

蓝藻抗病毒蛋白 N 衍生物的细胞毒性及抗病毒活性检测

陈佳, 吕芬, 吴崇超, 彭舟, 魏博, 杨辉, 陈伟, 熊盛*

(暨南大学, 生物医药研究开发基地, 广东省生物工程药物重点实验室, 广东广州 510632)

摘要 [目的] 研究蓝藻抗病毒蛋白 N(CVN) 衍生物(LCVN) 对永生化上皮角质形成细胞(HaCaT) 的毒性及 LCVN 凝胶的制备和体外活性检测。[方法] 用 MTT 法测定 LCVN 对 HaCaT 细胞株的半数毒性浓度(CC_{50}) 以及 LCVN 对流感病毒毒株 A/HK/8/68 (H3N2) 的半数抑制浓度(IC_{50}); 用流式细胞检测法检测 LCVN 对 HaCaT 细胞周期与细胞凋亡的影响; 用酶联免疫吸附法(ELISA) 检测 LCVN 凝胶与 HIV 包膜蛋白 GP120 的相互作用。[结果] 培养 24 和 48 h 后, LCVN 对 HaCaT 的 CC_{50} 分别为 (9.25 ± 1.21) 与 (1.94 ± 0.12) $\mu\text{mol/L}$, 将 LCVN 做成凝胶后, 与 HIV 外膜蛋白 GP120 的结合在一定浓度范围内具有剂量关系, LCVN 凝胶对 A/HK/8/68 (H3N2) 毒株的 IC_{50} 为 (98.20 ± 0.03) nmol/L 。[结论] LCVN 对 HaCaT 细胞的毒性明显小于 CVN, 当做成凝胶以后 LCVN 对流感病毒 A/HK/8/68 (H3N2) 具明显抑制作用, 并能与 HIV 包膜蛋白 GP120 相互作用。

关键词 蓝藻抗病毒蛋白 N; 流感病毒; GP120

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03323-04

Assay of Cytotoxicity and Antiviral Activity of Cyanovirin-N Derivative

CHEN Jia et al (Biomedical R&D Center, Institute of Biomedicine & National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632)

Abstract [Objective] To study the cytotoxicity of LCVN, the derivative of Cyanovirin N, to the immortal human keratinocyte cell line (HaCaT), conduct preparation and antiviral assay of LCVN gel. [Method] The 50% cell cytotoxicity concentration (CC_{50}) of LCVN on HaCaT cells and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of LCVN against influenza virus A/HK/8/68 (H3N2) infection were determined by MTT assay. The effect of LCVN on the cell cycle of HaCaT cells was examined by flow cytometry. The interaction between LCVN and the envelopment protein GP120 of HIV was evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). [Result] The CC_{50} values of LCVN on HaCaT cells were (9.25 ± 1.21) and (1.94 ± 0.12) $\mu\text{mol/L}$, following 24 and 48 h treatment respectively. After prepared as a gel form, LCVN interacted with GP120 of HIV in a dose-response relationship in certain concentration ranges. The IC_{50} value of LCVN against influenza virus A/HK/8/68 (H3N2) was (98.20 ± 0.03) nmol/L . [Conclusion] The cytotoxicity of LCVN on HaCaT cells is evidently lower than that of CVN, and the LCVN gel possesses anti-influenza A/HK/8/68 (H3N2) activity and can interact with GP120 of HIV.

