

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1597-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240613

罗伊氏乳杆菌对轮状病毒体内外复制的抑制作用及其对免疫因子表达的影响

李小凤¹, 程美慧², 刘洋¹, 刘长城¹, 贾雪娇¹, 刘梦琦¹, 赵微¹

(1. 锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室, 辽宁 锦州 121000; 2. 湖北省黄石市中心医院检验科, 湖北 黄石 435000)

[摘要] **目的:** 探讨罗伊氏乳杆菌对轮状病毒(RV) SA11株体内外复制的抑制作用, 并阐明其对相关免疫因子表达的影响。**方法:** 体外实验, 培养并鉴定罗伊氏乳杆菌, 绘制罗伊氏乳杆菌标准曲线和生长曲线, 筛选罗伊氏乳杆菌培养最佳时间和最适浓度。采用 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 、 200×10^8 和 500×10^8 CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌感染Caco-2细胞, 台盼蓝染色法检测Caco-2细胞存活率。将不同浓度罗伊氏乳杆菌与RV体外共孵育并作用于Caco-2细胞, Caco-2细胞分为阴性对照组(NC组)、阳性对照组(PC组)和 10^7 、 10^8 、 10^9 及 10^{10} CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌组, 免疫荧光灶法检测罗伊氏乳杆菌作用后Caco-2细胞中病毒滴度, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测不同浓度罗伊氏乳杆菌作用后Caco-2细胞中RV VP6基因拷贝数。体内实验, 将25窝SPF级乳鼠分为对照组、RV组(感染SA11毒株)、Ab-NC组(抗生素处理耗竭肠道菌群)、Ab-RV组(耗竭肠道菌群后感染SA11毒株)和Ab-Lac-RV组(耗竭肠道菌群, 并感染罗伊氏乳杆菌后感染SA11毒株)。收取各组乳鼠灌胃第2、4、6、8和10天的粪便样本和灌胃第4天结肠组织样本, RT-qPCR法检测各组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数和结肠组织中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-8、IL-10、 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA表达水平。**结果:** 罗伊氏乳杆菌生长良好, 形态圆润, 呈圆形、光滑和乳白色的凸起样菌落, 且边缘较整齐; 革兰染色后菌体呈紫色、不规则和方形杆状; 经16SrDNA测序后序列同源性为99%, 提示罗伊氏乳杆菌活化成功; 罗伊氏乳杆菌活菌数与吸光度(A)值呈线性关系, 回归分析标准曲线为 $Y=0.4375X+0.0006$, $R^2=0.9994$ 。培养0~2 h, 细菌处于对数生长期, 细菌生长迟缓; 培养2~14 h, 细菌快速生长, 并于培养14~16 h时细菌生长趋于稳定, 培养16 h时达到细菌生长速率顶峰, 随后进入衰亡期。 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 和 200×10^8 CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌感染后, Caco-2细胞存活率均 $>90\%$, 因此选用上述浓度罗伊氏乳杆菌感染细胞。与PC组比较, 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 和 200×10^8 CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌组Caco-2细胞中RV VP6基因拷贝数均明显降低($P<0.01$)。与PC组比较, 10^7 、 10^8 、 10^9 和 10^{10} CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌组Caco-2细胞中病毒滴度均明显降低($P<0.01$)。与对照组比较, Ab-NC组、Ab-RV组和Ab-Lac-RV组乳鼠肠道菌群菌落数量均明显减少, 乳鼠肠道菌群耗竭成功。灌胃第2和4天, 与RV组比较, Ab-RV组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数明显降低($P<0.05$); 灌胃第4、6、8和10天, 与Ab-RV组比较, Ab-Lac-RV组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数明显降低($P<0.05$)。与对照组比较, Ab-RV组和Ab-Lac-RV组乳鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 及TNF- α mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IL-8 mRNA表达水平均明显降低($P<0.05$), Ab-Lac-RV组乳鼠结肠组织中IL-10 mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论:** 罗伊氏乳杆菌可能通过上调IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 和TNF- α mRNA表达及下调IL-8 mRNA表达, 抑制RV复制。

[关键词] 罗伊氏乳杆菌; 轮状病毒; 乳鼠; 免疫因子; 标准曲线

[中图分类号] R373.2 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-12-21

[基金项目] 辽宁省教育厅基金项目(LJKMZ20221243); 辽宁省科技厅科技计划联合计划基金项目(2023-MSLH-046)

[作者简介] 李小凤(2000—), 女, 湖南省郴州市人, 在读硕士研究生, 主要从事病毒学基础方面的研究。

[通信作者] 赵微, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: zhaowei-v@jzmu.edu.cn)

Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on rotavirus replication *in vivo* and *in vitro* and its effect on expression of immune factors

LI Xiaofeng¹, Cheng Meihui², LIU Yang¹, LIU Changcheng¹, JIA Xuejiao¹, LIU Mengqi¹, ZHAO Wei¹
(1. Laboratory of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Laboratory, Central Hospital, Huangshi City, Hubei Province, Huangshi 435000, China)

