

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :484 - 491; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140288

双歧杆菌增强小鼠机体的免疫功能

范金波, 侯宇, 周素珍, 蔡茜彤

渤海大学食品科学研究所, 辽宁省食品安全重点实验室, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013

摘要: 【目的】本研究针对实验室自行从内蒙传统发酵乳制品中分离得到的两株双歧杆菌 *Bifidobacterium adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3, 对其调节机体免疫的功能进行了评价。【方法】采用健康 SPF 级 BALB/c 小鼠, 每组 10 只, 空白组灌胃无菌脱脂乳, 阳性对照组灌胃含有商业菌株 BB-12 的无菌脱脂乳, 处理组同样以无菌脱脂乳为溶液, 灌胃含有不同剂量的 *Bifidobacterium adolescentis* BB-2 或 *B. longum* BB-3, 测定细胞免疫 (迟发型变态反应 DTH、脾淋巴细胞增殖 MTT 显色反应、自然杀伤细胞活性), 体液免疫 (绵羊红细胞免疫后的血清溶血素活性), 以及非特异性免疫 (巨噬细胞吞噬活性) 指标。【结果】表明 BB-2 和 BB-3 两株双歧杆菌均能够增强 DTH 反应。双歧杆菌组小鼠的巨噬细胞的吞噬活性也有提高, 同时自然杀伤细胞活性及血清溶血素水平也高于对照组, 菌株处理组的脾淋巴细胞增殖率也有提高。剂量效应不显著, 其中低剂量浓度 (10^{2-6} cfu/mL) 即可发挥作用。【结论】证明双歧杆菌 BB-2 和 BB-3 能够促进小鼠先天性免疫力和获得性免疫力的提高。本研究的开展对开发我国具有自主知识产权的功能菌株具有重要意义。

关键词: 青春双歧杆菌, 长双歧杆菌, 细胞免疫, 体液免疫, 免疫促进

中图分类号: TS255.1 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0484-08

双歧杆菌是肠道益生菌的重要成员之一, 于 1899 年由法国人 H. Tisser 从母乳喂养儿的正常大便内首次发现。双歧杆菌作为人体重要的肠道益生菌之一, 在人体肠道内维持肠道正常菌群的生态平衡, 参与宿主的消化、代谢、吸收、免疫等过程, 抑制有害菌的繁殖。在国内外关于双歧杆菌益生菌株的研究报道中, 其最基础最重要的功能研究集中于免疫促进功能。免疫包括提高非特异性免疫力 (巨噬细胞吞噬活性和自然杀伤细胞活性), 体液免疫力 (抗体生成能力), 以及细胞免疫力 (淋巴细胞增殖活性)。健康正常的宿主免疫应答同时包括先天免疫应答和获得性免疫应答 (抗体介导的, 以及细胞

介导的) 的激活。我们设想双歧杆菌可能具有特别的免疫促进功能, 可同时促进先天性免疫力和获得性免疫力, 从而可以作为促进人体健康的保健食品组分。在我国, 双歧杆菌的研究起步较晚, 有关产品相对较少, 而且所用菌株都是进口产品, 国内具有自主权的优良双歧杆菌菌株亟待开发和完善。

本研究通过动物实验, 评价实验室从内蒙传统发酵乳制品中分离得到的双歧杆菌 BB-2 和 BB-3 对健康 BALB/c 小鼠多项免疫指标包括迟发型变态反应、巨噬细胞吞噬活性、抗体生成能力以及自然杀伤细胞活性的影响, 对双歧杆菌的机体免疫调节功能进行了全面评价, 并对菌株最佳作用剂量进行了系

统研究。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

RPMI-1640 培养基干粉, Gibco 公司; 青霉素、链霉素、Hepes、吩嗪硫酸甲酯 (PMS)、硝基氯化四氮唑 (INT), Amresco 公司; ConA、Giemsa 染料, Sigma 公司; 氧化型辅酶 I (NAD), Roche 公司; DL-乳酸锂、曲拉通 (Triton X-100), Merck 公司; 胎牛血清 (FBS), PAA 公司; MTT, Promega 公司; 绵羊红细胞 (SRBC), 北京大学医学部动物中心; 鸡 K562 细胞, 中国医学科学院基础医学研究所细胞中心; 豚鼠血清、都氏试剂, 中国医学科学院药用植物研究所。

游标卡尺, Mitutoyo 公司; UV-2102 紫外分光光度计, UNICO 公司; Bio-rad Model 680 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱, SANYO 公司。