Key words Cyanovirin-N; Influenza virus; GP120

蓝藻抗病毒蛋白 N(CVN) 是 1997 年美国国家癌症研究院(NCI) 从蓝藻中分离得到的一种广谱高效抗病毒蛋白^[1], 在低至纳摩尔浓度下, CVN 可在病毒侵入阶段不可逆地灭活野生型和实验室保存的 HIV-1 和 HIV-2, 同时对流感病毒、单纯疱疹病毒-1 (HSV-1)、猴免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒等多种病毒都有拮抗作用^[2-5]。此外 CVN 还具有稳定的理化性质且不易引起耐药性, 这些特性使 CVN 蛋白成为当前最具潜力的融合抑制剂之一, 用以降低 HIV 在性传播途径中对女性的感染率^[6]。然而作为一种外源性多肽, CVN 仍存在细胞毒性大、半衰期较短、易引起免疫应答等缺陷。实践证明聚乙二醇(PEG) 修饰能用以缓解多肽及蛋白类药物在开发过程中存在的一些问题, 如免疫原性强、稳定性差, 半衰期短等^[7]。如果直接对 CVN 的 N-末端进行修饰可能会影响 CVN 的活性, 因为其活性位点大多位于 N-末端, 在前期工作中, 笔者所在实验室成功在 CVN 的 N-末端引入了(GGGGS)₃ 柔性水溶性多肽序列(LCVN), 这样可避免直接修饰 CVN 可能引起的失活, 并且借助 SUMO 融合表达系统,

实现了 SUMO-LCVN 在大肠杆菌中的可溶性、高效表达^[8]。笔者在文中主要在细胞水平上检测 LCVN 的毒性以及凝胶状态下 LCVN 的抗病毒活性, 旨在为 LCVN 大规模应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物和试剂。 LCVN 及 CVN 于广东省生物工程药物重点实验室合成, 纯度大于 95%, GP120 购于北京雅怡生物科技有限公司。流式细胞周期检测试剂盒及细胞凋亡检测试剂盒购于 Sigma 公司, 96 孔细胞培养板及酶标板等购于广州斯佳生物有限公司, 其余材料购至宝生物(大连)有限公司。

1.1.2 细胞及病毒。 狗肾细胞 MDCK 细胞株, 引自美国 ATCC。人上皮角质化永生细胞 HaCaT, 购于武汉病毒所。生长液为 MEM 培养基含 10% 胎牛血清(杭州四季青)、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素, 细胞维持液为 MEM 培养基添加 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素(不含胎牛血清)。A/HK/8/68(H3N2) 甲型流感病毒由日本长崎大学微生物和免疫学系传染性病原体分子生物学实验室馈赠。

1.2 LCVN 细胞毒性试验 HaCaT 细胞经胰酶消化后, 按照 2.5×10^5 细胞/孔加入 96 孔细胞培养板中, 待细胞长成单层后弃生长液, 用培养液将 CVN 和 LCVN 稀释成 6 个浓度梯度(10.000 0、5.000 0、2.5000、1.250 0、0.625 0、0.312 5 $\mu\text{mol/L}$), 每浓度设 3 个复孔, 同时设正常细胞对照组, 37

基金项目 “重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划第二批课题(2012ZX09103-301-033); 暨南大学科研培育与创新基金(11611206)。

作者简介 陈佳(1987-), 女, 四川大邑人, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质及多肽药物, E-mail: 520094768@qq.com。* 通讯作者, 研究员, 从事蛋白质药物、抗体药物开发与应用研究, E-mail: Xiongsheng@jnu.edu.cn。

收稿日期 2013-03-22

℃、5% CO₂ 培养箱内分别培养 24 和 48 h 后,取出 96 孔细胞培养板,加入 10 μl MTT,继续培养 4 h,吸除上清后,每孔加入 100 μl DMSO 避光微摇 15 min,测定其 OD 值(酶标仪 Bio-Rad 550),测量波长 490 nm,参考波长 630 nm,计算半数中毒浓度 CC₅₀。

1.3 流式检测 LCVN 对 HaCaT 细胞周期及细胞凋亡的影响 HaCaT 细胞经胰酶消化后,按 2.5 × 10⁵ 细胞/孔加入 96 孔细胞培养板中,待细胞长成单层后弃生长液,用培养液将 CVN 和 LCVN 稀释成 3 个浓度梯度(0.500、0.250、0.125 μmol/L),每个浓度设 3 个复孔,同时设正常细胞对照组,37℃、5% CO₂ 培养箱内分别培养 48 h 后,取出去上清,胰酶消化后离心,用 PBS 液洗细胞 2 次后,按照流式细胞周期检测试剂盒及细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。

