 | 嗜酸乳杆菌 1 | 0.34 | 3.41 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 卷曲乳杆菌 | 0.82 | 3.86 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.56 | 3.74 | 13 | 14 | 0 |
| 12 | 嗜酸乳杆菌 1 | 1.82 | 3.81 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 植物乳杆菌 1 | 0.51 | 4.06 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.68 | 4.12 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 嗜酸乳杆菌 1 | 2.82 | 4.06 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 卷曲乳杆菌 | 2.16 | 3.72 | 11 | 12 | 15 |
| 17 | 棉籽糖乳球菌 | 0.51 | 4.15 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 植物乳杆菌 1 | 1.04 | 3.72 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 植物乳杆菌 1 | 0.59 | 3.71 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 卷曲乳杆菌 | 0.17 | 3.69 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.43 | 4.01 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 嗜酸乳杆菌 3 | 0.16 | 3.72 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 嗜酸乳杆菌 3 | 1.13 | 3.95 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 卷曲乳杆菌 | 0.19 | 4.11 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 卷曲乳杆菌 | 0.18 | 3.83 | 15 | 11 | 0 |
| 26 | 卷曲乳杆菌 | 0.16 | 3.80 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.49 | 3.76 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 卷曲乳杆菌 | 0.25 | 4.23 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.38 | 3.82 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 嗜酸乳杆菌 3 | 1.26 | 4.04 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 卷曲乳杆菌 | 0.51 | 4.22 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 棉籽糖乳球菌 | 0.13 | 3.70 | 14 | 11 | 0 |
| 33 | 发酵乳杆菌 2 | 0.54 | 4.17 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 唾液乳杆菌 | 0.49 | 3.97 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 嗜酸乳杆菌 3 | 0.37 | 3.72 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 卷曲乳杆菌 | 0.28 | 3.99 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 卷曲乳杆菌 | 2.021 | 3.56 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 卷曲乳杆菌 | 0.361 | 4.50 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 乳酸乳球菌乳亚种 | 0.255 | 3.98 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 卷曲乳杆菌 | 2.794 | 3.77 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | 植物乳杆菌 1 | 0.232 | 4.05 | 11 | 0 | 0 |
| 42 | 德氏乳杆菌德亚种 | 0.232 | 4.18 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | 棉籽糖乳球菌 | 0.187 | 3.74 | 0 | 0 | 0 |

3 讨 论

乳酸杆菌产生的细菌素等生物活性物质可抑制其他需氧菌、兼性厌氧菌的生长^[2]，目前研究表明乳酸杆菌活菌制剂能有效地改善阴道微生态，乳酸杆菌作为生态治疗的活菌制剂，既能恢复阴道的正常菌群，又能预防和治疗感染^[3-4]。因此乳酸杆菌制剂已经广泛应用于临床治疗阴道炎，但目前临床使用的商品化乳酸杆菌制剂为非人源性乳酸杆菌，定植和增殖效果差，而人源性乳酸杆菌活菌制剂在工业化生产、保存和运输上有一定的难度，因此如何找到合适的人源性乳酸杆菌菌株是目前临床面临的难题。

课题组从 35 位健康妇女阴道内分离出 43 株产 H₂O₂ 的乳酸杆菌，其中 3 株对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念

珠菌均有抑制作用，5 株对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌有抑制作用，1 株仅对大肠埃希菌有抑制作用，其他 34 株对 3 种指示菌株均无抑制作用。产生抑菌圈与未产生抑菌圈的细菌相比，其培养液 pH 及 H₂O₂ 浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$)，这说明乳酸杆菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及白色念珠菌的拮抗作用不完全依赖乳酸杆菌产生的乳酸和 H₂O₂，其代谢产物中尚存在着与乳酸和 H₂O₂ 不同的其他抑菌物质。在产生抑菌作用的培养液中，大肠埃希菌的抑菌圈与培养液 pH 值成负相关($r=-0.6437$)，但与 H₂O₂ 浓度无明显相关性($r=0.2571$)，金黄色葡萄球菌的抑菌圈与 pH 无明显相关性($r=-0.2810$)，而与 H₂O₂ 浓度成负相关($r=-0.5791$)；在 43 菌产 H₂O₂ 乳酸杆菌菌株中，仅有 3 个菌株表现出对白

色念珠菌的抑制作用,这和乳酸杆菌的生物学特点有关,乳酸杆菌是否对酵母菌具有抑制作用一直具有争议,目前研究认为部分乳酸杆菌与真菌有共生关系^[5],甚至白色念珠菌在乳酸杆菌抑制致病细菌生长过程中还起到一定的协同作用^[6]。在后续研究中也发现,在利用自体阴道中残留的乳酸杆菌体外增殖后再回植的实验研究中,9 例具有真菌性阴道炎患者的观察病例,有 7 例真菌性阴道炎在观察期复发,而且在复发时白带分泌物中产 H₂O₂ 乳酸杆菌的菌群密集度并未出现明显减少,白细胞也未明显增加,这些病例说明,移植所使用的产 H₂O₂ 乳酸杆菌虽然能在阴道中定植和增殖,但并不能抑制真菌的生长,因此如果利用具有对真菌有抑制作用的乳酸杆菌进行移植,或许可以到达临床治疗的效果。