1.2 动物实验设计

SPF 级 BALB/c 小鼠, 6 到 8 周龄, 雌性, 体重 18–22 g。饲养环境: 室温 22 ± 2℃, 12 h 灯照/黑暗循环, 自由饮水和摄食。小鼠随机分组, 每组 10 只, 适应性饲养 5 d 后, 空白组每只灌服 12% 脱脂乳 0.2 mL/d; 阳性对照组每只灌服商业菌株 *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 (10⁸ cfu/mL) 0.2 mL/d; 各剂量组每天分别灌服不同浓度的受试菌 *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 0.2 mL/d, 低剂量为 10⁶ cfu/mL, 中剂量为 10⁸ cfu/mL, 高剂量为 10¹⁰ cfu/mL, 以上各处理组是将菌株加入溶解到 12% 脱脂乳中。灌胃 4 w, 每周称 1 次体重。在处死前 5 d 腹腔注射 0.5 mL 2% (V/V) 的绵羊红细胞 (SRBC) 致敏。

1.3 迟发型变态反应 (DTH) 程度的测定

小鼠腹腔注射绵羊红细胞 4 d 后, 即处死前 1 d, 用游标卡尺测量左后足趾厚度, 在测量部位皮下注射 20% (V/V) 的 SRBC 每只 20 μL, 24 h 后再次测量左后足趾部厚度, 同一部位多次测量取平均值。以注射前后的足趾厚度差值来表示 DTH 的反应程度。

1.4 血清溶血素含量的测定

测定小鼠血清溶血素含量, 客观上能够反映小鼠的特异性体液免疫功能。小鼠处死前取血,

1800 × g 离心 10 min, 收集血清。血清样品用 0.9% 生理盐水稀释 500 倍, 豚鼠血清用生理盐水稀释 10 倍。每毫升稀释的血清添加 0.5 mL 10% SRBC (V/V), 以及 1 mL 豚鼠血清, 空白对照用生理盐水代替小鼠血清。将以上体系在 37℃ 孵育 30 min, 然后在 4℃ 以 2000 × g 离心 10 min 收集上清, 与反应终止液 (都氏试剂) 以 1:3 的比例混合, 用紫外分光光度计在 540 nm 下测定光密度值, 以 OD₅₄₀ 表示小鼠血清中溶血素的含量。

1.5 巨噬细胞吞噬能力的测定

小鼠取血后处死, 在超净工作台分离小鼠腹腔细胞液。巨噬细胞吞噬鸡红细胞 (CRBCs) 的活性采用 Giemsa 平板染色法测定^[1], 简述如下: 在腹腔细胞液中添加胎牛血清使其终浓度为 20% (V/V), CRBC 用生理盐水配成 1% (V/V) 的细胞液。将巨噬细胞液与 CRBC 等体积混合, 吹打均匀后快速滴加到用蜡笔或 3% 琼脂封闭边缘的玻片的封闭圈内, 使混合细胞液布满玻片。将玻片置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 20 min, 培养结束后迅速用生理盐水将未贴壁的巨噬细胞和未被吞噬的 CRBC 冲掉, 滴加甲醇固定 1 min。Giemsa 原液用 PBS 缓冲液稀释 8 倍, 均匀滴加到玻片上 (每张玻片 0.5 mL), 染色 15 min。用蒸馏水冲洗干净, 晾干。巨噬细胞吞噬活性用 60 倍光镜下计数被吞噬的 CRBC 数来表示。每张玻片计数 100 个巨噬细胞, 吞噬率为每 100 个巨噬细胞中吞噬 CRBC 的巨噬细胞所占的百分比。

1.6 自然杀伤细胞活性的测定

无菌取出小鼠脾脏, 用玻璃注射器内芯轻轻研磨脾组织, 使其通过 200 目筛网, 得到单核脾细胞。脾细胞液转移至离心管, 添加无菌水轻晃 20 s 以裂解其中的红细胞, 立即加入 2 × Hank's 液, 剩余的细胞 (脾淋巴细胞) 用 RPMI-1640 培养基洗涤 2 次, 重悬于完全 RPMI-1640 培养基中 (含 10% 胎牛血清, 100 IU/mL 青霉素, 100 mg/mL 链霉素), 调整细胞浓度为 2 × 10⁷ 个/mL。用比色法测定^[2]。

1.7 脾淋巴细胞的增殖

脾淋巴细胞的增殖采用 MTT 法测定^[3]。制备脾淋巴细胞, 用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 2 × 10⁶ /mL, 将脾细胞加入 96 孔板, 每孔 100 μL, 每孔再加入 100 μL 含有或不含有 ConA (终浓度 1.5 μg/mL) 的 RPMI-1640 完全培养基。含有 ConA 的

