

文章编号: 1000-0615(2005)05-0619-05

## 载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌 粘附尼罗罗非鱼上皮细胞的影响

胡彩虹, 夏枚生, 熊莉, 许梓荣

(浙江大学动物科学学院动物分子营养学教育部重点实验室, 浙江 杭州 310029)

**摘要:** 采用尼罗罗非鱼上皮细胞培养模型, 观察嗜水气单胞菌对鳃上皮、皮肤上皮、肠上皮细胞的粘附率, 研究载铜蒙脱石对细菌粘附的阻断作用及其对细菌粘附引起鱼上皮细胞膜生物特性变化的影响。结果显示: 嗜水气单胞菌与鱼上皮细胞均有不同程度的粘附作用, 粘附率大小顺序为鳃上皮 > 皮肤上皮 > 肠上皮细胞。载铜蒙脱石均显著降低了嗜水气单胞菌对鳃、皮肤和肠上皮细胞的粘附率 ( $P < 0.05$ ), 而且对不同上皮细胞的粘附阻断率无显著差异。嗜水气单胞菌粘附肠上皮细胞后细胞膜生物特性发生了显著变化, 与正常对照组相比, 嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞后, 胞浆游离钙和细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性显著上升。载铜蒙脱石可显著降低由于嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞引起的胞浆游离钙和细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性的升高。结果表明, 载铜蒙脱石可有效阻断病原菌粘附, 从而防治细菌感染和细菌移位。

**关键词:** 载铜蒙脱石; 嗜水气单胞菌; 粘附; 鱼上皮细胞; 细胞膜

中图分类号: S941.42 文献标识码: A

## Effects of Cu bearing montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* adhesion to epithelial cells of Nile tilapia

HU Cai-hong, XIA Mei-sheng, XIONG Li, XU Zi-rong

(Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition of Ministry of Education,  
College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Skin, gill and intestinal epithelial cells were developed using primary cultures of mucosal cells (isolated from healthy Nile tilapia) to study the adhesion of *Aeromonas hydrophila* to fish epithelial cells and the effects of Cu bearing montmorillonite (Cu-MMT) on the adhesion of bacteria and on cell membrane injury due to *Aeromonas hydrophila*. The three primary-culture cells are susceptible to *Aeromonas hydrophila* attachment, with the greatest binding affinity found in gills, and to a lesser extent, in skin and intestine epithelial cells. Cu-MMT significantly inhibited ( $P < 0.05$ ) adhesion of bacteria to skin, gill and intestinal epithelial cells. The cell membrane was injured due to *Aeromonas hydrophila*. The activity of cytosolic free calcium concentration and membranous phospholipase A<sub>2</sub> were increased ( $P < 0.05$ ) significantly. Cu-MMT can significantly reduced ( $P < 0.05$ ) cell membrane injury caused by the adhesion of *Aeromonas hydrophila*. Our study shows that Cu-MMT showed a strong ability to inhibition adhesion of pathogenic strains to fish epithelial cell and open the possibility of applying Cu-MMT in aquaculture.

**Key words:** Cu bearing montmorillonite; *Aeromonas hydrophila*; adhesion; fish epithelial cells; cell membrane

近年来, 由嗜水气单胞菌引发的鱼类疾病呈  
上升趋势, 防治由嗜水气单胞菌引起的鱼类疾病,

目前大多采用抗生素, 但长期使用和滥用抗生素,  
造成诸如细菌抗药性、耐药基因转移、水产品中药

收稿日期: 2004-09-09

资助项目: 国家自然科学基金项目(30471255); 浙江省科技厅重点攻关项目(2005C22054)

作者简介: 胡彩虹(1972-), 女, 浙江东阳人, 助理研究员, 从事动物分子营养学和水产动物营养学研究。Tel: 0571-86985607, E-mail: chhu@zju.edu.cn

