

应用体内外实验筛选可降低牛乳 β -乳球蛋白过敏的乳杆菌

李艾黎¹ 孟祥晨^{1*} 郭鸽¹ 马冬雪¹ 王言²

¹ 乳品科学教育部重点实验室 东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

² 哈尔滨医科大学附属第一医院 哈尔滨 150001

摘要: 【目的】通过体内外实验评估 5 种乳杆菌缓解牛乳 β -乳球蛋白 (BLG) 过敏的作用,为今后筛选具有抗过敏活性的乳杆菌提供参考。【方法】首先体外分析 5 种活的/热致死的乳杆菌促进小鼠原代淋巴细胞分泌细胞因子 (CK) IFN- γ 和 IL-4 的水平,随后应用小鼠 BLG 过敏模型评估这 5 种乳杆菌抑制过敏的能力。将实验动物随机分为空白组、BLG 致敏组和 5 种活的/热致死乳杆菌组。采用 ELISA 法检测各组小鼠淋巴细胞分泌 Th1/Th2 型 CK 的水平,并测定小鼠血清中总 IgE 和 BLG 特异性 IgE 的含量。【结果】在体外可促进淋巴细胞分泌 IFN- γ 、抑制 IL-4,使其 IFN- γ /IL-4 比值 (代表 Th1/Th2 细胞平衡) 显著高于正常对照组 ($P < 0.05$) 的乳杆菌,在体内实验中也能有效提高致敏小鼠淋巴细胞的 IFN- γ /IL-4 分泌率,并显著降低致敏小鼠血清中总 IgE 和 BLG 特异性 IgE 的水平 ($P < 0.05$)。相反,在体外的 IFN- γ /IL-4 比值较低的乳杆菌不能缓解特异性 IgE 抗体介导的食物过敏反应。【结论】基于乳杆菌体外刺激小鼠原代淋巴细胞分泌 Th1/Th2 型 CK 的结果,可以预测菌株在体内具有可通过纠正 Th2 占优势的 Th1/Th2 细胞失衡,下调抗体分泌量,缓解小鼠 BLG 过敏症状的能力。

关键词: 牛乳过敏,乳杆菌,细胞因子,Th1/Th2 细胞平衡

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)02-0243-07

牛乳营养丰富,是婴幼儿重要的食物蛋白来源。但据流行病学调查表明,2% - 6% 的儿童对牛乳产生过敏反应,严重影响其对优质乳蛋白的吸收利用^[1]。 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin, BLG) 被视为最主要的牛乳过敏原蛋白之一,可诱发特异性 IgE 抗体介导的 I 型超敏反应^[2],表现为 Th2 细胞反应亢进,IL-4 和 IL-10 等 Th2 细胞因子表达显著增强,导致体内 Th1/Th2 免疫失衡^[3],刺激 B 细胞生成过量 IgE 抗体^[4],轻者可引起皮肤、胃肠道过敏症状,重者可致哮喘发作、休克甚至死亡。且过敏引起的胃肠道疾病 (如婴幼儿结肠炎) 常致儿童生长迟缓^[5]。

近年来国内外许多研究证实乳杆菌可通过纠正 Th1/Th2 失衡来减轻过敏反应,且具有种 (株) 特异性,如 Paul F 等^[6]和 Li C Y 等^[7]分别指出罗伊氏乳杆菌和唾液乳杆菌可促进致敏小鼠淋巴细胞分泌多种免疫调节活性的细胞因子 (CK) (如 IL-12、IFN- γ),诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞转换,抑制 Th2 细胞的活性,进而降低 IgE 的产生,缓解过敏反应,李理等^[8]提出植物乳杆菌也可通过平衡 Th1/Th2 细胞因子来防治过敏。

选用合理的、有效快速的体内外实验模型是评价及筛选具抗过敏性能乳杆菌的关键。通常采用的

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31101267); 东北农业大学创新团队基金 (CXT007-2-1); 国家博士后科学基金 (20090460872)