为刺激孔, 不含的为对照孔, 每个样品设 5 个刺激孔和 5 个对照孔。细胞在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。距离培养结束前 4 h, 每孔吸弃 70 μL 上清, 加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT。培养结束后, 每孔加入细胞裂解液 100 μL, 37℃ 过夜。用酶标仪在 570 nm 下测定各孔吸光值, 脾细胞增殖情况用增殖率表示, 用公式 (1) 计算。

增殖率 = (刺激孔 OD₅₇₀ - 对照孔 OD₅₇₀) / 对照孔 OD₅₇₀ × 100% 公式 (1)

1.8 双歧杆菌调节机体系统免疫能力的剂量效应

在按照成人推荐的酸奶摄食剂量换算的基础上, 将长双歧杆菌 *B. longum* BB-3 的剂量降低, 设计 10² - 10⁶ cfu/mL 的低剂量, 每日给小鼠灌服 0.2 mL, 并与之前较高剂量 (10⁶ - 10¹⁰ cfu/mL) 相比较, 测定指标相同。

1.9 统计分析

试验结果数据用均值 ± 方差表示。数据采用 SPSS 13.0 软件进行两因素方差分析和 Duncan 法多重比较, 两两比较差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 小鼠体重变化

在 4 周的喂养过程中, 各组小鼠的体重变化没有显著差异 (结果没有展示)。

2.2 双歧杆菌的免疫功能

2.2.1 迟发型变态反应 (DTH): 不同组小鼠的 DTH 反应值如表 1 所示。与对照相比, 用双歧杆菌 BB-2 和 BB-3 喂养的小鼠都表现出了足趾厚度增厚, 且差异显著 ($P < 0.05$)。灌喂不同剂量的 *B. adolescentis* BB-2 的小鼠, 其 DTH 反应的足趾厚度 (0.052 ± 0.005 cm, 0.052 ± 0.003 cm 和 0.049 ± 0.006 cm) 均显著高于对照组 (0.035 ± 0.002 cm)。3 个剂量的 BB-3 对小鼠足趾厚度变化的也有影响 ($P < 0.05$), 其中低剂量的作用 (0.078 ± 0.001 cm) 要高于中剂量 (0.073 ± 0.003 cm) 和高剂量 (0.069 ± 0.001 cm) ($P < 0.05$)。

尽管目前迟发型变态反应和获得性细胞免疫之间的关联还有争议, 但它们都是 T 淋巴细胞介导的免疫记忆力的体现^[4]。在本研究中, 用抗原 (绵羊红细胞) 攻击小鼠的后足趾, 皮肤接受相同抗原刺激后出现的肿胀厚度变化反映迟发型变态反应的强

度, 体现机体的 T 细胞免疫应答。与预想的相一致, 饲喂 *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 后, 小鼠以足趾厚度变化为标志的迟发型变态反应增强了, 充分证明摄入双歧杆菌能够促进机体细胞免疫应答。其他研究者也有相同的报道, 来自人体的商业双歧杆菌益生菌株 *Bifidobacterium lactis* Bi-07 能够提高迟发型变态反应^[5]。

表 1. 用 *B. adolescentis* BB-2、*B. longum* BB-3 以及脱脂乳喂养小鼠的细胞免疫指标

Table 1. Cellular immune response parameters of mice fed with *B. adolescentis* BB-2 and *B. longum* BB-3 and the control diet (skim milk)

Treatments	Toe thickness difference / cm
BB-2 (10 ⁶ cfu/mL)	0.052 ± 0.005 ^b
BB-2 (10 ⁸ cfu/mL)	0.052 ± 0.003 ^b
BB-2 (10 ¹⁰ cfu/mL)	0.049 ± 0.006 ^b
BB-3 (10 ⁶ cfu/mL)	0.078 ± 0.001 ^d
BB-3 (10 ⁸ cfu/mL)	0.073 ± 0.003 ^c
BB-3 (10 ¹⁰ cfu/mL)	0.069 ± 0.001 ^c
Skim milk	0.035 ± 0.002 ^a

The values are presented as means ± SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

