

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090063

SU Shuonan, HOU Linzhong. Immunomodulatory Effect of Triple Probiotics and Fructo-Oligosaccharide Compound Powder in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 363–368. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090063

· 营养与保健 ·

三种益生菌与低聚果糖复合粉对小鼠免疫功能的影响

苏硕楠, 侯林中*

(唐山市工人医院, 河北唐山 063003)

摘 要:目的: 研究三种乳酸菌(乳双歧杆菌 V9、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P-8)与低聚果糖复配的益生复合粉(BLLF)对小鼠免疫功能的调控作用。方法: 取 C57BL/6J 小鼠分别每日灌胃给予蒸馏水(空白对照, 0.1 mL/10 g)和不同剂量的 BLLF(三联菌 0.01 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg、三联菌 0.02 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg、三联菌 0.06 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg) 0.1 mL/10 g 体重, 每日灌胃 1 次, 连续 30 d, 测定小鼠脏器与体重比; 检测各组小鼠的细胞免疫功能、单核-巨噬细胞功能、体液免疫功能及 NK 细胞活性。结果: 与对照组相比, BLLF 对小鼠体重、胸腺/体重比值、脾脏/体重比值均无显著影响($P>0.05$); 与对照组相比, 低、中、高剂量的 BLLF 对 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞增殖无显著影响($P>0.05$); 迟发型变态反应结果表明, 中、高剂量 BLLF 组的小鼠耳廓肿胀度显著高于对照组($P<0.05$); 中、高剂量 BLLF 组小鼠碳廓清功能显著高于对照组($P<0.05$); 中、高剂量 BLLF 组小鼠的抗体生成细胞数及半数溶血值均显著高于对照组($P<0.05$); 中、高剂量 BLLF 组小鼠 NK 细胞活性显著高于对照组($P<0.05$)。结论: BLLF 可通过增强细胞免疫、单核-巨噬细胞功能、体液免疫及 NK 细胞活性来增强小鼠的免疫功能。

关键词: 益生菌, 乳酸菌, 低聚果糖, 小鼠, 免疫功能

中图分类号: R392.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)11-0363-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090063



本文网刊:

Immunomodulatory Effect of Triple Probiotics and Fructo-Oligosaccharide Compound Powder in Mice

SU Shuonan, HOU Linzhong*

(Tangshan Workers Hospital, Tangshan 063003, China)

Abstract: Objective: The present study aimed to evaluate immunomodulatory effects of triple probiotics (*Bifidobacterium lactis* V9/*Lactobacillus plantarum* P-8/*Lactobacillus casei* Zhang) and fructo-oligosaccharide (BLLF) in mice and its mechanism. Methods: C57BL/6J mice received intragastric administration of distilled water (control group 0.1 mL/10 g) and different doses of BLLF (triple probiotics 0.01 mg/kg+fructo-oligosaccharide 0.1 g/kg, triple probiotics 0.02 mg/kg+fructo-oligosaccharide 0.1 g/kg, and triple probiotics 0.06 mg/kg+fructo-oligosaccharide 0.1 g/kg) 0.1 mL/10 g once daily for 30 days. The immunity of mice was evaluated by organ ratios. The function of cellular immunity, monocyte macrophage, humoral immunity, and NK cell activities of the mice were further evaluated. Results: Compared with the control group, low, medium and high dose BLLF showed no significant effects on body weights and organ ratios of the mice($P>0.05$). BLLF showed no significant effects on ConA-induced mouse splenic lymphocyte proliferations($P>0.05$). Medium and high dose BLLF significantly increased the delayed hypersensitivity induced by dinitrofluorobenzene in mice ($P<0.05$). The macrophage carbon clearance function of mice in high dose BLLF group was significantly increased compared with the control group ($P<0.05$). Medium and high dose BLLF significantly increased the mouse peritoneal

收稿日期: 2021-09-06

作者简介: 苏硕楠(1991-), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药及保健食品药理学, E-mail: 18810958986@163.com。

* 通信作者: 侯林中(1970-), 男, 硕士, 主任中药师, 研究方向: 中药及保健食品安全性, E-mail: 915580685@qq.com。

macrophage phagocytosis of chicken red blood cells ($P<0.05$). Medium and high dose BLLF significantly increased hemolytic activity and number of antibody producing cells in mice ($P<0.05$). Medium and high dose BLLF significantly increased NK cell activities in mice ($P<0.05$). Conclusions: BLLF exhibited potent immunomodulatory effects by increasing cellular immunity, humoral immunity, function of monocyte macrophage, and NK cell activity.