* 通信作者。Tel: +86-451-55191813; Fax: +86-451-55190340; E-mail: xchmeng@163.com

作者简介: 李艾黎 (1978 -) 女, 哈尔滨人, 副教授, 博士, 主要从事食品微生物研究。E-mail: aili@mail@163.com

收稿日期 2011-08-12; 修回日期: 2011-11-25

动物实验筛选方法因其周期长、耗费大、效率低,其实际运用受到一定限制。细胞模型也是快速筛选的重要方法之一,作者在前期实验中证实^[9]正常离体小鼠脾脏淋巴细胞可用于体外初步筛选具潜在免疫活性的乳杆菌,缩小用于动物实验的目标菌株的范围。在此基础上,进一步探究体内外实验数据是否具有很好的相关性,从而提供一种从体外到体内筛选抗过敏乳杆菌菌株的有效模式。本文基于乳杆菌调节 Th1/Th2 细胞平衡与过敏关系的理论,首先比较不同的活的/热致死的乳杆菌对原代小鼠脾淋巴细胞体外分泌 Th1/Th2 型 CK 的影响,继而采用过敏动物模型验证其缓解 BLG 过敏的效果,为筛选潜在的抗过敏乳杆菌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株: 约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) KLDS 1.0731、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) KLDS 1.0738、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) KLDS 1.0740 及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) KLDS 1.0724 均分离自婴儿肠道,由乳品科学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心 (KLDS-DICC) 冻干保藏。罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) CHM 分离自市售抗过敏益生菌冲剂。

1.1.2 实验动物: 雌性清洁级 6-8 周龄 BALB/c 小鼠,购自哈尔滨肿瘤医院实验动物中心,饲养环境的温度 (23 ± 2) °C,湿度 50% - 75%,自由摄取高压灭菌的市售块状基础饲料(其中不含牛奶及乳制品)和自来水。

1.1.3 主要试剂和仪器: IL-12、IL-4、IFN- γ 和 IL-10 的 ELISA 法检测试剂盒 (美国 R&D 公司); RPMI 1640 培养液 (美国 GIBCO 公司); 总 IgE 试剂盒 (美国 Bethyl 公司); 羊抗鼠 IgE 酶标二抗 (英国 AbD Serotec 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料公司); 淋巴细胞分离液 (Salarbio 公司); 牛乳 β -乳球蛋白标品和弗氏完全佐剂 (FCA) (Sigma 公司); MRS 培养基 (上海科兴生物科技有限公司); HF90 型 CO₂ 培养箱 (香港力康公司); Model 680 型酶标仪 (美国 Beckman); EL104/00 型电子天平 (梅特勒公司); AE-30 倒置生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有

限公司); LD4-2 型低速离心机 (北京医用离心机厂)。

1.2 乳杆菌菌悬液的制备

受试乳杆菌接种于 MRS 液体培养基, 37°C 培养 48 h。分离自市售制品的罗伊氏乳杆菌菌株,通过形态观察、生化和 16S rRNA 细菌鉴定后,接种于 MRS 液体培养基, 37°C 培养 48 h。将菌液 2000 \times g 离心 10 min 后,用灭菌 0.01 mol/L、pH 7.4 PBS 重悬,调整菌浓度为 10⁹ CFU/mL,分为活菌组和热致死菌组 (100°C 热处理 30 min, 验明无活菌存在,但仍保持正常细菌形态)。将处理后的菌液清洗后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬。

1.3 脾细胞提取及培养

无菌取小鼠脾脏,用玻璃针芯在 200 目筛网上研磨后,加入到 RPMI1640 培养液中制成密度为 4 \times 10⁶ 个/mL 的单细胞悬液。加入淋巴细胞分离液进行离心,分离出淋巴细胞,再用 RPMI1640 培养液洗涤 (2000 \times g 离心 10 min) 2 次。

1.4 乳杆菌对脾淋巴细胞分泌 CK 的影响^[10]

将 5 种活/死的乳杆菌与按 1.3 方法获得的脾淋巴细胞按 10:1 比例接种于 96 孔板, 37°C、5% CO₂ 条件下培养 60 h,离心收集上清用于检测 IFN- γ 和 IL-4 的水平 (pg/mL)。

1.5 动物模型建立^[11]

小鼠购进后适应性喂养 3 天,随机分组 (每组 10 只),即空白组、BLG 致敏组和 5 种乳杆菌的活菌组以及死菌组。自第 1 天起,活/死菌组小鼠分别灌胃 0.1 mL/只的 5 种乳杆菌菌悬液 (浓度为 4 \times 10⁹ CFU/mL), 1 次/日,共 28 天,致敏组、空白组同时以等量生理盐水灌胃。BLG 致敏组、活菌组和死菌组小鼠在第 7、21、28 天给予腹腔注射 0.2 mL 0.5 mg/mL 的过敏原 (1 mL 弗氏佐剂 + 1 mL 1 mg/mL BLG),空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水。于实验的第 30 天,即末次腹腔注射 48 h 激发后,在小鼠足趾处行 BLG 点刺实验,皮丘 > 3 mm 视为皮肤点刺阳性^[12]。之后统一处死小鼠检测各项指标。

