文章编号:1004 - 9231(2004)05 - 0235 - 03

继续教育 ·

微生态制剂发展方向的讨论

李亦德 (上海市预防医学会微生态专业委员会,上海 200070)

以微生态理论为基础制备的微生态制剂,在治病、防病、保健等方面正显示其特殊的功效,因而受到普遍的重视。微生态制剂方兴未艾,今后制品的发展方向如何,受到关注。微生态制剂创始时是活菌制剂,以后很多研究资料表明,死菌也有一定功效,也有人认为提取细菌生理功能的有效成分将是一种新的发展方向,本文就上述问题进行讨论。

1　微生态活菌制剂

按微生态的观点,人类疾病和衰老一个重要促进因素是由于体内的有害菌占了"统治"地位,如果体内有益菌和有害菌能保持平衡,就能促进健康。根据这一原理制备的微生态制剂,是以活的有益的生理细菌补充人体,以期微生态平衡,达到治病、防病的目的。由此微生态活菌制剂也就诞生了。

活菌制剂的作用是生理细菌进入人体定植(定居繁殖)、繁殖,其菌体及代谢产物能发挥特殊的生理功能,以拮抗、抑制有害菌,促进人体的营养和免疫功能,这类活菌制剂是目前国内外微生态制剂的主流,各种类型的活菌制剂包括药品、保健品和食品有数百种之多,这些制品在治疗上取得了特殊的效果,在保健上取得积极的作用。长期来,大量的资料证明活菌制剂是有效的,也是安全的[1,2]。

但活菌制剂仍需进一步完善。首先,活的细菌进入人体会遇到很多困难,如生产工艺、制品贮藏,要保证足够量的活菌数,服用过程又会遇到胃酸等生物屏障而影响活菌进入体内,但在这方面通过生产工艺及制品剂型的改进有很多产品已取得很好的效果。

更重要的是体外活菌补充进入到人体后较难定植,而成为"过路菌",其功效显著减少。解决这问题最简单的方法是不断地补充活菌制剂。但不断地大量补充,有些问题值得注意:首先,细菌有"定位转移"(易位)的可能,即微生物由原籍生境转移到外籍生境或本无微生物生存的位置,这种现象有对人体造成感染的可能性,特别对免疫缺陷者。已有报道,酵母菌、乳酸菌、肠球菌等,引起心内膜炎、败血症、肝脓肿等[3]。另一方面,活菌制剂的活菌如带有"耐药质粒",这有可能将"抗药性"传递给其他细菌[4],使原对药物敏感的细菌变成抗药,增加感染性疾病治疗的难度。

提高活菌制剂的功效和安全性,其生产菌株的选择是关键,近期欧共体有关研究报告[5]对筛选菌株的标准提出从三方面评价,可作参考:

①安全性:必须分离自健康人胃肠道,具有长期的非致病菌历史,与感染性心内膜炎症或胃肠功能紊乱疾病无关,不具有脱胆汁盐性能,不携带有任何可转移的耐药质粒。

②功效性:具有耐酸性能,耐胆汁盐性能,有与上皮细胞的黏附和定植的能力,有免疫激活性能而没有炎症影响,对致病菌(如幽门螺杆菌、沙门菌等)有拮抗作用,有抗突变和抗肿瘤性能。

③技术性能(工艺的可行性):有良好的发酵性能(良好的生长、代谢性能),有噬菌体抗性,加工过程中具有较高的存活率,产品贮藏过程中具有良好的稳定性能。

除菌株外,生产工艺的提高,如高密度发酵培养,提高活菌数;剂型的改进如冻干、微胶囊等;加入有效的保护剂,确保贮存过程的稳定性也十分重要。对剂量和用量问题也需研究,不同的细菌,对人体最佳摄入量是不同的。因此,每种制品每天应服多少量的活菌、服用周期多长才是合理的,需作研究及观察,以科学的确定剂量及服用方法。