ABSTRACT **Objectives:** To discuss the inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on the replication of rotavirus (RV) strain SA11 *in vivo* and *in vitro*, and to clarify its effect on the expression of related immune factors. **Methods:** For *in vitro* experiments, *Lactobacillus reuteri* was cultured and identified, and the standard curve and growth curve were plotted to screen the optimal time and concentration for *Lactobacillus reuteri* cultivation. The cells were infected with *Lactobacillus reuteri* at the concentrations of 5×10^8 , 10×10^8 , 50×10^8 , 100×10^8 , 200×10^8 , and 500×10^8 CFU·mL⁻¹, and the survival rates of Caco-2 cells were detected by trypan blue staining method. Various concentrations of *Lactobacillus reuteri* were co-incubated with RV *in vitro* and applied to the Caco-2 cells. The cells were divided into negative control group (NC group), positive control group (PC group), and 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* groups. Immunofluorescence focus method was used to detect the viral titers in the Caco-2 cells after treated with *Lactobacillus reuteri* and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the copy numbers of RV VP6 gene in the Caco-2 cells after treated with various concentrations of *Lactobacillus reuteri*. In *in vivo* experiments, 25 litters of SPF suckling mice were divided into control group, RV group (infected with SA11 strain), Ab-NC group (treated with antibiotic to deplete gut microbiota), Ab-RV group (depleting gut microbiota and then infected with SA11 strain), and Ab-Lac-RV group (depleting gut microbiota, treated with *Lactobacillus reuteri*, and then infected with SA11 strain). The fecal samples were collected on days 2, 4, 6, 8, and 10 gavage, colon tissue sample were collected on day 4 of and RT-qPCR method was used to detect the copy numbers of RV VP6 gene in feces and the mRNA expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-8, IL-10, interferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in colon tissue of the suckling mice in various groups. **Results:** The *Lactobacillus reuteri* grew well, with round, smooth, and milky white convex colonies and neat edges. After Gram staining, the bacteria appeared purple, irregular, and square-shaped rods. 16SrDNA sequencing showed 99% sequence homology, indicating successful activation of *Lactobacillus reuteri*. The number of live *Lactobacillus reuteri* was linearly related to the absorbance (A) value, and the standard curve for regression analysis was $Y=0.4375X+0.0006$, $R^2=0.9994$. During the 0–2 h cultivation period, the bacteria were at the logarithmic growth phase with slow growth; from 2–14 h, the bacteria grew rapidly and stabilized at 14–16 h, reaching the growth rate peak at 16 h, after which they entered the decline phase. Infection with *Lactobacillus reuteri* at concentrations of 5×10^8 , 10×10^8 , 50×10^8 , 100×10^8 , and 200×10^8 CFU·mL⁻¹ resulted in the survival rates of Caco-2 cells were all >90%, so these concentrations were selected for the further experiments. Compared with PC group, the copy numbers of RV VP6 gene in the Caco-2 cells in 5×10^8 , 10×10^8 , 50×10^8 , 100×10^8 , and 200×10^8 CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with PC group, the viral titers in the Caco-2 cells in 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with control group, the numbers of gut microbiota colonies in Ab-NC, Ab-RV, and Ab-Lac-RV groups were significantly decreased, indicating successful depletion of gut microbiota in the suckling mice. On days 2 and 4 after gavage, the RV VP6 gene copy number in the feces

in Ab-RV group was significantly lower than that in RV group ($P < 0.05$). On days 4, 6, 8, and 10 after gavage, the RV VP6 gene copy number in the feces in Ab-Lac-RV group was significantly lower than that in Ab-RV group ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression levels of IL-1 β , IL-10, IFN- γ , and TNF- α mRNA in colon tissue in Ab-RV and Ab-Lac-RV groups were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression level of IL-8 mRNA was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of IL-10 mRNA in colon tissue in Ab-LAC-RV group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** *Lactobacillus reuteri* may inhibit the RV replication by upregulating the expressions of IL-1 β , IL-10, IFN- γ , and TNF- α mRNA and downregulating the expression of IL-8 mRNA.

KEYWORDS *Lactobacillus reuteri*; Rotavirus; Suckling mice; Immune factor; Standard curve

罗伊氏乳杆菌可在人体不同部位定植, 主要存在于消化系统, 也可定植于泌尿系统、生殖系统和皮肤^[1]。研究^[2-9]显示: 罗伊氏乳杆菌可改善肠道功能和胃肠道症状, 恢复人类微生物群的平衡组成, 在治疗急性水样腹泻和预防新的腹泻发作方面发挥积极作用。轮状病毒 (rotavirus, RV) 是引起婴幼儿腹泻的主要病原体之一。研究^[10]表明: RV在肠道内的感染和定植可明显减少肠道内乳酸杆菌、双歧杆菌和肠球菌数量。目前, 益生菌与口服补液等传统治疗药物相结合, 成为RV诱导胃肠炎的治疗干预手段。

本课题组^[11]前期通过建立RV感染乳鼠模型并分析RV与细菌之间的关系, 对乳鼠肠道内容物进行16S rRNA测序分析, 结果显示: 与未感染病毒组比较, 病毒感染组罗伊氏乳杆菌相对丰度明显降低。罗伊氏乳杆菌对RV复制的影响及其分子机制尚不明确。本研究探讨罗伊氏乳杆菌对RV复制的影响, 并阐明小鼠体内免疫因子变化情况, 为肠道益生菌在RV临床治疗中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、病毒和菌株 25窝SPF级昆明乳鼠购自锦州医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001, 实验动物伦理学审批号: 2021014。Caco-2细胞和RV SA11株均由锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室保藏。罗伊氏乳杆菌菌株ATCC 23272购自广东微生物菌种保藏中心。