1.4 LCVN 凝胶的制备 卡波姆 9 802 g,甘油 20 g,乙醇胺 640 μl,去离子水加至 98.4 g,121℃、20 min 高压灭菌后加入 Euxyl PE 1.6 g,在无菌操作台上等体积加入一定浓度的 CVN 或 LCVN 配制成凝胶。凝胶稳定性检测:观察外观是否为无色透明胶体;检测 pH;3 000 r/min 离心 30 min;55℃恒温水浴 6 h,-20℃冷冻 24 h。

1.5 MTT 法测定 LCVN 凝胶对甲型流感病毒 A/HK/8/68 (H3N2) 毒株增殖的半数抑制浓度 IC₅₀ 将 MDCK 细胞于 96 孔细胞培养板内培养至单层备用。用 PBS 将 CVN 及 LCVN 凝胶稀释成不同浓度的药物稀释液各 50 μl,再与流感毒株(H3N2)的病毒稀释液(100 TCID₅₀) 50 μl 混合并加到 MDCK 细胞上,每个浓度 3 个复孔,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h。同时设阳性药物组,病毒对照组和阴性对照组。MTT 法检测 OD 值,计算抑制率(%) = (OD_{药物组} - OD_{病毒对照组}) / (OD_{细胞对照组} - OD_{病毒对照组}) 及半数有效浓度 IC₅₀。

1.6 酶联免疫吸附试验 用 PBS 稀释 GP120,按 100 ng/孔加入 96 孔酶标板,37℃孵育 2 h,PBST 洗板 3 次,加入 15% 胎牛血清,每孔 100 ml,37℃封闭 2 h,PBST 洗板 3 次,加入系列浓度的 LCVN 凝胶稀释液(10 000 ng 至 0.000 1 ng,10 倍稀释),每个浓度设 3 个复孔,并以相应浓度 BSA 作为阴性对照,37℃孵育 2 h,PBST 洗板,加入 Cyanovirin-N rabbit-

polyclonal antibody(1:10 000),37℃孵育 2 h,PBST 洗板,加入羊抗兔酶标二抗(1:3 000 Santa Cruz) 37℃保温 2 h,PBST 洗板,TMB 显色 15 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止显色,于 450/630 nm 酶标仪读取 OD 值。

2 结果与分析

2.1 LCVN 对 HaCaT 细胞的半数毒性浓度 将 LCVN 和 CVN 稀释成一系列浓度梯度加入到 HaCaT 单层细胞分别作用 24 和 48 h 后,MTT 检测其毒性数据如表 1 所示。培养 24 h 后 LCVN 的 CC₅₀ 为 (9.25 ± 1.21) μmol/L,是 CVN 的 6 倍多。当培养到 48 h 以后,LCVN 的 CC₅₀ 是 (1.94 ± 0.12) μmol/L,同样比 CVN 高 1.5 倍。这表明对 HaCaT 而言,LCVN 比野生型 CVN 的毒性更小。为进一步了解 LCVN 的毒性大小,试验检测了 LCVN 对 HaCaT 细胞周期及细胞凋亡的影响。

表 1 LCVN 和 CVN 对人永生表皮角质细胞的细胞毒性

蛋白	CC ₅₀ //μmol/L	
	24 h	48 h
CVN	1.51 ± 0.37	1.26 ± 0.07
LCVN	9.25 ± 1.21	1.94 ± 0.12

2.2 LCVN 对 HaCaT 细胞周期的影响 将 LCVN 加入 HaCaT 细胞中 48 h 后流式检测细胞周期结果如图 1 和表 2 所示,G₂/G₁ 期细胞保持不变,G₁ 期细胞略微增加,G₂ 期细胞略微减少,S 期细胞略微减少期,但并无统计学意义。

表 2 LCVN 作用 48 h 后细胞周期的变化

浓度 μmol/L	G ₁ //%		G ₂ //%		S//%		G ₂ /G ₁	
	CVN	LCVN	CVN	LCVN	CVN	LCVN	CVN	LCVN
0.500	40.0	52.6	4.3	4.1	55.7	43.2	1.90	1.94
0.250	38.1	49.0	2.6	4.3	59.2	46.7	1.90	1.90
0.125	36.1	45.8	4.0	3.9	60.0	50.3	1.88	1.89
对照	43.1		5.8		51.1		1.89	

