

## 两歧双歧杆菌FL-228.1增强小鼠先天免疫功能研究

周 瑜, 田晓英, 崔庆宇, 张 喆, 公丕民, 林 凯, 易华西, 刘同杰, 张兰威

### Enhancement of Innate Immune Function in Mice by *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1

ZHOU Yu, TIAN Xiaoying, CUI Qingyu, ZHANG Zhe, GONG Pimin, LIN Kai, YI Huaxi, LIU Tongjie, and ZHANG Lanwei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030010>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 牦牛血胰蛋白酶水解液中抗菌肽的筛选研究

Study on identification of antimicrobial peptides from trypsin hydrolysate of yak blood

食品工业科技. 2018, 39(11): 121-125,131 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.11.021>

#### 婴儿源双歧杆菌对人胎结肠上皮细胞的增殖作用及机制研究

Proliferation Effect and Mechanism of *Bifidobacterium* from Infantis on Human Fetal Colon Epithelial Cells

食品工业科技. 2020, 41(20): 307-313 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.051>

#### 两株动物双歧杆菌的潜在干预糖尿病作用

Potential Intervention for Diabetes Mellitus of Two *Bifidobacterium animalis* Strains

食品工业科技. 2018, 39(13): 136-141,149 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.025>

#### 洋葱槲皮素对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应抑制作用

Inhibiting effect of onion quercetin on lipopolysaccharide-induced mice's enterocoelia macrophage inflammatory response

食品工业科技. 2017(23): 284-288 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.052>

#### 酰化高丝氨酸内酯对巨噬细胞模型影响初探

Preliminary study on the effect of acyl-homoserine lactones on macrophage model

食品工业科技. 2017(24): 227-230 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.24.044>

#### 北五味子多糖提取工艺优化及其对LPS刺激巨噬细胞线粒体膜电位的保护作用

Optimization of Extraction Technology of *Schisandra chinensis* Polysaccharide and Its Protective Effect on LPS Induced Mitochondrial Membrane Potential in Macrophages

食品工业科技. 2020, 41(20): 33-40 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.006>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周瑜, 田晓英, 崔庆宇, 等. 两歧双歧杆菌 FL-228.1 增强小鼠先天免疫功能研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 335–341. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030010

ZHOU Yu, TIAN Xiaoying, CUI Qingyu, et al. Enhancement of Innate Immune Function in Mice by *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 335–341. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030010

· 营养与保健 ·

# 两歧双歧杆菌 FL-228.1 增强小鼠先天免疫功能研究

周 瑜, 田晓英, 崔庆宇, 张 喆, 公丕民, 林 凯, 易华西, 刘同杰\*, 张兰威\*  
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266000)

**摘要:** 本文以 8 株潜在功能菌株为研究对象, 将其分别干预 RAW264.7 鼠巨噬细胞和人外周血单核细胞 (PBMCs), 并检测 RAW264.7 细胞吞噬活性和自然杀伤 (NK) 细胞活性变化, 将筛选出的潜在益生菌进一步干预 BALB/c 小鼠, 探究其在体内的免疫调节功效。结果表明, 在细胞实验中, 不同菌株干预均能显著提高 RAW264.7 细胞吞噬活性 ( $P<0.05$ ), 而两歧双歧杆菌 FL-228.1 和鼠李糖乳酪杆菌 FN518 能显著提高 NK 细胞活性 ( $P<0.05$ ), 且综合来看, 两歧双歧杆菌 FL-228.1 在体外表现效果最优, 进一步开展体内研究。摄入两歧双歧杆菌 FL-228.1 能促进小鼠胸腺发育并显著提高腹腔巨噬细胞吞噬活性, 脾脏中 NK 细胞活性, 血清 IgG 含量, 脾淋巴细胞转化和抗菌肽相关基因 Cryptdin-4 和 CRAMP 的表达 ( $P<0.05$ ), 但对血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12 和 IFN- $\gamma$  以及抗菌肽相关基因 RegIII- $\gamma$  的表达无显著影响 ( $P>0.05$ )。综上, 两歧双歧杆菌 FL-228.1 可以通过调节免疫细胞活性、细胞因子表达以及免疫分子抗菌肽相关 mRNA 水平来提高先天免疫功能并对免疫系统具有较全面的改善作用。

**关键词:** 两歧双歧杆菌, 先天免疫, 巨噬细胞, 自然杀伤细胞, 抗菌肽

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0335-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030010



本文网刊:

## Enhancement of Innate Immune Function in Mice by *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1

ZHOU Yu, TIAN Xiaoying, CUI Qingyu, ZHANG Zhe, GONG Pimin, LIN Kai, YI Huaxi, LIU Tongjie\*, ZHANG Lanwei\*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

**Abstract:** In this study, eight potential functional strains were selected to interfere with RAW264.7 murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Then, changes in phagocytic activity of RAW264.7 cells and natural killer (NK) cell activity were detected and the screened potential probiotics were further intervened in BALB/c mice to explore their immunomodulatory efficacy *in vivo*. In cell experiments, the results showed that the intervention of different strains significantly increased the phagocytic activity of RAW264.7 cells ( $P<0.05$ ), while *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* FN518 significantly increased NK cell activity ( $P<0.05$ ). In general, *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1 showed the best *in vitro* performance for further *in vivo* studies. The intake of *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1 promoted thymus development and significantly increased the phagocytic activity of peritoneal macrophages, NK cell activity in spleen, serum IgG content, splenic lymphocyte transformation and the expression of antimicrobial peptide-related genes Cryptdin-4 and CRAMP in mice ( $P<0.05$ ), but had no significant effect on the serum cytokines TNF- $\alpha$ ,