2.2.2 血清溶血素含量的测定: 用绵羊红细胞免疫小鼠, 可以引发小鼠血清中的特异性抗绵羊红细胞的抗体的产生, 该抗体为溶血素, 能够导致绵羊红细胞的溶解。小鼠血清中的抗体溶血素水平由血清在 540 nm 下的光密度值 (OD₅₄₀) 表示。各组小鼠的血清样品光密度值如图 1 所示。与对照组相比 (0.136 ± 0.005), *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 的 3 个剂量组的小鼠血清的溶血素值显著升高 ($P < 0.05$)。对于 *B. adolescentis* BB-2 (图 1-A), 中剂量组和高剂量组的血清吸光值 OD₅₄₀ (0.457 ± 0.031 和 0.434 ± 0.044) 高于低剂量组 (0.238 ± 0.025) ($P < 0.05$)。对于 *B. longum* BB-3 (图 1-B), 3 个剂量组之间效果差异不显著 (0.315 ± 0.020, 0.296 ± 0.025 和 0.279 ± 0.055) ($P > 0.05$)。

用绵羊红细胞 (SRBC) 来免疫机体会导致血清中产生抗 SRBC 的特异性抗体, 这些抗体会对 SRBC 起溶血反应。本研究中, 小鼠口服双歧杆菌菌株 BB-2 和 BB-3 后, 血清中抗体对 SRBC 的溶血反应要显著强于对照组。SRBC 属于胸腺依赖型免疫原^[6]。本研究中血清溶血素含量的升高证明, 双歧杆菌菌株 BB-2 和 BB-3 增强了针对胸腺依赖型细胞

抗原的特异性抗体应答, 表明这两株双歧杆菌具有对体液获得性免疫力增强的作用。

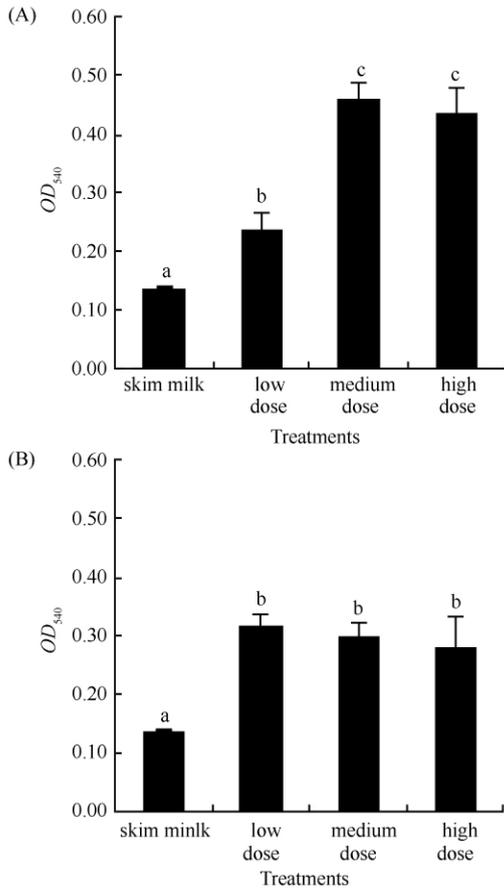


图 1. 灌喂 4 w 不同剂量的 *B. adolescentis* BB-2 (A) 和 *B. longum* BB-3 (B) 对血清中抗体溶血素含量的影响 (n = 10)

Figure 1. Effects on the amount of antibody lysozyme in serum of mice after 4 weeks of administration with *Bifidobacterium adolescentis* BB-2 (A) and *Bifidobacterium longum* BB-3 (B) of different dose: 2×10^{11} (high dose), 2×10^9 (medium dose), or 2×10^7 (low dose) CFU/kg body weight and the control diet (skim milk). The values are presented as means \pm SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

2.2.3 腹腔巨噬细胞的吞噬活性: 不同处理组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞 (CRBCs) 的吞噬活性如图 2 所示。由图 2-A 可以得到, 用 *B. adolescentis* BB-2 喂养的 3 个剂量组的小鼠, 腹腔巨噬细胞吞噬率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中中剂量组和高剂量组表现出来的吞噬率水平 ($71.0\% \pm 4.2\%$ 和 $71.0\% \pm 3.4\%$) 要高于低剂量组的吞噬水平 ($56.6\% \pm 4.0\%$) ($P < 0.05$)。对于 *B. longum*

BB-3 (图 2-B), 高、中、低 3 个剂量组的吞噬率 ($43.5\% \pm 6.3\%$, $42.0\% \pm 5.7\%$ 和 $39.8\% \pm 3.6\%$) 都显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但剂量组之间两两比较差异不显著。