2.3 LCVN 对 HaCaT 细胞凋亡的影响 将 LCVN 加入 HaCaT 细胞中 48 h 后流式检测细胞凋亡结果如图 2 所示,加入浓度为 0.500、0.250、0.125 μmol/L LCVN 时对应细胞早期

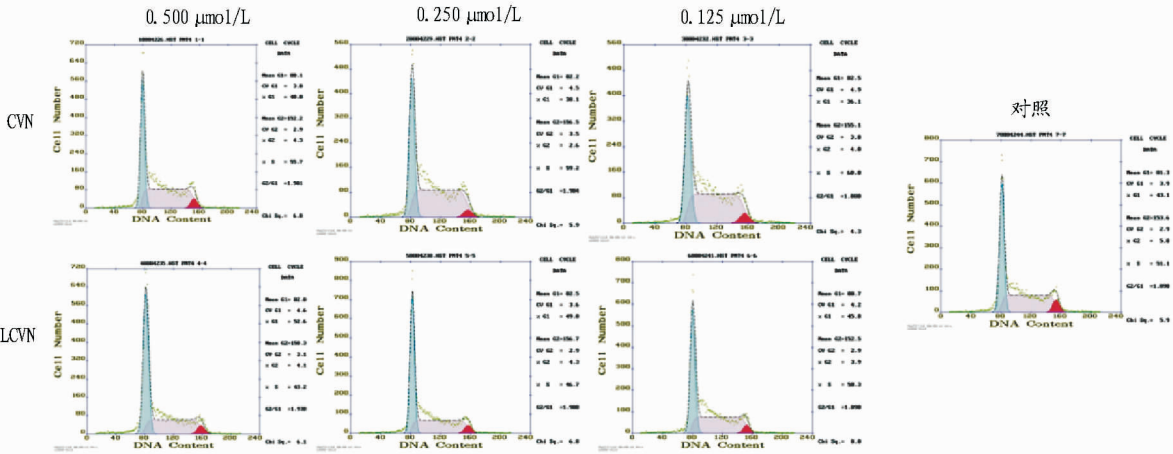


图 1 LCVN 对 HaCaT 细胞作用 48 h 后流式检测细胞周期结果

凋亡率分别是 7.3%、3.4%、3.3%，而正常细胞早期凋亡率为 8.0%，说明加入 LCVN 后细胞的早期凋亡减少了。相反不同浓度 LCVN 对应的晚期凋亡或死亡率为 14.8%、9.0%、7.0%，对比正常细胞的 1.8% 明显增大了。如此说明 LCVN 对 HaCaT 细胞的毒性并不是源于细胞凋亡，可能是引起细胞

死亡所导致的。与 LCVN 不同，当加入 CVN 的浓度为 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞早期凋亡率为 16.6%，晚期凋亡或死亡率为 14.4%，相比正常细胞都有明显增加，说明 CVN 的浓度达一定值后可能会引起 HaCaT 细胞的凋亡。