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 山东省泰山产业领军人才项目 (LJNY202101)。

作者简介: 周瑜 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性益生菌的开发与利用, E-mail: 1134982702@qq.com。

\* 通信作者: 刘同杰 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性乳品与益生菌的开发与利用, E-mail: liutongjie@ouc.edu.cn。

张兰威 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能性乳品与益生菌的开发与利用, E-mail: zhanglanwei@ouc.edu.cn。

IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and the expression of antimicrobial peptide-related gene RegIII- $\gamma$  ( $P>0.05$ ). In conclusion, *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1 can improve innate immune function and have a more comprehensive effect on the immune system by regulating immune cell activity, cytokine expression and mRNA levels of immune molecules related to antimicrobial peptides.

**Key words:** *Bifidobacterium bifidum*; innate immunity; macrophages; natural killer cells; antimicrobial peptide

免疫系统包括先天免疫和适应性免疫,在预防、控制感染和维持机体稳态方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>。先天免疫系统的缺陷可导致无法识别病原体 and 迅速激活免疫反应,从而容易发生严重或复发性感染<sup>[2]</sup>。作为人体先天免疫防御战线的重要成员,巨噬细胞几乎存在于所有组织中,其主要功能是吞噬细胞碎片和外来病原体,并且活化的巨噬细胞可以分泌细胞因子和趋化因子,从而招募和激活其他免疫细胞<sup>[3-4]</sup>。自然杀伤(Natural killer, NK)细胞是细胞毒性淋巴细胞的一员,但与T细胞不同,NK细胞可以直接识别和解决病毒感染,并在没有预先刺激的情况下自发地裂解肿瘤细胞<sup>[5]</sup>。此外,潘氏细胞可以产生、储存和分泌多种抗菌肽(Antimicrobial peptide, AMP),包括 $\alpha$ -防御素(在小鼠中称为Cryptidins)、Cathelicidins(在小鼠中称为Cathelin-related antimicrobial peptide, CRAMP)和再生胰岛衍生蛋白3 $\gamma$ (Regenerating islet-derived protein 3 gamma, RegIII- $\gamma$ )等<sup>[6]</sup>。总体而言,这些免疫细胞和免疫分子作为先天免疫的重要组成部分,参与了宿主抵抗外部病原体入侵的第一道防线。

益生菌是活的微生物,当给予适当剂量时,会对宿主的健康有益<sup>[7]</sup>。它们可以提高免疫力,是良好的免疫激活剂<sup>[8]</sup>。研究表明,益生菌能通过提高NK细胞活性、调节淋巴细胞亚群和细胞因子的表达等途径改善老年人的免疫力<sup>[9]</sup>。然而,目前益生菌对普通人群免疫功能的作用还存在争议,且效果上具有菌株和个体差异性。Shida等<sup>[10]</sup>研究发现每日摄入干酪乳酪杆菌LcS能降低健康中年上班族的上呼吸道感染率和持续时间。但在健康女性医护人员中,补充保加利亚乳杆菌OLL1073R-1发酵的酸奶没有显示出对流感的显著预防作用或NK细胞活性的增强<sup>[11]</sup>。同时,益生菌调节免疫功能作用机制尚不清晰,且目前多集中于体外研究。如Rocha-Ramirez等<sup>[12]</sup>研究发现乳酸杆菌在体外以TLR2依赖的方式刺激人源巨噬细胞中促炎细胞因子的表达并促进其对病原体的吞噬作用和杀菌活性。

因此,本文结合体外筛选和体内验证,探究了潜在功能菌株在正常个体中的免疫调节作用,并对效果较好的两歧双歧杆菌FL-228.1的作用机制进行初步探讨。首先借助RAW264.7细胞和人外周血单核细胞(PBMCs),从8株菌中筛选出最具先天免疫调节潜力的菌株并进一步在正常小鼠体内从免疫细胞活性、细胞因子和免疫分子抗菌肽的表达等方面综合评价其对先天免疫系统的影响并对可能的作用机制进行探讨,以期益生菌作为免疫增强食品的开发和

利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

RAW264.7细胞、K562细胞、YAC-1细胞 中国科学院细胞库;BALB/c雌性6周龄小鼠 北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为SCXK(京)2021-0006;实验所用菌株:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)FL-228.1和动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*)F1-7来源于健康婴儿粪便;副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*)K14、X11,鼠李糖乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus*)MN45、FN518和植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)FWDG来源于传统发酵乳制品;阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*)MN11来源于产道拭子 保藏于中国海洋大学功能性乳品与益生菌工程实验室;干酪乳酪杆菌LC(*Lactocaseibacillus casei*)从市面上有增强免疫力功能的产品中分离;MRS液体培养基 青岛海博生物技术有限公司;RPMI 1640培养基、DMEM高糖培养基、SDS溶液、刀豆蛋白A(ConA)、台盼蓝染色液、PBS缓冲液 北京索莱宝科技有限公司;中性红染色液、青霉素-链霉素混合溶液、TritonX-100 上海碧云天生物技术有限公司;特级胎牛血清 BI 生物科技公司;Ficoll-Hypaque 分离液 天津瀚洋生物技术有限公司;Trizol 裂解液 南京诺唯赞生物技术有限公司;SYBR Green Realtime PCR Master Mix、逆转录试剂盒 东洋纺生物技术有限公司;TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$ 和IgG试剂盒 苏州卡尔文生物技术有限公司。