Key words: probiotics; *Lactobacillus*; fructo-oligosaccharide; mouse; immunomodulatory effect

肠道内特定的微生物群可有效维持免疫平衡,并对人体健康起着至关重要的作用,当正常微生物群遭到破坏则打破了肠道免疫系统平衡,可能会引发疾病^[1-2]。益生菌可通过改善肠道微生物构成、产生抗炎因子、抑制病原菌群生长,从而预防和治疗一些消化道疾病^[3-5]。乳杆菌属(*Lactobacillus*)细菌是肠道正常菌群中益生菌的重要成员,近年来越来越引起食品科学、微生物学、微生物生态学等领域的关注^[6-8]。

乳双歧杆菌 V9(*Bifidobacterium lactis* V9, *B. lactis* V9)、干酪乳杆菌 Zhang(*Lactobacillus casei* Zhang, *L. casei* Zhang)、植物乳杆菌 P-8 (*Lactobacillus plantarum* P-8, P-8)均为国内外目前用于开发的重要的 *Lactobacillus* 属细菌^[9-11]。这三种菌株均具有良好的耐酸性,能够较好的耐受人胃液、肠液以及胆盐,是目前国内外重点研究开发的益生菌^[12-13]。越来越多研究证明,*Lactobacillus* 属细菌对维持肠道微生态平衡,增强肠道免疫功能尤为重要^[5, 14]。

不同乳酸菌株的免疫调节功能因菌株类型而异。一方面是由于不同菌株细胞壁构成不同,其对免疫细胞的影响也不同^[5]。另外一方面,不同的乳酸菌产生的胞外多糖等代谢产物亦不同,其对免疫力的影响也不同^[15-17]。低聚果糖(fructo-oligosaccharide, FOS)是一种不易被小肠吸收的膳食纤维,可促进肠道中双歧杆菌的生长,抑制病原菌生长,从调节肠道菌群^[18-19]。研究表明,益生菌与低聚果糖等益生因子合用可更好地调节机体免疫力^[20]。但益生菌 V9、P-8、Zhang 与 FOS 联合使用对免疫系统的影响尚未见研究报道。本文重点通过检测三种益生菌(乳双歧杆菌 V9、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P-8)与低聚果糖复配的益生复合粉(BLLF)对小鼠免疫脏器指数、细胞免疫、单核-巨噬细胞功能、体液免疫及 NK 细胞活性的影响,以探讨其对小鼠免疫功能的调节作用,为其开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳双歧杆菌 V9(活菌数 2000 亿/g)、干酪乳杆菌 Zhang(活菌数 2000 亿/g)、植物乳杆菌 P-8 菌粉(活菌数 2000 亿/g)、低聚果糖 金华银河生物科技有限公司;刀豆蛋白 A(ConA)、二硝基氟苯(DNFB)

Sigma 公司; Hank's 液、RPMI1640 培养基、胎牛血清 美国 Gibco 公司; MTT 试剂盒、LDH 检测试剂盒 英国 Abcam 公司;淋巴细胞分离液、0.4% 台盼兰溶液 北京索莱宝科技有限公司;印度墨汁、YAC-1 细胞、20% 鸡红细胞 上海源叶生物科技有

限公司; 1% NP40、0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.2) 碧云天生物科技有限公司; C57BL/6J 小鼠(雄性, 18~22 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号: SCXK(京)2019-0010,饲养环境: 室温(23±2)℃,相对湿度: 40%~70%。

MS3 基本型旋涡混合器 德国 IKA 公司; 去离子水发生器 美国 Millipore 公司; Multiskan MK3 型酶标仪 美国 Thermo Scientific 公司; 721 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; CX33 显微镜 日本奥林巴斯。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及给药 参考文献配比比例^[15-16],称取冷冻干燥保存的乳双歧杆菌 V9、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P-8,按照质量比 50:25:25 的比例用双蒸水溶解至所需浓度后,备用。低聚果糖用双蒸水溶解至所需浓度后,备用。将小鼠随机分为 8 个免疫组,每个免疫组分为 4 个实验组,即蒸馏水组(空白组)、BLLF 低、中、高剂量组(三联菌 0.01 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg、三联菌 0.02 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg、三联菌 0.06 mg/kg+低聚果糖 0.1 g/kg) 0.1 mL/10 g 体重,每日灌胃 1 次,连续 30 d。按照文献中增强免疫力的研究方法对 BLLF 进行评价^[21-24]。