上述结果说明,乳酸杆菌对细菌的抑制作用主要依靠细菌素等生物活性物质,而乳酸及 H₂O₂ 在乳酸杆菌的抑菌活性中起到一定的加强作用,同时不同菌株产生抗菌物质的种类或数量有差异^[7],课题组的研究工作为下一步研究奠定了坚实基础。

参考文献

[1] 付长春. 杯碟法影响抗生素效价测定的因素分析[J]. 西北药学 • 临床研究 •

杂志,2008,23(5):310-312.
[2] 李桂军,蒋琰琰,周建娟 等. 恢复阴道微生态在细菌性阴道病个体化治疗中的价值分析[J]. 实用妇产科杂志,2013,29(2):147-151.
[3] 何文静. 定君生在预防阴道炎复发中的临床效果[J]. 中国微生态学杂志,2012,24(3):281-282.
[4] 郭爱霞,李红林. 恢复阴道微生态对复发性细菌性阴道病的治疗效果观察[J]. 安徽医药,2014,18(7):1364-1365.
[5] 王振江,吕小玲,董振香. 微生态制剂(定君生)在调整阴道菌群失衡的应用[J]. 中国医院用药评价与分析,2006,6(2):117-119.
[6] 周倩如,刘艳,刘祥. 阴道内乳酸杆菌抑菌能力相关因素的研究[J]. 卫生研究,2006,35(3):310-313.
[7] 王丽莉,陈其御. 产 H₂O₂ 乳酸杆菌对大肠杆菌的体外拮抗作用[J]. 基础医学与临床,2006,26(1):88-90.

(收稿日期:2015-02-08)

不同肝病患者血清中 HBV DNA 检测结果及其同 HBV 标志物相互关系的探讨

郭晓东,李小平

(浠水县人民医院检验科,湖北浠水 438200)

摘要:目的 探讨不同肝病患者血清中 HBV DNA 检测结果及其同 HBV 标志物相互关系。方法 采用 FQ-PCR 法和酶联免疫吸附试验(ELISA)对 250 例不同的肝病患者进行 HBV DNA 定量以及乙型肝炎病毒标志物(HBVM)检测。**结果** 急性乙型肝炎、肝硬化、肝癌患者血清中 HBV DNA 水平明显高于慢性乙型肝炎患者,差异有统计学意义($P<0.01$)。阳性检出率分别为急性乙型肝炎 79.4%、肝硬化 81.8%、肝癌 80.0%慢性乙型肝炎 54.7%。ELISA 检测结果为“HBsAg(+)、HBeAg(+)、HBcAb(+)”、“HBsAg(+)、HBeAg(+)”阳性模式者,HBV DNA 阳性检出率及体内 HBV DNA 水平明显高于其他模式;e 抗原阳性和阴性患者体内 HBV DNA 的差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FQ-PCR 法定量检测 HBV DNA 可真实反映病毒感染和复制状态,对乙型肝炎的早期临床诊断、病情评估、疗效观察、预后判断和新药验证都具有十分重要的意义。

关键词:肝病患者; 乙型肝炎病毒标志物; 相互关系

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.057 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)12-1773-02

运用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对经 ELISA 检测的乙型肝炎病毒标志(HBVM)阳性的不同肝病患者血清进行定量检测,通过对比分析,了解不同肝病患者血清中 HBV DNA 定量检测结果及与 HBV 血清标志物的关系,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2014 年 2~8 月门诊和住院患者 250 例。其中男 210 例,女 40 例,年龄 11~60 岁;其中慢性乙型肝炎 179 例,急性乙型肝炎 34 例,肝硬化 22 例,肝癌 15 例。**1.2 仪器与试剂** 上海雷勃 Wellscan K3 酶标仪、LITTLE GENIUS 基因扩增仪、FX-990 荧光检测仪。ELISA 试剂盒由上海实业科华生物技术有限公司提供,HBV DNA FQ-PCR 试剂盒由上海复星医学科技发展有限公司提供。

1.3 方法 ELISA 检测使用科华生物技术有限公司生产的 ELISA 试剂盒对血清标本进行 HBVM 检测,乙肝 DNA 使用上海复星医学科技发展有限公司荧光定量检测试剂盒进行定

量检测,严格按说明书要求进行操作。**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计学软件,检测结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。**2 结 果**
2.1 不同临床类型的乙型肝炎患者血清 HBV DNA 的阳性率及水平 见表 1。

表 1 不同类临床类型的乙型肝炎患者血清 HBVDNA 阳性率及水平

| 项目 | n | HBV DNA 检测 | HBV DNA 水平 |
|--------|-----|------------|------------------|
| | | [n(%)] | 阳性样品对数值(copy/mL) |
| 急性乙型肝炎 | 34 | 27(79.4) | 8.72±2.23* |
| 慢性乙型肝炎 | 179 | 98(54.7) | 5.45±2.16 |
| 肝硬化 | 22 | 18(81.8) | 7.07±2.09* |
| 肝癌 | 15 | 12(80.0) | 7.86±2.10* |

* : $P<0.01$,与慢性乙型肝炎比较。

2.2 HBV DNA 检测与 HBV-M 标志物检测的关系 研究者