LRH-250生化培养箱 上海一恒仪器有限公司;MW80二氧化碳培养箱 上海皓庄仪器有限公司;VARIOSKAN FLASH全波长多功能酶标仪、NanoDrop2000超微量分光光度计 赛默飞世尔科技公司;BIO-RAD CFX96实时荧光定量PCR仪 美国BIO-RAD公司;TP600PCR扩增仪 宝日生物技术有限公司;TG20KR-D高速冷冻离心机 长沙东旺实验仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养 实验所用菌株储存在-80℃冰箱,室温解冻后按1%(v/v)接种量分别接种于MRS液体培养基,37℃厌氧培养24h。取活化第三代的菌株在4℃,8000 r/min下离心10 min,收集菌体,用PBS缓冲液洗涤三次,最后用PBS(动物实验)或细胞培养基(细胞实验)重悬至实验所需浓度,其中



以 LC 作为参考菌株。

1.2.2 PBMCs 分离培养 从 10 名 18~30 岁的健康志愿者中抽取空腹血样,得到了所有受试者的知情同意。使用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMCs<sup>[13]</sup>,将得到的细胞进行台盼蓝染色,当 PBMCs 活力大于 95% 时,用于后续实验。

1.2.3 RAW264.7 细胞吞噬活性测定 如前所述,采用中性红法检测巨噬细胞吞噬活性,并稍做修改<sup>[14]</sup>。用 DMEM 高糖培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,以菌:细胞=10:1 的浓度培养细胞 24 h 后,向每孔加入 200  $\mu$ L 1% 中性红染色液。继续培养 0.5 h 后用 PBS 洗涤三次,每孔加入 200  $\mu$ L 裂解液(冰醋酸:无水乙醇体积比为 1:1),4  $^{\circ}$ C 静置过夜,用酶标仪测 540 nm 下吸光度值。

1.2.4 NK 细胞活性测定 如前所述,采用乳酸脱氢酶释放法检测 NK 细胞活性,并稍做修改<sup>[15]</sup>。用  $2 \times 10^7$  CFU/mL 的菌悬液干预 PBMCs 24 h。用 RPMI 1640 培养基调整 K562 细胞浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL,按效靶比为 50:1,将 PBMCs(效应细胞)和 K562 细胞(靶细胞)各 100  $\mu$ L 加入 U 型 96 孔培养板,同时设自然释放孔加靶细胞和含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基各 100  $\mu$ L,最大释放孔加靶细胞和 2.5% TritonX-100 各 100  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 下培养 4 h,1500 r/min 离心 5 min,每孔吸取 100  $\mu$ L 上清液,同时加入 100  $\mu$ L LDH 基质液,反应 5 min,随后每孔加入 30  $\mu$ L 1 mol/L 的 HCL 溶液终止反应,在 490 nm 处测 OD 值,NK 细胞活性计算公式如下:

$$\text{NK细胞活性(\%)} = \frac{\text{实验组OD值} - \text{自然释放组OD值}}{\text{最大释放组OD值} - \text{自然释放组OD值}} \times 100$$

1.2.5 动物模型与分组 30 只 BALB/c 小鼠在清洁级、12 h 光照/黑暗交替、(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 温度、(55% $\pm$ 5%) 相对湿度的动物房适应性喂养 7 d,随后被随机分成 3 组(n=10),分别为空白对照组(Control 组)、FL-228.1 干预组和 LC 干预组,所有组别小鼠均喂食普通饲料。实验按照中国科学技术部动物管理条例,并经中国海洋大学食品科学与工程学院实验动物伦理委员会批准(批准号:SPXY2021112402)。实验设计为:空白对照组每天灌胃 0.2 mL PBS,菌株干预组每天灌胃 0.2 mL 菌悬浮液( $5 \times 10^8$  CFU/mL),实验持续 28 d。

1.2.6 小鼠血清及组织处理 小鼠禁食不禁水 12 h,称重,麻醉,眼球取血,室温放置 30 min 后 3000 r/min

离心 15 min,小心吸取上层淡黄色血清分装保存。取脾脏和胸腺,用生理盐水清洗,滤纸吸干表面水分后称重,分别计算脾脏和胸腺与小鼠体重的比值。

1.2.7 腹腔巨噬细胞吞噬活性测定 将 5 mL RPMI 1640 培养基注入腹腔,轻轻按压 2 min,提取腹腔液体到离心管中,1500 r/min 离心 5 min。弃去上清液,调整浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL,培养 24 h 后弃去液体,其余同 1.2.3。

1.2.8 NK 细胞活性测定 取出小鼠脾脏,制成浓度为  $2 \times 10^6$  个/mL 的脾细胞悬液作为效应细胞。按效靶比为 50:1,将脾细胞(效应细胞)和 YAC-1 细胞(靶细胞)各 100  $\mu$ L 加入 U 型 96 孔培养板,其余同 1.2.4。

1.2.9 ConA 诱导的脾淋巴细胞转化实验 实验方法如前所述<sup>[16]</sup>,将脾细胞悬液( $5 \times 10^6$  个/mL)接种到有/无 75  $\mu$ L ConA 作为 T 细胞刺激剂的 24 孔板中,培养 68 h 后,每孔吸走 0.7 mL 培养基,加入 50  $\mu$ L 5 mg/mL MTT 和 0.7 mL 不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。培养 4 h 后,每孔加入 1 mL 3% SDS 溶液溶解紫色晶体,用酶标仪测定 570 nm 处 OD 值。用有/无 Con A 的 OD 值之差代表转化能力。