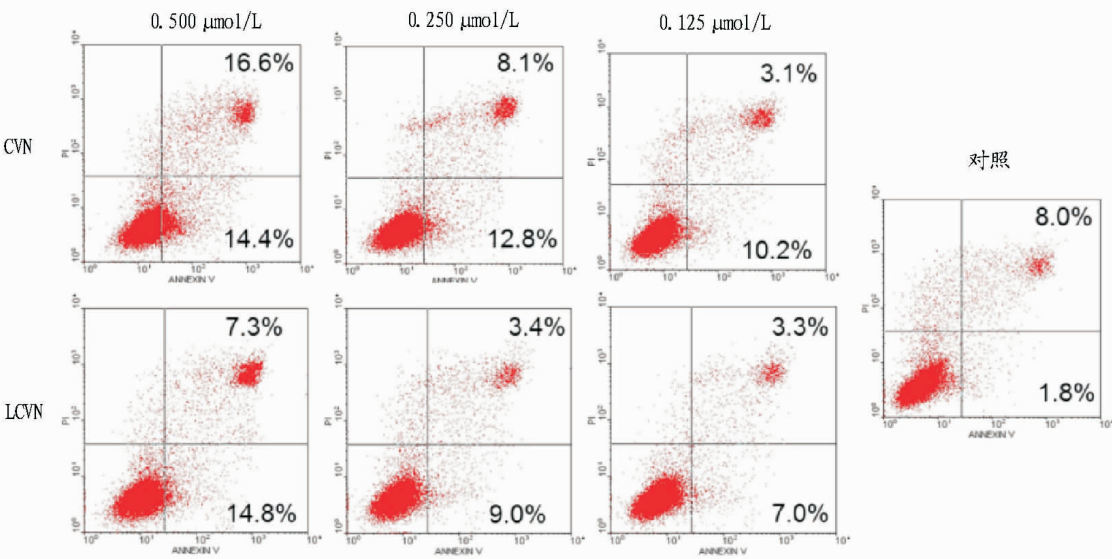


图 2 LCVN 对 HaCaT 细胞作用 48 小时后流式检测细胞凋亡结果

2.4 LCVN 凝胶稳定性鉴定和对流感病毒的半数抑制浓度 IC_{50} 鉴于 LCVN 的细胞毒性小于 CVN，有进一步研究的价值，所以将其做成凝胶做进一步研究。观察凝胶外观成无色透明胶体，且延展性良好，检测其 pH 为 5.1，将其 3 000 r/min 离心 30 min，55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 6 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 24 h 后均无分层、变色等现象。MTT 检测 LCVN 凝胶对 A/HK/8/68 (H3N2) 流感病毒毒株在 MDCK 细胞中扩增的半数抑制浓度如表 3 所示，LCVN 凝胶和 CVN 凝胶的 IC_{50} 分别为 (98.20 ± 0.03) 和 (3.15 ± 0.03) nmol/L，而赋形剂并无活性。虽然 LCVN 凝胶 IC_{50} 略低于 CVN，但可看出 LCVN 对 A/HK/8/68 (H3N2) 流感病毒毒株的增殖抑制非常敏感，在低纳摩尔水平明显抑制该病毒的增殖。

表 3 LCVN 凝胶和 CVN 凝胶的抗流感病毒活性

项目	流感病毒毒株	IC_{50} //nmol/L
LCVN 凝胶	A/HK/8/68 H3N2	98.20 ± 0.03
CVN 凝胶	A/HK/8/68 H3N2	3.15 ± 0.03
赋形剂	A/HK/8/68 H3N2	-

2.5 LCVN 凝胶结合 HIV 外膜糖蛋白 GP120 LCVN 凝胶与 HIV 包膜蛋白 GP120 的结合效果如图 3 所示，LCVN 凝胶与 GP120 蛋白的结合发生在 1 ng 以上，与 CVN 凝胶的结合能力相同，吸光值随着 LCVN 浓度的升高而升高，当低于 1 ng 时，LCVN 凝胶与 GP120 蛋白无结合，吸光值与阴性对照牛血清白蛋白 BSA 接近。

3 结论与讨论

蓝藻抗病毒蛋白 N (CVN) 因其能特异、高亲合性地与 HIV 病毒表面包膜蛋白 GP120 结合，阻止病毒与宿主细胞表

面的受体结合，并阻止病毒在感染细胞和正常细胞之间的传播而倍受关注^[9]。做为一种全新的蛋白，其具有独特的氨基酸序列，与任何已知的蛋白质和转录产物的氨基酸序列没有任何大于 8 个连续氨基酸残基的同源性或全序列大于 20% 的同源性^[10]。随着 CVN 功能学研究的发展，还发现它能与 Ebola 病毒表面糖蛋白和丙肝病毒 HCV 包膜蛋白结合，并且能抑制鼠肝炎病毒、猫冠状病毒和多种流感病毒的增殖^[11-15]。但 CVN 分子量小，只有 11 kD，并且其分子结构中有 2 个二硫键，这对 CVN 在大肠杆菌中的直接表达造成了困难。连接肽 (Linker) 是融合蛋白中不可或缺的组成部分，能够促使 2 个有活性的蛋白形成融合蛋白，并能形成正确构象且保持各自的活性^[16]。笔者所在课题组在 CVN 的 N 末端插入 15 个柔性多肽序列 (GGGS)₃，不仅能够增加蛋白的表达量，而且能够使各个单体以正确的形式折叠，使其活性得到最大的保持并通过 SUMO 融合标签表达系统。