2　死菌体(加代谢产物)制剂

活菌微生态制剂的效果已被实践证实,死菌的微生态制剂是否也有效?研究资料表明[6~8],益生菌的死菌体也有生理功能,死菌虽不能像活菌那样能够繁殖,但它仍保有着生物活性,因此,对人体仍可产生生物效应。以下的资料可表明,死菌体在微生态制剂主要功效上的作用:

2.1　黏附作用

黏附作用是细菌定植的基础,益生菌"占位"后,其他有害菌就无"立足之地"。很多资料表明,死菌体也能在肠壁黏附,伦永志等[9~11]报道,灭活的双歧杆菌和活的双歧杆菌一样对肠上皮细胞有黏附作用,而其培养上清液对黏附也起着重要作用。死菌体也有黏附作用,原因是大多数革兰阳性菌的细胞壁含有脂磷壁酸(L TA),它对肠壁有黏附作用,另外细菌培养液中也含有与黏附有关的黏附素成分。

2.2　平衡与拮抗

微生态学观点认为,人体微生态的平衡是健康的保证,已有不少资料报道,灭活死菌体和细菌培养的上清液与活菌一样,同样有促使微生态平衡的作用。吕密凯等报道[12]将 3 组小鼠用抗生素清除肠道细菌后,分别喂双歧杆菌活菌、灭活死菌、细菌培养上清液等,3 天后观察菌群生长情况,发现以上 3 种样品灌胃后,其肠内双歧杆菌的活菌数均高于自然恢复组,表明死菌体和培养上清液同样有促使肠道双歧杆菌生长以达肠道微生态平衡的作用,其原因除上述死菌也能黏附肠壁"占位"外,另一方面死菌体含有对有害菌生长的抑菌物如生物酶、活性肽、细菌素等;细菌培养上清液含有代谢产物如乙酸、乳酸、过氧化氢和细菌素等抑菌物质,还因为肠内容物变酸,促使肠蠕动,使有害菌在定植前就被排出体外。上述对有害菌的拮抗作用是微生态平衡的一个因素。此外死菌体和培养上清液可能存在促进有益菌生长的因子和营养,有利有益菌的繁殖。

2.3　营养

益生菌菌体的本身对宿主(人)是一种营养。有人用 ^{15}N 标记的蛋白质证明双歧杆菌的氮 80 %可为宿主吸收,75 %可成

作者简介:李亦德(1935～),男,研究员。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

为宿主蛋白池中的组分;此外益生菌依赖酶的作用,分解蛋白质、脂类及碳水化合物,成为人体可吸收的营养物,而这些酶在死菌体及培养液内都可能存在;益生菌能合成 B 族维生素、生物素、烟酸等,这些维生素可在菌体内也可能在培养液内;益生菌不论死菌或活菌都有降低血胆固醇和三酰甘油的作用[13]。

2.4 免疫

益生菌对人体免疫的促进作用是极为重要的,是防病、治病、抗衰老的基础。资料表明[14~16],死菌体也有免疫作用,有人将灭活的和活的双歧杆菌以及培养的上清液对环磷酰胺造成免疫低下的动物模型进行灌胃,结果灭活的和活的双歧杆菌都能提高免疫低下的小鼠血清中 IL - 1β、IL - 6 和 IFN - α 的含量,两者的作用效果差异无显著性[6]。而培养的上清液也有一定的免疫促进作用[17]。也有人将热灭活的双歧杆菌输入家兔肠内,5 d 后电镜检查,发现双歧杆菌菌体已被 M 细胞摄取,此时潘氏盘就有抗体产生和细胞增殖;细胞培养技术证明,在潘氏盘细胞的组织培养液中,加入经加热处理的人源性的双歧杆菌,用 ELISA 方法测定 IgA,发现大部分分离的菌株,都能促进 IgA 量的增加[13];有资料报道,大多数革兰阳性菌的细胞壁都含有 LTA,它不仅与细菌的黏附和定植密切相关,而且有较强的免疫赋活作用,实验表明,细菌的细胞壁的胞壁肽聚糖(PG),能刺激 T 细胞的增殖,并能诱导产生干扰素(IFN)、杀伤细胞(NK)、肿瘤坏死因子(TNF)等多种细胞因子,是人类抗感染、抗肿瘤、抗衰老的重要物质[18~23]。