1.2.10 小鼠血清细胞因子和 IgG 测定 用酶联免疫吸附法按照试剂盒说明书检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  和 IgG 的含量。

1.2.11 RT-PCR 检测抗菌肽相关基因的 mRNA 表达 利用 RT-PCR 方法,加入 Trizol 裂解液从回肠组织中提取总 RNA。通过逆转录试剂盒合成 cDNA 单链后进行 qPCR 操作。所用引物委托上海生工生物工程有限公司设计并合成,序列如表 1 所示, $2^{-\Delta\Delta Ct}$  用于计算基因表达的倍数。

### 1.3 数据处理

所有实验均至少重复 3 次,结果均用平均值 $\pm$ 标准差形式表示,数据使用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,组间差异检验采用 Duncan 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。数据图采用 Prism 8.0 软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌株干预对先天免疫细胞活性的影响

2.1.1 不同菌株干预对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 RAW264.7 细胞来源于具有巨噬细胞特性的 BALB/c 小鼠细胞,其被认为是体外研究巨噬细胞功能的合适模型<sup>[17]</sup>。因此,在本研究中,通过中性红法

表 1 逆转录聚合酶链反应的引物序列

Table 1 Primer sequences of reverse transcription polymerase chain reaction

| 基因                                | 正向(5'-3')                 | 反向(3'-5')                  |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>Cryptdin-4</i>                 | AAGAGGACCAGGCTGTGTCTATCTC | GTATTCCACAAGTCCCACGAAGCTCG |
| <i>CRAMP</i>                      | GTCACATCACTGCTGCTGCTACTG  | GATCCAGGTCCAGGAGACGGTAG    |
| <i>RegIII-<math>\gamma</math></i> | AACAGAGGTGGATGGGAGTGGAG   | TGCCTGAGGAAGAGGAAGGATTCTG  |
| <i><math>\beta</math>-actin</i>   | GGCTGTATCCCTCCATCG        | CCAGTTGGTAACAATGCCATGT     |

检测不同菌株干预对 RAW 264.7 细胞吞噬作用的影响。结果如图 1A 所示,与空白组相比,用不同菌株处理的 RAW264.7 细胞吞噬活性均显著提高,增长超过 51.11%,其中 FL-228.1、FWDG、FN518、X11 和 MN45 表现效果优于 LC 对照组( $P<0.05$ )。与此相一致的是,Rocha-Ramírez 等<sup>[12]</sup>的研究也显示所有菌株干预均能增强巨噬细胞的吞噬作用,但瑞士乳杆菌 IMAU70129 和干酪乳酪杆菌 IMAU60214 效果最优,这表明不同菌株对巨噬细胞的吞噬作用具有差异性。

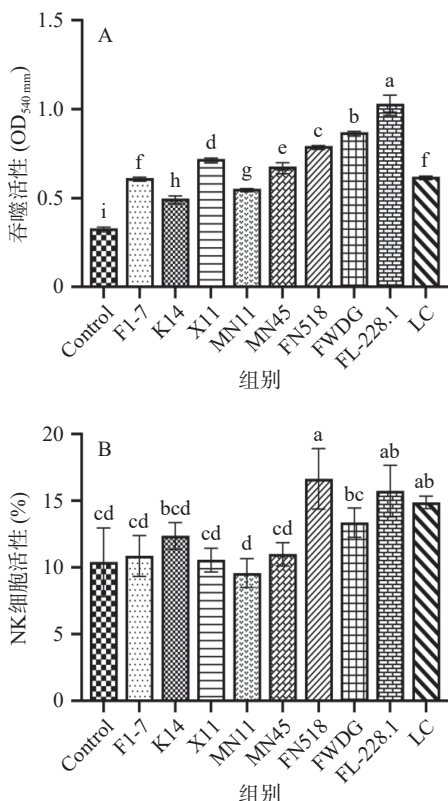


图 1 益生菌对 RAW264.7 细胞吞噬活性和 NK 细胞活性的影响

Fig.1 Effects of probiotics on phagocytic activity of RAW264.7 cells and NK cell activity

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),图 2~图 4 同。

**2.1.2 不同菌株干预对 NK 细胞活性的影响** 益生菌的免疫作用不仅限于肠道,已有研究发现益生菌干预能提高人外周血中 NK 细胞活性<sup>[18]</sup>。本研究在 PBMCs 中检测不同菌株干预后人原代 NK 细胞活性的变化,结果如图 1B 所示,与空白组相比,仅两歧双歧杆菌 FL-228.1 和鼠李糖乳酪杆菌 FN518 能显著提高 NK 细胞活性( $P<0.05$ ),增长超过 51.2%,增强效果与 LC 对照组相当,其具体作用机制尚需进一步研究,可能是通过促进细胞因子分泌进而刺激 NK 细胞活化<sup>[19-20]</sup>。