1.2 主要试剂和仪器 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和DMEM培养基均购自美国Gibco公司, MRS肉汤、MRS琼脂、厌氧袋、厌氧包和厌氧指示剂均购自青岛海博生物技术有限公司, 台盼蓝溶液和TRIzol试剂均购自北京Solarbio公司, VP6抗体购自美国Immubocruz公司, TB Green[®]

Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 试剂盒和PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒均购自日本TaKaRa公司, 1%青-链霉素混合液双抗购自北京索莱宝科技有限公司。恒温CO₂培养箱购自美国Nuair公司, PCR仪购自美国Bio-Rad公司, 荧光显微镜购自德国Leica公司, 倒置显微镜购自重庆奥特光学仪器有限公司, 酶标仪和紫外分光光度计均购自美国Thermo公司。

1.3 细胞培养 采用含10% FBS和1%青-链霉素双抗的DMEM培养基培养Caco-2细胞, 待细胞贴壁生长, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。于倒置显微镜下观察细胞形态表现和细胞密度, 待细胞生长至90%且生长状况良好时即可进行传代培养。

1.4 绘制罗伊氏乳杆菌生长曲线和标准曲线 菌株冻干粉采用0.1~0.2 mL MRS肉汤培养基溶解后, 接种于MRS琼脂平板上, 37℃温箱中厌氧培养48 h后, 挑取单个菌落至10 mL MRS肉汤培养基中, 37℃厌氧培养一定的时间, 并采用分光光度计检测其在波长600 nm处的吸光度(A)值。 $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min, 弃上清, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬后进行平板稀释涂布, 按照10倍梯度稀释 ($10^{-7}\sim 10^{-1}$), 将各浓度菌液涂布于MRS琼脂平板, 至少涂布3个平板, 所有平板37℃倒置厌氧培养48 h, 计数平板菌落数量, 并取相同浓度的3个平板菌落数平均值为其活菌数。以时间为横坐标, A值和活菌数为纵坐标绘制罗伊氏乳杆菌生长曲线。选取 10^{-7} 稀释的菌液进行2倍比稀释涂布平板 ($2^{-8}\sim 2^{-1}$), 计算其菌落数, 同时测定其菌液对应的A值, 随后以菌落数为横坐标, A值为纵坐标, 绘制回归分析标准曲线。根据标准曲线和A值计算细菌浓度, 筛选罗伊氏乳杆菌培养最佳时间和最适浓度。每毫升中总活菌数 ($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) = 同一稀释度菌落平均数 ($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) \times 稀释倍数。

1.5 台盼蓝染色法检测 Caco-2 细胞存活率

Caco-2细胞以每孔 2×10^6 个的密度接种于6孔细胞培养板,待细胞密度为80%~90%后,采用 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 、 200×10^8 和 500×10^8 CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌感染细胞,培养1 h后弃去菌液,PBS缓冲液洗涤5次,每孔加入2 mL含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 猪胰酶的DMEM培养液。培养12 h后,PBS缓冲液洗涤3次,胰酶消化,将单细胞悬液与台盼蓝9:1混合,均匀注入细胞计数板,将计数板放入细胞计数仪中,记录结果,每个样本重复测定3次。细胞存活率=活细胞/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 免疫荧光灶法检测罗伊氏乳杆菌作用后 Caco-2 细胞中病毒滴度

Caco-2细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于24孔细胞培养板,待细胞长至80%后,将Caco-2细胞分为阴性对照组(NC组,Caco-2细胞不进行任何处理)、阳性对照组(PC组,Caco-2细胞未感染罗伊氏乳杆菌)和 10^7 、 10^8 、 10^9 及 10^{10} CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌组[分别采用 10^7 、 10^8 、 10^9 和 10^{10} CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌与Caco-2细胞共孵育1 h后,每孔加入感染复数(multiplicity of infection, MOI)为1的RV,感染细胞1 h,弃去病毒液,PBS缓冲液润洗1次,每孔加入2 mL含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 猪胰酶的DMEM培养液]。各组细胞维持培养12 h后进行免疫荧光实验:吸弃维持液,PBS缓冲液洗涤3次,4%多聚甲醛固定,加入0.1% Triton X-100作为细胞通透剂,1% BSA封闭后加入以鼠源RV VP6一抗和FITC标记的山羊抗鼠二抗,倒置荧光显微镜下观察并记录各孔免疫荧光灶数,计算病毒滴度。病毒滴度(FFU·mL⁻¹)=(最高稀释倍数孔荧光灶数的平均值+相邻较低稀释倍数孔荧光灶数的平均值)/[2 \times 相邻较低稀释倍数 \times 每孔加入的病毒稀释液的体积(mL)]。

1.7 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测不同浓度罗伊氏乳杆菌作用后 Caco-2 细胞中 RV VP6 基因拷贝数

采用 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 、 200×10^8 和 500×10^8 CFU·mL⁻¹罗伊氏乳杆菌侵袭Caco-2细胞1 h,PBS缓冲液洗涤5次,每孔加入MOI为0.01的RV感染Caco-2细胞1 h,12 h后收集各组细胞,TRIzol法提取细胞总RNA,反转录合成cDNA后,采用RT-qPCR法扩增检测