1.6 ELISA 法检测各组小鼠脾淋巴细胞分泌的 CK^[13]

无菌取各组小鼠脾脏淋巴细胞,调细胞密度为 4 \times 10⁶ 个/mL 分别接种于 96 孔板中,同时加入含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基及 BLG (终浓度

1 mg/mL), 37°C、5% CO₂ 条件下培养48 h, 离心收集上清用于检测 IL-12、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的水平 (pg/mL)。

1.7 ELISA 法检测抗体水平

小鼠摘除眼球放血, 离心后收集血清。按试剂盒说明用 ELISA 方法检测小鼠血清总 IgE 的水平 (ng/mL)。BLG 特异性 IgE 检测参考 Adel-Patient K 等^[2]的方法。

1.8 统计学处理

实验数据均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 应用 Excel 软件建立数据库, 采用 SPSS 11.5 进行单因素方差分析及相关性分析, 以 $P < 0.05$ 者认为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 乳杆菌对原代小鼠淋巴细胞 Th1/Th2 细胞平衡的影响

如图 1-A 所示, 当不同的活的/热致死的乳杆菌与淋巴细胞共孵育时, 所有菌株均可有效提高 Th1 型 CK 的含量; 如图 1-B 所示, 活的约氏乳杆菌 KLDS 1.0731 和植物乳杆菌 KLDS 1.0724 可以显著促进 Th2 型 CK 分泌 ($P < 0.05$)。

由于 Th1、Th2 细胞的比例同 IFN-γ 和 IL-4 分泌的水平密切相关^[14], 故本实验以 IFN-γ/IL-4 比值为代表研究乳杆菌对淋巴细胞 Th1/Th2 细胞平衡的影响。如图 1-C 所示, 热致死的乳杆菌的 IFN-γ/IL-4 比值高于活的乳杆菌, 特别是热致死的嗜酸乳杆菌 KLDS 1.0738 发酵乳杆菌 KLDS 1.0740 和罗伊氏乳杆菌 CHM 的 IFN-γ/IL-4 比值分别为 41.56 ± 2.39 、 43.27 ± 1.98 和 47.64 ± 2.94 , 显著高于正常对照组的 35.13 ± 2.99 ($P < 0.05$)。

2.2 乳杆菌缓解 β-乳球蛋白过敏的作用

2.2.1 一般情况: 致敏组小鼠首次激发后, 多数小鼠出现腹泻、平均体质量减轻, 实验过程中死亡 3 只。而空白组和乳杆菌组小鼠平均体质量增加。末次激发后进行 BLG 点刺, 皮丘大小以经点刺处互相垂直的两条直径平均值表示, 皮丘 > 3 mm 视为皮肤点刺阳性。致敏组、活细胞的约氏乳杆菌组和植物乳杆菌组小鼠多出现足趾肿胀充血现象, 空白组和其他乳杆菌组小鼠变化不明显。