## 2.2 两歧双歧杆菌 FL-228.1 干预小鼠调节先天免疫的效果

**2.2.1 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠体重和免疫器官指数的影响** 基于细胞实验的结果,进一步进行动

物实验评价 FL-228.1 在体内调节先天免疫的效果。由表 2 可知,实验期间小鼠体重增长正常,各组间小鼠最终体重无显著性差异( $P>0.05$ ),表明口服菌株 FL-228.1 对动物生长安全性良好<sup>[21]</sup>。与空白组相比,各组小鼠的脾脏指数无明显变化( $P>0.05$ ),FL-228.1 干预可以显著增加小鼠的胸腺指数( $P<0.05$ )。而脾脏指数和胸腺指数是反映免疫器官发育的重要指标,其状态直接影响机体免疫功能和抗病能力<sup>[22]</sup>,故口服 FL-228.1 菌悬液可以促进胸腺发育。

表 2 各组小鼠体重及脏器/体重比值的比较

Table 2 Comparison of body weight and organ/body weight ratio of mice in each group

| 组别       | 初始体重(g)                 | 终末体重(g)                 | 脾脏/体重(mg/g)            | 胸腺/体重(mg/g)             |
|----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Control  | 16.57±1.23 <sup>a</sup> | 18.58±0.79 <sup>a</sup> | 5.63±0.38 <sup>a</sup> | 2.27±0.34 <sup>b</sup>  |
| FL-228.1 | 17.18±0.82 <sup>a</sup> | 18.51±1.02 <sup>a</sup> | 5.74±0.75 <sup>a</sup> | 3.02±0.25 <sup>a</sup>  |
| LC       | 17.00±0.75 <sup>a</sup> | 18.30±0.86 <sup>a</sup> | 5.91±0.79 <sup>a</sup> | 2.68±0.56 <sup>ab</sup> |

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

**2.2.2 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响** 巨噬细胞的吞噬功能在某种程度上是免疫反应中不可或缺的步骤<sup>[23]</sup>。由图 2A 可知,与空白组和 LC 对照组相比,补充 FL-228.1 能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性( $P<0.05$ ),增长超过一倍。Lee 等<sup>[24]</sup>研究表明这种增强作用是通过激活巨噬细胞表面 TLR2 进而导致细胞内丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活化所介导,据此推测 FL-228.1 可能也是通过这种信号级联反应发挥免疫促进作用。

**2.2.3 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠 NK 细胞活性的影响** NK 细胞来源于骨髓,主要存在于血液和淋巴组织,特别是脾脏中<sup>[25]</sup>。实验结果如图 2B 所示,摄入 FL-228.1 能显著提高小鼠脾脏处 NK 细胞对癌细胞的杀伤活性( $P<0.05$ )。具体而言,当 NK 细胞识别癌细胞后,会调动细胞毒性颗粒向免疫突触移动并将其释放到细胞间隙,破坏靶细胞完整性,进而诱导细胞凋亡<sup>[26]</sup>。Cheon 等<sup>[27]</sup>研究发现脱颗粒抑制剂刀豆素 A 预处理能有效阻断嗜酸乳杆菌 La205 诱导的 NK 细胞活性,故菌株 FL-228.1 对 NK 细胞活性的增强最终可能是通过促进 NK 细胞的颗粒胞吐作用实现的。

**2.2.4 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响** T 淋巴细胞受到 Con A 刺激后会转化为母细胞持续增殖<sup>[28]</sup>。当 T 细胞表现出低活性或免疫缺陷时,其转化率下降,免疫功能降低<sup>[29]</sup>。由图 2C 可知,补充 FL-228.1 可以显著提高小鼠脾淋巴细胞转化率( $P<0.05$ ),增强细胞介导的免疫。Ren 等<sup>[29]</sup>的实验结果也显示小鼠连续摄入  $1 \times 10^8$  CFU 的植物乳植杆菌 Lp 能显著促进脾淋巴细胞转化,并且其所用剂量与本研究一致,表明补充特定菌株能对机体适应性免疫产生积极作用。

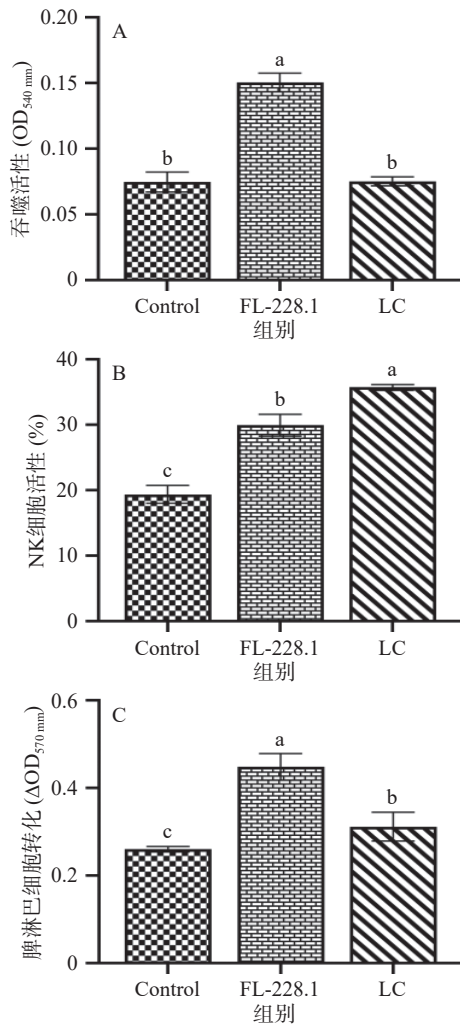
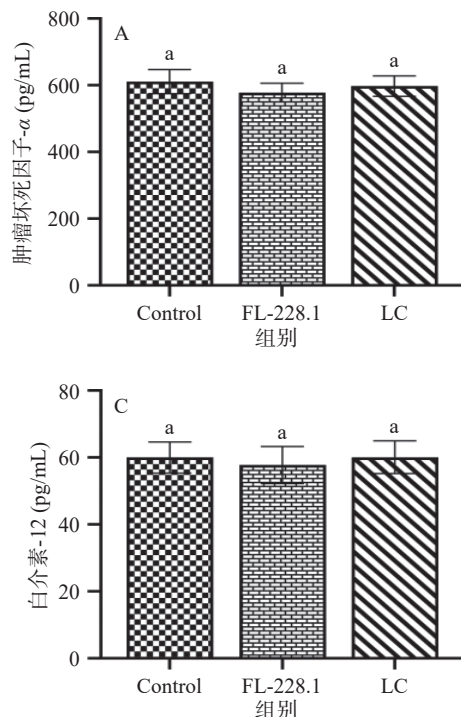