物残留等不良后果,直接或间接威胁人类健康<sup>[1]</sup>。离子型无机抗菌材料是以无机矿物质为载体,负载抗菌金属离子或金属氧化物而制成,具有抗菌谱广、细菌不易产生耐药性、使用安全等优点,引起了人们的极大关注<sup>[2]</sup>。蒙脱石(montmorillonite)是一种双八面体层状结构的天然纳米铝硅酸盐矿物,在由硅氧四面体和八面体组成的结构层之间,是易于被其它阳离子或功能团所置换的水合阳离子层,因此能够通过阳离子交换反应和插层反应把具有抗菌功效的阳离子植入其晶格<sup>[3]</sup>。此外,蒙脱石层纹状的表面结构和非均匀性电荷分布使其对病毒、病原菌及其产生的毒素等有优良的吸附能力<sup>[4]</sup>。我们通过吸附、离子交换反应把抗菌性铜离子植入蒙脱石晶格,制成载铜蒙脱石,并使蒙脱石在搭载铜离子后表面剩余正电荷,从而提高其吸附带负电荷的细菌的能力;另一方面,利用蒙脱石巨大的比表面积及其缓释效应,通过抗菌性铜离子的溶出兼有杀灭细菌的作用<sup>[3,5]</sup>。体外抗菌实验表明,载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 K88 等均有较强的抗菌活性<sup>[3,5,6]</sup>。粘附是细菌致病的重要先决条件,细菌通过粘附素和宿主细胞表面受体结合,然后在局部产生毒素或侵入深部组织致病;阻断病原菌粘附,可有效防治细菌感染和细菌移位<sup>[7]</sup>。本试验拟采用尼罗罗非鱼肠上皮、鳃上皮、皮肤上皮细胞培养模型,研究嗜水气单胞菌与鱼上皮细胞的粘附性能,探讨载铜蒙脱石对上述粘附作用的影响,为载铜蒙脱石作为杀菌保健剂应用于水产养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

载铜蒙脱石按胡彩虹等<sup>[3,5]</sup>方法制备。蒙脱石矿属火山沉积岩系热液蚀变型,为钙基蒙脱石,矿石蒙脱石含量达 97% 以上。蒙脱石矿在温度为 80 °C 的烘箱中干燥,研磨至小于 300 目;加水配制成浓度为 10% 的悬浮液,高速搅拌机中打浆;沉淀除去粒度大于 1 μm 的组分;按重量比为蒙脱石:氯化钠为 10:1,加水并在高速搅拌机中打浆,制成浓度 20% 的悬浮液矿浆,水洗 5~7 次至无 Cl<sup>-</sup>,用水重新制成浓度 10% 的矿浆,按重量比为蒙脱石:CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 为 4:1 的比例搅拌均匀成悬浮液;调节溶液 pH 为 5.0;60 °C,6 h 以加速

离子交换反应;8 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,倾去上层清液,加入蒸馏水清洗、离心,并重复 3 次;得到的载铜蒙脱石在 80 °C 烘箱中干燥,研磨至小于 300 目备用。经原子吸收光谱分析,载铜蒙脱石的铜含量为 2.5%。试验前准确称取 0.2 g 载铜蒙脱石,用 100 mL 无血清、无双抗 Leibovitz Medium L-15 制成悬液。

主要试剂:多粘杆菌蛋白酶、伊思考夫改良杜尔贝可培养基、Leibovitz Medium L-15、Hank 氏平衡盐溶液、胎牛血清购自 GIBCO 公司,庆大霉素、青霉素、链霉素、苯氧乙醇购自 Sigma 公司,培养瓶、培养板购自 Corning 公司, Tryptic Soy Broth (TSB) 肉汤购自 Difco 公司,<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷购自中国原子能科学研究院同位素研究所,放射性比活度为 60 Ci·mmol<sup>-1</sup>。

