

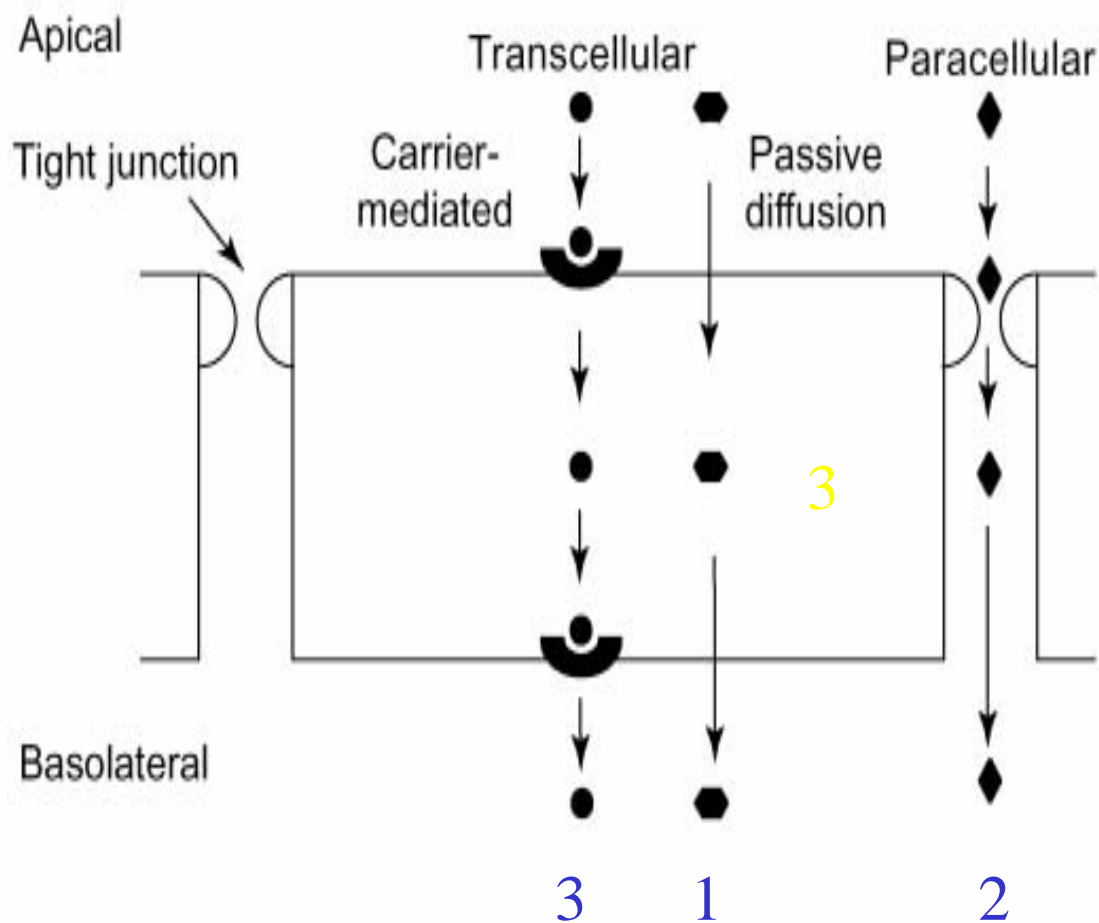
# 益生菌與腸道吸附

王啟賢 陳正祥 顏聰榮

# 一、前言

近年來，國人對於維護健康的觀念已由消極的治療疾病轉變成重視預防保健，除了讓自身養成運動習慣之外，在飲食方面也特別注重機能性食品的攝取，然而大多數的食物由口腔攝取經過胃、腸的消化作用之後，所產生的養分會在腸道中吸收，因此瞭解腸道中之吸收機轉將有助於維持個人的身體健康。

# 人體腸道物質通透的機制



Pharmaceutical Science & Technology Today

分子通過腸道上皮細胞進入血液中主要靠三種路徑來進行吸收分別是  
(1) 通過細胞膜的被動滲透運輸 (transcellular pathway)、  
(2) 在兩相鄰細胞間的被動運輸 (paracellular pathway)  
與 (3) 輸送子調控的運輸 (carrier-mediated transcellular pathway)

Fig.1. Transport across intestinal epithelium. (Ward, 2000.)

(Ward, 2000.)

# 益生菌

益生菌一詞最早是由Lilly與Stillwell在1965年所提出，他們的對益生菌的解釋是：

“單一微生物所產生的物質能刺激其他微生物生長。”

1989年Fuller給Probiotic一辭下了更明確的註解：

“益生菌是活的微生物，其可供食用且能藉由促進腸道菌相平衡有利於宿主動物的附屬物。”

1992年Havenaar與Huis in't Veld.又將益生菌的定義延伸到：

“以單一或是混合培養的方法應用到食品與非食品中。”

所謂的益生菌必須有下列特性：

- 一、為腸道的常駐菌。
- 二、益生菌能夠產生抗菌物質，抑制其他雜菌的生長。
- 三、耐胃酸和膽鹽能力
- 四、具吸附腸道上皮的能力
- 五、能在腸道中快速增殖

# Probiotic Foods

Three main components here:

- 1) **Probiotics** - the actual microbes that **grow** in the gut (G.I. tract) 'Friendly Microbes'  
Pro Biotics = For Life
- 2) **Prebiotics** - special nutrients for the microbes (but NOT for the host)  
- mainly carbohydrates

3a) **Symbiotics** (as in symbiosis) - where both pro- and pre-biotics are mixed together and function normally

3b) **Synbiotics** (as in synergism) - where both pro- and pre-biotics function together to give an enhanced effect

- main research activities on Synbiotics are in Japan
  - these products are just starting to appear in N. America

# 乳酸菌的吸附機制

## 提出者

## 吸附機制

1975年Brooker

乳酸菌附著於腸壁碳水化合物扮演重要的角色

1983年Savage

利用鞭毛吸附在小白鼠的胃上皮細胞

1984年Firon

菌種表面含有lectins，可針對上皮細胞的mannose進行特异性吸附。

1985年Chan

菌體的細胞壁結構可能與附著人體泌尿道表面有關。

2001年Yamamoto

乳酸菌吸附至小腸可能是藉由醣鏈(sugar chain)的作用。



# 人體腸道In vitro實驗model

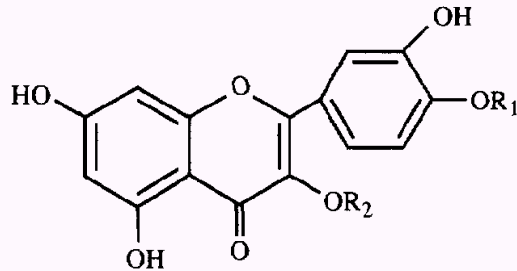
Caco-2 cell line是一株從人類結腸腺癌所分離出來的細胞株，其是以表皮吸附的方式生長，經由適當的培養，此一細胞株可以表現出體外型態學上及功能上的分化並且表現出包括極化(polarization)、具功能性的刷狀緣(Brush board)及腸道上層的水解酵素等的成熟腸道特性故目前已被廣泛的拿來當作探討in vitro藥物通透與益生菌或致病菌吸附的實驗model。

## 實驗動機與目的

乳酸菌*L. GG*是一種益生菌，其在腸道中有不錯的吸附能力且在食用及臨床上的應用相當廣泛，因此將之選為本次實驗吸附的益生菌model。

藥物的吸收一直是臨床醫師與藥物研發者十分重視的事，一般臨床醫師投藥至病患體內的最佳路徑大多經由口服路徑，此一路徑避免了侵入病患體內針劑注射方法可能引發感染的疑慮，在病患舒適度上也較能接受，但是口服路徑唯一受限的是藥物在腸內的吸收效果問題，因此我們想要藉由這次研究探討益生菌*L. GG*的吸附是否有助藥物或是養分的吸收。

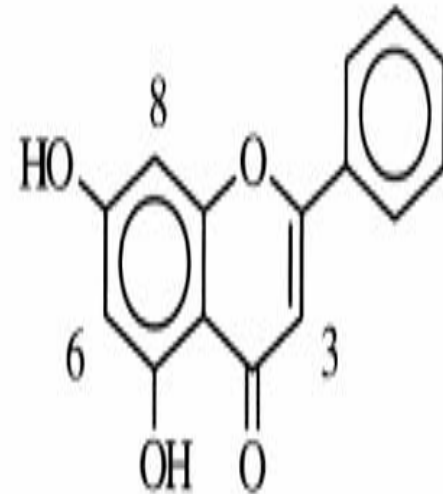
在藥物的選擇上，經參考腸胃科臨床醫師的建議，我們選用一般臨床常用的抗生素(Gentamicin、Erythromycin及Neomycin)作為探討對象，另外的通透對象上，我們參考Walgren et al. 在1998年及Walle et al.在1999年的研究，分別選定屬於生物黃酮類的物質Quercetin (Fig.6)及Chrysin (Fig.7)來研究他們在有無乳酸菌*L. GG*吸附的情況下，於Caco-2細胞model上的通透情形。



R<sub>1</sub>            R<sub>2</sub>

Quercetin

H                H



Chemical structure of Quercetin(left) and Chrysin(right).

# 乳酸菌最適吸附模式實驗

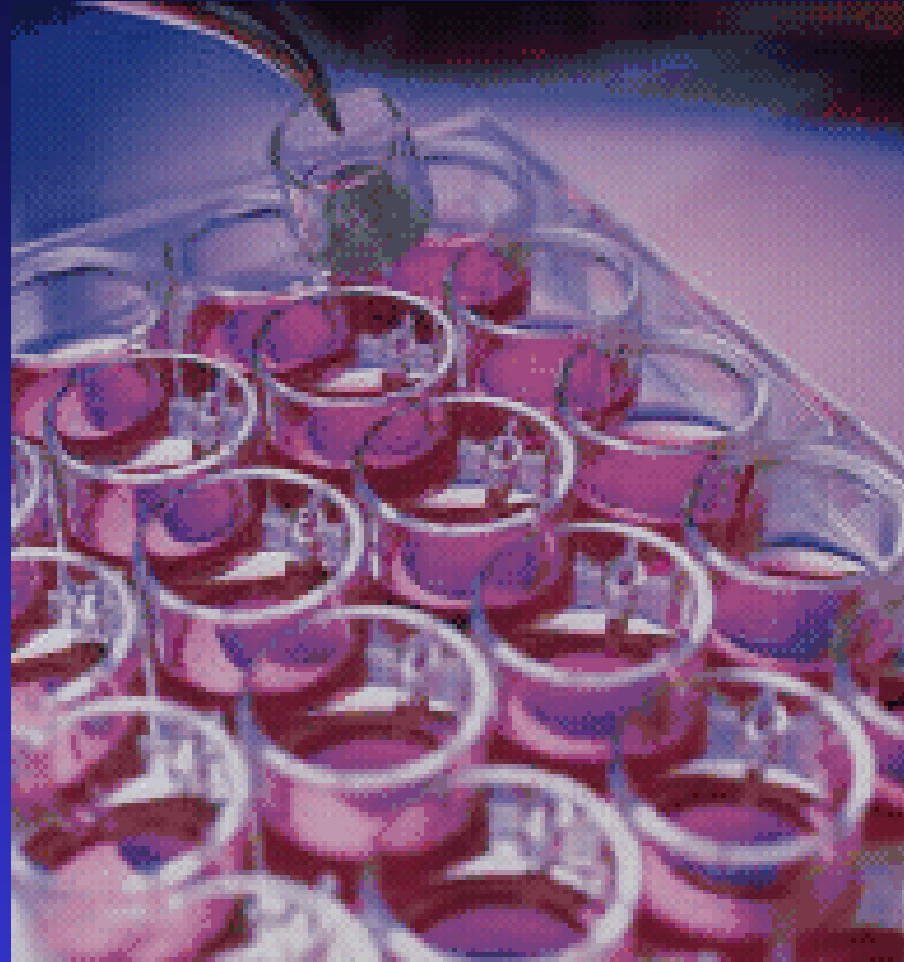
選取30個細胞數目相同的well為一組來進行實驗，分別探討不同吸附時間下加入不同乳酸菌菌數的吸附情形，藉以探求乳酸菌*Lactobacillus* GG最適吸附條件。

## Transwell insert培養法

實驗前一天，Transwell insert事先於無菌狀態下浸泡在0.5M 醋酸overnight。將濾膜組裝至dish上。Transwell insert中（12 well-0.5 ml）與plate中（12 well-1.5 ml）分別加入培養基。接種細胞（12 well- $1 \times 10^6$  cells）。於37℃、潮濕、5%CO<sub>2</sub>環境下培養monolayers約3-5天長成，5-10天或更長細胞完成分化。每兩天更換新鮮培養基。通透實驗的檢測可依檢測物的特性選用HPLC法或是微生物法來進行檢測。