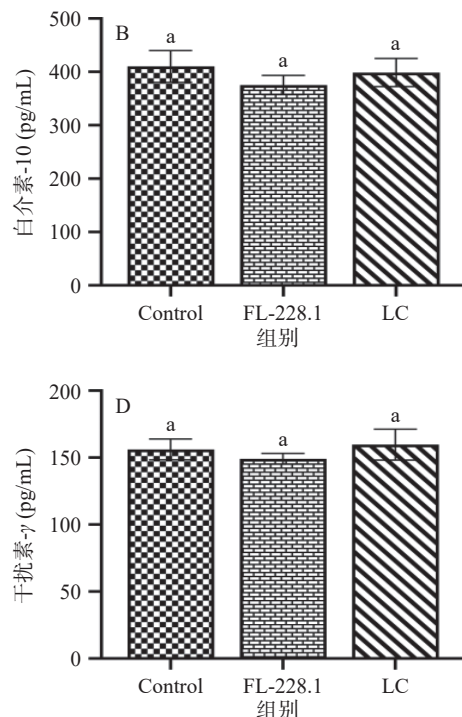
图 2 益生菌对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性、NK 细胞活性和脾淋巴细胞的转化的影响

Fig.2 Effects of probiotics on phagocytic activity of peritoneal macrophages, NK cell activity and splenic lymphocyte transformation



2.2.5 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠血清细胞因子和 IgG 的影响 先天免疫细胞,如巨噬细胞、树突状细胞,可以通过释放大量的细胞因子和趋化因子与其他细胞产生联系,从而协调免疫反应<sup>[30]</sup>。在本研究中检测血清细胞因子变化,结果如图 3A~图 3D 所示,各组间 TNF-α、IL-10、IL-12 和 IFN-γ 水平无显著差异( $P>0.05$ )。由于 IL-10 与 IL-12 的比值是确定免疫反应方向的关键,而 IL-10 和 TNF-α 的相对平衡对于控制免疫偏差至关重要<sup>[31]</sup>。因此推测这一实验结果可能是摄入菌株后促炎细胞因子和抗炎细胞因子在外界刺激下保持平衡的结果,从而使机体在保持警惕的同时,不会产生过度的免疫反应。先前的一项研究也有相似的发现,分别给每只小鼠灌胃  $5 \times 10^8$  CFU 和  $1 \times 10^9$  CFU 的植物乳植杆菌 CGMCC1.557 不会引起血清 IL-10、IFN-α 和 IFN-γ 含量的显著变化<sup>[32]</sup>。IgG 是再次免疫应答的主要抗体,也是唯一一种可以穿过胎盘保护胎儿的抗体,其存在于所有体液中<sup>[16]</sup>。由图 3E 可知,补充 FL-228.1 后血清中 IgG 的含量显著增加( $P<0.05$ ),进而提高小鼠体液免疫功能。

2.2.6 两歧双歧杆菌 FL-228.1 对小鼠抗菌肽相关基因 mRNA 表达的影响 潘氏细胞是位于肠隐窝底部的小肠上皮细胞,其分泌的抗菌肽类似于分泌型免疫球蛋白 A<sup>[33]</sup>。这些抗菌肽是真核生物中广泛存在的重要先天免疫分子,其可以有效攻击和杀灭潜在的有害微生物<sup>[34]</sup>。在本研究中,取小鼠末端回肠进行抗菌肽相关基因的检测。结果如图 4 所示,与空白组相比较,补充 FL-228.1 能够显著上调 Cryptdin-4 和 CRAMP 的基因表达( $P<0.05$ ),其增强效果与 LC 对照组相当,但对 RegIII-γ 的 mRNA 表达无显著影响





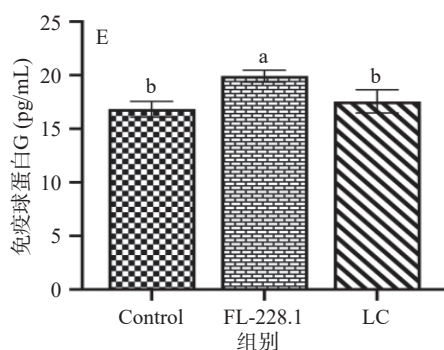


图3 益生菌对小鼠细胞因子和IgG的影响

Fig.3 Effects of probiotics on cytokines and IgG in mice

( $P>0.05$ )。与此相反的是, Hrdý等<sup>[35]</sup>发现罗伊氏粘液乳杆菌而非动物双歧杆菌可以显著提高小鼠RegIII- $\gamma$ 的基因表达, 但Cryptdin-4的mRNA水平无明显变化。另有研究发现, 芽孢杆菌LF4通过TLR和NLR信号诱导肠上皮细胞中抗菌肽的基因上调<sup>[36]</sup>, 这些研究表明菌株促进抗菌肽表达的效果具