RV VP6基因拷贝数,引物序列见表1。RT-qPCR的具体步骤按照TB Green® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)说明书操作。每个样品平行测定3次。扩增后得到Ct值,并绘制标准曲线,计算病毒基因拷贝数,RV VP6基因标准曲线由实验室前期构建质粒所得: $Y = -0.2987X + 16.613$ ($R^2 = 0.9997$, Y代表Lg病毒拷贝数, X代表Ct值)。

1.8 罗伊氏乳杆菌与RV体内共培养动物模型建立

将25窝SPF级昆明乳鼠随机分为对照组、RV组(感染SA11毒株)、Ab-NC组(抗生素处理耗竭肠道菌群)、Ab-RV组(耗竭肠道菌群后感染SA11毒株)和Ab-Lac-RV组(耗竭肠道菌群,并感染罗伊氏乳杆菌后感染SA11毒株),每组5窝,每窝8~9只乳鼠。Ab-NC组、Ab-RV组和Ab-Lac-RV组乳鼠连续3 d灌胃四联抗生素 $100 \mu\text{L}$ (新生霉素 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、万古霉素 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、甲硝唑 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和氨苄西林 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。每日收集乳鼠粪便,采用LB平板有氧培养和MRS琼脂平板厌氧培养检测肠道菌群耗竭情况。RV组和Ab-RV组乳鼠连续10 d灌胃 $6.5 \text{ Lg FFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ SA11毒株,Ab-Lac-RV组乳鼠上午感染 $100 \mu\text{L} 10^{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 罗伊氏乳杆菌,下午感染 $6.5 \text{ Lg FFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ SA11毒株。NC组和Ab-NC组乳鼠灌胃PBS缓冲液,持续灌胃10 d。分别于灌胃第2、4、6、8和10天收集各组乳鼠粪便样本,用于后续实验。

1.9 RT-qPCR法检测各组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数和结肠组织中免疫因子mRNA表达水平

取各组乳鼠粪便,均称取相同质量,加入等量PBS缓冲液,振荡器震荡3次,每次15 s,4℃、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取 $250 \mu\text{L}$ 上清,TRIzol法提取总RNA,反转录为cDNA,采用RT-PCR法检测RV VP6基因拷贝数,参考“1.7”中方法。

收集灌胃第4天各组乳鼠结肠组织,称取相同结肠组织质量,加入 $800 \mu\text{L}$ PBS缓冲液和5颗研磨珠,置于研磨机上研磨2 min,离心后取 $400 \mu\text{L}$ 上清,TRIzol法提取RNA,反转录为cDNA,根据白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-8、IL-10、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因设计特异性引物,进行RT-qPCR实验,以GAPDH作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各免疫因子mRNA表达水平。引物序列见表1。

1.10 统计学分析

采用Origin2018和Graphpad

表1 PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Gene	Primer sequence
VP6	F 5'-ACTTGGAACAACCTTTGCTGAAC-3' R 5'-AGCGAGTCTGATTGAGGTGC-3'
IL-1 β	F 5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3' R 5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
TNF- α	F 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' R 5'-TGGGCTACAGGCTTGTCACT-3'
IL-8	F 5'-CAGGCCACAGACGGACATG-3' R 5'-GGACGAAGATGCCTAGGTTAAGG-3'
IL-10	F 5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3' R 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'
IFN- γ	F 5'-CATTCATGAGTATTGCCAAGTTTG-3' R 5'-GCTGGATTCCGGCAACAG-3'
GAPDH	F 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' R 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

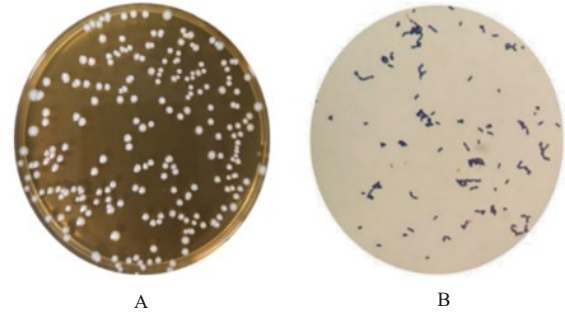


图1 罗伊氏乳杆菌菌落大体形态(A)和革兰染色观察菌落形态表现(B)

Fig. 1 Colony morphology (A) and morphology of *Lactobacillus reuteri* observed by Gram staining (B)

Prism 9.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞中 RV VP6 基因拷贝数、免疫荧光灶数和病毒滴度, 各组乳鼠粪便中 RV VP6 基因拷贝数和结肠组织中免疫因子 mRNA 表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本间均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗伊氏乳杆菌鉴定和生长曲线 罗伊氏乳杆菌经活化和培养, 于 MRS 琼脂平板上生长良好, 形态圆润, 呈圆形、光滑和乳白色的凸起样菌落, 且边缘较整齐。革兰染色后菌体呈紫色、不规则和方形杆状。见图 1。罗伊氏乳杆菌经 16s rDNA 测序后序列同源率为 99%, 提示罗伊氏乳杆菌活化成功。见图 2。罗伊氏乳杆菌活菌数与 A 值呈线性关系, 回归分析标准曲线为 $Y = 0.4375X + 0.0006$, $R^2 = 0.9994$ 。培养 0~2 h, 细菌处于对数生长期, 细菌生长迟缓; 培养 2~14 h, 细菌快速生长, 并于培养 14~16 h 时细菌生长趋于稳定, 培养 16 h 时达到细菌生长速率顶峰, 随后进入衰亡期。见图 3。