# MiniCell Culture

Caco-2 (ATCC) 培養在適當的培養基中，以潮濕、5% CO<sub>2</sub>、37°C 的環境培養，約80%滿時繼代。對於所有的運輸實驗Caco-2細胞皆接種於具有12mm Transwell® insert (polycarbonate membrane, 0.4 μm pore size, Corning Costar Corp.) 的12 well plate中，數目控制在 $1.0 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>，頂層與底層分別加入適量的細胞培養基，培養前14天每週更換培養基3次，其後每天更換。(Richard A. Walgren, 1998, Biochemical Pharmacology 55, pp.1721-1727)



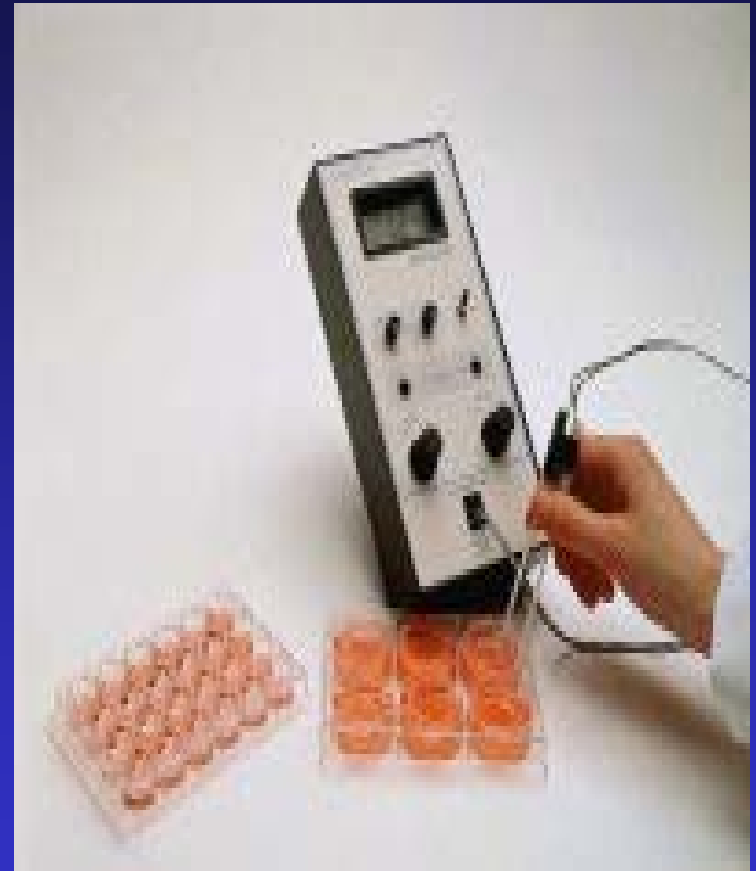
Millcell Cell Culture Plate Inserts---millipore

## 單層膜完整性測試實驗

Transepithelial Electrical Resistance (TEER) 法：TEER值是用來判斷細胞單層膜的完整性，此數值以Millicell-ERS Voltohmmeter來測量，在測量TEER值的前一晚將Voltohmmeter senser置於培養基中，偵測前以70%酒精消毒後，將senser一端伸入transwell insert中，另一端伸入下層培養盤中偵測，待數值穩定後記錄之(所表示的TEER值為測量值減去無細胞的insert測量值)。

# Transepithelial Permeability Experiments

47-79代的Caco-2細胞於輸送實驗前20-35天培養在Transwell中，通過細胞單層膜的TEER值（transepithelial electrical resistance）以Millicell-ERS Voltohmmeter來測量，並選用在細胞培養基中TEER值 > 350  $\times\text{cm}^2$ 的inserts進行實驗。inserts以溫的transport medium（具有25mM HEPES且pH值為7.4的Hank's Balance Salt Solution）沖洗30分鐘。  
(Richard A. Walgren, 1998, Biochemical Pharmacology 55, pp.1721-1727)



Millicell-ERS Voltohmmeter---millipore

## Caco-2細胞單層膜通透實驗

Quercetin 與Chrysin皆溶於100 % 甲醇並以HBSS稀釋成不同測試濃度後加至Transwell insert的Ap\*或Bl\*，進行1小時通透實驗。之後以HPLC 分析通透結果。(\*註：Ap:apical side; Bl: basoleteral side)

HPLC條件：

偵測：UV 254nm

管柱：YMC-Pack Pro C18(S-5  $\mu$  m, 12nm),150 $\times$ 4.6 mmI.D

管柱溫度：37

移動相:甲醇：三次水 = 55:45並加入0.1% formic acid



所得到的Quercetin或Chrysin濃度數據以P<sub>app</sub>值表示通透結果(公式如下所示)

公式：

$$P_{app} = \left( \frac{V}{A \cdot C_0} \right) \times \frac{dC}{dt}$$

A：單層膜表面積

V：接受部位的容積

C<sub>0</sub>：加入部位Sample的初始濃度

dC/dt：通透速率

### 三、結果與討論

#### 細胞生長情形

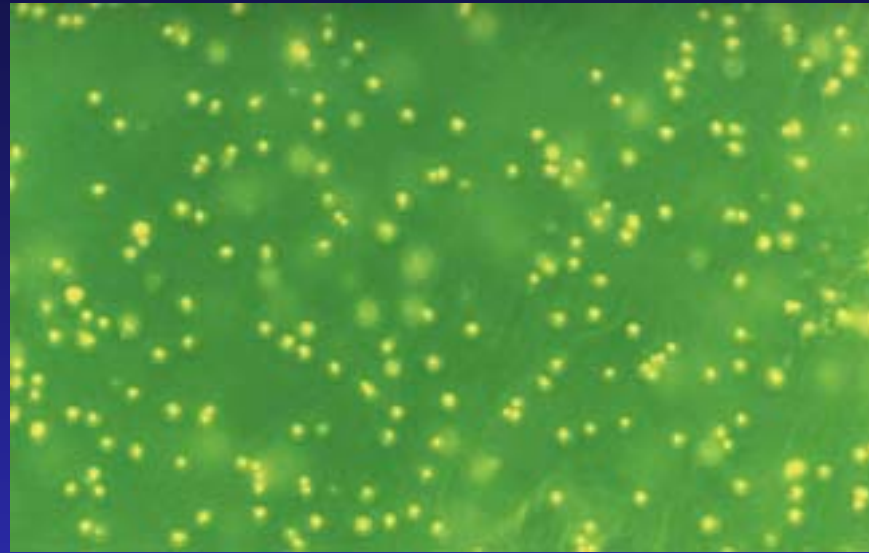


Fig. 5. The figure of Caco-2 after subculture. After subculture process, Caco-2 cells were diluted with culture medium and seeded to a new flask for culture. (magnification 100×)

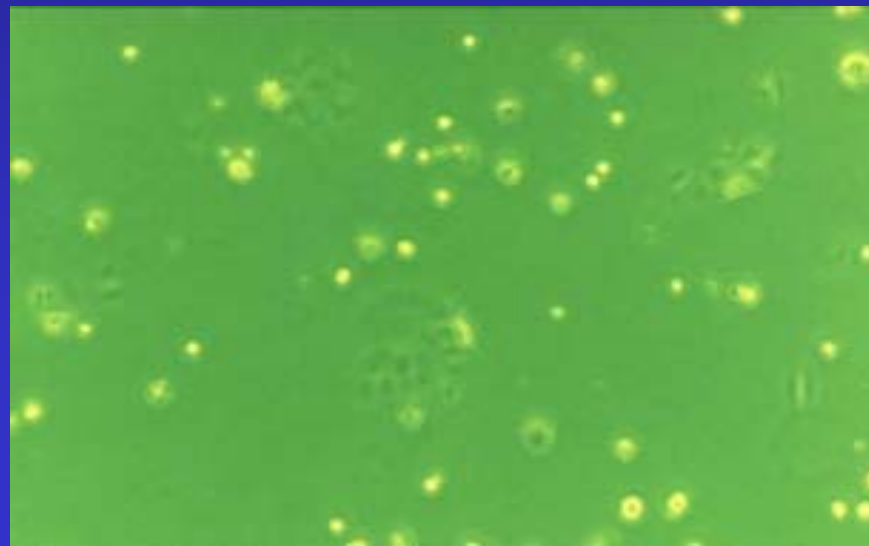


Fig. 6. The picture of Caco-2 culture one day. (magnification 100×)

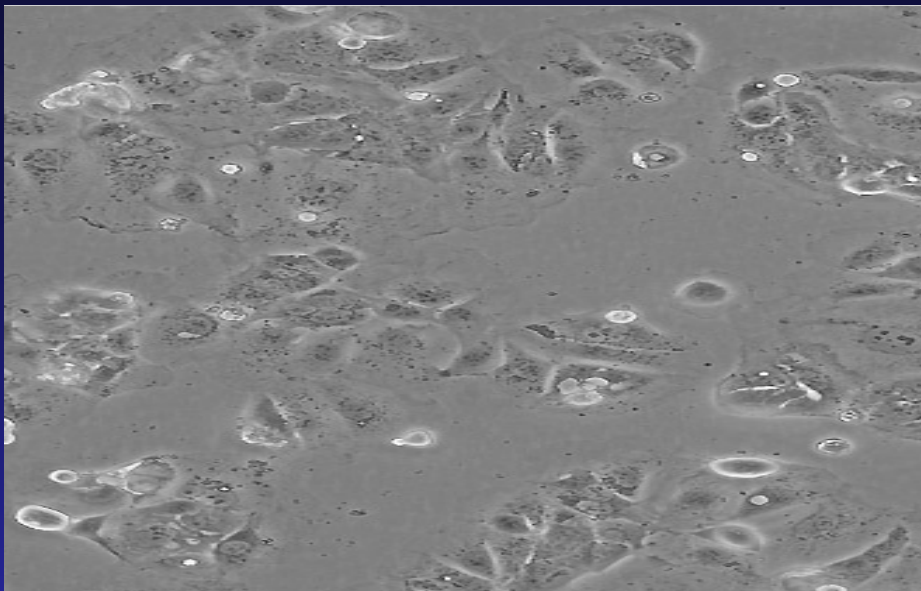


Fig. 7. The picture of Caco-2 cultured 4 days. (magnification 200x)

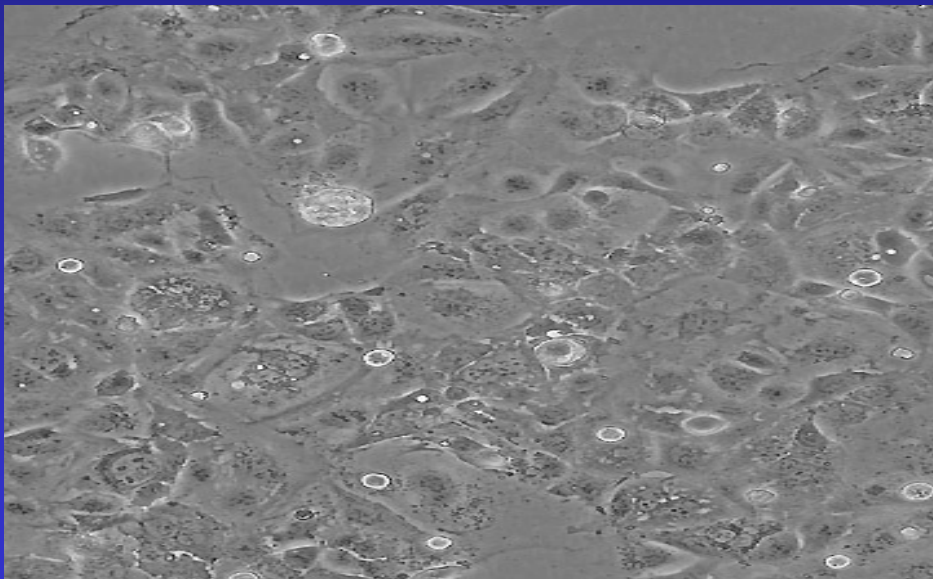


Fig. 8. The picture of Caco-2 cultured 6 days. (magnification 200x)