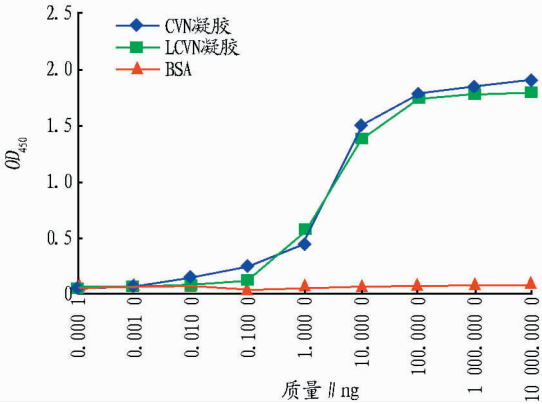


图 3 LCVN 凝胶与 GP120 的相互作用

插入 Linker 后得到的 LCVN 不但保持了原有的活性且毒性也大幅度减小,LCVN 的成功构建有利于进一步在其 N 末端位点特异性修饰,能改善 CVN 的免疫原性和毒性,而不破坏 CVN 原有的活性。LCVN 与 CVN 相比具有更小的细胞毒性,将其做成凝胶以后性质稳定,对流感病毒 A/HK/8/68 (H3N2)有明显抑制作用。分子试验表明 LCVN 凝胶能与 HIV 包膜蛋白 GP120 在低浓度下高效结合,结合能力与 CVN 凝胶相当,而 CVN 是通过与 HIV 包膜蛋白 GP120 高效结合,从而达到对 HIV 病毒的抑制作用,间接说明了 LCVN 凝胶具有与 CVN 相同的抗 HIV 能力。LCVN 的成功构建表达为 CVN 的进一步修饰奠定了基础,并且 LCVN 本生也是一种有效的抗病毒候选药物,具有进一步研究开发的價值。

参考文献

- [1] ROBERT M J, BENTLEY M D, HARRIS J M. Chemistry for peptide and protein PEGylation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(4): 459–476.
- [2] 吕锐, 于红, 阎博民. 重组蓝藻抗病毒蛋白 N 抗柯萨奇 B₃ 病毒的体外实验研究[J]. 医学研究生报, 2008, 21(12): 1242–1245, 1355.
- [3] BOYD M R, GUSTAFSON K R, MCMAHON J B, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120; potential applications to microbicide development [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41(7): 1521–1530.
- [4] DEY B, LERNER D L, LUSSO P, et al. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N; blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses [J]. J Virol, 2000, 74(10): 4562–4569.

- [5] 安立冰, 刘宗涛, 于红. 重组蓝藻抗病毒蛋白 N 抗单纯疱疹病毒 2 型作用的实验研究[J]. 社区医学杂志, 2008, 6(13): 7–8.
- [6] SHATTOCK R J, MOORE J P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1: 25–34.
- [7] AN Q, LEI Y, JIA N, et al. Effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics [J]. Biomed Eng, 2007, 24(6): 643–649.
- [8] GAO X, CHEN W. Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009(4): 1051–1060.
- [9] 陆源, 文建凡. 蓝藻抗病毒蛋白 N[J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 92–93.
- [10] BEWLEY C A, GUSTAFSON K R, BOYD M R, et al. Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein[J]. Nat Struct Biol, 1998, 5(7): 571–578.
- [11] BARRIENTOS L G, O'KEEFE B R, BRAY M, et al. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1, 2 and inhibits infectivity of Ebola virus[J]. Antiviral Res, 2003, 58(1): 47–56.
- [12] O'KEEFE B R, SMEE D F, TURPIN J A, et al. Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2518–2525.
- [13] HELLE F, WYCHOWSKI C, VU-DACU N, et al. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(35): 25177–25183.
- [14] VAN DER MEER F J, DE HAAN C A, SCHUURMAN N M, et al. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents against Nidovirales in cell culture[J]. Antiviral Res, 2007, 76(1): 21–29, 245.
- [15] TIWARI V, SHUKLA S Y, SHUKLA D. A sugar binding protein cyanovirin-N blocks herpes simplex virus type-1 entry and cell fusion[J]. Antiviral Res, 2009, 84(1): 67–75.
- [16] 闫璐颖, 陈建华, 张新国. 融合蛋白连接肽的研究进展[J]. 生物技术, 2008, 18(3): 92–94.