2.2 不同浓度罗伊氏乳杆菌感染后 Caco-2 细胞存活率 采用 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 和 200×10^8 CFU·mL⁻¹ 罗伊氏乳杆菌感染 Caco-2 细胞, Caco-2 细胞存活率均 >90%, 因此后续实验采用 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 和

200×10^8 CFU·mL⁻¹ 罗伊氏乳杆菌进行细胞感染。见图 4。

2.3 各组 Caco-2 细胞中 RV VP6 基因拷贝数 与 PC 组比较, 5×10^8 、 10×10^8 、 50×10^8 、 100×10^8 和 200×10^8 CFU·mL⁻¹ 罗伊氏乳杆菌组 Caco-2 细胞中 RV VP6 基因拷贝数均明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 各组 Caco-2 细胞中病毒滴度 与 PC 组 [(6.383 ± 0.021) Lg FFU·mL⁻¹] 比较, 10^7 、 10^8 、 10^9 和 10^{10} CFU·mL⁻¹ 罗伊氏乳杆菌组 Caco-2 细胞中病毒滴度 [(6.247 ± 0.042) 、 (6.097 ± 0.091) 、 (6.030 ± 0.075) 和 (5.837 ± 0.050) Lg FFU·mL⁻¹] 均明显降低 ($P < 0.01$)。见图 5。

2.5 乳鼠肠道菌群耗竭模型和罗伊氏乳杆菌移植模型验证 与对照组比较, Ab-NC 组、Ab-RV 组和 Ab-Lac-RV 组乳鼠肠道菌群菌落数量均明显减少, 乳鼠肠道菌群耗竭成功。见图 6 和 7。

2.6 各组乳鼠粪便中 RV VP6 基因拷贝数 灌胃第 2 和 4 天, 与 RV 组比较, Ab-RV 组乳鼠粪便中 RV VP6 基因拷贝数明显降低 ($P < 0.05$)。灌胃第 4、6、8 和 10 天, 与 Ab-RV 组比较, Ab-Lac-RV 组乳鼠粪便中 RV VP6 基因拷贝数明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.7 各组乳鼠结肠组织中免疫因子 mRNA 表达水平 与对照组比较, Ab-RV 组和 Ab-Lac-RV 组乳鼠结肠组织中 IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-8 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), Ab-Lac-RV 组乳鼠结肠组织中 IL-10 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见表 4。

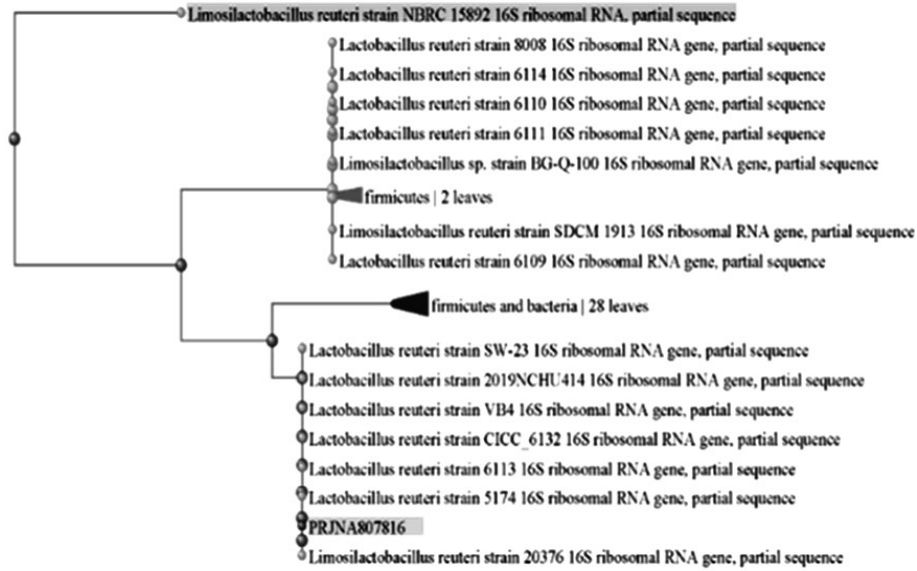
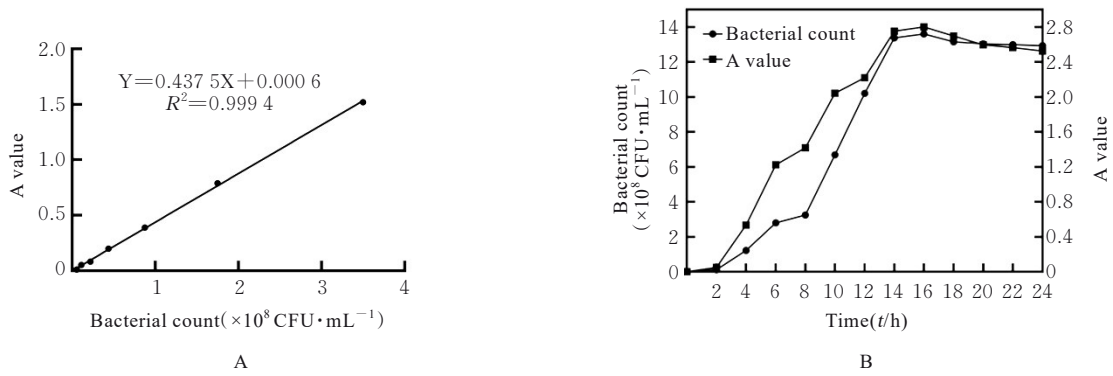


图2 16s rDNA 序列构建进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by 16s rDNA sequences



A: Standard curves; B: Growth curves.