### 1.2 细菌培养

嗜水气单胞菌 ATCC 14715 分离自患病银鲑鱼肠道。细菌同位素标记参照 Elina 等<sup>[8]</sup>方法。将细菌在 20 μL·mL<sup>-1</sup>的<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的 TSB 肉汤培养液中 28 °C 培养 24 h。培养完毕后,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min, PBS 液(pH 7.2, 10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸盐)洗 2 次,用 PBS 液悬浮细菌,调整菌液浓度为(1~2)×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>,备用。

### 1.3 尼罗罗非鱼肠上皮细胞分离和原代培养

参照 Guzman-Murillo 等<sup>[9]</sup>方法。体重 10 g 左右的健康尼罗罗非鱼用苯氧乙醇麻醉后,取出肠、鳃、皮肤组织,放置在含庆大霉素、青霉素和链霉素(200 μg·mL<sup>-1</sup>)的 PBS 液中,冰浴。组织样品用 0.1% 次氯酸钠处理 3 min,无菌蒸馏水洗 4 次,70% 乙醇 1 min,蒸馏水洗 3 次,含庆大霉素、青霉素和链霉素(200 μg·mL<sup>-1</sup>)的 PBS 液洗 1 次。组织样品用 PBS 漂洗,剪成 0.1 mm×0.1 mm 大小的组织块。组织块用冷提取缓冲液(25 mmol·L<sup>-1</sup> Hank 氏平衡盐溶液, pH 7.4, 含 1 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>和 10 mmol·L<sup>-1</sup> 4-二硫代苏糖醇)洗 2 次后与提取缓冲液混合,温度 25 °C。30 min 后,通过 150 μm 尼龙网过滤,分离细胞。残留片断继续培养,加入含 1.5 mg·mL<sup>-1</sup>多粘杆菌蛋白酶和 20% 胎牛血清的伊思考夫改良杜尔贝可培养基,30 °C 搅拌 30 min。上述方法制备的单个细胞悬浮液混合后,经 1500 g·min<sup>-1</sup>,25 °C 离心 10 min,悬浮在含 5% 胎牛血清、庆大霉素、青霉素和链霉素(200 μg·mL<sup>-1</sup>)的 Leibovitz Medium L-15 液中,

苔盼蓝染色排斥法计算细胞活率, 用 Leibovitz Medium L- 15 调整细胞数为每毫升  $1 \times 10^5$  个, 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔 2 mL, 置 28 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞在培养板底部形成完整的类似上皮样的膜状结构时用于试验。期间每隔 1 天更换 1 次培养液。细胞使用前 Hank 氏液洗 3 次。

#### 1.4 细菌粘附试验和阻断试验

参照 Elina 等<sup>[8]</sup>和 Guzman-Murillo 等<sup>[9]</sup>方法。每孔加入 100 μL 菌液(简称细菌粘附组), 再加入 100 μL Leibovitz Medium L- 15 液(阻断试验加入 100 μL 载铜蒙脱石悬液, 简称阻断试验组)。然后置于 28 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1.5 h。吸弃上液, 用 Hank 氏液洗涤培养孔 3 次, 以除去未粘附细菌。然后加入 100 μL 0.9 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液, 37 °C 过夜以裂解细胞和细菌。再加入 150 μL 闪烁液, 在液闪仪 [Wallac MicroBeta (R) TriLux, Finland] 上测定放射性强度。每个做 3 个重复。

细菌粘附率(%) =  $\frac{\text{粘附在细胞中细菌的放射性强度}}{\text{所加入细菌的放射性强度}} \times 100$

粘附阻断率(%) =  $\frac{\text{阻断实验组细菌粘附率}}{\text{细菌粘附组细菌粘附率}} \times 100$

#### 1.5 载铜蒙脱石对细菌粘附引起鱼上皮细胞膜生物特性变化的影响

试验分为 3 组: (1) 无细菌粘附的正常对照组; (2) 细菌侵入组; (3) 细菌侵入+ 载铜蒙脱石

组。试验方法同 1.4。培养 1.5 h 后吸弃上液, 用 Hank 氏液洗涤培养孔 3 次, 将待测细胞用胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 采用荧光法<sup>[10]</sup>, 用 Fura2-AM 作为荧光探针, 于 Ex = 340 nm, Em = 490 nm, 狭缝 5 nm, RF- 540 型荧光分光光度计测定细胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度; 采用放射化学法<sup>[11]</sup>, 用液闪仪测定细胞液中磷脂酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) 活性。