2.2.2 乳杆菌对致敏小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影

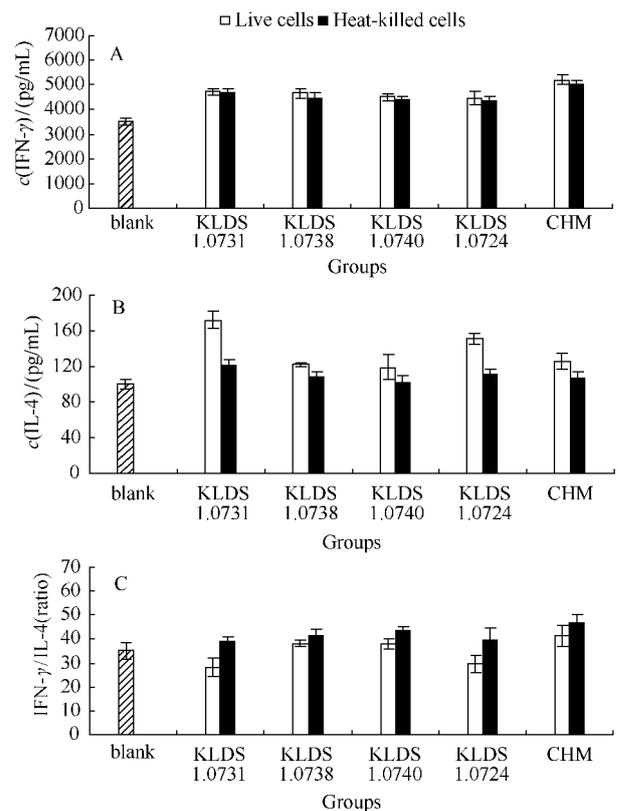


图 1 五种乳杆菌对原代淋巴细胞分泌 IFN-γ (A) IL-4 (B) 及其 IFN-γ/IL-4 比值 (C) 的影响 (pg/mL, $n = 3$, $\bar{X} \pm SD$)

Fig. 1 Effect of IFN-γ (A), IL-4 (B) Production and IFN-γ/IL-4 ratio (C) from normal splenic cells stimulated with 5 lactobacilli strains (pg/mL, $n = 3$, $\bar{X} \pm SD$).

响: 如表 1 所示, 灌服活的/热致死的乳杆菌后可有效提高致敏小鼠淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子, 其中活的/热致死的罗伊氏乳杆菌 CHM 的 IFN-γ 分泌水平显著高于正常对照组的 623.08 ± 23.39 pg/mL ($P < 0.05$), 而热致死的嗜酸乳杆菌 KLDS 1.0738、发酵乳杆菌 KLDS 1.0740 和植物乳杆菌 KLDS 1.0724 的 IFN-γ 分泌水平显著高于致敏组的 344.87 ± 29.87 pg/mL ($P < 0.05$)。活的/热致死的罗伊氏乳杆菌 CHM 和热致死的嗜酸乳杆菌 KLDS 1.0738、发酵乳杆菌 KLDS 1.0740 则可显著下调 IL-4 和 IL-10 的分泌量 ($P < 0.05$)。

由图 2 可以看出: 5 株热致死乳杆菌组的 IFN-γ/IL-4 比值均高于相应的活菌组, 特别是热致死的嗜酸乳杆菌 KLDS 1.0738 和发酵乳杆菌 KLDS 1.0740 的 IFN-γ/IL-4 比值 (13.70 ± 2.00 、 9.82 ± 1.66) 显著高于其活菌组的比值 (10.62 ± 1.03 、 7.19)。

表1 灌服5种乳杆菌对致敏小鼠淋巴细胞分泌Th1/Th2型细胞因子的影响 (pg/mL n=3 $\bar{X} \pm SD$).

Table 1 Effect of 5 lactobacilli strains on Th1, Th2 cytokine production in β -Lactoglobulin-sensitized mice (pg/mL n=3 $\bar{X} \pm SD$)

groups	Th1 type cytokine		Th2 type cytokine		
	IL-12	IFN- γ	IL-4	IL-10	
blank	4.74 \pm 0.11	623.08 \pm 23.39	80.34 \pm 3.35	21.38 \pm 3.11	
allergy	4.18 \pm 0.10	344.87 \pm 29.87	103.19 \pm 4.36	89.71 \pm 4.03	
<i>L. johnsonii</i> KLDS 1.0731	Live cells	3.92 \pm 0.05	362.12 \pm 22.02	91.76 \pm 4.04	68.04 \pm 2.05*
	Heat-killed cells	3.86 \pm 0.123	515.38 \pm 35.25*	88.13 \pm 5.50*	71.79 \pm 3.12*
<i>L. acidophilus</i> KLDS 1.0738	Live cells	4.59 \pm 0.12	520.51 \pm 13.51*	49.29 \pm 4.81*	10.96 \pm 0.07*
	Heat-killed cells	4.52 \pm 0.07	608.97 \pm 17.34*	44.98 \pm 5.59*	8.46 \pm 0.12*
<i>L. fermentium</i> KLDS 1.0740	Live cells	4.33 \pm 0.03	517.95 \pm 9.68*	63.35 \pm 3.04*	32.21 \pm 1.19*
	Heat-killed cells	4.36 \pm 0.27	586.41 \pm 18.18*	53.45 \pm 5.26*	24.71 \pm 1.36*
<i>L. plantarum</i> KLDS 1.0724	Live cells	4.29 \pm 0.06	387.18 \pm 28.35	87.78 \pm 1.07*	37.21 \pm 2.06*
	Heat-killed cells	4.13 \pm 0.10	616.67 \pm 18.17*	74.02 \pm 2.43*	32.21 \pm 1.10*
<i>L. reuteri</i> CHM	Live cells	6.13 \pm 0.24	774.36 \pm 10.10*	56.87 \pm 3.10*	35.12 \pm 2.23*
	Heat-killed cells	7.46 \pm 0.12	712.41 \pm 18.23*	48.69 \pm 2.02*	22.16 \pm 1.10*

