

牛初乳复合细胞营养因子 (CHF)的体内、外抗菌作用研究*

余江河 姚文兵¹ 郎晓怡² 宋春梅³

(中国药科大学微生物学教研室; ¹生物技术研究中心;南京 210009;

²湖南省衡阳药检所,衡阳 421001; ³宁夏银川第一人民医院药房,银川 750001)

摘要 牛初乳复合细胞营养因子 (CHF)对伤寒杆菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、福氏痢疾杆菌 6种肠道常见致病菌均有一定的正常凝集效价,其中对大肠杆菌和绿脓杆菌的凝集效价与人 γ 球蛋白相同。体外试验表明 CHF对白色葡萄球菌和福氏痢疾杆菌有一定的抑菌作用,且这种抑菌作用不依赖补体的参与。CHF可促进小鼠体内抗绿脓杆菌的免疫保护作用,当绿脓杆菌的攻击量达 2.8 \times LD₅₀时,就有非常显著的作用,且强度与人 γ 球蛋白相似。

关键词 细胞营养因子;牛初乳;分泌型免疫球蛋白;抑菌作用

从母牛产犊后的初乳中经分离、纯化的牛初乳复合细胞营养因子 (CHF),其中有较多的分泌型免疫球蛋白 SIgA(含量可达 10%)^[1]和几种细胞生长因子。已证实 CHF对表皮细胞的生长具有促进作用,对免疫功能具有增强作用。本文着重研究其对肠道常见致病菌的抑菌作用。

1 实验材料

CHF由本校生物技术研究中心提供,按文献^[1]方法制备;人 γ 球蛋白:意大利进口;补体:三只豚鼠的新鲜混合血清(1:5稀释)。

小白鼠 昆明种,体重 20~22 g,雌雄各半,由本校实验动物中心提供,卫生合格证号:苏动 93012号。

菌种 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*),大肠杆菌 (*E. coli*),变形杆菌 (*Proteus vulgaris*),白色葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*),绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*),福氏痢疾杆菌 (*Shigella flexneri*)由本校微生物学教研室保存。

药品 蛋白胨 (BR)、牛肉膏 (BR),上海

化学试剂采购站经销;氯化钠 (AR),南京化学试剂厂产品;琼脂 (BR),日本进口分装。

2 方法与结果

2.1 CHF对肠道常见致病菌的正常凝集效价测定

将 CHF与人 γ 球蛋白二者均作倍比稀释,使每 ml 样品中 CHF 和 γ 球蛋白的含量分别为 10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.30 和 0.15 mg/ml,每管 0.5 ml,最后一管以生理盐水对照。将 6个试验菌制成 9亿/ml 的菌液,在不同滴度的 CHF 及人 γ 球蛋白试管中,每管加入菌液 0.5 ml,摇匀,37°C 培养 24 h 后,取出,记录凝集效应。结果见表 1。

结果表明:样品对 6种肠道常见致病菌均具有一定的正常凝集效价,其中对大肠杆菌和绿脓杆菌的凝集效价与人 γ 球蛋白相同。

2.2 CHF的体外抑菌试验

将白色葡萄球菌和福氏痢疾杆菌 6h 的培养物分别稀释成 10³ cfu 的菌液,取无菌试管 6支,分成二种细菌的组别,每种三组,分别为 (1)试验组: CHF 1 ml(5 mg/ml), 补体

* 收稿日期 1997-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

0.5 ml(1:5稀释),菌液0.5 ml;(2)对照组:CHF1 ml(5 mg/ml),生理盐水0.5 ml,菌液0.5 ml;(3)补体对照组:生理盐水1 ml,补体0.5 ml(1:5稀释),菌液0.5 ml;将各组试管中的成分混匀后,置37℃水浴反应2 h后

Tab 1. The agglutination titer of CHF and Gamma globulins

Bacteria	Conc., mg/ml														control	
	10.0		5.0		2.5		1.25		0.625		0.30		0.15			
	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R		
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

C, CHF; R, Gamma globulins; 1, *Salmonella typhimurium*; 2, *Proteus vulgaris*; 3, *Pseudomonas aeruginosa*; 4, *E. coli*; 5, *Staphylococcus epidermidis*; 6, *Shigella flexneri*

Tab 2. In vitro inhibitory effect of CHF against bacteria ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Group	CHF, ml	Alexin, ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , number	<i>Shigella flexneri</i> , number
A	1.0	0.5	1800 \pm 280.6	1500 \pm 20.7
B	1.0	0	150 \pm 26.4	270 \pm 38.1*
C	0	0.5	3000 \pm 460.8	2400 \pm 467.4

* P < 0.05; ** P < 0.01 vs A group; A, test group; B, control group; C, alexin group