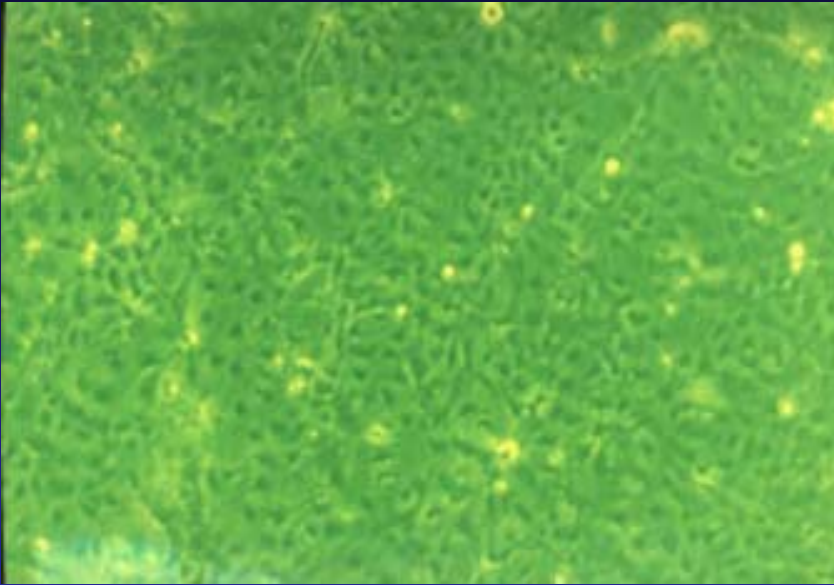


Fig. 9. The picture of Caco-2 cultured 8 days. (magnification 100x)

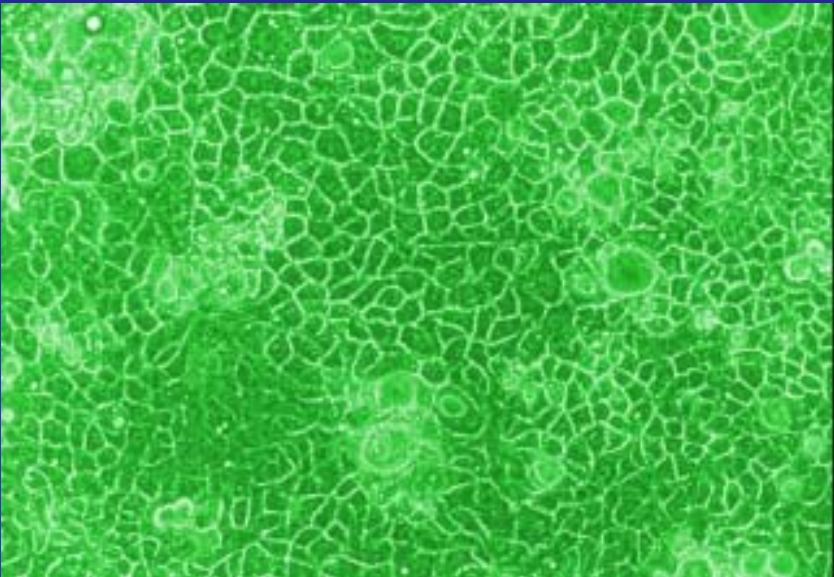


Fig. 10. The picture of Caco-2 cultured 15 days. (magnification 100x)

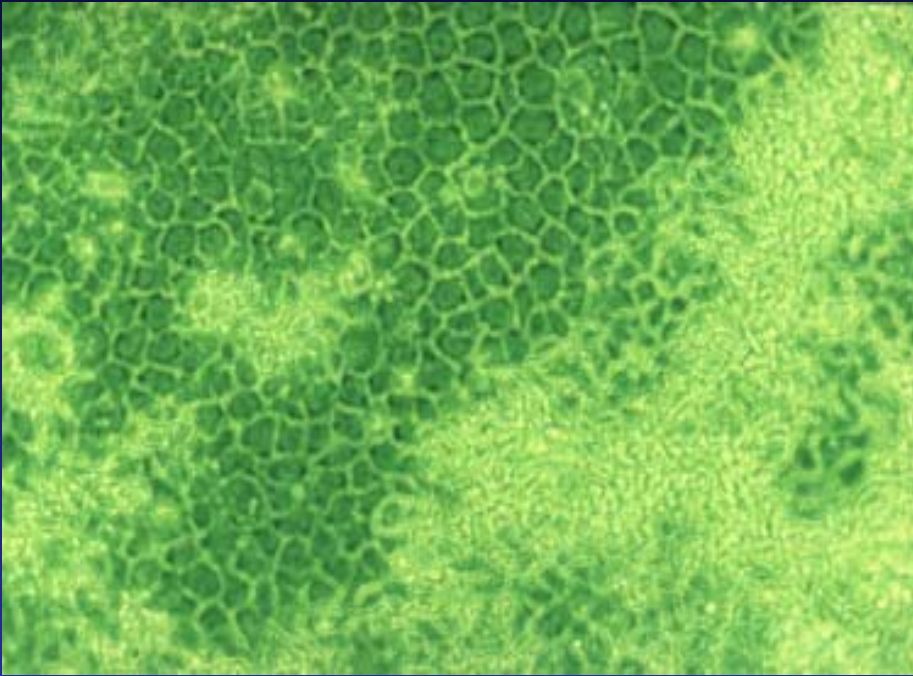
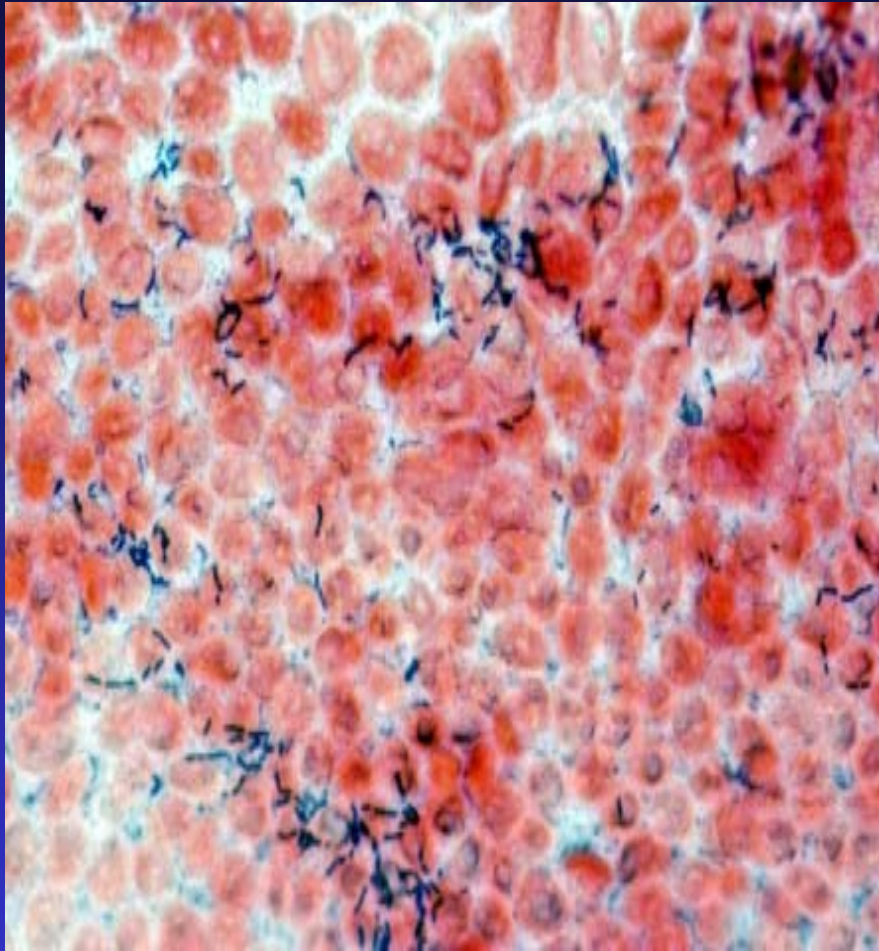
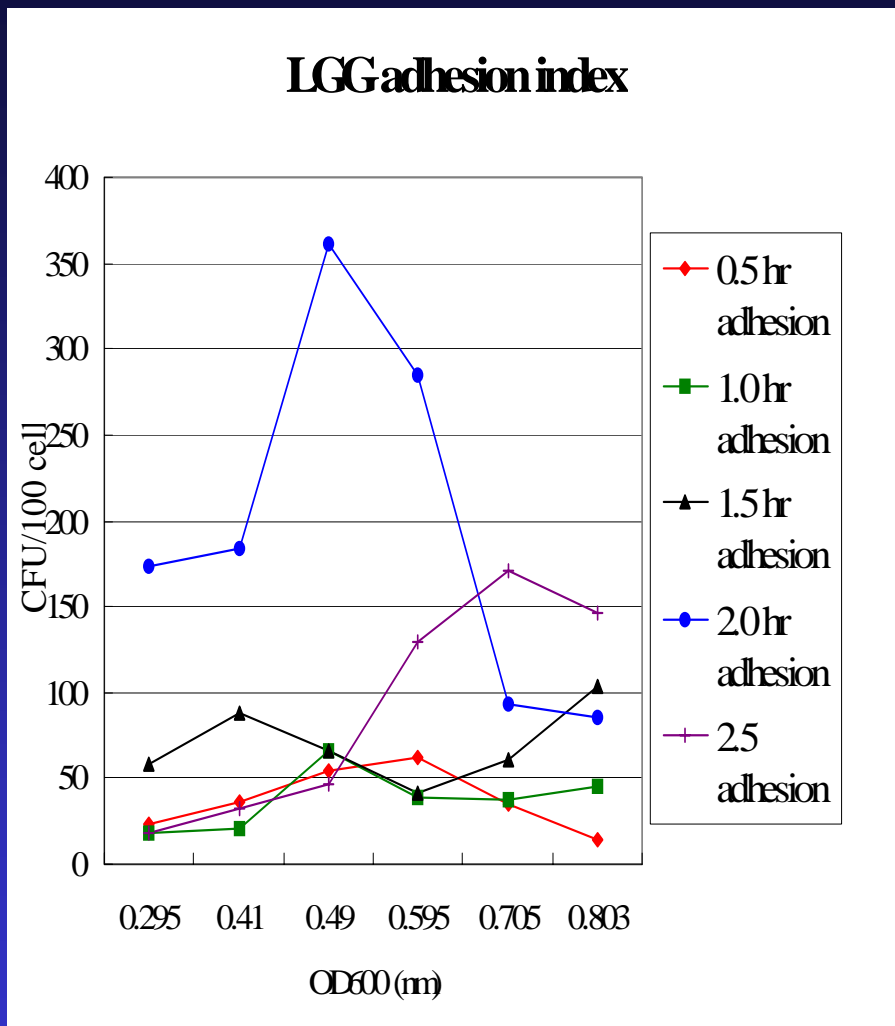


Fig. 11. The picture of Caco-2 cultured 25 day. (magnification 200x)



在最適吸附條件測試實驗中，我們以格藍氏染色法將不同吸附時間與不同乳酸菌數 ( $OD_{600}$  吸光值) 的實驗各組予以染色並在顯微鏡下觀察乳酸菌 *L. GG* 的吸附情形(見Fig.13)

Fig. 13. The Gram staining result of *Lactobacillus GG* adhered to Caco-2 monolayer (magnification 400 $\times$ ).

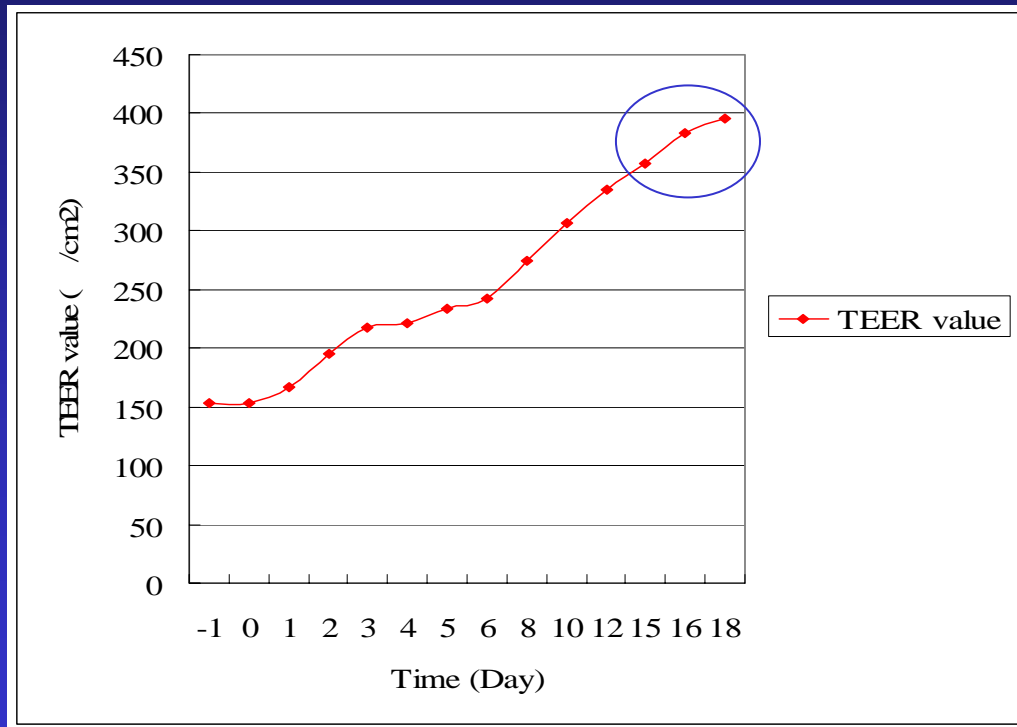


，將本次實驗結果與Gopal et al. 於2001年實驗的結果比較，Gopal等人的*L. GG* ( $1 \times 10^8$ )在培養2小時後的adhesion index為  $145 \pm 24$  CFU/100 cell，雖然adhesion index數值並不相同，但是培養時間及加入*L. GG*菌數皆十分吻合，故乳酸菌*L. GG*的最適吸附條件可訂為OD<sub>600</sub>吸光值為  $0.5 \pm 0.01$ ，吸附培養時間為2小時。

Fig. 14. After incubated in various time intervals, the result of different concentrations *L. GG* adhere to the Caco-2 cell monolayer, to find the optimal adhesive condition.