#### 1.6 统计学处理

各处理间平均值的比较采用方差分析中的最小显著极差法(LSD), 结果以平均数 ± SD 表示。计算程序采用 SAS(6.12) 中的一般线性模式进行。

## 2 结果

### 2.1 载铜蒙脱石对细菌粘附率的影响

嗜水气单胞菌对尼罗罗非鱼上皮细胞的粘附率和载铜蒙脱石对粘附的阻断率见表 1。嗜水气单胞菌与鱼上皮细胞均有不同程度的粘附作用, 其中对鳃上皮细胞的粘附率显著大于肠上皮细胞 ( $P < 0.05$ )。与空白组相比, 载铜蒙脱石均显著降低了嗜水气单胞菌对鳃、皮肤和肠上皮细胞的粘附率 ( $P < 0.05$ ), 但是对不同上皮细胞的粘附阻断率无显著差异。

表 1 嗜水气单胞菌对尼罗罗非鱼上皮细胞的粘附率和载铜蒙脱石对粘附的阻断率

Tab. 1 Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to epithelial cells isolated from gills, skin and intestine of Nile tilapia and inhibition of adherence by Cu-MMT

	细菌粘附组细菌粘附率 adhesion percentages of the treatment of <i>A. hydrophila</i> invasion	阻断试验组细菌粘附率 adhesion percentages of the treatment of Cu-MMT	粘附阻断率 inhibiting percentages
鳃 gill	10.52 ± 2.01 <sup>Aa</sup>	4.19 ± 0.87 <sup>Ab</sup>	60.14 ± 10.33
皮肤 skin	8.94 ± 2.64 <sup>Ab</sup>	2.55 ± 1.11 <sup>ABb</sup>	71.52 ± 8.12
肠 intestine	6.52 ± 1.25 <sup>Ba</sup>	2.07 ± 0.64 <sup>Ab</sup>	68.23 ± 9.93

注: 结果以平均数 ± 标准差表示; n = 3。同一行中肩标小写字母不同者差异显著 ( $P < 0.05$ ); 同一列中肩标大写字母不同者差异显著 ( $P < 0.05$ )

Notes: Values are presented as means and standard deviations; n = 3 per treatment. Means in a row with different lowercase letters differ significantly ( $P < 0.05$ ). Means in a line with different capital letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### 2.2 载铜蒙脱石对细菌粘附引起鱼上皮细胞膜生物特性变化的影响

嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞以后, 胞浆游离钙和细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性显著上升(表 2)。与正常对照组相比, 鳃、皮肤和肠上皮细胞胞浆游

离钙浓度分别升高了 70.81% ( $P < 0.05$ )、62.35% ( $P < 0.05$ )、66.47% ( $P < 0.05$ ), 细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 分别升高了 83.33% ( $P < 0.05$ )、137.50% ( $P < 0.05$ )、106.67% ( $P < 0.05$ )。与细菌侵入组相比, 细菌+ 载铜蒙脱石组鳃、皮肤和肠上皮细胞胞浆游离钙

浓度分别降低了 28.41% ( $P < 0.05$ )、24.67% ( $P < 0.05$ )、28.40% ( $P < 0.05$ )，细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 分别降低了 34.09% ( $P < 0.05$ )、42.11% ( $P < 0.05$ )、

35.48% ( $P < 0.05$ )，而与正常对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 2 载铜蒙脱石对细菌粘附引起鱼上皮细胞膜生物特性变化的影响

Tab. 2 Effects of Cu-MMT on membrane characteristics of epithelial cells caused by *Aeromonas hydrophila* adhesion