Statistically significant difference : * - vs allergy group. (P < 0.05)

± 0.40) ,且显著高于致敏组的 3.57 ± 0.45 (P < 0.05)。

2.2.3 乳杆菌对小鼠血清中抗体含量的影响:图3显示,BLG能够诱导小鼠产生的总IgE和BLG特异性IgE抗体水平升高。致敏组小鼠血清中总IgE含量达到139.66 ng/mL,显著高于空白组的55.18 ng/mL(P < 0.05)。

灌服活的/热致死的乳杆菌后可一定程度上抑制总IgE和BLG特异性IgE抗体的产生,特别是罗伊氏乳杆菌CHM、嗜酸乳杆菌KLDS 1.0738和发酵乳杆菌KLDS 1.0740组的总IgE和BLG特异性IgE值显著低于致敏组(P < 0.05),而且多数热致死的乳杆菌比活的菌株更显著地抑制了BLG特异性IgE的分泌(P < 0.05)。

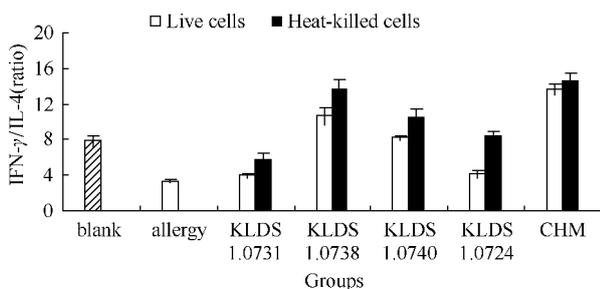


图2 灌服5种乳杆菌对致敏小鼠脾淋巴细胞IFN- γ /IL-4比值的影响 (n=3 $\bar{X} \pm SD$)

Fig. 2 Effect of 5 lactobacilli strains on IFN- γ /IL-4 ratio in β -lactoglobulin-sensitized mice (n=3 $\bar{X} \pm SD$).

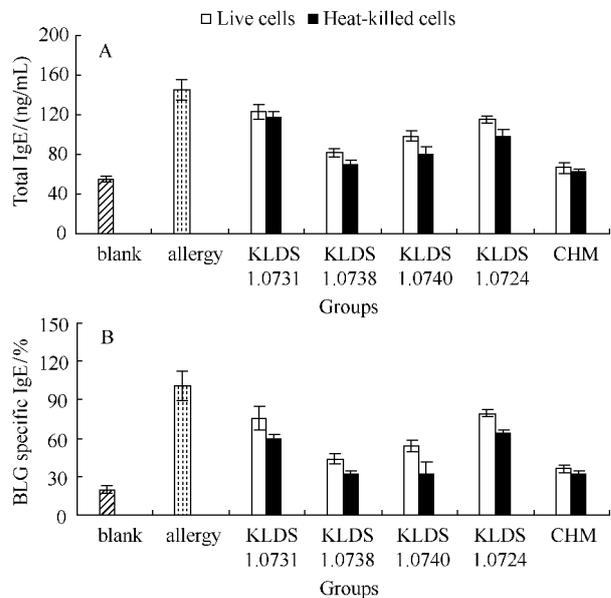


图3 灌服5种乳杆菌对致敏小鼠血清中总IgE(A)和BLG特异性IgE(B)的影响 (n=3 $\bar{X} \pm SD$)

Fig. 3 Effect of 5 lactobacilli strains on total IgE (A) and BLG-special IgE (B) levels in β -lactoglobulin-sensitized mice (n=3 $\bar{X} \pm SD$).