图3 罗伊氏乳杆菌标准曲线和生长曲线

Fig. 3 Standard curves and growth curves of *Lactobacillus reuteri*

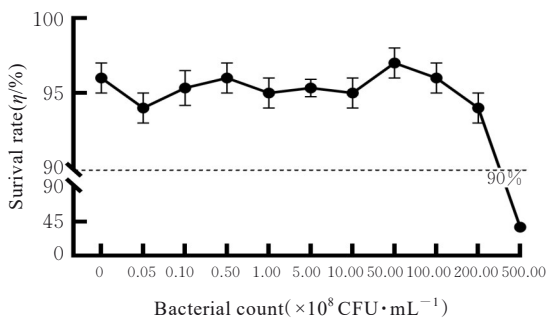


图4 罗伊氏乳杆菌感染后 Caco-2 细胞存活率

Fig. 4 Survival rates of Caco-2 cells after infected with *Lactobacillus reuteri*

表2 各组 Caco-2 细胞中 RV VP6 基因拷贝数

Tab. 2 Copy numbers of RV VP6 gene in Caco-2 cells in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

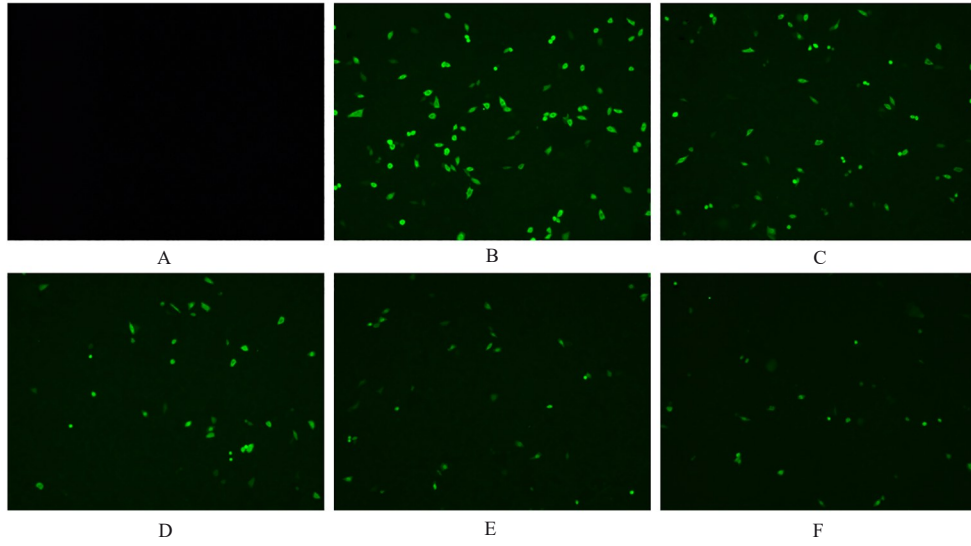
Group	Copy number (copies · mL ⁻¹)
PC	2.085 × 10 ⁸ ± 1.406 × 10 ⁷
<i>Lactobacillus reuteri</i> (CFU · mL ⁻¹)	
5 × 10 ⁸	6.903 × 10 ⁷ ± 1.435 × 10 ⁶ *
10 × 10 ⁸	1.456 × 10 ⁷ ± 6.986 × 10 ⁵ *
50 × 10 ⁸	7.016 × 10 ⁶ ± 1.772 × 10 ⁵ *
100 × 10 ⁸	4.444 × 10 ⁶ ± 2.653 × 10 ⁵ *
200 × 10 ⁸	2.736 × 10 ⁶ ± 1.463 × 10 ⁵ *

*P < 0.01 compared with PC group.

3 讨论

在儿童常见的疾病中, 急性腹泻是仅次于呼吸

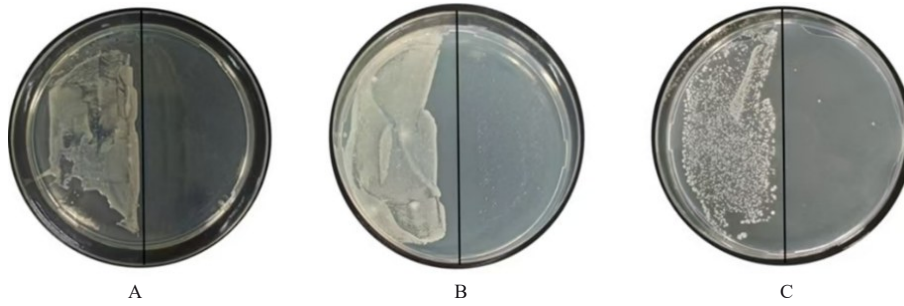
道感染的第二大常见疾病, RV 是急性腹泻最常见的触发因素之一^[12]。肠道微生物群在维持宿主健



A: NC group; B: PC group; C: 10^7 CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* group; D: 10^8 CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* group; E: 10^9 CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* group; F: 10^{10} CFU·mL⁻¹ *Lactobacillus reuteri* group.