组别 treatment	胞浆游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度 (nmol·L <sup>-1</sup> ) cytosolic free calcium			细胞膜磷脂酶 A <sub>2</sub> 活性 (μmol·min <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup> ) membranous PLA <sub>2</sub> activity		
	鳃 gill	皮肤 skin	肠 intestine	鳃 gill	皮肤 skin	肠 intestine
正常对照组 control	121.34 ± 18.73 <sup>b</sup>	155.43 ± 23.71 <sup>b</sup>	130.22 ± 26.54 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.06 <sup>b</sup>
细菌侵入组 <i>A. hydrophila</i> invasion	207.26 ± 35.32 <sup>a</sup>	252.34 ± 31.17 <sup>a</sup>	216.78 ± 38.61 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>a</sup>
细菌+载铜蒙脱石组 <i>A. hydrophila</i> + Cu-MMT	148.37 ± 24.63 <sup>b</sup>	190.10 ± 35.34 <sup>b</sup>	155.22 ± 25.17 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>b</sup>

注: 结果以平均数 ± 标准差表示; n = 3。同一列中肩标大写字母不同者差异显著 ( $P < 0.05$ )

Notes: Values are presented as means and standard deviations; n = 3 per treatment. Means in a line with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

胡彩虹等<sup>[3,5]</sup>认为, 载铜蒙脱石所载铜主要是以水合或复合阳离子的形式, 以离子交换的方式进入蒙脱石晶格层间。Bahranowski 等<sup>[12]</sup>报道, Cu<sup>2+</sup> 主要以 [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> 形式, 以交换吸附的方式存在于蒙脱石层间, 同时有少量的 Cu<sup>2+</sup> 以 [Cu(AlO)<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4-n</sub>]<sup>x+</sup> 的形式, 以化学吸附的方式存在于层间。由于蒙脱石晶格的层间位置只能容纳阳离子, 当多核络离子 [Cu(AlO)<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4-n</sub>]<sup>x+</sup> 对蒙脱石层间 Ca<sup>2+</sup> 的交换, 以及 Cu<sup>2+</sup> 进入蒙脱石 Si-O 四面体晶内孔和八面体中的空位时, 导致蒙脱石电价失衡, 使之带正电荷<sup>[3,5,12]</sup>。蒙脱石与细菌间的吸附作用分为物理吸附和化学吸附。由于在生理条件下, 细菌细胞壁带负电荷<sup>[13]</sup>, 而蒙脱石在生理 pH 值下表面也带负电荷<sup>[14]</sup>, 这样蒙脱石与细菌间靠静电作用的化学吸附就较弱。所以, 蒙脱石主要以物理吸附的形式与细菌表面发生作用。胡秀荣等<sup>[15]</sup>研究表明, 蒙脱石未显抗菌活性。而载铜蒙脱石有很强的抗菌活性, 它对嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌的最小抑菌浓度分别为 150, 150, 75 mg·L<sup>-1</sup>, 最小杀菌浓度分别为 600, 600, 300 mg·L<sup>-1</sup><sup>[3]</sup>。胡彩虹等<sup>[3,5]</sup>研究了载铜蒙脱石在 TSB 肉汤中铜的释放, 发现上清液中铜浓度在 2 h 后就达到平衡, 占总铜的 1.22% ~ 2.27%, 显示了良好的缓释效果。胡彩虹等<sup>[3,5]</sup>和夏枚生等<sup>[6]</sup>均认为, 载铜蒙脱石的抗菌能力和两方面因素有关: 一方面是其表面剩余正电荷能从介质

中大量吸附表面带负电荷的细菌; 另一方面是载铜蒙脱石释放至表面的铜离子直接作用于细菌, 而不是先进入介质再作用于细菌, 也就是说, 载铜蒙脱石表面的有效铜离子浓度, 大大高于它在介质中的实际浓度; 载铜蒙脱石对细菌的抗菌效能, 是静电吸附与铜离子杀菌能力协同作用的综合结果。本研究表明载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞均有较强的抗粘附作用, 显然, 这与载铜蒙脱石的吸附、杀菌作用有关。