死菌体虽不能繁殖,但生物活性物质仍有功效。特别要说明的是,细菌培养后的上清液内含有生理活性的酶、功能性肽、短链脂肪酸、营养成分、细菌素以及菌体组分等,其对人体是有益的。应该说活菌制剂如进入体内不能繁殖则不可能产生代谢产物,也就缺乏代谢产物所具有的活性功能。死菌体制品当然更不可能有代谢产物。因此代谢产物作为制品的一部分,确实是丰富了制品的有效成分,特别是细菌在体外培养可以人为的满足生理菌所需的各种条件,其代谢产物会比在体内繁殖更丰富,因此死菌制品(乃至有些活菌制品),加上代谢产物是很有必要的。

灭活制品的潜在不足就是不能像活菌一样在体内繁殖(如果活菌真能在体内定植繁殖的话),但其同时存在活菌制剂无法具备的优点:

①拓宽了菌株的选择面:无需过分考虑菌株的侵蚀性,并可采用多株菌株使功效更全面,而活菌采用多种菌株可能会造成营养竞争以及相互干扰等。

②生产工艺更易控制:由于是死菌制品,在生产过程及储运过程中,不必为活菌数层层采取繁琐的措施。

③质控指标更明确:首先死菌体的菌数比活菌数的检测更确切。死菌制品还可以进一步确定有效成分的指标,使质量控制指标更完善。

④制品含量可调控:由于是死菌比活菌更安全。因此,制品细菌的数量可大大高于活菌数,以提高制品效果。

⑤制品可有更多的配伍内容:不像活菌制品为保持活菌数,限制了其他成分的加入,死菌制品允许更多有效成分的配伍,以提高制品的综合效果,例如可加入中药、益生元、代谢产物、维生素等。

⑥制品质量稳定易保存:与活菌相比,其有效期更长,运输、保存无需冷藏,携带、使用方便。禁忌少,不易受胃酸屏障的影响,可与抗生素同时使用。

⑦制品更安全:不会经肠道转移造成二度感染。

死菌制品有成功的例子:乳酸菌素片作为医治胃肠病的药品在我国已使用 20 多年,其有效成分就是乳酸菌经发酵后产生的有机酸等代谢产物以及乳酸菌死菌体及其碎片。又如法国生产的一种微生态药品制剂,是嗜酸乳杆菌 LB 菌株灭活的死菌制品,同时加上了冻干的细菌培养液上清,该制品已获得我国政府有关部门批准为医保药品。临床资料表明,对急慢性腹泻及便秘效果显著;抑制 HP 感染作用与抗生素相仿(溃疡愈合率达 85.9 %),而且无不良反应。

死菌微生态制剂存在着很大的发展潜力,进一步的深入研究,将会显示其更大的功效及广阔的前景。

3 精制提纯制品

疫苗的制备开始采用减毒的活的微生物,但由于安全性差、不良反应率高,免疫效果不佳,疫苗制品逐步向提取特异性免疫原,提纯精制制品方向发展。如流脑疫苗开始采用灭活菌体疫苗,接种后全身中强反应率达 10 %～40 %,接种 3 针其保护率约 60 %～70 %。20 世纪 80 年代,我国试制成功流脑多糖疫苗,它是从细菌荚膜中提取的多糖抗原,有很强免疫原性并无毒副作用,因此在实际应用中,几乎无接种反应,仅接种 1 针,保护率可达 90 %以上。由于流脑多糖疫苗的高效免疫,使横行我国数十年的流脑得以控制。疫苗制品把精制提纯作为发展方向,菌苗类制品也在朝精制提纯方向发展,根据 2000 版中国生物制品规程,现用的菌苗类制品共 11 种(大类),其中提纯制品就有 6 种,有此可见一斑。