图 5 免疫荧光灶法检测各组 Caco-2 细胞中病毒滴度($\times 10$)

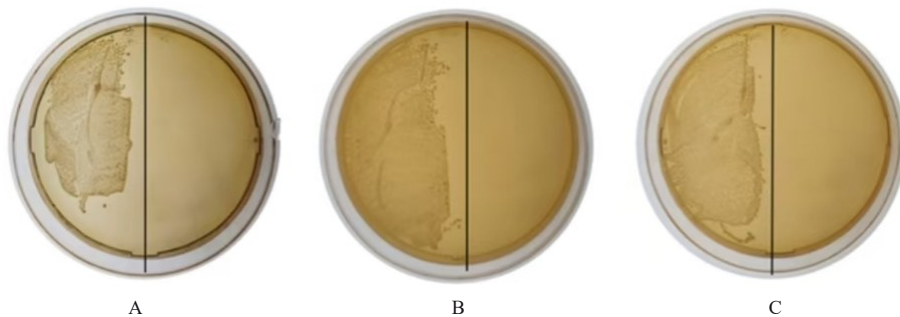
Fig. 5 Viral titres in Caco-2 cells in various groups detected by immunofluorescence focal method($\times 10$)



A: Control group(left) and Ab-NC group(right); B: Control group(left) and Ab-RV group(right); C: Control group(left) and Ab-Lac-RV group(right).

图 6 LB 平板检测各组乳鼠肠道菌群耗竭情况

Fig. 6 Depletion of intestinal flora of suckling rats in various groups detected by LB plate



A: Control group(left) and Ab-NC group(right); B: Control group(left) and Ab-RV group(right); C: Control group(left) and Ab-Lac-RV group(right).

图 7 MRS 平板检测各组乳鼠肠道菌群耗竭情况

Fig. 7 Depletion of intestinal flora of suckling rats in various groups detected by MRS plate

表3 各组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数

Tab. 3 Copy numbers of RV VP6 gene in feces of suckling rats in various groups

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Copy number (copies·mL ⁻¹)					
	(t/d)	2	4	6	8	10
RV		5.984±0.016	5.858±0.008	4.297±0.040	3.910±0.021	3.300±0.029
Ab-RV		5.409±0.004*	5.188±0.009*	4.932±0.012	4.097±0.032	3.742±0.031
Ab-Lac-RV		5.428±0.012	4.970±0.018 [△]	4.335±0.040 [△]	4.070±0.060 [△]	3.582±0.043 [△]

*P<0.05 compared with RV group; [△]P<0.05 compared with Ab-RV group.表4 各组乳鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-8、IL-10、IFN- γ 和TNF- α mRNA表达水平Tab. 4 Expression levels of IL-1 β , IL-8, IL-10, IFN- γ , and TNF- α mRNA in colon tissue of suckling rats in various groups(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	IL-1 β	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF- α
Control	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
RV	0.986±0.018	0.631±0.070	0.188±0.020	0.248±0.084	1.567±0.129
Ab-NC	0.942±0.031	0.196±0.055	0.702±0.109	1.501±0.239	1.318±0.070
Ab-RV	1.718±0.031*	0.407±0.117*	1.058±0.191	2.731±0.244**	2.512±0.221**
Ab-Lac-RV	7.878±0.285*	0.216±0.029*	4.877±0.016**	17.739±1.384**	5.963±0.287**

*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

康中发挥重要作用。研究^[13]显示：微生物群的生态和功能与肠道病毒感染有关，病毒感染也可以改变肠道微生物的组成和活性。研究^[14-17]显示：脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒、诺如病毒和RV均可影响肠道微生物群。部分共生细菌也已被证实可以通过多种机制增强肠道病毒的感染性，如细菌可以增强病毒颗粒的稳定性、帮助病毒吸附靶细胞和抑制抗病毒免疫反应等^[18]。研究^[19-22]发现：部分细菌也可以减弱肠道病毒的感染性，其中乳杆菌和双歧杆菌能够阻断RV的体外复制，分段丝状菌可以预防和治疗小鼠体内RV的感染，克劳氏芽孢杆菌可以保护Caco-2细胞免受RV的感染。但目前对于罗伊氏乳杆菌与RV相互作用的机制尚未完全阐明。

本研究前期研究^[11]证实：RV感染的乳鼠体内肠道微生物发生明显变化，其中罗伊氏乳杆菌丰度明显降低。本研究结果显示：罗伊氏乳杆菌与RV共感染后，RV VP6基因拷贝数和病毒滴度均明显降低，这与FERNANDEZ-DUARTE等^[23]的研究结果一致。本研究结果显示：与未经抗生素处理的感染RV组比较，抗生素处理后感染RV组乳鼠粪便中RV VP6基因拷贝数明显降低，提示肠道菌群对RV的感染有一定的影响作用，肠道菌群的总体效应是促进RV的感染，与DOMÍNGUEZ-DÍAZ等^[24]

的研究结果一致。与抗生素处理后感染RV组比较，罗伊氏乳杆菌RV感染组VP6基因拷贝数明显降低，且随着罗伊氏乳杆菌作用时间延长，VP6基因拷贝数逐渐降低，提示罗伊氏乳杆菌可以在体内抑制RV复制，其作用时间越长，抑制效果越好。当RV入侵机体时，罗伊氏乳杆菌可能通过上调免疫因子IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 和TNF- α mRNA表达及下调免疫因子IL-8 mRNA表达，抑制RV复制。