有差异性, 而模式识别受体可能在此过程中发挥重要作用。

### 3 结论

本研究通过体外细胞筛选和动物实验得到一株在提高先天免疫细胞活性方面表现效果最好的两歧双歧杆菌FL-228.1, 并从提高免疫细胞活性、调节细胞因子表达和促进免疫分子抗菌肽相关基因的上调等方面对其免疫调节能力进行了表征。本研究表明, 两歧双歧杆菌FL-228.1能调节先天免疫系统, 同时对适应性免疫具有积极影响, 并使机体处于免疫平衡状态而不产生过度反应, 这为益生菌作为免疫增强食品的开发提供理论基础, 未来具有广泛的应用前景。同时, 本研究中两歧双歧杆菌FL-228.1增强机体先天免疫力的具体作用机制还有待深入的研究。

### 参考文献

- [1] YANG R Y, ZHANG Z F, PEI X R, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice[J]. Food Chemistry, 2008, 113(2): 464–470.
- [2] AKAR-GHIBRIL N. Defects of the innate immune system and related immune deficiencies[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2022, 63(1): 36–54.
- [3] BONNARDEL J, GUILLIAMS M. Developmental control of macrophage function[J]. Current Opinion in Immunology, 2018, 50: 64–74.
- [4] HUME D A. The mononuclear phagocyte system[J]. Current Opinion in Immunology, 2006, 18(1): 49–53.
- [5] MORVAN M G, LANIER L L. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks[J]. Nature Reviews Cancer, 2016, 16(1): 7–19.
- [6] BUSCH R A, HENEGHAN A F, PIERRE J F, et al. The enteric nervous system neuropeptide, bombesin, reverses innate immune impairments during parenteral nutrition[J]. Annals of Surgery, 2014, 260(3): 432–444.
- [7] KERRY R G, PATRA J K, GOUDA S, et al. Benefaction of probiotics for human health; A review[J]. Journal of Food Drug Analysis, 2018, 26(3): 927–939.
- [8] 黎雨晴, 汪泽坤, 杨恩东, 等. 单一或复合益生菌对小鼠免疫机能的影响[J]. 生物化工, 2022, 8(3): 19–23. [LI Y Q, WANG Z K, YANG E D, et al. Effects of single and multiple strains of probiotics on immune function of mice[J]. Biological Chemical Engineering, 2022, 8(3): 19–23.]
- [9] FINAMORE A, ROSELLI M, DONINI L, et al. Supplementa-

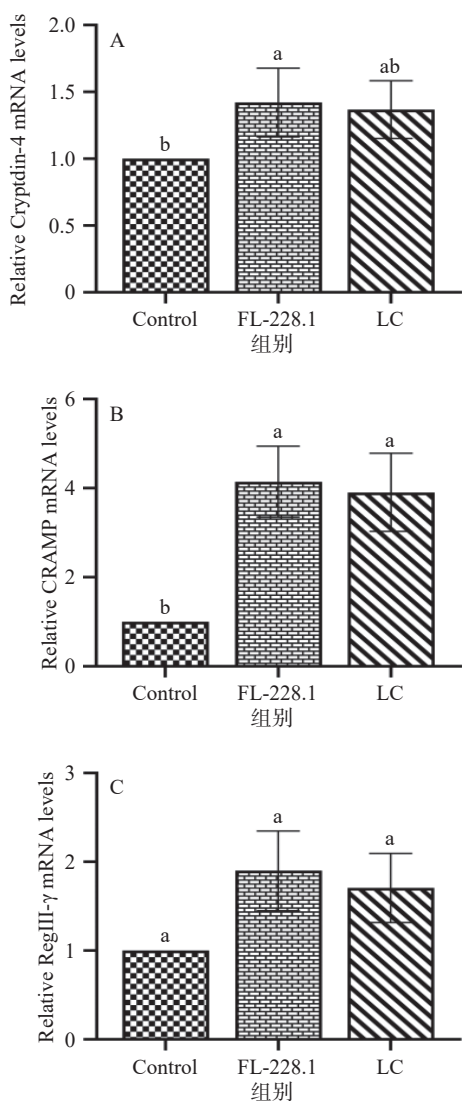


图4 益生菌对小鼠回肠抗菌肽相关基因mRNA表达的影响

Fig.4 Effects of probiotics on mRNA expression of antimicrobial peptide-related genes in mouse ileum