# 單層膜完整性測試

單層膜完整性以電位的不同(Transepithelial Electrical Resistance; TEER), 此一電位差以通過膜的電阻表示( $\Omega/\text{cm}^2$ ), 若TEER過低, 則表示細胞單層膜有漏洞, 從細胞繼代後開始, 每天以Millicell-ERS Voltohmmeter測量transwell insert的TEER值。



將實驗結果與Walgren et al. 於1998年所提出的”選用大於350  $\Omega/\text{cm}^2$ 的transwell insert進行實驗”比較, 我們Transwell insert的TEER值於第十五天超過350  $\Omega/\text{cm}^2$ 相符(見Fig.15), 因此有關物質通透實驗用的Caco-2細胞單層膜皆以TEER值大於350  $\Omega/\text{cm}^2$ 為標準。

Fig. 15. Monitoring the TEER value of Caco-2 cell from the day of subculture to Day 18.



# Caco-2細胞單層膜通透實驗

## Quercetin

Quercetin及其糖類衍生物是存在於蔬菜、水果及飲料中的Flavonoid類物質(Hertog et al. 1992; 1993)，也存在於新鮮的洋蔥中(Kiviranta et al. 1988)，根據流行病學的證據顯示，飲食中富含Flavonoids可以預防冠心病與中風(Knekt et al. 1996; Keli SO et al. 1996)，其預防機制在於抑制血液中LDL的氧化(Cook et al. 1996)及血小板的聚集(Pace-Asciak et al. 1995)，在動物實驗的證據上也指出又預防癌症的功能(Deschner et al. 1991; 1993 )

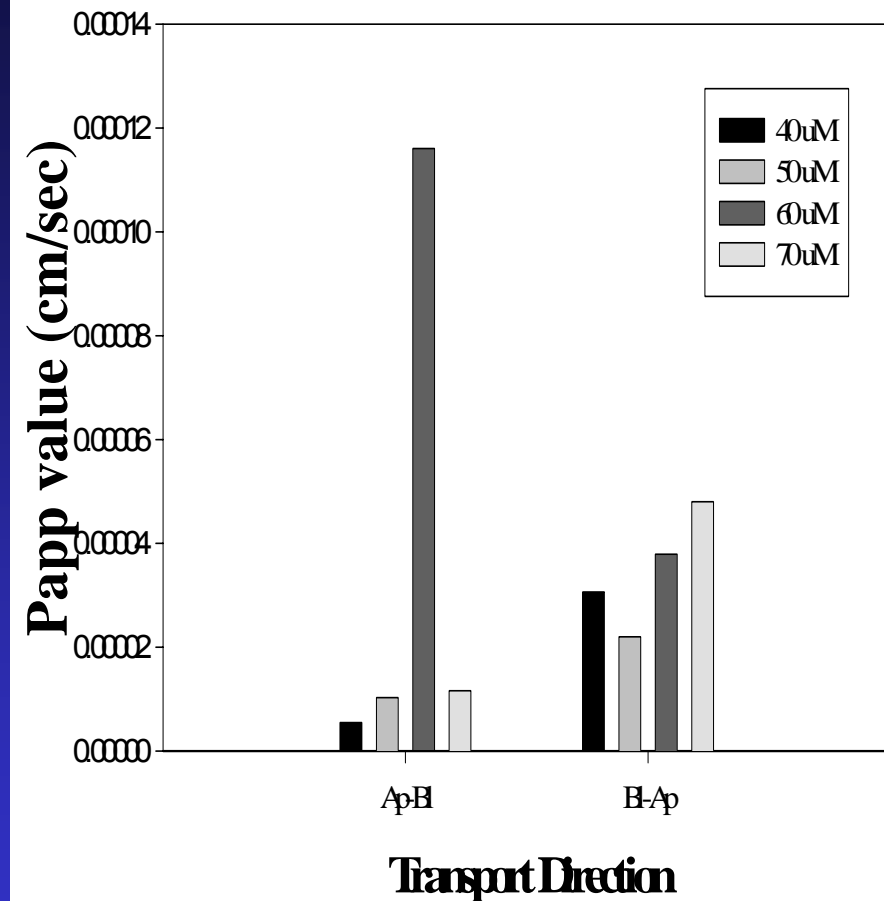
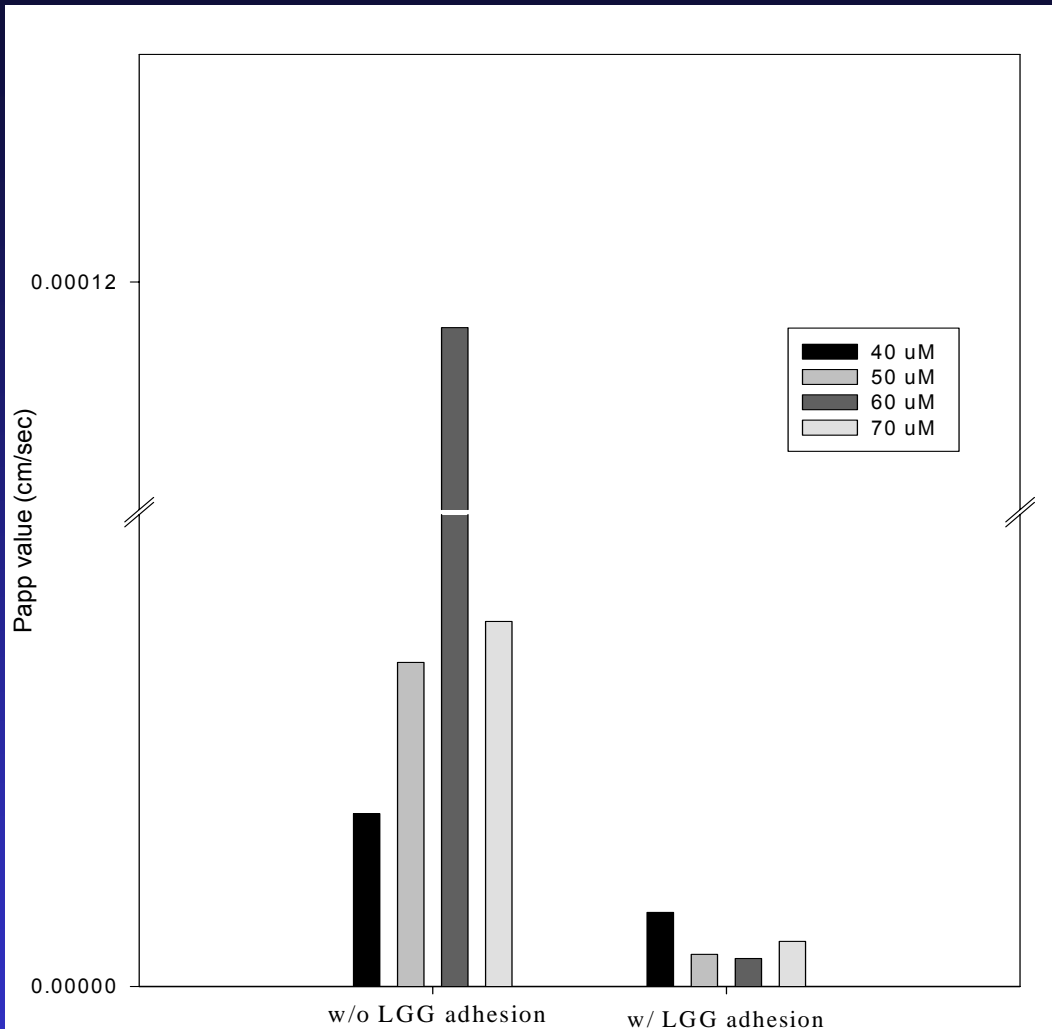


Fig. 16. The result of Quercetin transport in both direction of the Caco-2 monolayer at different concentration.

Quercetin 通透的實驗結果可知，在沒有乳酸菌 *L. GG* 的吸附前處理情況下 (Fig. 16)，50  $\mu$  M Quercetin 由 Ap-BI 與 BI-Ap 的通透係數 ( $P_{app}$  值) 分別為  $1.03 \times 10^{-5}$  cm/sec 與  $2.20 \times 10^{-5}$  cm/sec，BI-Ap 的通透約為 Ap-BI 的兩倍，此一結果與 Walgren et al 在 1998 年的實驗結果相比較，Ap-BI 的通透係數為  $5.8 \times 10^{-6}$  cm/sec，BI-Ap 為  $11.1 \times 10^{-6}$ ，我們可以發現雙方 BI-Ap 的通透皆為 Ap-BI 通透的兩倍。另外針對不同濃度的 Quercetin 來比較可知，當 Quercetin 的濃度為 60  $\mu$  M 可以在腸道中通透較好並在血液中累積較多量。



有無乳酸菌*L. GG*的狀況下比較Quercetin由Ap-B1的通透的情形 (Fig.17)，在有乳酸菌*L. GG*吸附時，Quercetin各組濃度的通透皆比沒有吸附時來的低，以50  $\mu$  M的Quercetin來說，在有乳酸菌*L. GG*吸附的情況下Quercetin的通透比原來未吸附時降低了10倍。

Fig. 17. The result of Quercetin transport with or without *L. GG* adhered. (w/o:without; w/:with)

## Chrysin

Chrysin是一種Flavonoid，大量存在於蜂蜜與蜂膠中(Siess et al. 1996)，其是依種有效的藥物代謝酵素的抑制物，如CYP1A1(Tsyrllov et al. 1994)及P-form的phenosulfotransferase(Walle et al.)，而這兩種酵素都參與了生癌物質的生活性(cracinogen bioactivation)，故選擇探討Chrysin在Caco-2細胞單層膜上通透的情形。