(上接第 3315 页)

为 10^4 CFU/ml 时被杀死的时间一致,说明乳酸杆菌 L1 对白色念珠菌的拮抗作用并没有因为其菌落数的调高而受到影响,其对白色念珠菌的拮抗作用仍十分显著。

2.6 乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌菌落数为 10^7 CFU/ml 时的拮抗作用 由图 6 可看出,实验组的金黄色葡萄球菌在 15 h 时就被全部杀死,说明乳酸杆菌 L1 对金黄色葡萄球菌仍有显著的拮抗作用,尽管金黄色葡萄球菌相对“2.3”中被杀死的时间延后了约 6 h。

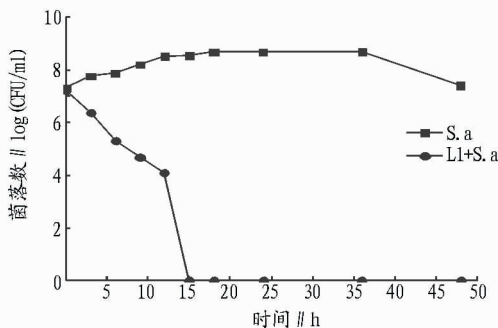


图6 乳酸杆菌 L1 对金黄色葡萄球菌菌落数为 10^7 CFU/ml 的拮抗作用

3 讨论

(1)从整体上来分析,4 株乳酸杆菌对大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌都有显著的拮抗作用,其中对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗作用要强于白色念珠菌;同一株

菌对不同的致病菌显示出不同的拮抗效果,这可能和乳酸杆菌对不同致病菌产生拮抗的原理不同以及致病菌本身的生理特性有关,白色念珠菌生长的适宜 pH 为 4.0~4.7,这与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的适宜 pH 不同。

(2)从 4 株乳酸杆菌的对比分析来看,乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 对大肠杆菌的拮抗效果差别不明显,乳酸杆菌 L1、L2 对白色念珠菌的拮抗效果要明显强于乳酸杆菌 L3、L4,乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌的拮抗作用为 L1 > L2 > L4 > L3。不同的乳酸杆菌对同种致病菌显示出不同的拮抗效果,乳酸杆菌 L1 对这 3 种致病菌的拮抗效果要强于另外 3 株乳酸杆菌,这可能是由于乳酸杆菌 L1 产乳酸快,导致培养基的 pH 下降速度快,而培养基 pH 降低越明显,其抑菌效果就越强,这与张辉华等^[4]、Coconnier 等^[5]的报道相一致。乳酸杆菌 L1 也没有因为致病菌菌落数的提高,而对它们的拮抗作用产生太大影响。

参考文献

- [1] 李兰娟. 感染微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [2] HYERAN N, KYUNGHEE W, YEONHEE L. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women [J]. Microbiol, 2007, 45: 515–520.
- [3] 郑晶晶, 宋静慧. 乳酸杆菌及阴道微生态制剂[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(S2): 141–144.
- [4] 张辉华, 曹永长, 毕英佐, 等. 乳酸杆菌体外对大肠埃希菌 O-78 拮抗作用试验[J]. 中国微生物学杂志, 2002, 14(6): 322–333.
- [5] COCONNIER M H, LIEVIN V, HEMERY E, et al. Antagonistic activity against helicobacter infection in vitro and in vivo by the human lactobacillus acidophilus strain LB[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4573–4580.