1.2.2 小鼠体重及免疫脏器指数的测定 每周称量一次各组小鼠的重量,实验当天称重结束后颈椎脱臼处死,无菌取出小鼠的脾脏、胸腺,将周围组织剥离干净,用滤纸吸净组织表面血液后,称重,分别计算胸腺或脾脏重量(mg)与体重(g)的比值^[25]。

1.2.3 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验 无菌取脾,磨碎后过滤,制成浓度为 3×10^6 个/mL 的细胞悬液。每孔 1.0 mL,加至 24 孔培养板中,实验组加 75 μ L ConA/孔(终浓度为 7.5 μ g/mL),对照组加 75 μ L 无菌水,继续培养 72 h。测定实验孔和对照孔在 570 nm 处的 OD 值^[26-27]。

1.2.4 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应(DTH)实验(耳肿胀法) 小鼠腹部脱毛后,取 50 μ L 1% DNFB 溶液,均匀涂抹在小鼠腹部皮肤进行致敏反应。5 d 后,取 20 μ L 1% DNFB 溶液均匀涂抹右耳上,左耳作为对照。24 h 后处死小鼠,采用打孔器取相同大小的左右耳片进行称重。以两耳片的重量之差表示 DTH 的程度^[28-29]。

1.2.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法) 取 20% 鸡红细胞悬液 1 mL,腹腔注射进入小鼠体内。30 min 后脱臼处死,经腹腔注入生理盐水

2 mL, 转动鼠板 1 min 后, 吸出腹腔洗液 1 mL, 平均滴于 2 片载玻片上, 37 ℃ 保湿孵育 30 min。生理盐水漂洗后, 1:1 丙酮-甲醇溶液固定, 4%(v/v) Giemsa-磷酸缓冲液染色 3 min, 蒸馏水漂洗晾干, 油镜下观察计数, 计算吞噬指数和吞噬百分率^[30]。

1.2.6 小鼠碳廓清实验 将用生理盐水 4 倍稀释的印度墨汁尾静脉注入小鼠 0.1 mL/10 g。于注入墨汁第 2、10 min 分别从内眦静脉丛取血 20 μL, 加到 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。以 Na₂CO₃ 溶液为空白对照, 用分光光度计在 600 nm 波长处测定 OD 值并计算吞噬指数 α^[24,31]。

1.2.7 抗体生成细胞测定 收集绵羊红细胞(SRBC), 用生理盐水配成 2%(v/v)的细胞悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫。4 d 后处死小鼠, 无菌条件下取脾脏, 制备脾细胞悬液, 用生理盐水稀释成 5×10⁶ 个/mL 的脾细胞悬液。用 Jerne 改良玻片法检测抗体生成细胞^[23]。

1.2.8 血清溶血素测定 同 1.2.7 方法免疫小鼠, 4 d 后, 摘除眼球血于离心管中, 收集血清。取 300 倍稀释后的血清 1.0 mL, 依次加入 10% SRBC 0.5 mL、补体 1.0 mL, 反应 20 min 后, 离心取上清 1.0 mL, 加都氏试剂 3.0 mL。以 10% SRBC 0.25 mL 加都氏试剂 4.0 mL 混匀后作空白对照。540 nm 处测定各管光密度值, 计算半数溶血值(HC₅₀)^[22-23]。

1.2.9 小鼠 NK 细胞活性测定 收集 YAC-1 细胞, 调整细胞浓度至 4×10⁵ 个/mL。无菌取脾, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10⁷ 个/mL。取靶细胞和效应细胞各 100 μL(效靶比 50:1), 加入 U 型 96 孔培养板中, 以加靶细胞+培养液各 100 μL 的孔作为靶细胞自然释放孔, 以加靶细胞+1% NP40 各 100 μL 的孔作为靶细胞最大释放孔。培养箱中继续培养 4 h, 1500 r/min 离心, 每孔吸取上清 100 μL 到平底 96 孔培养板中, 加入 LDH 基质液 100 μL, 反应 3 min, 每孔加入 1 mol/L 的 HCl 30 μL, 490 nm 处测定 OD 值, 计算 NK 细胞活性^[24]。

1.3 数据处理

数据以均数±标准差表示, 每组 n=10, 采用 SPSS 10.0 软件分析, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)检验, 成对组间比较采用 t 检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重、胸腺、脾脏指数测定结果

实验期间, 各组小鼠一般状况良好, 未发现纳差、腹泻、中毒或自然死亡等现象。各组小鼠的初始体重和终末体重均无显著性差异 (P>0.05), 提示低、中、高剂量组 BLLF 对健康小鼠均无明显毒性(见表 1)。衡量机体免疫功能的指标为免疫器官的脏器系数, 其中, 胸腺和脾脏指数主要以反映免疫器官的发育和免疫细胞的功能状况为主, 同时, 间接反映了机体的整