综上所述，罗伊氏乳杆菌可以通过调节免疫因子表达抑制RV复制，为罗伊氏乳杆菌在预防和治疗RV相关疾病中的应用提供参考。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

李小凤参与研究选题、数据收集整理和论文撰写，程美慧参与实验操作，刘洋和刘长城参与数据统计学分析，贾雪娇和刘梦琦参与论文审校，赵微参与论文撰写指导。

[参考文献]

- [1] MU Q H, TAVELLA V J, LUO X M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 757.
- [2] GUARINO A, GUANDALINI S, VECCHIO A L. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea[J]. J Clin Gastroenterol, 2015, 49(Suppl 1): S37-S45.

- [3] WU H Q, XIE S, MIAO J F, et al. *Lactobacillus reuteri* maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa [J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 997-1014.
- [4] AL-HADIDI A, NAVARRO J, GOODMAN S D, et al. *Lactobacillus reuteri* in its biofilm state improves protection from experimental necrotizing enterocolitis[J]. Nutrients, 2021, 13(3): 918.
- [5] ZHOU Q H, WU F T, CHEN S W, et al. *Lactobacillus reuteri* improves function of the intestinal barrier in rats with acute liver failure through Nrf-2/HO-1 pathway[J]. Nutrition, 2022, 99/100: 111673.
- [6] PENG Y J, MA Y Z, LUO Z C, et al. *Lactobacillus reuteri* in digestive system diseases: focus on clinical trials and mechanisms [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1254198.
- [7] AMOROSO C, PERILLO F, STRATI F, et al. The role of gut microbiota biomodulators on mucosal immunity and intestinal inflammation[J]. Cells, 2020, 9(5): 1234.
- [8] WILKINS T, SEQUOIA J. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence [J]. Am Fam Physician, 2017, 96(3): 170-178.
- [9] SUN X Q, KONG J, ZHU S T, et al. A systematic review and meta-analysis: the therapeutic and preventive effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17, 938 addition in children with diarrhea[J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 141.
- [10] AZIZ A B, ALI M, BASUNIA A H, et al. Impact of vaccination on the risk factors for acute rotavirus diarrhea: an analysis of the data of a cluster randomized trial conducted in a rural area of Bangladesh [J]. Vaccine, 2020, 38(9): 2190-2197.
- [11] ZHAO W, YU M L, TAO X L, et al. Analysis of the intestinal microbial community altered during rotavirus infection in suckling mice[J]. Virol J, 2021, 18(1): 254.
- [12] VALENCIA-RODRÍGUEZ A, AQUINO-MATUS J, VERA-BARAJAS A, et al. New therapeutic options for bile acid malabsorption diarrhea [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(22): 695.
- [13] WIRUSANTI N I, BALDRIDGE M T, HARRIS V C. Microbiota regulation of viral infections through interferon signaling[J]. Trends Microbiol, 2022, 30(8): 778-792.
- [14] KUSS S K, BEST G T, ETHEREDGE C A, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis [J]. Science, 2011, 334(6053): 249-252.
- [15] GRAU K R, ZHU S, PETERSON S T, et al. The intestinal regionalization of acute norovirus infection is regulated by the microbiota via bile acid-mediated priming of type III interferon[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(1): 84-92.
- [16] KNIPPING K, MCNEAL M M, CRIENEN A, et al. A gastrointestinal rotavirus infection mouse model for immune modulation studies[J]. Virol J, 2011, 8: 109.
- [17] RIGO-ADROVER M D M, KNIPPING K, GARSEN J, et al. Prevention of rotavirus diarrhea in suckling rats by a specific fermented milk concentrate with prebiotic mixture[J]. Nutrients, 2019, 11(1): 189.
- [18] KARST S M. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(4): 197-204.
- [19] CHATTHA K S, VLASOVA A N, KANDASAMY S, et al. Divergent immunomodulating effects of probiotics on T cell responses to oral attenuated human rotavirus vaccine and virulent human rotavirus infection in a neonatal gnotobiotic piglet disease model[J]. J Immunol, 2013, 191(5): 2446-2456.
- [20] VLASOVA A N, CHATTHA K S, KANDASAMY S, et al. Lactobacilli and bifidobacteria promote immune homeostasis by modulating innate immune responses to human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76962.
- [21] SHI Z D, ZOU J, ZHANG Z, et al. Segmented filamentous bacteria prevent and cure rotavirus infection[J]. Cell, 2019, 179(3): 644-658.e13.
- [22] PAPARO L, TRIPODI L, BRUNO C, et al. Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an *in vitro* model of Rotavirus infection[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 12636.
- [23] FERNANDEZ-DUARTE K P, OLAYA-GALÁN N N, SALAS-CÁRDENAS S P, et al. *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) and *Lactobacillus casei* (lafti L26-DSL): probiotics able to block the *in vitro* adherence of rotavirus in MA104 cells [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2018, 10(1): 56-63.
- [24] DOMÍNGUEZ-DÍAZ C, GARCÍA-OROZCO A, RIERA-LEAL A, et al. Microbiota and its role on viral evasion: is it with us or against us?[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 256.