3 讨论

如何降低 β -乳球蛋白所致牛乳过敏症已成为现代乳制品生产中急待解决的问题,许多研究者希望能借助乳酸菌来有效减缓过敏反应。一般多认为

Th2 细胞占优势的 Th1/Th2 细胞失衡是过敏发病最重要的免疫学异常^[2]:即 Th2 细胞作为介导体液免疫的重要细胞,其数量增加、功能亢进的最终结果是诱导 B 细胞产生高水平的 IgE 应答和嗜酸性粒细胞活化,引起组胺、白三烯等多种炎性介质释放,导致过敏反应发生。因此,本研究着重探讨乳杆菌纠正 Th1/Th2 细胞失衡与减轻过敏反应的关系。

本实验通过建立 BALB/c 小鼠过敏模型,研究乳杆菌对 BLG 过敏的体内治疗效果。结果显示乳酸菌的免疫调节作用具有种(株)特异性,在体外可促进淋巴细胞分泌 IFN- γ 、抑制 IL-4,使其 IFN- γ /IL-4 比值显著高于正常对照组($P < 0.05$)的乳杆菌,在体内实验中也能有效刺激致敏小鼠的细胞产生 IL-12 和 IFN- γ ,降低 IL-4 水平,促进 Th1 型免疫应答,在抑制 IgE 介导的 β -乳球蛋白过敏炎症中发挥了重要作用。相反,在体外的 IFN- γ /IL-4 比值低于正常对照组的乳杆菌,不能逆转致敏小鼠体内 Th2 细胞过度亢进,并显著降低致敏小鼠血清中总 IgE 和 BLG 特异性 IgE 的水平($P < 0.05$)。

以往研究多关注活菌的免疫作用,目前越来越多的研究表明热致死的乳杆菌也能调节免疫应答,并具有抗过敏的作用。Segawa S 等人^[15-16]研究发现口服热致死的短杆菌可直接诱导致敏小鼠产生 IFN- γ 和 IL-12,抑制由 IL-4 诱导的 Th2 型免疫应答。Chu-Chyn Ou 等人^[17]发现使用不同的热处理温度和时间对乳酸菌进行灭活,可提高其分泌 IFN- γ 和 IL-12 的水平和对 Cao-2 细胞的粘附作用。本实验结果表明 5 株活/死的乳杆菌均可不同程度地干预致敏小鼠的 Th1/Th2 细胞平衡,且某些热致死乳杆菌比其活菌株更显著地抑制了 BLG 特异性 IgE 的分泌($P < 0.05$)。Sashihara T 等人^[18]指出乳杆菌发挥其免疫调节作用的原因之一来自于其细胞壁组分(如磷壁酸和肽聚糖),后者可以作为一种主要的病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP)被机体的固有免疫系统所识别,从而增强机体对外来抗原的反应。Chuang 等人^[19]分析乳杆菌在热致死过程中,菌体的细胞膜壁遭到破坏,也可能释放出细胞内与调节免疫活性相关的活性物质,但其具体的作用机制尚不清楚,有待进一步

研究。

本研究将体内实验筛选有效地结合在一起,实现了省时省力、节约成本的要求,有助于快速优选具抗过敏性能的目标菌株。另外,实验结果表明热致死乳杆菌抗过敏的能力丝毫不逊于活菌,由此推测,乳杆菌的菌体成份,而非菌的存活性,可能是其调节淋巴细胞免疫功能的决定因素。

参考文献

- [1] Caffarelli C, Baldi F, Bendandi B, Calzone L, Marani M, Pasquinelli P. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Pediatrics*, 2010, 36(5):1-7.
- [2] Adel-Patient K, Créminon C, Bernard H, Clément G, Négroni L, Frobert Y, Grassi J, Wal JM, Chatel JM. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine b-lactoglobulin BLG: development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 235(1-2):21-32.
- [3] Mansueto P, Montalto G, Pacor ML, Esposito-Pellitteri M, Ditta V, Lo Bianco C, Leto-Barone SM, Di Lorenzo G. Food allergy in gastroenterologic diseases: Review of literature. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(48):7744-7752.
- [4] Holger G, Harald R. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*, 2007, 212(6):441-452.
- [5] Sergio R. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?. *Immunology*, 2004, 112(3):352-363.
- [6] Forsythe P, Inman MD, Bienenstock J. Oral Treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 175(1):561-569.
- [7] Li CY, Lin HC, Hsueh KC, Wu SF, Fang SH. Oral administration of *Lactobacillus salivarius* inhibits the allergic airway response in mice. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56(5):373-379.
- [8] 李理 蔡琳,于宝丹 徐军. 口服乳酸菌对尘螨致敏小鼠脾细胞的免疫调节作用. 免疫学杂志(*Journal of Immunology*), 2011, 27(3):193-197.