体免疫水平^[25]。低、中、高剂量组的 BLLF 对小鼠免疫脏器指数的影响结果详见表 1。结果显示, 给予小鼠 BLLF 连续灌胃 30 d, 低、中、高剂量组小鼠的脾脏/体重比值、胸腺/体重比值与空白对照组相比差异均无统计学意义(P>0.05)。结果表明 BLLF 对小鼠的免疫器官的重量无显著影响, 进一步证明了其安全性。

表 1 BLLF 对小鼠脏器/体重比值的影响(̄x±s, n=10)
Table 1 Effects of BLLF on mice organs ratios to body weight (̄x±s, n=10)

组别	初始体重(g)	终末体重(g)	脾脏/体重(mg/g)	胸腺/体重(mg/g)
空白对照组	20.47±1.14	30.14±1.07	2.56±0.74	2.26±0.58
低剂量BLLF组	20.15±1.37	29.25±2.01	2.55±0.47	2.54±0.81
中剂量BLLF组	20.75±1.50	29.46±1.59	2.84±1.31	2.15±0.95
高剂量BLLF组	20.45±1.05	30.36±1.67	2.91±1.14	2.10±0.45

2.2 不同剂量 BLLF 对小鼠细胞免疫功能的影响

T 淋巴细胞受到 ConA 刺激后会转化为母细胞持续增殖。通过 MTT 法检测其细胞增殖能力可以反映细胞免疫功能的强弱^[25]。不同剂量 BLLF 对 ConA 促进脾淋巴细胞增殖作用结果见表 2。统计发现, 低、中、高剂量 BLLF 组的 OD 差值与对照组的 OD 差值间均无显著性差异(P>0.05)。本实验结果表明 BLLF 对小鼠的脾淋巴细胞的增殖能力无显著影响。

表 2 BLLF 对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖能力及耳廓肿胀度的影响(̄x±s, n=10)

Table 2 Effects of BLLF on ConA-induced mouse splenic lymphocyte transformation ability and auricle swelling degree (̄x±s, n=10)

组别	脾淋巴细胞增殖能力(OD _{570 nm})			耳廓肿胀度(mg)
	ConA(-)	ConA(+)	OD差值	
空白对照组	0.41±0.12	0.85±0.09	0.44±0.11	12.01±1.04
低剂量BLLF组	0.42±0.10	0.87±0.08	0.45±0.09	13.18±2.12
中剂量BLLF组	0.44±0.07	0.93±0.14	0.49±0.12	15.45±2.04*
高剂量BLLF组	0.46±0.09	1.01±0.13	0.55±0.13	16.50±2.25*

注: 与空白对照组比较, * P<0.05; 表3-表5同。

DNFB 涂抹于小鼠耳廓后, 可引起迟发性变态反应, 导致鼠耳局部组织增厚。小鼠耳廓肿胀度可反映小鼠细胞免疫功能的强弱^[25]。表 2 中的数据显示, 中、高剂量 BLLF 组的耳廓肿胀度显著(P<0.05)高于空白对照组。本实验结果表明 BLLF 可增强 DNFB 诱发的迟发性变态反应, 正向调控小鼠的细胞免疫功能。研究表明, 益生菌可影响肠道黏膜免疫细胞群的数量和分布, 增强肠道免疫功能。低果聚糖在肠道不可被消化吸收, 也可以促进肠道有益菌的增殖, 进而增强益生菌免疫调控作用^[19]。

2.3 不同剂量 BLLF 对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响

单核-巨噬细胞是具有抗感染、抗肿瘤和免疫调节作用的免疫细胞, 反映了机体非特异性免疫反应的强弱。当机体受到病原体或异物侵入时, 这些巨噬细胞

胞能向这些部位募集,并通过胞吞作用吞噬并消化分解异物^[26]。由表3可知,给予小鼠低、中、高剂量的 BLLF 30 d 后,与对照组相比,高剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数均显著 ($P<0.05$) 升高。

表3 BLLF 对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of BLLF on the function of monocyte macrophage of the mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	单核-巨噬细胞功能		小鼠碳廓清能力
	吞噬率(%)	吞噬指数	吞噬指数(α)
空白对照组	16.57 $\pm$ 3.68	0.23 $\pm$ 0.10	6.18 $\pm$ 1.34
低剂量BLLF组	18.26 $\pm$ 3.24	0.29 $\pm$ 0.05	7.04 $\pm$ 1.12
中剂量BLLF组	17.24 $\pm$ 4.05	0.26 $\pm$ 0.14	7.86 $\pm$ 0.56*
高剂量BLLF组	31.35 $\pm$ 2.56*	0.50 $\pm$ 0.12*	8.27 $\pm$ 0.89*