微生态制剂是生理细菌制备的制品,我们将其有效成分提取浓缩,这是一种质的飞越,将大大提高制品的功效。此外,随着对益生菌功能的基因组的了解,益生菌的基因工程菌将得以发展,工程菌的开发和应用,最安全有效的方法,还是有效成分的提纯。因此,精制、提纯必将是微生态制剂发展的方向。

根据国内外资料报道[24~28],目前已知益生菌功能的物质基础如下:

①黏附功能:细菌表层活性物质、脂磷壁酸、黏附素。

②抗感染及抑制致病菌:有机酸(pH 和 Eh 下降造成酸性环境)、过氧化氢、细菌素(有类似抗生素作用)。

③控制毒性及有害物质:短链脂肪酸、乳酸(抑制腐败菌生长减少内毒素,促使氨的吸收、尿素的形成),脱饱和酶,脱羟基酶(使胆固醇变成粪固醇排出)。

④抗衰老:短链脂肪酸、乳酸(抑制腐败菌生长减少毒胺、靛基质、吲哚、氨、粪臭素、硫化氢等有毒物质生存),SOD(清除自由基)。

⑤营养:分解酶(能分解蛋白质、脂肪、淀粉为可吸收的营养),合成酶(生成各类维生素),短链脂肪酸(能改善对钙、镁、铁离子的代谢和吸收)。

⑥抗肿瘤:短链脂肪酸(能诱导肿瘤细胞凋亡),致癌物质分

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

解酶(如亚硝胺分解酶),脂磷壁酸,胞壁肽聚糖(抗突变、抵制及消灭癌细胞)。

⑦提高免疫功能:多糖类产物(促进非特异性免疫),脂磷壁酸,胞壁肽聚糖(活化 B 及 T 淋巴细胞,促进淋巴细胞有丝分裂及产生多种细胞因子)。

以上仅初步反映了益生菌生理功能的物质基础,当然为进一步寻找其有效成分以及将有效成分提纯浓缩,还存在着很多的技术难题。但一旦开发成功将会给人类的健康长寿开辟新纪元。

实际上对生理细菌有效成分的提取已取得了一定效果,如细菌素的提取,已有好几种市售产品,由于其为多肽类物质,因此质量稳定,耐酸、碱及高温,且安全无毒,是较为理想的生物防腐剂。应用较多的有乳链菌肽(Nisin),该制品已经美国 FDA 认可。目前有人应用乳链菌肽与柠檬酸合用治疗 HP 取得很好的效果。国外正对 PG 及 LTA 进行生产规模的研究。新一代的精制提纯的微生态制剂将会很快得以发展。

4　参考文献:

[1]熊德鑫. 微生态学研究的重要意义和实际应用[J]. 中国微生态学, 2001, 13(5): 252.

[2]张达荣. 消化系统疾病与微生态[M]. 上海:上海科技出版社. 2001.

[3] Kirjavinen PV, et al. In vitro adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia - associated Lactobacilli[J]. Infection and Immunity, 1999, 5: 2653 - 2655.

[4] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemintion of resistance genes[J]. Science, 1994, 264: 357 - 382.

[5] Demonstration of Nutritional functiondity of Porbiontic Foods, PROBDEMO, FAIR CT 96 - 1028.

[6]纪芳,黄敏,伦永志,等. 灭活的双歧杆菌对小鼠血清中细胞因子水平的影响[J]. 中国微生态学, 2003, 15(2): 78.

[7] Haller D, Bode C, Hammes WP. Cytokine secretion by stimulated monocytes depends on the growth phase and heat treatment of bacteria: A comparative study between Lactic Acid Bacteria and invasive pathogens [J]. Microbiol Immunol, 1999, 43(10): 925 - 935.

[8] Hatcher GE, Lambrecht RS. Augmentation of macrophage phagocyte activity by cell free extracts of selected lactic acid producting bacteria [J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 2485 - 2492.