灌服 *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 的小鼠, 其腹腔巨噬细胞的吞噬活性有了显著的提高。巨噬细胞的噬菌功能对于宿主抵御外来入侵病原体的过程, 是在早期发挥关键作用。一些研究表明^[7-9], 服用乳酸菌的特定菌株能够促进腹腔和肺部巨噬细胞的吞噬活性, 促进溶菌酶的分泌, 以及促进噬菌细胞分泌单核因子。还有研究报道, 人服用嗜酸乳杆菌 (Lal) 和双歧杆菌 (Bb12) 后, 粒细胞的吞噬活性显著提高^[10]。

2.2.4 自然杀伤细胞活性: 自然杀伤细胞活性由靶细胞释放的乳酸脱氢酶反应产物的光密度值 OD_{490} 的变化来表示。如表 2 所示, *B. adolescentis* BB-2 中剂量和高剂量处理组小鼠的自然杀伤细胞活性 ($54.55\% \pm 5.15\%$ 和 $58.08\% \pm 2.18\%$) 要高于对照组 ($48.91\% \pm 2.45\%$) ($P < 0.05$), 但中、高剂量两个处理组之间差异不显著。低剂量处理组与对照相比, 自然杀伤细胞活性变化不显著。对于 BB-3, 3 个剂量组小鼠的 LDH 释放量相对于对照组都有了提高, 差异性显著 ($P < 0.05$), 其中中剂量组 ($76.31\% \pm 9.70\%$) 和高剂量组 ($75.70\% \pm 4.26\%$) 的杀伤率高于低剂量组 ($60.31\% \pm 2.45\%$) ($P < 0.05$)。

在本研究中, 饲喂 *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 使小鼠脾脏自然杀伤细胞的杀伤活性显著增强。与很多前人的报道结论一致, Matsuzaki 等的研究证明, 新生小鼠和成年小鼠口服干酪乳杆菌 *L. casei* Shirota 后, 其脾细胞的自然杀伤活性显著提高^[11]。在人群试验中, 志愿者服用鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001, 干酪乳杆菌 *L. casei* strain Shirota, 或双歧杆菌 *Bifidobacterium lactis* strain HN019 3 周后, 外周血自然杀伤细胞的体外抑瘤活性显著升高^[12]。自然杀伤细胞是来源于骨髓的大颗粒淋巴细胞, 它们平时作为先天性免疫系统的效应细胞来进攻靶细胞。由于自然杀伤细胞能够识别肿瘤细胞中的正常细胞, 它们在机体抗肿瘤、抗病毒感染体系中提供第一道防线, 并发挥抑瘤监视作用。在一个长达 11 年的人群监测访问实验中, 无论男性和女性, 外周血淋巴细胞杀伤活性越

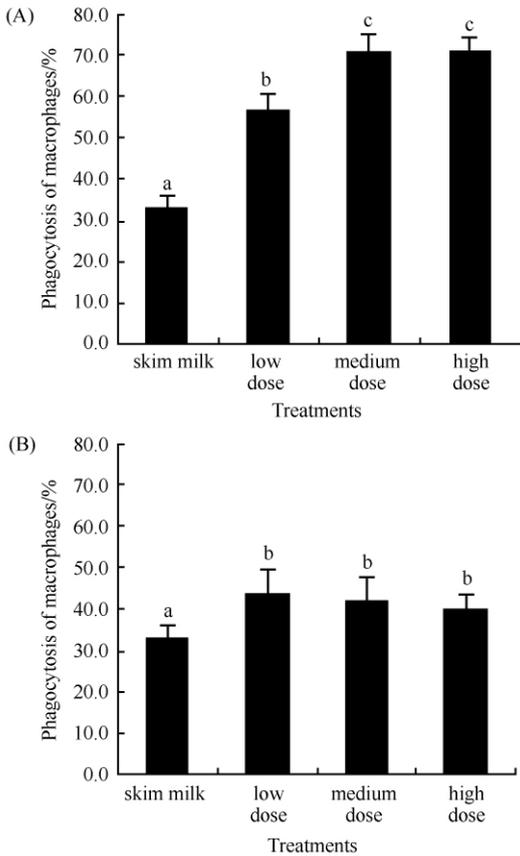


图 2. 灌喂 4w 不同剂量的 *B. adolescentis* BB-2 (A) 和 *B. longum* BB-3 (B) 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响 (n = 10)

Figure 2. Effects on the phagocytic activity of macrophages of mice after 4 weeks of administration with *Bifidobacterium adolescentis* BB-2 (A) and *Bifidobacterium longum* BB-3 (B) of different dose as follows: 2×10^{11} (high dose), 2×10^9 (medium dose), or 2×10^7 (low dose) CFU/kg body weight and the control diet (skim milk). The values are presented as means \pm SD (n = 10 mice per group).