BLLF 对小鼠碳廓清功能的影响结果见表3。其中中、高剂量组小鼠的吞噬指数 α 与空白对照组相比具有统计学差异 ($P<0.05$)。与对照组相比,中、高剂量组碳廓清功能显著升高 ($P<0.05$)。这一结果表明 BLLF 能有效增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力,提示小鼠非特异性免疫能力明显增强。这可能是益生菌与低果聚糖共同作用的结果。益生菌可增强巨噬细胞的吞噬活性,当肠道受到病原体或异物侵入时,这些巨噬细胞能向这些部位募集,并通过胞吞作用吞噬并消化分解异物,增加肠道防御能力。低果聚糖在肠道不可被消化吸收,且在肠道可促进肠道双歧杆菌的增殖^[19]。

2.4 不同剂量 BLLF 对小鼠体液免疫功能的影响

溶血空斑试验可用于体外检测和计数抗体生成细胞数目^[31]。空斑的数量是反映机体的体液免疫功能的重要指标。低、中、高三个剂量 BLLF 组与空白对照组的空斑数(每 10^6 脾细胞)见表4。统计分析结果表明,中、高剂量组的空斑数与空白对照组相比具有显著性差异 ($P<0.05$),说明给予 BLLF 能明显提高小鼠体液免疫功能。

表4 BLLF 对小鼠抗体生成细胞与血清溶血素检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of BLLF on number of antibody producing cells and hemolytic activity ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	空斑数(每 10^6 脾细胞)	HC ₅₀
空白对照组	16 $\pm$ 4	64.25 $\pm$ 14.58
低剂量BLLF组	18 $\pm$ 2	73.43 $\pm$ 18.37
中剂量BLLF组	29 $\pm$ 6*	95.68 $\pm$ 10.54*
高剂量BLLF组	30 $\pm$ 4*	106.83 $\pm$ 16.58*

小鼠体内产生的抗体溶血素在补体的参与下,与 SRBC 共同孵育发生溶血反应,释放血红蛋白,而通过测定血红蛋白含量能反映动物产生溶血素的能力^[24,26]。HC₅₀ 的测定可评价 SRBC 细胞发生溶血反应产生溶血素的能力。低、中、高三个剂量 BLLF 组与空白对照组的 HC₅₀ 值见表4。统计分析结果表

明,中、高剂量组的 HC₅₀ 值与空白对照组相比具有显著性差异 ($P<0.05$)。这进一步证明, BLLF 可显著提高小鼠的体液免疫功能。益生菌可通过调节抗炎因子、转录因子等的分泌影响局部和整体的免疫应答反应,产生相应的抗体。低果聚糖也可以机体血清 IgG 抗体的浓度,进而增强益生菌的体液免疫功能^[20]。

2.5 不同剂量 BLLF 对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞是机体重要的免疫细胞,其活化后可合成和分泌多种细胞因子,发挥免疫调节及靶细胞杀伤作用^[28-29]。低、中、高三个剂量 BLLF 组与空白对照组的 NK 细胞活性见表5。统计分析结果表明,中、高剂量 BLLF 组 NK 细胞活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。这表明,中、高剂量 BLLF 可显著增强 NK 细胞的活性,进而提高机体靶细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。益生菌及其代谢产物可通过增强机体的免疫反应,提高 NK 细胞的杀伤活性。低果聚糖也可以调控如 INF γ /IL-4、IL-10、TGF- β 等的分泌,进而增强益生菌的体液免疫功能^[20]。

表5 BLLF 对 NK 细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 5 Effects of BLLF on NK cell activities ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	NK细胞活性(%)
空白对照组	24.17 $\pm$ 10.42
低剂量BLLF组	27.24 $\pm$ 14.15
中剂量BLLF组	36.51 $\pm$ 10.28*
高剂量BLLF组	38.67 $\pm$ 9.38*