试验结果表明,单独CHF对白色葡萄球菌和福氏痢疾杆菌的抑菌作用优于补体存在的抑菌作用,其作用十分显著;补体参与的CHF的抗菌活性优于补体对照组的抗菌活性。

2.2 CHF对小鼠体内抗绿脓杆菌免疫保护试验

取出,吸0.1 ml注入无菌平皿中,加入预溶并冷却至56℃左右的普琼脂培养基混匀,置37℃孵育24 h后,活菌计数;样品重复8份,按统计学方法处理,结果见表3

预先测出绿脓杆菌对小鼠半数致死量的菌浓度为2.16 \times 10³ CFU/ml,将绿脓杆菌定量接种于肉汤培养基中,37℃振荡培养8 h后取出,离心,除去培养基,用无菌生理盐水将菌配成一定的浓度,即5.6 \times LD₅₀,2.8 \times LD₅₀,1.4 \times LD₅₀,0.7 \times LD₅₀4个不同的菌浓度,同时设立空白对照组。取小鼠96只,雌雄各半,分成样品组人γ球蛋白组和生理盐水对照组。将CHF和人γ球蛋白分别用无菌生理盐水配成5 mg/ml溶液,分别给小鼠腹腔注射,每鼠0.2 ml(5 mg/kg),对照组给等量生理盐水,3 h后将不同浓度的菌液分别接种于小鼠腹腔,每个浓度8只,每只0.2 ml,间隔3 h后,按上面同样的方法接种一次CHF和人γ球蛋白,饲养观察7 d,记录小鼠的死亡数,结果见表3

Tab 3. The inhibitory effect of CHF against *Pseudomonas aeruginosa* in mice

Group	Number of mice	Number of death			
		5.6 \times LD ₅₀	2.8 \times LD ₅₀	1.4 \times LD ₅₀	0.7 \times LD ₅₀
Control	32	8	8	6	0
CHF	32	8	0*	0*	0
Gamma-globulins	32	6	0	0	0

* P > 0.05; ** P < 0.05, vs control

结果表明: CHF对小鼠抗绿脓杆菌的保护作用与人 γ 球蛋白的相似,当绿脓杆菌的攻击量达 $2.8 \times LD_{50}$ 时,有非常显著的保护作用。

3 讨 论

1)经国内外生物化学家多年的研究表明, SIg A在母亲初乳中的含量可高达300 mg/ml,进入婴、幼儿体内后,在粘膜上皮细胞处可以粘附细菌,中和病毒和毒素,并且可以阻止这些细菌和病毒的侵入^[2]。CHF中含有较高的 SIg A,这可能是其具有抑制肠道致病菌作用的主要原因之一。

2)体外抗菌试验的结果表明:在无补体存在时,CHF对白色葡萄球菌和福氏痢疾杆菌的抑菌作用十分显著,说明 CHF本身具有较高的抗菌活性,而在有补体存在时,CHF

的抗菌作用仅比补体对照组的抗菌活性高,这说明 CHF的抗菌活性不依赖补体的协同作用。相反补体的参与在一定程度上降低了 CHF的抗菌活性,其机理有待于进一步研究。

3)体内免疫保护试验结果显示,CHF对绿脓杆菌感染的小鼠具有较强的保护作用,这说明 CHF本身对绿脓杆菌具有较强的抗菌活性,动物试验的结果为 CHF用于临床辅助性治疗绿脓杆菌的感染提供了一定的依据。

参 考 文 献

- 1 姚文兵,郎晓怡.牛初乳复合细胞营养因子的制备.分析及生物活性研究.中国药科大学学报,1996,27(10):632
- 2 堤裕幸.初乳中 Ig A 抗体对呼吸道合胞病毒 (RSV) 各种构造蛋白的作用.医学のあゆみ,1989,150(11):751

Antibacteria Activity of Cell Health Factor from Bovine Colostrum

Yu Jianghe,¹ Yao Wenbing,² Lang Xiaoyi,³ Song Chunmei

Department of Microbiology,¹ Biotechnology Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ² Hengyang Institute for Drug Control, Hengyang 421001; ³ Yin Chuan First People's Hospital, Yin Chuan 750001

Abstract The antibacteria activities of Cell Health Factor (CHF) from bovine colostrum were studied in this paper. The result showed the CHF had a agglutination titer to *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri*. CHF had the same agglutination titer as γ -globulins to *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *In vitro*, CHF showed some antimicrobial activity to *Staphylococcus epidermidis* and *Shigella flexneri* which were not dependent on complement. *In vivo*, CHF can increase the immunological protective effect on *Pseudomonas aeruginosa*. Especially, when *Pseudomonas aeruginosa* add up to $2.8 \times LD_{50}$, the effect increased significantly and was similar to the effect of γ -globulins.

Key words Cell health factor; Bovine colostrum; SIg A; Antibacteria activity