高的人,其患癌风险就越低,这说明先天的免疫防御系统与癌症发生率之间有一定关联^[13]。*B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 很可能通过增强自然杀伤细胞的杀伤活性来激活机体的抗肿瘤功能。

2.2.5 脾淋巴细胞增殖:饲喂双歧杆菌对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响结果见表 2。在 ConA 刺激下,双歧杆菌 *B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 喂养的小鼠脾脏免疫细胞增殖活性均有提高 ($P < 0.05$)。饲喂低剂量 BB-3 的小鼠,其脾淋巴细胞的增殖率 ($41.6\% \pm 9.7\%$) 要显著高于中剂量和高剂量处理组 ($P < 0.05$)。相比之下,对于 BB-2 处理

组,中剂量和高剂量的增殖刺激率 ($38.6\% \pm 8.5\%$ 和 $41.4\% \pm 8.7\%$) 要高于低剂量组 ($26.0\% \pm 7.0\%$),差异性显著 ($P < 0.05$)。

淋巴细胞的增殖可能是冲刷清除病原微生物的一种机制,因此细胞增殖率提高可以增强粘膜再生^[14]。在我们的实验中,*B. adolescentis* BB-2 和 *B. longum* BB-3 能够作为有丝分裂原刺激脾淋巴细胞促进其增殖,这对于宿主免疫应答非常重要。由此可以推测,这些双歧杆菌菌株可能具有促进人体细胞免疫力的潜能。将来可以通过进一步的临床研究来探讨这些菌株对人类健康的影响。

表 2. 用 *B. adolescentis* BB-2、*B. longum* BB-3 以及脱脂乳喂养小鼠的细胞免疫指标
Table 2. Cellular immune response parameters of mice fed with *B. adolescentis* BB-2 and *B. longum* BB-3 and the control diet (skim milk)

Treatments	Natural killer cell activity /%	The lymphocyte proliferation rate /%
BB-2 (10^6 cfu/mL)	46.62 \pm 3.42 ^a	26.0 \pm 7.0 ^b
BB-2 (10^8 cfu/mL)	54.55 \pm 5.15 ^b	38.6 \pm 8.5 ^d
BB-2 (10^{10} cfu/mL)	58.08 \pm 2.18 ^b	41.4 \pm 8.7 ^d
BB-3 (10^6 cfu/mL)	60.31 \pm 2.45 ^b	41.6 \pm 9.7 ^d
BB-3 (10^8 cfu/mL)	76.31 \pm 9.70 ^c	31.2 \pm 8.8 ^c
BB-3 (10^{10} cfu/mL)	75.70 \pm 4.26 ^c	30.8 \pm 9.3 ^c
Skim milk	48.91 \pm 2.45 ^a	5.7 \pm 2.3 ^a

The values are presented as means \pm SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

2.3 双歧杆菌调节机体系统免疫能力的剂量效应

2.3.1 迟发型变态反应 (DTH):如图 3 所示,长双歧杆菌 BB-3 从最低剂量 10^2 cfu/mL 开始,各剂量处理组小鼠的足趾厚度差均高于对照组,且差异性显著 ($P < 0.05$)。随着剂量的升高,肿胀的程度也在逐渐增强, 10^6 cfu/mL 的剂量使肿胀度达到最高值,之后随着剂量的升高,肿胀厚度变化没有相应升高,但仍高于对照组 ($P < 0.05$)。结果证明,低剂量的 *B. longum* BB-3 能够提高淋巴细胞的增殖,引发迟发型变态反应。

2.3.2 血清抗体——溶血素的生成:如图 4 所示,长双歧杆菌 BB-3 从最低剂量 10^2 cfu/mL 起,各剂量处理组小鼠的血清溶血素吸光值都高于对照组,且差异性显著 ($P < 0.05$)。随着剂量的升高,溶血素含量逐渐增强, 10^6 cfu/mL 的剂量使血清中的溶血

素水平达到最高值,之后随着剂量的升高,溶血素含量没有继续升高,但仍高于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明 BB-3 能够提高血清中溶血素的生成量,增强对绵羊红细胞的溶解反应,从而增强小鼠机体的体液免疫应答。