3 讨论与结论

乳酸菌能够调节肠道微生物区系的平衡,在增强机体抵抗力方面具有不可低估的作用^[6-7,32]。研究证实,不同益生菌株对免疫功能的影响也不同^[3-5]。研究表明,不同的乳酸菌进入机体后,能通过不同的机制激活肠黏膜免疫系统,起到保护机体免受感染源的侵袭、抗突变和防癌、预防糖尿病和心血管疾病的作用^[5,32-33]。赵雯等^[32]研究表明,热灭活的乳双歧杆菌 BL-99 能够通过增强免疫球蛋白 A 的分泌,促使肠黏膜淋巴细胞的增殖,增强自然杀伤细胞和巨噬细胞功能等机制增强机体免疫力。乳双歧杆菌 M8 可以通过增加淋巴细胞比例、T 淋巴细胞转化增殖能力和促进细胞因子分泌等机制改善细胞免疫、体液免疫及固有免疫,从而增强免疫功能低下的大鼠的免疫功能^[33]。

随着益生菌产业的快速发展,多元化的复合益生菌产品不断涌现。研究表明,低聚糖类益生元可作为益生菌的营养和能量来源,协同促进益生菌在肠道的定植和功效发挥,增强益生菌的免疫保护功能。Finamore 等^[34]研究发现,乳杆菌与长双歧杆菌的复合制剂能增强 T 细胞、B 细胞的功能和 NK 细胞活性进而提高机体免疫力。朱自平等^[20]研究表明,嗜酸乳杆菌 LA85 和低聚果糖复配组成合生元菌剂可

显著增加小鼠迟发型变态反应、淋巴细胞转化能力、抗体生成细胞数、 HC_{50} 值,并可提高小鼠单核-巨噬细胞吞噬能力和 NK 活性。本研究评估了三种益生菌与低聚果糖复配的益生复合粉对机体免疫能力的影响,为其开发和利用提供实验依据。胸腺、脾脏是动物体内主要的免疫器官,胸腺和脾脏指数能反映免疫器官的发育和免疫细胞的功能状况^[23-25]。本研究结果表明,各剂量 BLLF 组小鼠脾脏指数和胸腺指数无差异。这初步明确了给予高、中、低剂量 BLLF 对小鼠的安全性。其急性毒性、遗传毒性、亚慢性毒性等尚需进一步的体内外实验验证。

ConA 诱导的 T 细胞增殖转化率和 DNFB 诱导小鼠 DTH 常用来反映细胞免疫能力的强弱。近年来关于乳酸菌对迟发型超敏反应(DTH)的影响已有一些报道。如乳酸菌 *Lactobacillus casei*(*L. casei*)活菌体细胞呈时间和浓度依赖性地增强鼠体内抗原特异性的 DTH 效应^[35]。本研究结果表明,BLLF 对 ConA 诱导的脾淋巴细胞转化无显著影响($P>0.05$),而中、高剂量 BLLF 组的耳廓肿胀度显著高于空白对照组($P<0.05$)。这与文献报道相符^[34-35]。

乳酸菌细胞壁肽聚糖、脂磷壁酸或胞外多糖等成分激活免疫系统的巨噬细胞。常见的双歧杆菌、乳酸杆菌和鼠李糖乳杆菌都可以有效提高巨噬细胞的吞噬能力^[32,34]。本研究结果表明,高剂量 BLLF 可显著提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬能力($P<0.05$),中、高剂量 BLLF 可显著增加小鼠碳廓清功能($P<0.05$)。益生菌细胞壁肽聚糖的主要成分是胞壁酰二肽,可激活巨噬细胞释放 IL-1 和 IL-6,诱导淋巴细胞产生 IFN- γ ,增强 NK 细胞的杀伤作用^[32-35]。本研究结果表明,中、高剂量 BLLF 可显著增强 NK 细胞的活性($P<0.05$)。

综上所述,BLLF 可通过增强细胞免疫、单核-巨噬细胞功能、体液免疫及 NK 细胞活性来增强小鼠的免疫系统水平。该制剂与其他益生菌复方制剂的相比,其对免疫功能的调控机制相似,但确切的分子水平的调控机制尚需进一步研究。本研究为乳双歧杆菌 V9、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P-8、FOS 组成的复合制剂的增强免疫力的功能提供了基础数据支持,也为其进一步的开发和利用奠定了基础。

参考文献

[1] 柯程仁,叶兰仙.肠道菌群及益生菌对青少年抑郁症影响的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(9): 855-859. [KE C R, YE L X. Characteristics of intestinal flora and antidepressant effect of probiotics on adolescents[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2021, 46(9): 855-859.]

[2] YOUSEFI B, ESLAMID M, GHASEMIAN A, et al. Probiotics importance and their immunomodulatory properties[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8008-8018.

[3] PIQUE N, BERLANGA M, MINANA-GALBIS D. Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2534.