另一方面, 载铜蒙脱石对细菌粘附的阻断作用还与蒙脱石的独特性质有关。蒙脱石通过与肠粘液糖蛋白识别、结合、定位, 可在消化道形成胶体保护膜, 从而降低细菌粘附素与肠粘膜受体的结合; 蒙脱石还可提高粘液的质和量, 能与粘液蛋白结合从而增强粘液的凝集性和内聚力, 达到粘液屏障的作用, 抵抗外来致病因子的侵入<sup>[16, 17]</sup>。

本实验研究了嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞对其细胞膜生物特性的影响, 结果发现, 嗜水气单胞菌粘附后胞浆游离钙和细胞膜磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性显著上升。Ca<sup>2+</sup> 在细胞内过度的积聚对细胞生长和功能的实现具有负面效应, 导致细胞膜损伤, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超负荷导致细胞膜损伤的机制尚未完全阐明。目前认为, 胞浆内 Ca<sup>2+</sup> 增高时可激活中性蛋白酶和磷脂酶, 加速膜磷脂的降解而引起膜的损伤, 损伤部位包括细胞的质膜、线粒体内质网和细胞骨架系统。一旦膜发生不可逆性损伤, 它对各种离子的屏障作用即丧失, 导致细胞内外离子分布的紊乱, 大量 Ca<sup>2+</sup> 流入细胞内, 进入细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 一

方面进一步激活磷脂酶, 另一方面, 大量的  $\text{Ca}^{2+}$  沉积于线粒体内, 使其能量代谢功能障碍乃至丧失, ATP 减少, 最终导致细胞功能的降低和死亡<sup>[18]</sup>。磷脂酶  $\text{A}_2$  是哺乳动物体内广泛分布的一类水解酶, 水解甘油磷脂  $\text{Sn-2}$  位酯键产生游离脂肪酸 (FFA) 和溶血磷脂<sup>[19]</sup>, 磷脂酶  $\text{A}_2$  在生物膜的稳态过程中起重要作用, 胞浆游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增多是激活磷脂酶  $\text{A}_2$  的重要因素<sup>[20]</sup>。载铜蒙脱石对细菌粘附引起鱼上皮细胞膜生物特性变化的影响结果表明, 载铜蒙脱石可显著降低由于嗜水气单胞菌粘附鱼上皮细胞引起的胞浆游离钙和细胞膜磷脂酶  $\text{A}_2$  活性的升高, 即显著降低了嗜水气单胞菌粘附造成的细胞膜损伤, 这进一步证实了载铜蒙脱石对细菌粘附的阻断作用。