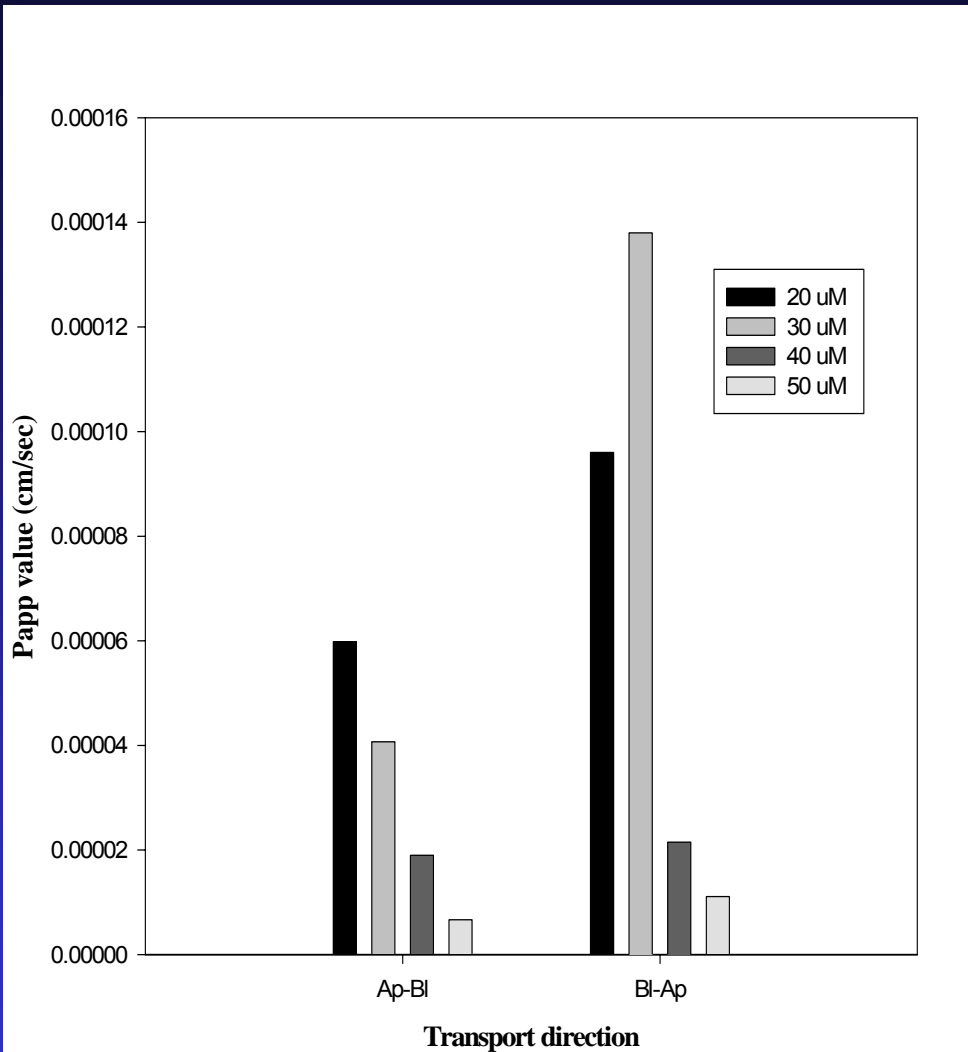
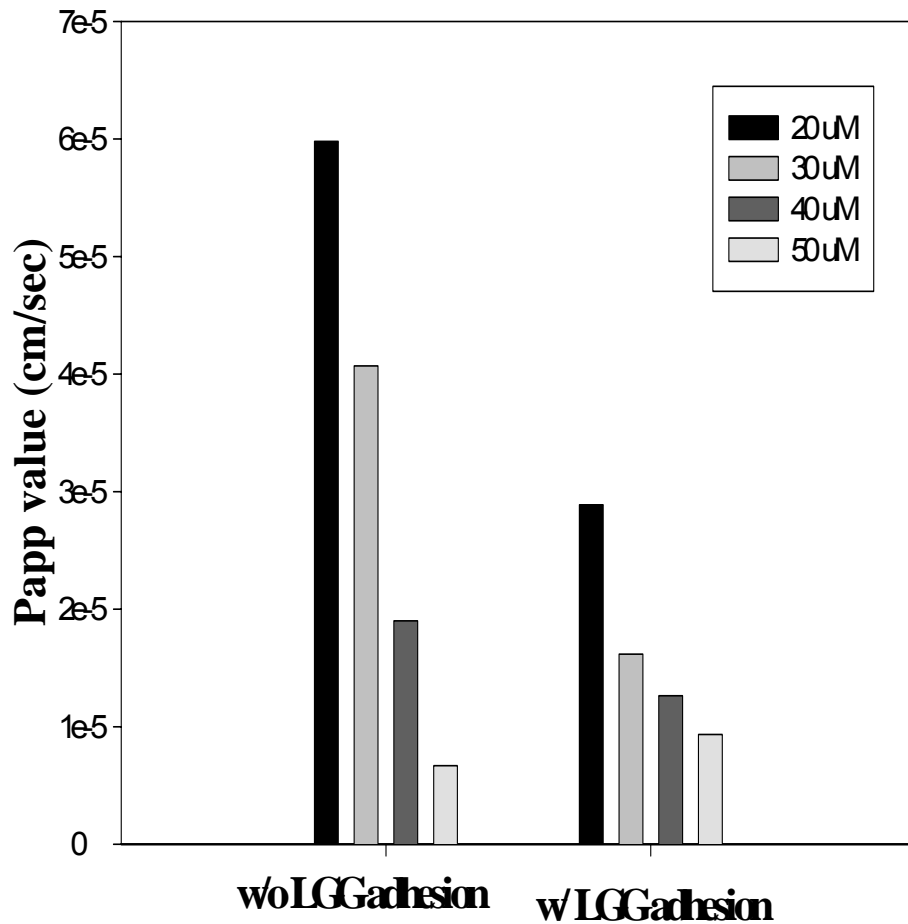


Fig. 18. The result of Chrysin transport in both direction of the Caco-2 monolayer at different concentration.

Chrysin在沒有乳酸菌吸附時，各組濃度的通透皆為BI-Ap大於Ap-BI(見Fig.18)，以20  $\mu$  M Chrysin的通透來看，BI-Ap的通透係數是 $9.6 \times 10^{-5}$  cm/sec，而Ap-BI的則為 $5.98 \times 10^{-5}$  cm/sec，兩者相差了1.6倍，將此一結果與Walle et al.於1999年的實驗結果相比較，Walle等人的20  $\mu$  M Chrysin兩個方向的通透係數分別是 $6.9 \times 10^{-6}$  cm/sec (Ap-BI) 與 $14.1 \times 10^{-6}$  cm/sec (BI-Ap)，在比值上也十分類似，由此顯示Chrysin可以在腸道中通透，但是在吸收效果方面則受到限制。



在乳酸菌*L. GG*吸附與否對Chrysin由Ap-B1通透的影響實驗結果中(Fig.19)，有乳酸菌吸附的情況下，Chrysin由Ap-B1的通透係數皆下降，只有在濃度為60 μ M時有些許增加(6.67×10<sup>-6</sup>到9.33×10<sup>-6</sup>)，在此我們仍只能推測是乳酸菌吸附在monolayer上阻擋了Chrysin的通透，進一步的原理仍待往後實驗證明。

**Fig. 19. The result of Chrysin transport with or without *L. GG* adhered.**  
(w/o:without; w/:with)

## 抗生素

Gentamicin 是一種屬於胺基配糖體(Aminoglycoside)類的殺菌性抗生素，能與細菌 30S ribosome 結合，抑制蛋白質合成，並造成基因密碼判讀錯誤。Ribosome 隨後與 mRNA 分離，細菌細胞因而死亡，主要治療以下病菌之嚴重感染：*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* sp., *Citrobacter* sp.及*Staphylococcus* sp.，其具有潛在的腎毒性及耳毒性。

同為胺基配糖體類抗生素的Neomycin可用於抑制腸胃道細菌的生長。其抗菌範圍包括*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp.，及*Pseudomonas aeruginosa*等。很快由腎臟排出，未吸收的部份則由糞便中以原型排出，其副作用多為噁心、嘔吐及腹瀉。

Erythromycin 為廣效性macrolide 抗生素，可能為抑菌劑，也可能為殺菌劑。它能與 50S ribosome 結合而抑制細菌的蛋白質合成，主要用來治療 *Mycoplasma pneumoniae*、*Corynebacterium diphtheriae*、*C. minutissimum*、*Hemophilus influenzae*、*Entamoeba histolytica*、*Bordetella pertussis* 及 *Legionella pneumophila*，可能的副作用有引起腸胃不適、過敏反應與耳、肝及神經方面的毒性。





首先針對乳酸桿菌*L. GG*對於三種抗生素的耐受性進行測試。在不同濃度的抗生素作用下，除了屬於廣效性的抗生素-Erythromycin在MRS plate上造成了不明顯的抑制區外，其他組的*L. GG*大多不受影響 (Fig.20)

Fig. 20. The result of *L. GG* tolerated three target antibiotics on MRS plate.

# Gentamicin

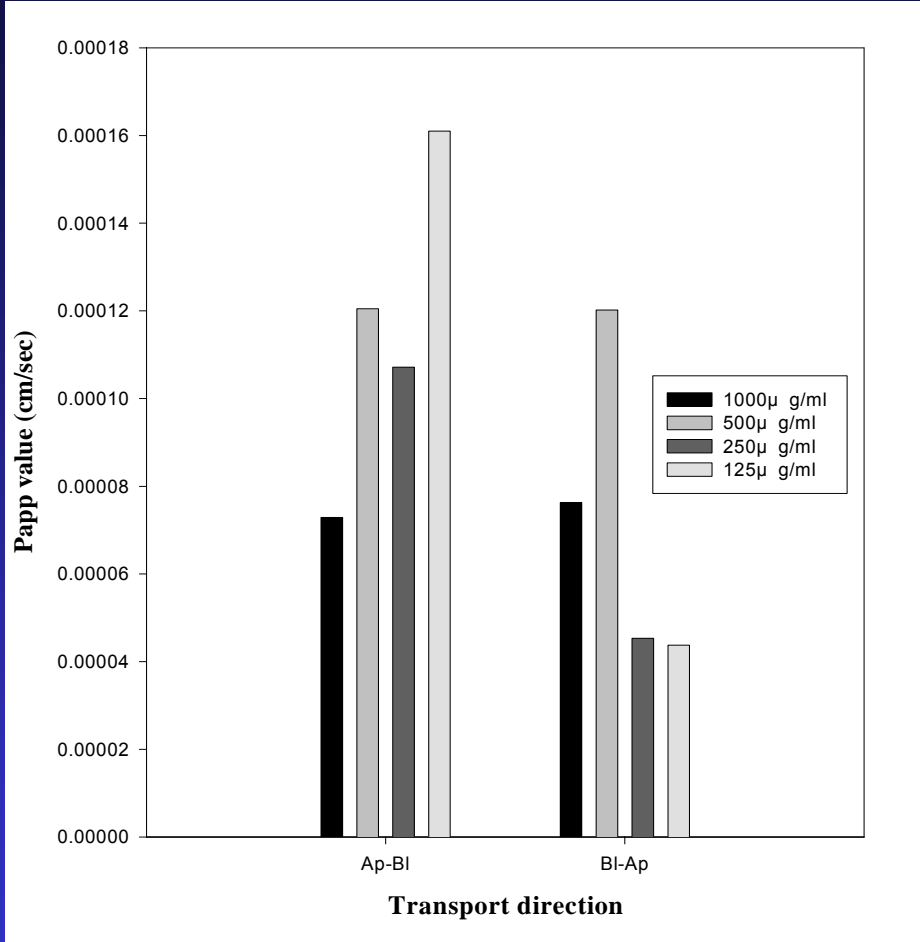
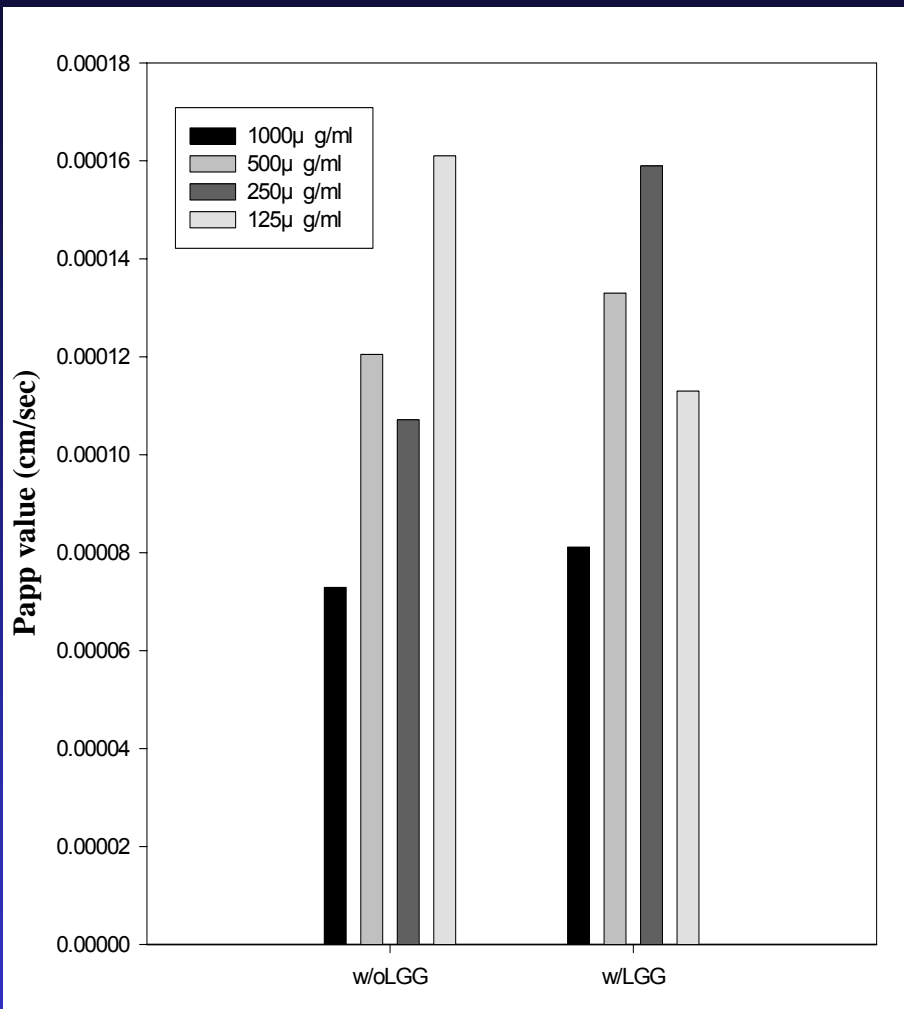


Fig. 21. The result of Gentamicin transport through Caco-2 monolayer.