[4] 陈莹,江剑平.益生菌在保健食品中的应用研究进展[J]. *保健医学研究与实践*, 2020, 17(6): 89-92. [CHEN Y, JIANG J P. Progress in applied research of probiotics in health care food[J]. *Health Med Res and Prac*, 2020, 17(6): 89-92.]

[5] 王淑梅,邱维,妥彦峰,等.益生菌的免疫调控作用研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(5): 23-26. [WANG S M, DI W, TUO F, et al. Research progress on immune regulation of probiotics[J]. *Cereals & Oils*, 2021, 34(5): 23-26.]

[6] BRUCH-BERTANI J P, URIBE-CRUZ C, PASQUALOTTO A, et al. Hepatoprotective effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG through the modulation of gut permeability and inflammations in a model of alcoholic liver disease in zebrafish[J]. *J Am Coll Nutr*, 2020, 39(2): 163-170.

[7] XU H, HIRAIISHI K, KURAHARA L H, et al. Inhibitory effects of breast milk-derived *Lactobacillus rhamnosus* ProBio-M9 on colitis associated carcinogenesis by restoration of the gut microbiota in a mouse model[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1143.

[8] CUNA A, YU W, MENDEN H L, et al. NEC-like intestinal injury is ameliorated by *Lactobacillus rhamnosus* GG in parallel with SIGIRR and A20 induction in neonatal mice[J]. *Pediatr Res*, 2020, 88(4): 546-555.

[9] YAN Y, LIU C, ZHAO S, et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 attenuates hepatic steatosis and inflammation in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 101.

[10] SONG Y, HE Q, ZHANG J, et al. Genomic variations in probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 in the human and rat gut[J]. *Front Microbiol*, 2018, 5(9): 893.

[11] 托娅,张和平.一株分离自内蒙古传统酸马奶中的乳酸杆菌 *Lactobacillus casei*. Zhang 对小鼠免疫功能的影响[J]. *中外医疗*, 2008, 11: 39-42. [TUO Y, ZHANG H P. Effect of *Lactobacillus casei*. Zhang isolated from traditional milk in Neimenggu on immunologic function of mice[J]. *China Foreign Medical Treatment*, 2008, 11: 39-42.]

[12] 白梅,黄天,郭帅,等.益生菌干酪乳杆菌 Zhang 和乳双歧杆菌 V9 发酵乳胞外多糖含量对流变学特性、质构和稳定性的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 193-202. [BAI M, HUANG T, GUO S, et al. Effects of extracellular polysaccharide in yogurt produced by the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 on rheological properties-texture and stability[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 193-202.]

[13] DAN T, CHEN H, LI T, et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability[J]. *Front Microbiol*, 2019, 9: 3133.

[14] 蒙月月, SATHI C, SHUVAN K S, 等.植物乳杆菌 KLDS 1.0318 对小鼠免疫调节作用初步研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(7): 303-308. [MENG Y Y, SATHI C, SHUVAN K S, et al. Preliminary study on the immunomodulatory function of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318 in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(7): 303-308.]

[15] CARLA P, GEORGIOS S, ALESSIO T, et al. Proneurogenic and neuroprotective effect of a multi strain probiotic mixture in a mouse model of acute inflammation: Involvement of the gut-brain