[9]伦永志,黄敏,袁杰利,等. 灭活的双歧杆菌对肠上皮细胞黏附及其影响因素的研究[J]. 中国微生态学, 2000, 12(6): 314.

[10]伦永志,黄敏,袁杰利,等. 灭活的双歧杆菌对 EPEC 的黏附抑制作用[J]. 中国微生态学, 2003, 15(1): 13.

[11]邓一平. 双歧杆菌及表面分子对胃黏膜糖蛋白的黏附作用[J]. 中国微生态学, 2000, 12(4): 193.

[12]吕密凯,陈燕芹,马淑霞,等,灭活的双歧杆菌对抗生素脱污小鼠肠道生理菌群的调整[J]. 中国微生态学, 1999, 11(3): 143.

[13]康白. 双歧杆菌[M]. 大连:大连海事大学出版社, 1998.

[14]王玉梅,孟红,孙广莲,等. 双歧杆菌处理体对弱抗原免疫应答的影响[J]. 中国微生态学, 2003, 15(2): 76.

[15]蓝景刚,胡宏. 双歧杆菌及其表面分子的免疫增强作用[J]. 中国微生态学, 1999, 11(3): 129.

[16]史俊华,张雪萍,赵宇,等. 双歧杆菌细胞壁对荷瘤小鼠体内 ANAE 及 NO 的影响[J]. 中国微生态学, 1999, 11(3): 141.

[17] Laffineur E, Genetet N, Leonil J. Immunomodulutory activity of β-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria[J]. J Dairy Sci, 1996, 79: 2112 - 2120.

[18]史俊华,潘浩,张雪萍,等. 耐氧双歧杆菌及其 B - CW 对荷瘤鼠 TNF-α的体内诱导[J]. 中国微生态学, 1999, 11(1): 14.

[19]王立生,潘令嘉,郑跃杰,等. 双歧杆菌的完整肽聚糖对实验性大肠癌凋亡凋控基因表达的影响[J]. 中国微生态学, 1999, 11(4): 195.

[20]王立生,潘令嘉,陈村龙,等. 完整肽聚糖对实验性大肠癌的抑制作用及其机制探讨[J]. 中国微生态学, 1999, 11(5): 257.

[21]张宝元,马晓红,刘震,等. 双歧杆菌及其 WPG 对 S180 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. 中国微生态学, 2001, 13(1): 8.

[22]张金浩,王立生,潘令嘉,等. 双歧杆菌的完整肽聚糖对实验性大肠癌诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 中国微生态学, 2001, 13(1): 11.

[23] Ishinara K, hayasaka K., Yarnazaki N, et al. Current status of melanoma treatment with inferteron, cytokines and other biological response modifiers in Japan[J], J Invest Dermatol, 1989, 92(suppl): 326s - 328s.

[24]郭兴华. 益生菌[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2002.

[25]任建国. 丁酸钠诱导 Hela 细胞凋亡过程中端粒酶活性及长度的变化[J]. 科学通报, 2000, 45(17): 1861.

[26]梅汝鸿. 植物微生态学[M]. 北京:农业出版社, 1998.

[27] Archer SY, Meng S, et al. P21(WAF1) is required for butyrate - mediated growth inhibition of human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 6791 - 6796.

[28] Sobel JD, Faro S, Farce Rw, et al. Valvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations[J]. Am J Obestet Gyneco, 1998, 178(2): 203.

(收稿日期:2004 - 02 - 09)

本刊举办继续教育刊授班

根据上海市卫生局批文,我刊申报的"2004 年预防医学进展刊授学习班"已被定为市级继续教育项目(代码 0304501207008)。凡对本刊 2004 年度 12 期杂志中刊授内容(继续教育栏目)全部学习完成,并每次答卷及格的学员,均可以在不脱产的情况下,获得 I 类学分 5 分。欲参加者即日起,可到上海市疾病预防控制中心培训部(021 - 62758710)或本刊编辑部报名,培训费用 250 元整/人(包括赠送全年《上海预防医学》杂志一份)。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.