胡彩虹等<sup>[21]</sup> 和夏枚生等<sup>[6, 22, 23]</sup> 研究了载铜蒙脱石对猪、鸡的作用效果, 发现: 与对照组相比, 饲料中添加载铜蒙脱石使猪、鸡生长性能显著提高, 肠道内容物大肠杆菌和梭菌数显著降低, 肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度的比率显著提高(粘粘膜健康状况指标)。本实验发现, 载铜蒙脱石可有效阻断嗜水气单胞菌粘附罗非鱼上皮细胞, 并显著降低嗜水气单胞菌粘附上皮细胞造成的细胞膜损伤, 这可望将载铜蒙脱石作为饲料添加剂用于水产动物的杀菌和保健, 但其对水产动物的体内作用效果还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原—嗜水气单胞菌的耐药性研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28: 59–63.
- [2] 马玉龙, 许梓荣. 离子型无机抗菌材料研究进展[J]. 材料导报, 2004, 18: 16–18, 48.
- [3] 胡彩虹, 夏枚生, 许梓荣. 载铜蒙脱石对水产病原菌的抗菌活性及其机理研究[J]. 硅酸盐学报, 2005, 33: 1375–1379.
- [4] Girardeau J P. Smectite aggregation by *Escherichia coli* [J]. Acta Gastroenterologica Belgica, 1987, 50: 181–192.
- [5] Hu C H, Xu Z R, Xia M S. Antibacterial effect of  $\text{Cu}^{2+}$ -exchanged montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* and discussion on its mechanism[J]. Vet Microbiol, 2005, 109: 83–88.
- [6] Xia M S, Hu C H, Xu Z R, et al. Effects of Copper bearing montmorillonite (Cu-MMT) on *Escherichia coli* and diarrhea on weanling pigs [J]. Asian Aust J Anim Sci, 2004, 17: 1712–1716.
- [7] Le S, Yin Y Z, Ge R, et al. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for *in vitro* epithelial cell invasion [J]. J Fish Diseases, 1997, 20: 169–177.
- [8] Elna M T, Seppo J S. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 41: 45–51.
- [9] Guzman-Murillo M A, Merino-Contreras M L, Ascencio F. Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralichthys maculatofasciatus*) in culture [J]. J Applied Microbiol, 2000, 88: 897–906.
- [10] Yada T, Oiki S, Ueda S, et al. Intestinal secretagogues increase cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and  $\text{K}^+$  conductance in a human intestinal epithelial cell line [J]. J Membr Biol, 1989, 112: 159–167.
- [11] Bhat M K, Muller Harvey I, Summer I G, et al. Simplified methods for the synthesis of 2-hexadecanoylthio-1-ethylphosphorylcholine and for the determination of phospholipase  $\text{A}_2$  activity [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1166: 244–250.
- [12] Bahranowski K, Duk R, Labanowska M, et al. ESR study of Cu centers supported on  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$  and  $\text{Zr}^{4+}$  pillared montmorillonite clays [J]. Appl Spectro, 1996, 50: 1439–1445.
- [13] Breen P J, Compadre C M, Fifer E K, et al. Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella typhimurium* to poultry tissues [J]. J Food Sci, 1995, 60: 1191–1196.
- [14] 路现彩, 尹琳, 赵连泽, 等. 常见层状硅酸盐矿物的表面特征[J]. 硅酸盐学报, 2003, 31: 60–65.
- [15] 胡秀荣, 吕光烈, 陈林深, 等. 天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究[J]. 药学学报, 2002, 37: 718–720.
- [16] Albreges E S, Urien J P, Tillement P, et al. Interactions between smectite, a mucus stabilizer, and acidic and basic drugs [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1985, 28: 601–605.
- [17] Droy-Lefain M T, Drouet Y, Schatz B. Sodium glycodeoxycholate and spinability of gastrointestinal mucus: Protective effect of smectite [J]. Gastroenterol, 1985, 88 (Suppl): 1369.
- [18] Uratani Y, Kobayashi M, Yokoyama Y, et al. Phospholipids stabilize the secondary structure of the sodium-coupled branched-chain amino acid carrier of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1435: 71–83.
- [19] Bhat M K, Muller H I, Summer I G, et al. Simplified methods for the synthesis of 2-hexadecanoylthio-1-ethylphosphorylcholine and for the determination of phospholipase  $\text{A}_2$  activity [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1166: 244–250.
- [20] Francesconi M, Casonato A, Pontara E, et al. Type  $\text{CB}$  factor induces phospholipase  $\text{A}_2$  activation and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase in platelets [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214: 102–109.
- [21] Hu C H, Xia M S, Xu Z R, et al. Effects of copper bearing montmorillonite on growth performance and digestive function of growing pigs [J]. Asian Aust J Anim Sci, 2004, 17: 1575–1581.
- [22] Xia M S, Hu C H, Xu Z R. Effects of copper bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers [J]. Poultry Sci, 2004, 83: 1868–1875.
- [23] Xia M S, Hu C H, Xu Z R. Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs [J]. Anim Feed Sci Tech, 2005, 118: 307–317.