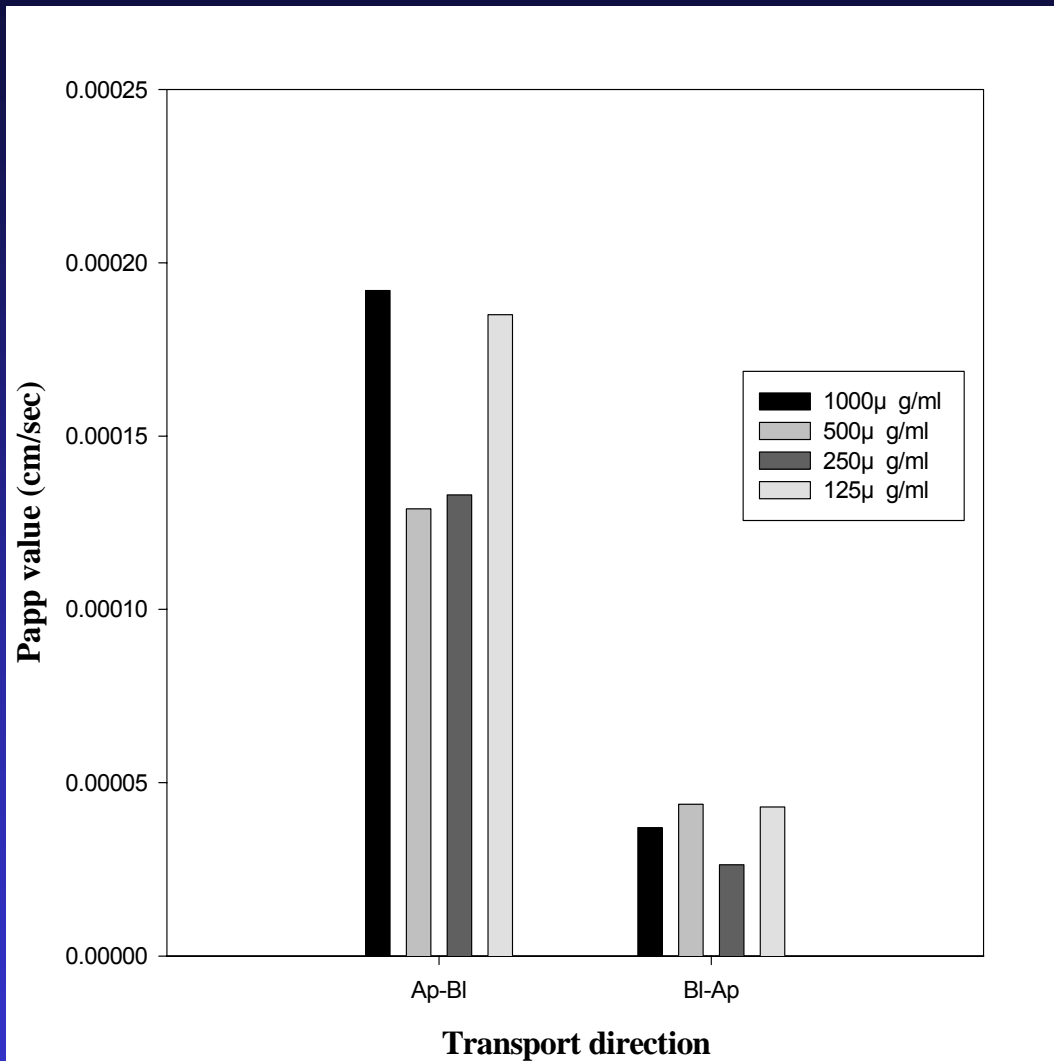
對不同濃度的Gentamicin在Caco-2細胞單層膜上通透的結果顯示(見Fig.21)，在濃度為1000及500  $\mu$  g/ml時，Gentamicin雖然都可以通透，但是Ap-BI的通透係數與BI-Ap十分接近，此一現象可以用臨床上Gentamicin因吸收效果不好故皆以針劑給藥而非口服來解釋。



經過乳酸菌吸附的前處理之後，Gentamicin濃度較高的前三組的通透皆有些許增加，但在低濃度125 μg/ml則無此一現象(見Fig.22)。

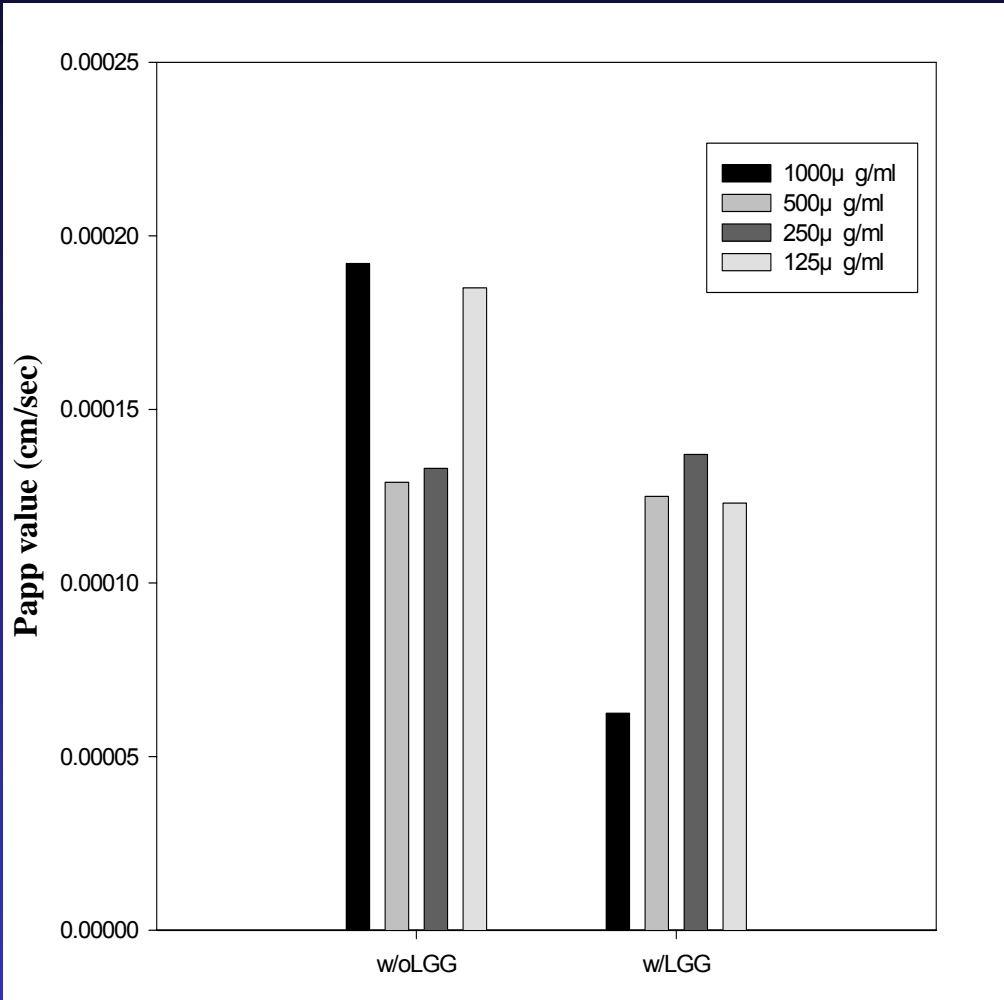
Fig. 22. Comparison of the effect of *L. GG* adhesion to Gentamicin transport. (w/o:without; w/:with)

# Neomycin



在Neomycin的通透上，由於不同於Gentamicin的低吸收效果，Neomycin沒有乳酸菌吸附的通透上，Ap-BI的通透皆大於BI-Ap(見 Fig.23)

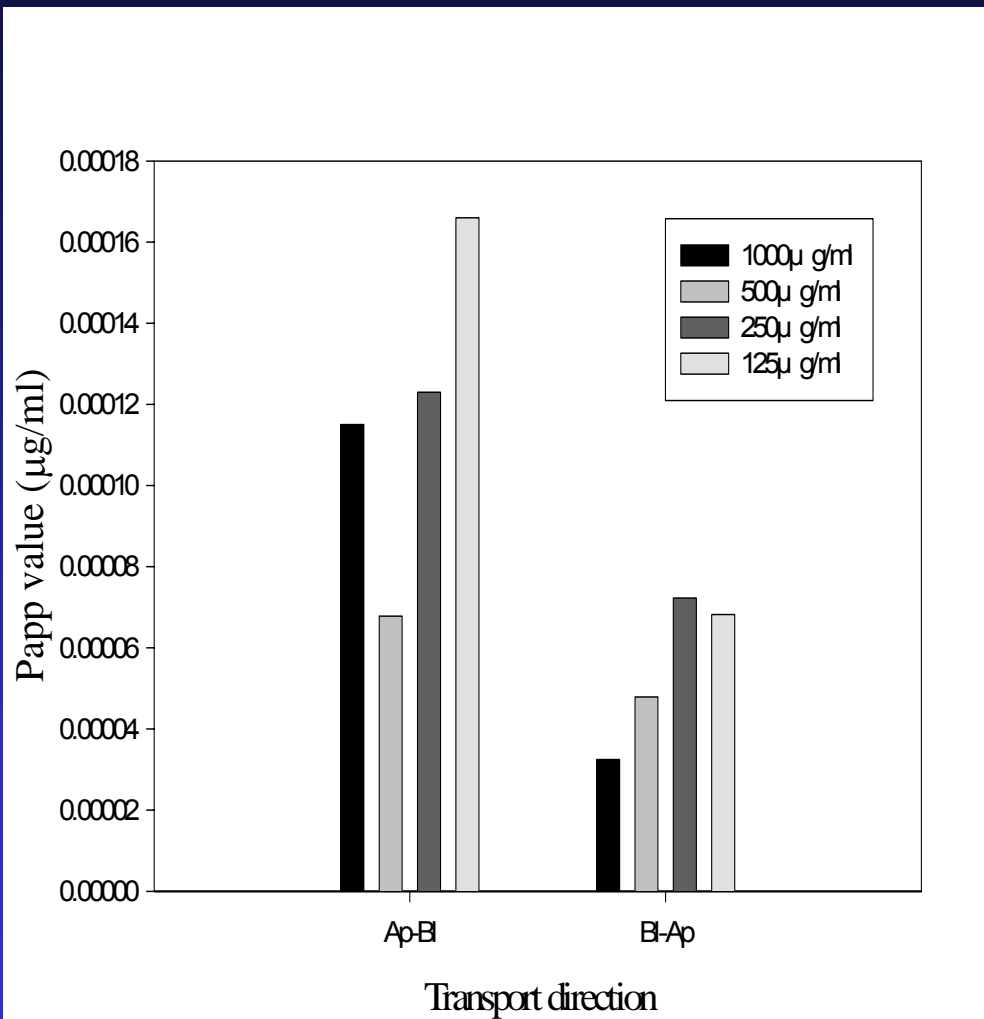
Fig. 23 The result of Neomycin transport through Caco-2 monolayer.