- tion with *Bifidobacterium longum* Bar33 and *Lactobacillus helveticus* Bar13 mixture improves immunity in elderly humans (over 75 years) and aged mice[J]. *Nutrition*, 2019, 63-64: 184-192.
- [ 10 ] SHIDA K, SATO T, IIZUKA R, et al. Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers[J]. *European Journal of Nutrition*, 2017, 56(1): 45-53.
- [ 11 ] KINOSHITA T, MARUYAMA K, SUYAMA K, et al. The effects of OLL1073R-1 yogurt intake on influenza incidence and immunological markers among women healthcare workers: A randomized controlled trial[J]. *Food & Function*, 2019, 10(12): 8129-8136.
- [ 12 ] ROCHA-RAMÍREZ L M, PÉREZ-SOLANO R A, CASTAÑÓN-ALONSO S L, et al. Probiotic *Lactobacillus* strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages[J]. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017: 4607491.
- [ 13 ] 李中正, 田芳, 郭靖. 密度梯度离心法与免疫磁珠阴性选择法分离人外周血单个核淋巴细胞效果比较[J]. *湘南学院学报(医学版)*, 2016, 18(2): 64-65. [ LI Z Z, TIAN F, GUO J. Comparison of the effect of density gradient centrifugation and immunomagnetic bead negative selection method for isolation of human peripheral blood single nuclear lymphocytes[J]. *Journal of Xiangnan University (Medical Sciences)*, 2016, 18(2): 64-65. ]
- [ 14 ] HUANG Q, LI L Y, CHEN H L, et al. GPP (composition of *Ganoderma lucidum* poly-saccharides and *Polyporus umbellatus* poly-saccharides) enhances innate immune function in mice[J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1480.
- [ 15 ] GAO D, LIU Z J, LIU F, et al. Study of the immunoregulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320 in immunosuppressed mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 79: 104423.
- [ 16 ] HE L X, REN J W, LIU R, et al. Ginseng (*Panax ginseng meyer*) oligopeptides regulate innate and adaptive immune responses in mice via increased macrophage phagocytosis capacity, NK cell activity and Th cells secretion[J]. *Food & Function*, 2017, 8(10): 3523-3532.
- [ 17 ] LV X C, CHEN D D, YANG L C, et al. Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 86: 28-42.
- [ 18 ] LAWS G L, HALE J D F, KEMP R A. Human systemic immune response to ingestion of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* BLIS K12[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(6): 1521-1529.
- [ 19 ] SHIDA K, SUZUKI T, KIYOSHIMA-SHIBATA J, et al. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, 13(9): 997-1003.
- [ 20 ] 孟祥红, 程小星. 自然杀伤细胞及其受体与结核病研究进展[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(8): 112-116. [ MENG X H, CHENG X X. Research development in natural killer cells and receptors with tuberculosis[J]. *Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2015, 27(8): 112-116. ]
- [ 21 ] 朱自平, 汪振炯, 朱华. 嗜酸乳杆菌复合益生菌片对小鼠免疫功能的影响及机制研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(22): 44-50. [ ZHU Z P, WANG Z J, ZHU H. The effect mechanism of *Lactobacillus acidophilus* probiotic compound tablets on immune function in mice[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(22): 44-50. ]
- [ 22 ] SUN H, NI X Q, SONG X, et al. Fermented Yupingfeng polysaccharides enhance immunity by improving the foregut microflora and intestinal barrier in weaning rex rabbits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8105-8120.
- [ 23 ] LI J, QIAN W, XU Y H, et al. Activation of RAW 264.7 cells by a polysaccharide isolated from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-5[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 130: 97-103.
- [ 24 ] LEE J, KIM H J, NGUYEN T T H, et al. Emodin 8-O-glucoside primes macrophages more strongly than emodin aglycone via activation of phagocytic activity and TLR-2/MAPK/NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 88: 106936.
- [ 25 ] STEFAN B, VERONIKA G, JUN W, et al. Pillars article: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA[J]. *Journal of Immunology*, 2018, 200(7): 2231-2233.
- [ 26 ] STINCHCOMBE J C, GRIFFITHS G M. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23(1): 495-517.
- [ 27 ] CHEON S, LEE K W, KIM K E, et al. Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* La205 enhances NK cell cytotoxicity through increased granule exocytosis[J]. *Immunology Letters*, 2011, 136(2): 171-176.
- [ 28 ] 苏硕楠, 侯林中. 三种益生菌与低聚果糖复合粉对小鼠免疫功能的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(11): 363-368. [ SU S N, HOU L Z. Immunomodulatory effect of triple probiotics and fructooligosaccharide compound powder in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(11): 363-368. ]
- [ 29 ] REN D Y, WANG D, LIU H Y, et al. Two strains of probiotic *Lactobacillus* enhance immune response and promote naive T cell polarization to Th1[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 281-295.
- [ 30 ] LACY P, STOW J L. Cytokine release from innate immune cells: Association with diverse membrane trafficking pathways[J]. *Blood*, 2011, 118(1): 9-18.
- [ 31 ] LÓPEZ P, GUEIMONDE M, MARGOLLES A, et al. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 138(1-2): 157-165.
- [ 32 ] REN D Y, LI C, QIN Y Q, et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by *in vivo* tests[J]. *Anaerobe*, 2015, 35: 22-27.
- [ 33 ] CAZORLA S I, MALDONADO-GALDEANO C, WEILL R, et al. Oral administration of probiotics increases paneth cells and intestinal antimicrobial activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 736.
- [ 34 ] MERGAERT P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(4): 336-356.
- [ 35 ] HRDÝ J, ALARD J, COUTURIER-MAILLARD A, et al. *Lactobacillus reuteri* 5454 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 5764 improve colitis while differentially impacting dendritic cells maturation and antimicrobial responses[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5345.
- [ 36 ] LIU Z Y, YANG H L, WEI C Y, et al. Commensal *Bacillus siamensis* LF4 induces antimicrobial peptides expression via TLRs and NLRs signaling pathways in intestinal epithelial cells of *Latolabrax maculatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 134: 108634.