- axis[J]. *Pharmacological Research*, 2021: 105795.
- [16] FM A, PYDA A, AWB B, et al. A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production *in vitro*[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 555: 1–10.
- [17] HS A, YK B, ED B. Bifidogenic effect and *in vitro* immunomodulatory roles of melibiose-derived oligosaccharides produced by the acceptor reaction of glucansucrase E81[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 91: 126–131.
- [18] 张金, 王美华, 杨永龙, 等. 低聚果糖和低聚半乳糖的研究进展及在乳制品中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(10): 129–134. [ZHANG J, WANG M H, YANG Y L, et al. Research progress and application in dairy products of fructo-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide[J]. *China Food Additives*, 2020, 31(10): 129–134.]
- [19] 张慧, 贺延苓, 李琼, 等. 低聚果糖的生物药理学效用及应用研究进展[J]. *药物生物技术*, 2019, 26(5): 446–448. [ZHANG H, HE Y L, LI Q, et al. Research advances of function effects and application of fructo-oligosaccharide[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2019, 26(5): 446–448.]
- [20] 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 and mechanism of *Lactobacillus acidophilus* probiotic compound tablets on immune function in mice[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(22): 44–50.]
- [21] 刘冬英, 刘臻, 张丽婧, 等. 免疫防御蛋白粉对小鼠免疫功能的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1945–1949. [LIU D Y, LIU Z, ZHANG L J, et al. Effect of immune defence protein powder on immune function in mice[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(5): 1945–1949.]
- [22] 吴琼, 张丽艳, 黄颖, 等. 参芪茯苓片拆方对小鼠免疫功能的影响[J]. *贵州中医药大学学报*, 2021, 43(1): 29–33. [WU Q, ZHANG L Y, HUANG Y, et al. Effect of Shenqifuling tablet on immune function in mice[J]. *Journal of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 43(1): 29–33.]
- [23] 沙玥彤, 蔡胡强, 蔡振亮, 等. 常青素对小鼠免疫功能的影响及机制研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2020, 54(6): 569–574. [SHA Y T, CAI H Q, QI Z L, et al. Effects of Changqingsu on immune function in mice and its mechanism[J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2020, 54(6): 569–574.]
- [24] 顾晓龙, 罗明友. 黄精对小鼠免疫调节作用的影响研究[J]. *四川畜牧兽医*, 2019, 46(4): 24–26. [GU X L, LUO M Y. Study on the Immunomodulation effect of *Polygonatum sibiricum* on mice[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2019, 46(4): 24–26.]
- [25] 檀新珠, 吴晓晴, 吕明其, 等. 太子参茎叶多糖对小鼠免疫器官指数和血清免疫球蛋白、补体含量的影响[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2017, 46(5): 590–594. [TAN X Z, WU X Q, LV M Q, et al. Effect of *Radix pseudostellariae* stem and leaf polysaccharides on immune organ index and immunoglobulin complement in serum of mice[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 46(5): 590–594.]
- [26] FU H, LIN X, FU H, et al. Effects of compound *Phellinus igniarius*(L. ex Fr.) Quel. oral liquids polysaccharide on the immunologic function of mice[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2015, 16(6): 1290–1294.
- [27] 李凤文, 覃辉艳, 赵鹏, 等. 黄芪胶囊增强免疫力的实验研究[J]. *应用预防医学*, 2008, 14(6): 330–333. [LI F W, TAN H Y, ZHAO P, et al. Experimental research of Huangqi capsule on enhancement of immunologic function[J]. *Applied Preventive Medicine*, 2008, 14(6): 330–333.]
- [28] 钟媛媛, 杨晓涵, 张要武, 等. 三七多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(6): 573–576. [ZHONG Y Y, YANG X H, ZHANG Y W, et al. Effect of *Panax notoginseng* polysaccharide on immunologic function of mice[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 31(6): 573–576.]
- [29] 郑纯威, 陈宇, 丁华煜, 等. 复方氨基酸口服液对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2010, 17(2): 108–109. [ZHENG C W, CHEN Y, DING H M, et al. Effect of amino acid complex on immunologic function of mice[J]. *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology*, 2010, 17(2): 108–109.]
- [30] 陈冬金, 黄志坚, 陈强. 复方黄芩颗粒剂对小鼠免疫功能的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2007, 5: 809–812. [CHEN D J, HUANG Z J, CHEN Q. Effect of compound *Radix scutellariae* granule on immunologic function of mice[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2007, 5: 809–812.]
- [31] 朱艳, 姜盛, 李明亮, 等. 紫苏籽蛋白对免疫力低下小鼠免疫调节功能的研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 322–326, 332. [ZHU Y, JIANG S, LI M L, et al. Study on immune regulation of *Perilla frutescens* seed protein in mice with low immunity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(21): 322–326, 332.]
- [32] 赵雯, 刘伟贤, 巴根纳, 等. 热灭活乳双歧杆菌 BL-99 缓解小鼠结肠炎及调节肠道菌群的功能研究[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(11): 4–10. [ZHAO Wen, LIU Weixian, BA Genna, et al. Function research of heat-inactivated *Bifidobacterium lactis* BL-99 in ameliorating colitis and regulating intestinal microbiota in mice[J]. *China Dairy Industry*, 2020, 48(11): 4–10.]
- [33] 翟云, 王雅菲, 托娅. 乳双歧杆菌 M8 对免疫抑制模型大鼠免疫功能的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(3): 582–588. [ZHAI Y, WANG Y F, TUO Y. Effect of *Bifidobacterium lactis* M8 on immune function of immunosuppressive model rats[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2020, 46(3): 582–588.]
- [34] FINAMORE A, ROSELLI M, DONINI L, et al. Supplementation 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.
- [35] DE W R, CLAASSEN E, BOKKEN G, et al. Enhanced immunological memory responses to listeria monocytogenes in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following lactobacillus casei shirota ingestion[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2003, 10(1): 59–65.