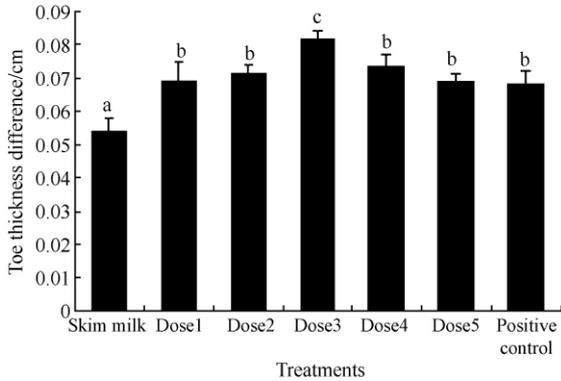


图 3. 不同剂量双歧杆菌 *B. longum* BB-3 对小鼠迟发型变态反应的影响 (n = 10)

Figure 3. DTH of mice fed with *B. longum* BB-3 with different doses and skim milk. Doses 1 – 5 were 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} cfu/mL. The values are presented as means \pm SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

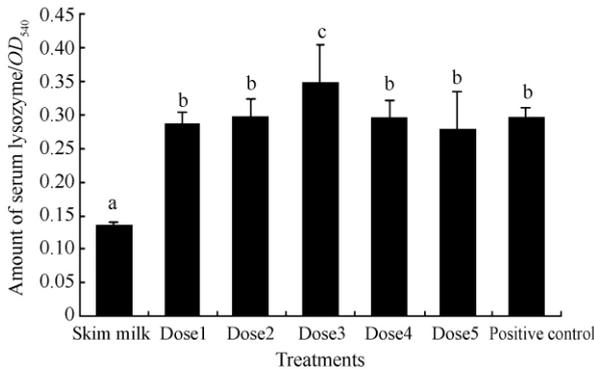


图 4. 不同剂量双歧杆菌 *B. longum* BB-3 对小鼠血清溶血度的影响 (n = 10)

Figure 4. Amount of serum lysozyme in of mice fed with *B. longum* BB-3 with different doses and skim milk. Doses 1 – 5 were 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} cfu/mL. The values are presented as means \pm SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

2.3.3 腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬能力:如图 5 所示,与对照组相比,最低浓度的 *B. longum* BB-3 处理组 (10^2 cfu/mL) 的巨噬细胞吞噬率有了提高

($P < 0.05$),且随着菌浓度剂量的升高,吞噬率逐渐升高;但剂量升高至 10^8 cfu/mL 时,吞噬率没有继续升高,达到顶峰;继续提高剂量至 10^{10} cfu/mL 时,吞噬率微高于对照组,但没有显著性差异。

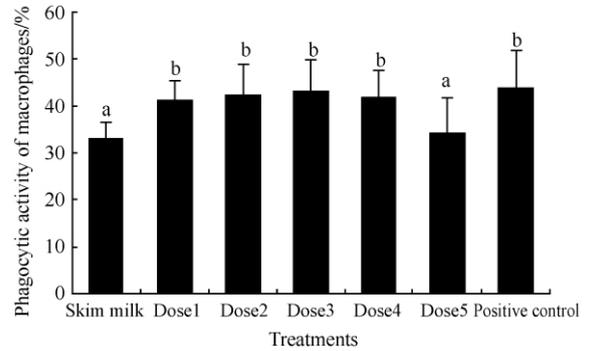


图 5. 不同剂量双歧杆菌 *B. longum* BB-3 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 (n = 10).

Figure 5. Phagocytic activity of macrophages of mice fed with *B. longum* BB-3 with different doses and skim milk. Doses 1 – 5 were 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} cfu/mL. The values are presented as means \pm SD (n = 10 mice per group).

2.3.4 自然杀伤细胞活性:如图 6 所示,长双歧 *B. longum* BB-3 的各个剂量处理组小鼠的自然杀伤细胞活性均高于对照组,差异性显著 ($P < 0.05$),且随着菌浓度剂量的升高,杀伤率逐渐升高, 10^8 cfu/mL 的剂量使杀伤率达到最高,用最高剂量 10^{10} cfu/mL 处理后,杀伤率没有相应升高,与 10^8 cfu/mL 的剂量得到的杀伤率差异不显著。