在有乳酸菌吸附的實驗組中，Neomycin在濃度為1000與125 μg/ml時的通透會比未吸附前低，另外兩組則無明顯變化(見Fig.24)

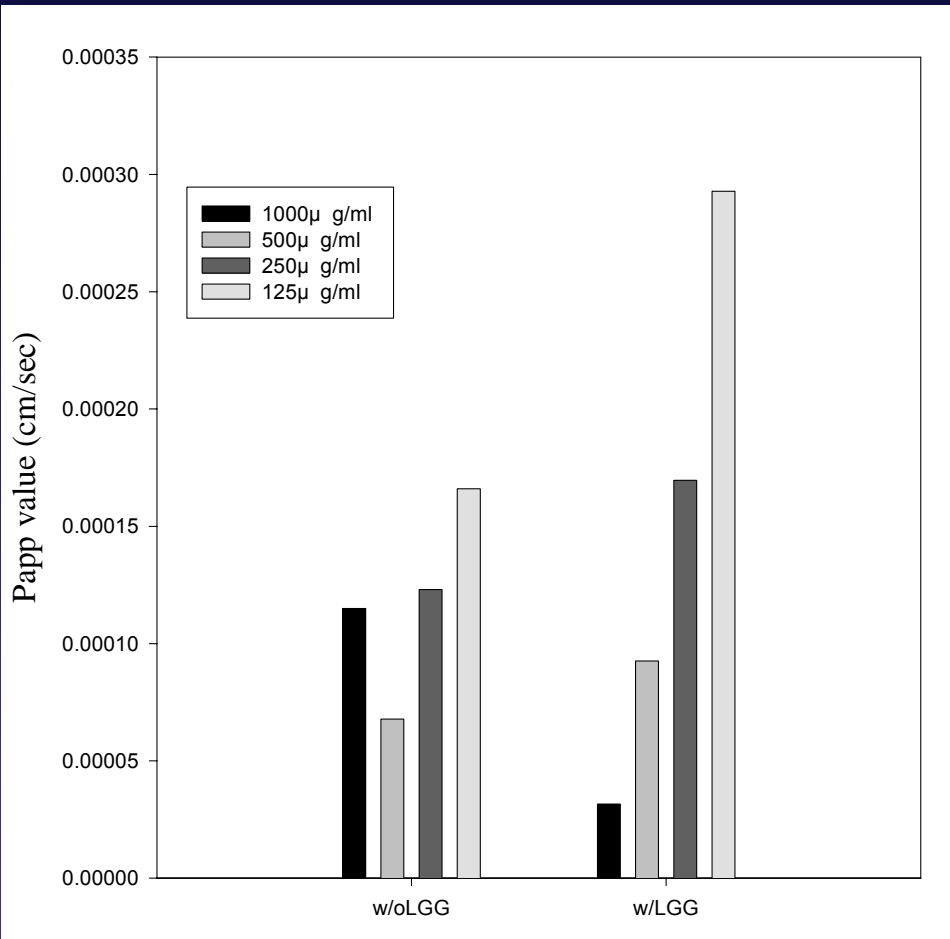
Fig. 24. Comparison of the effect of *L. GG* adhesion to Neomycin transport.  
(w/o:without; w/:with)

# Erythromycin



在沒有乳酸菌吸附的情況下，巨環類抗生素-Erythromycin這組實驗結果與Neomycin通透的情形相同，皆為Ap-BI的通透大於BI-Ap(Fig.25)

Fig. 25. The result of Erythromycin transport through Caco-2 monolayer.



在Erythromycin (見Fig.26) , 濃度為1000 μ g/ml時會降低通透，但在另外三組則有增加通透的現象。

藉由上面三組抗生素的通透實驗可知針對口服吸收效果不佳的Gentamicin或已經能吸收的Erythromycin , 乳酸桿菌的吸附可以增加藥物的吸收，而對Neomycin則無明顯影響。

Fig. 26. Comparison of the effect of *L.* GG adhesion to Erythromycin transport.

# 結論

一、Caco-2細胞在培養第八天之後便會形成單層膜，但是到了第十五天才分化完成並有類似小上皮細胞的狀態，並可作為通透及吸附實驗用。

二、乳酸菌*L. GG*在Caco-2細胞單層膜上的最適吸附條件是 $OD_{600}$ 吸光值 $0.5 \pm 0.01$ ，吸附培養時間為2小時可以得到最大吸附量。

三、Quercetin的濃度為 $60 \mu M$ 時，可以在腸道中通透較好並在血液中累積較多量，另外在有乳酸菌*L. GG*吸附的情況下，各組濃度Quercetin的通透可能因為*L. GG*乳酸菌的吸附佔據了細胞表面而使得Quercetin的通透降低。



四、Chrysin可以在腸道中通透，但是在吸收效果方面則受到限制。有乳酸菌吸附的情況下，Chrysin由Ap-B1的通透只有在濃度為60  $\mu$  M增加，在此我們仍推測是乳酸菌吸附在monolayer上阻礙了Chrysin的通透。

五、針對口服吸收效果不佳的Gentamicin或已能吸收的Erythromycin，乳酸桿菌的吸附可以增加藥物的吸收，而Neomycin則無明顯影響。

# 益生性乳酸菌對*Clostridium difficile*在Caco-2細胞單層膜吸附之影響

Effect of probiotic lactic acid bacteria on adhesion of  
*Clostridium difficile* to Caco-2 cell line

陳正祥 顏聰榮

# 一、前言

## 緒言

偽膜性腸炎是因為使用抗生素引起的腸炎，因抗生素清除掉了腸道裡多數細菌，包括益菌與害菌，但使得原本不重要、少數的厭氧菌不正常滋長，而這細菌會產生毒素導致症狀，包括腹瀉、發燒等，也會在腸道黏膜上引起潰瘍，潰瘍覆蓋上膿液與腸液，以內視鏡觀察時可見到白黃色的突起斑，稱之為偽膜。而與抗生素使用相關的腹瀉中有 10-20% 和 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) 感染有關。

## 實驗動機與目的

偽膜性腸炎和抗生素引起的腹瀉全是*C. difficile*引起。臨床研究20%的病人在處理抗生素metronidazole或是vancomycin會有好發性*C. difficile* diarrhea，而一般臨床醫師在遇到偽膜性腸炎時所能給與的治療就是給予口服藥劑、而這一類的疾病都是屬於長期性的疾病。所以想利用非致病性的生物進入腸胃修復微生物平衡。口服此一路徑可避免了侵入病患體內針劑注射方法可能引發感染的疑慮，在病患舒適度上也較能接受。而乳酸菌*L. GG*是一種益生菌，其在腸道中有不錯的吸附能力且在食用及臨床上的應用相當廣泛，因此將之選為本次實驗吸附的益生菌model。

## *Clostridium difficile* 的特性

1935年在正常嬰兒腸道中發現 *C. difficile*。它是屬革蘭氏陽性桿菌(Gram-positive rod shaped bacteria)長0.5~1.9 $\mu\text{m}$ ，橢圓形。有endospores呈卵形，會膨脹細胞。菌與菌之間會形成鍊狀。可在 $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$ 中生存，最適生長溫度為37 $^{\circ}\text{C}$ 。本身可分泌toxin A(enterotoxic)和toxin B(cytotoxic)二種不同的毒素。Toxin A的分子量在440~500 kDa，toxin B分子量360~470kDa。

## *L. GG*抑制*Clostridium difficile*生長實驗

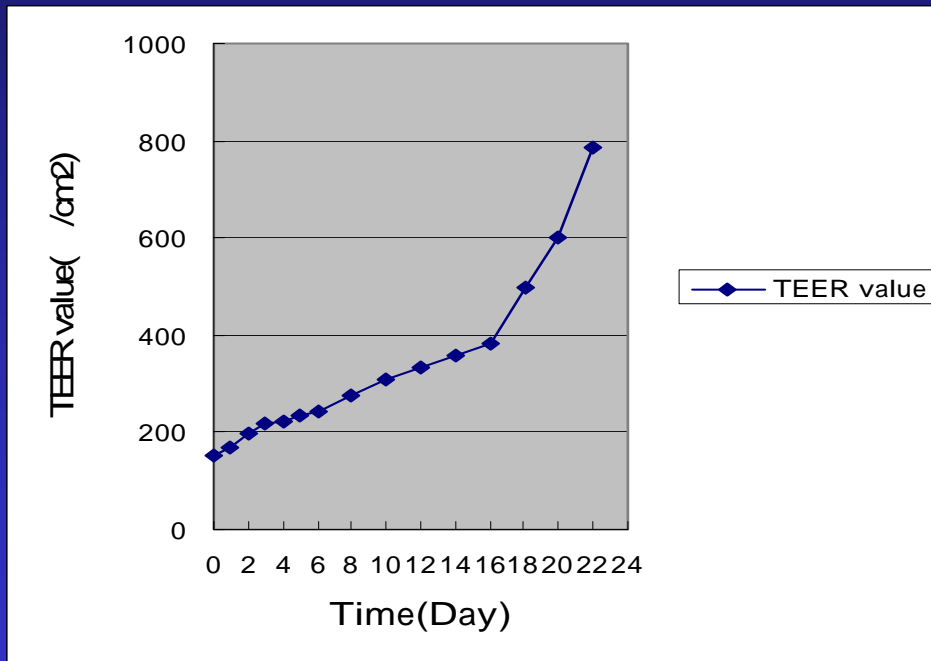
取*L. GG* OD600吸光值為0.49 (1.17E+8CFU/ml) 與 *Clostridium difficile* OD600吸光值為0.41 (1.14E+8 CFU/ml)共同培養於MRS broth至於厭氧鋼中，之後菌液進行連續稀釋並塗佈至CFA plate上待菌長出計數菌數並回推真實菌數

# The interaction of *L.GG*, *C. difficile*, and Caco-2 cells Experiment

Caco-2細胞在transwell insert培養15天，取相同菌數 *L. GG* 與 *Clostridium difficile* 分別離心、用PBS清洗20分、分別以含有FBS的MEM medium混合稀釋為 $1 \times 10^8$  CFU/ml，將菌菌加入transwell insert培養，最後以TEER值觀察

# 單層膜完整性測試

單層膜完整性以電位的不同(Trans epithelial Electrical Resistance; TEER), 此一電位差以通過膜的電阻表示( $\Omega/\text{cm}^2$ ), 若TEER過低, 則表示細胞單層膜有漏洞, 從細胞繼代後開始, 每天以Millicell-ERS Volt ohmmeter測量transwell insert的TEER值。



將實驗結果與Walgren et al. 於1998年所提出的”選用大於350  $\Omega/\text{cm}^2$ 的transwell insert進行實驗”比較, 我們Transwell insert的TEER值於第十五天超過350  $\Omega/\text{cm}^2$ 相符, 因此有關物質通透實驗用的Caco-2細胞單層膜皆以TEER值大於350  $\Omega/\text{cm}^2$ 為標準。

Fig. 4. Monitoring the TEER value of Caco-2 cell from the day of subculture to Day 18.



## L.GG抑制*C. difficile*生長實驗

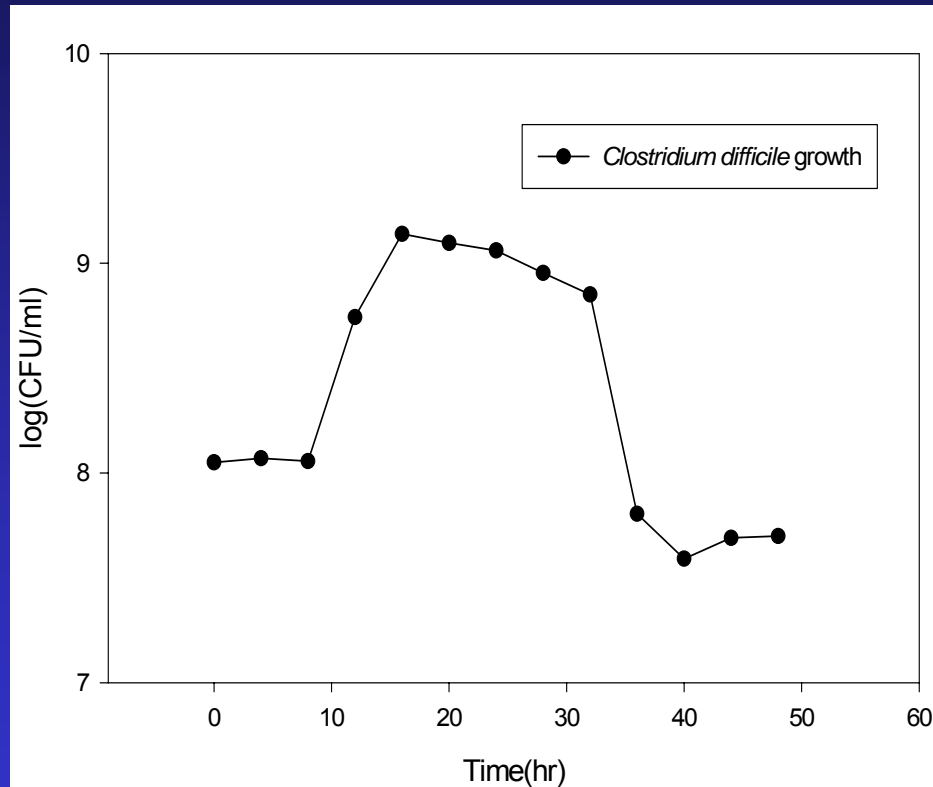


Fig.7.L.GG抑制*C. difficile*生長，第16小時*C. difficile*生長變慢，至第36小時生菌數下降。

## *C. difficile*破壞Caco-2細胞單層膜

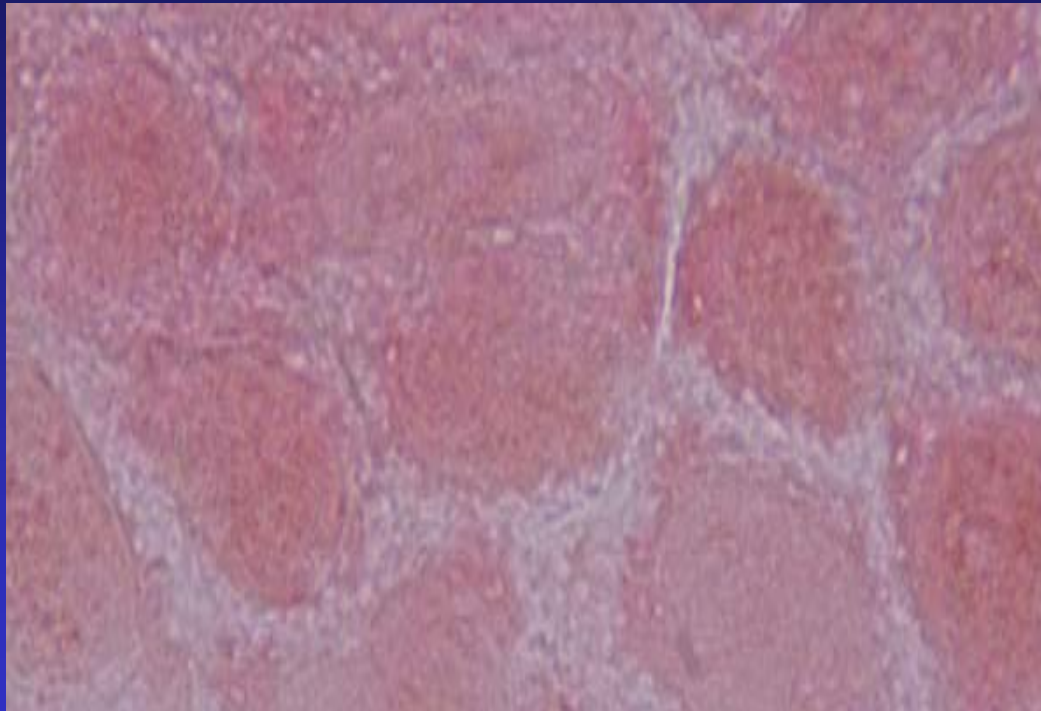


Fig. 8. The Gram staining result of C.Caco-2 monolayer (magnification 1000 $\times$ ).