- [9] 李艾黎,马冬雪,孟祥晨. 乳杆菌对原代淋巴细胞 Th1/Th2 平衡的影响. *细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)*, 2011, 27(4): 389-391.
- [10] Hougee S, Vriesema AJM, Wijering SC, Knippels LMJ, Folkerts G, Nijkamp FP, Knol J, Garssen J. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International archives of allergy and immunology*, 2010, 151(2): 107-117.
- [11] Inoue Y, Iwabuchi N, Xiao J Z, Yaeshima T, Iwatsuki K. Suppressive effects of *Bifidobacterium breve* strain M-16V on T-Helper Type 2 immune responses in a murine model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 32(4): 760-763.
- [12] 吴群, 邵洁, 俞善昌, 李云珠. 食物过敏动物模型中辅助性 T 淋巴细胞 1/辅助性 T 淋巴细胞 2 相关细胞因子变化. *实用儿科临床杂志 (Journal of Applied Clinical Pediatrics)*, 2007, 22(21): 1642-1643.
- [13] 曹晋宜, 韩军丽, 王友湘. 瑞士乳杆菌对小鼠肠道黏膜和肠组织中细胞因子影响的研究. *食品科学 (Food Science)*, 2009, 30(21): 338-342.
- [14] Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2004, 135(3): 205-215.
- [15] Segawa S, Hayashi A, Nakakita Y, Kaneda H, Watari J, Yasui H. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates the development of dermatitis and inhibits immunoglobulin E production in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(5): 884-889.
- [16] Segawa S, Nakakita Y, Takata Y, Wakita Y, Kaneko T, Kaneda H, Watari J, Yasui H. Effect of oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121(1): 1-10.
- [17] Ou CC, Lin SL, Tsai JJ, Lin MY. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *Journal of Food Science*, 2011, 76(5): 260-267.
- [18] Sashihara T, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(8): 2846-2855.
- [19] Chuang L, Wu K G, Pai C, Hsieh P S, Tsai J J, Yen J H, Lin M Y. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2007, 55(26): 11080-11086.

Screening of β -lactoglobulin allergy-modulating lactobacilli strains using *in vitro*-*in vivo* correlation

Aili Li¹, Xiangchen Meng^{1*}, Ling Guo¹, Dongxue Ma¹, Yan Wang²

¹ Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food College, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

² First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Abstract: [Objective] We investigated the correlation between the *in vitro* immune profiling of 5 lactobacilli strains and their *in vivo* protective effect in a mouse β -lactoglobulin (BLG) allergy model for selecting the candidate strains with potential anti-allergy activity. [Methods] *In vitro* immunomodulation was assessed by measuring interleukin (IL)-4 and interferon γ (IFN- γ) release by primary lymphocytes stimulated with 5 active/heat-killed lactobacilli. A mice model of β -lactoglobulin allergy was then used to evaluate the alleviating allergy capacity of the same set of strains. The rats were randomly divided into blank group, BLG allergy group and different lactobacilli strains group. The total IgE and BLG-specific IgE contents in the serum of rats were measured with ELISA. Splenic lymphocytes were isolated and cultured *in vitro*, the levels of Th1/Th2 type cytokine were detected by ELISA. [Results] Protection of BLG-induced allergy was strain-specific. The strains displaying an *in vitro* capacity to induce higher levels of the Th1 type cytokine (IFN- γ) and lower levels of the Th2 type cytokine (IL-4), significantly decreased the levels of total IgE and BLG-IgE in allergic rat serum ($P < 0.05$). In contrast, strains leading to a low IFN- γ /IL-4 cytokine ratio could not significantly attenuate allergic symptoms. [Conclusion] We could predict the *in vivo* protective capacity of the studied lactobacilli strains based on the cytokine profile established *in vitro*. Oral consumption of specific strain may be effective in preventing and alleviating BLG allergic symptoms by the improvement of the Th1/Th2 cell balance toward Th1 dominance, and the inhibition of IgE production.

Keywords: milk allergy, Lactobacilli strains, cytokine, Th1/Th2 cell balance

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China (31101267), by the Innovation Team Foundation of Northeast Agriculture University (CXT007-2-4) and by the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (20090460872)

* Corresponding author. Tel: +86-451-55191813; Fax: +86-451-55190340; E-mail: xchmeng@163.com

Received: 12 August 2011 / Revised: 25 November 2011