## *C. difficile*破壞Caco-2細胞單層膜

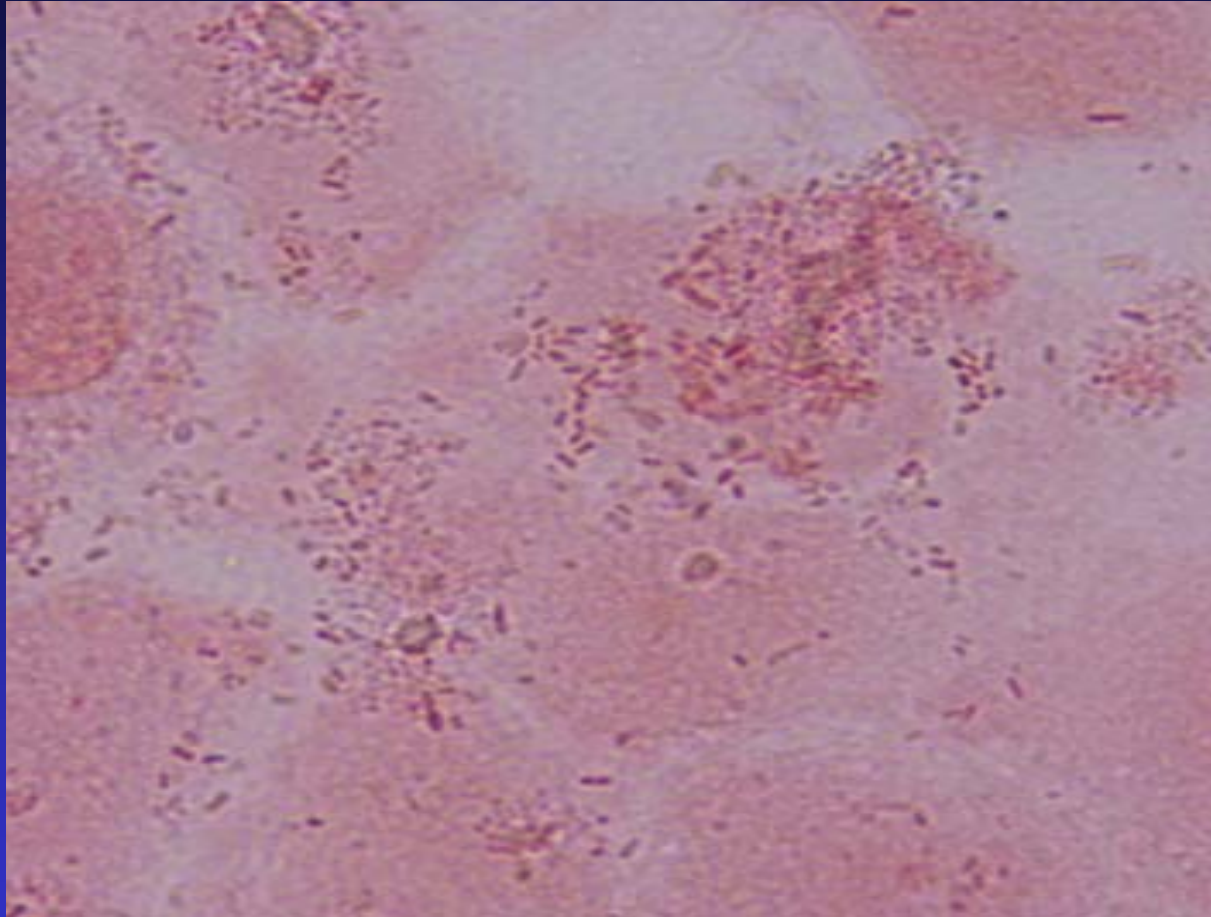
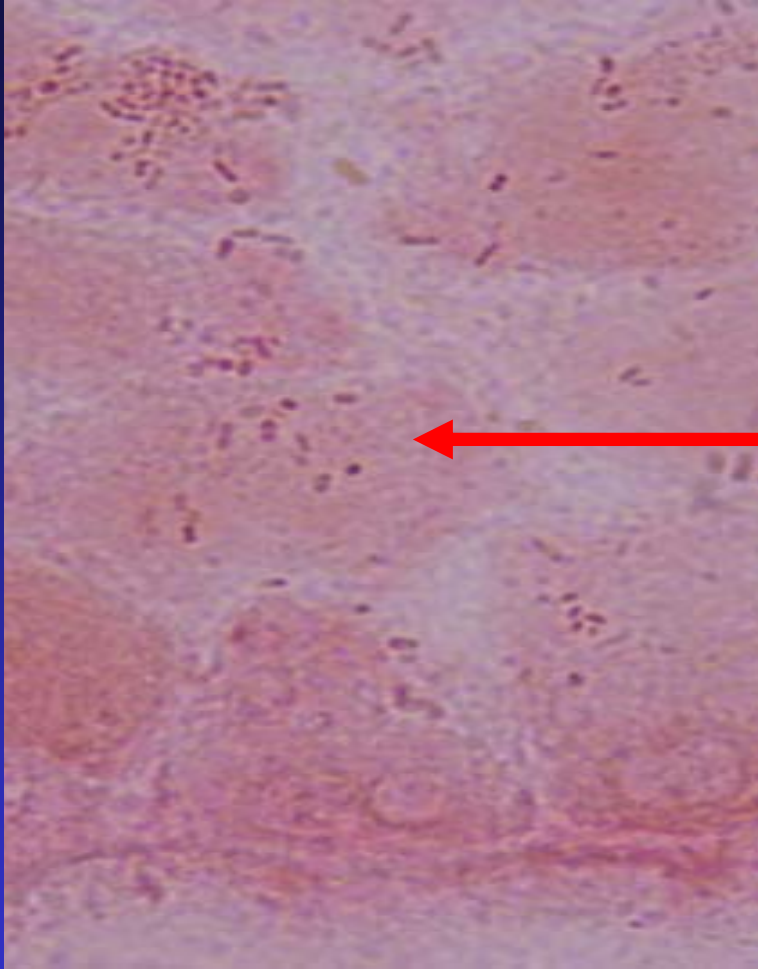


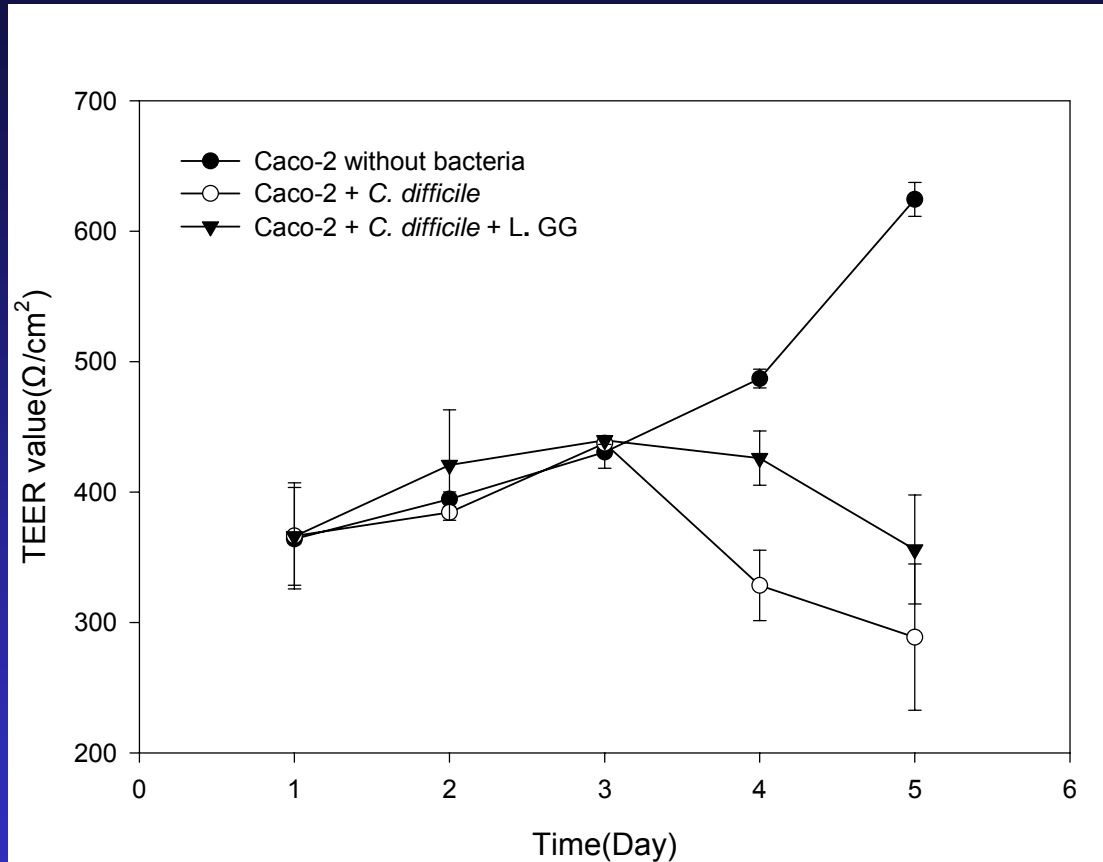
Fig. 9. The Gram staining result of *C. difficile* adhered to Caco-2 monolayer (2hr) (magnification 1000×).

## *C. difficile*破壞Caco-2細胞單層膜



*C. difficile*可觀察到大多數的細菌會黏附在細胞接合處

Fig. 10. The Gram staining result of *C. difficile* adhered to Caco-2 monolayer (magnification 1000×).



**Fig.** Effect of co-culture of *L.GG* on disruption of Caco-2 monolayer by *C. difficile*.

Caco-2細胞在培養第八天之後便會形成單層膜，但是到了第十五天才分化完成並有類似小腸上皮細胞的狀態，可作為實驗model。

將實驗結果與Walgren et al.於1998年所提出的”選用大於350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>的transwell insert進行實驗”比較，我們Transwell insert的TEER值於第十五天超過350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>相符，實驗用的Caco-2細胞單層膜皆以TEER值大於350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>為標準。

*L. GG*與*C.difficile*共同培養在MRS broth中，*C. difficile*的生長會受到抑制。

利用顯微鏡觀察發現，Caco-2細胞單層膜會受到傷害，而大多數的*C. difficile*會吸附在細胞的邊緣。

## 四、結論

Caco-2細胞在培養第八天之後便會形成單層膜，但是到了第十五天才分化完成並有類似小腸上皮細胞的狀態，可作為實驗model。

將實驗結果與Walgren et al.於1998年所提出的”選用大於350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>的transwell insert進行實驗”比較，我們Transwell insert的TEER值於第十五天超過350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>相符，實驗用的Caco-2細胞單層膜皆以TEER值大於350  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>為標準。

*L. GG*與*C.difficile*共同培養在MRS broth中，*C. difficile*的生長會受到抑制。

利用顯微鏡觀察發現，Caco-2細胞單層膜會受到傷害，而大多數的*C. difficile*會吸附在細胞的邊緣。