我国食品标准尚没有明确规定酸奶活菌数。在本研究首次喂养试验中,BALB/c 小鼠的最低剂量为 10^6 cfu/mL 的菌悬液,每天灌服 0.2 mL,即 10^7 cfu/kg 体重,相对应成年人每天平均饮用 400 g 酸奶所摄入的乳酸菌剂量^[15]。然而,本研究中在双歧杆菌提高健康 BALB/c 小鼠的机体免疫功能的同时,双歧杆菌的一些不同的剂量对此却表现出了近乎类似的效果,没有显著的剂量差异, 10^6 cfu/mL 的菌悬液即可以使机体免疫力显著提高。为了探明双歧杆菌的有效摄入量,我们将长双歧 *B. longum* BB-3 的剂量设为 10^2 – 10^6 cfu/mL,并与之前的高剂量进行比较,发现更低的剂量依然具有显著的免疫促进功能。长双歧杆菌 *B. longum* BB-3 在 10^2 – 10^6 cfu/mL 的剂量范围内,作用效果有随剂量升高而升高的趋势,剂量达到 10^6 cfu/mL 以后,效果没有继续增加,表现出持平状态甚至有下降趋势。这说

明双歧杆菌的服用效果具有峰值,持续提高摄入量并不会提高免疫指标数值。这可能是因为机体对于免疫应答有控制平衡的机制,如口服耐受,低剂量抗原能诱导相关细胞因子(IL-4、IL-10 和转化生长因子 TGF- β)的产生,抑制 Th1 细胞分化,使机体产生口服耐受;而高剂量抗原的诱导会导致克隆无能,使 T 细胞处于免疫不应答状态,不能分泌 IL-2 和增殖^[16]。

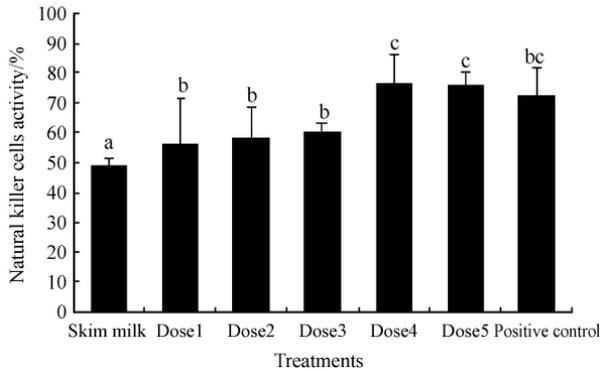


图 6. 不同剂量双歧杆菌 *B. longum* BB-3 对小鼠自然杀伤细胞活性的影响 (n = 10)

Figure 6. Natural killer cells activities of mice fed with *B. longum* BB-3 with different doses and skim milk. Doses 1–5 were 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} cfu/mL. The values are presented as means \pm SD. Columns that do not share the same superscript letter are significantly different from each other at $P < 0.05$ (n = 10 mice per group).

3 结论

本研究评估双歧杆菌菌株 *Bifidobacterium adolescentis* BB-2 和 *Bifidobacterium longum* BB-3 口服灌喂给健康 BALB/c 小鼠后对其机体免疫功能的影响。研究证明这两株菌均可以诱导淋巴细胞增殖,增强迟发型变态反应和血清溶血的生成,提高自然杀伤细胞活性以及腹腔巨噬细胞的吞噬活性。表明菌株能够增强机体先天性免疫力和获得性免疫力,并且较低剂量的菌株 ($10^2 - 10^6$ cfu/mL) 即可发挥免疫增强功能。

参考文献

[1] Ghoneum M, Gollapudi S. Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines in vitro. *Cancer Detection and*

Prevention, 2004, 28 (1): 17–26.

- [2] Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4 + CD25 + T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8 + and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clinical Immunology*, 2004, 112 (3): 258–267.
- [3] Bujalance C, Moreno E, Jimenez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113 (1): 28–34.
- [4] Baldrige JR, Barry RA, Hinrichs DJ. Expression of systemic protection and delayed-type hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* is mediated by different T-cell subsets. *Infection and Immunity*, 1990, 58 (3): 654–658.
- [5] Cai W, Cui A, Huang Q, Huang JK. Animal studies on enhancement of immune function by dietary probiotic supplementation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07. *Journal of China Microecology*, 2008, 2 (1): 17–19. (in Chinese)
蔡玫, 崔岸, 黄琼, 黄建康. 摄入含嗜酸乳杆菌 NCFM 和乳双歧杆菌 Bi-07 的益生菌补充剂增强免疫功能的动物实验研究. *中国微生态学杂志*, 2008, 2 (1): 17–19.
- [6] Koenen ME, Kramer J, van der Hulst R, Heres L, Jeurissen SHM, Boersma WJA. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *British Poultry Science*, 2004, 45 (3): 355–366.
- [7] Perdigon G, Nader De Macias ME, Alvarez S. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infection and Immunity*, 1986, 53 (2): 404–410.
- [8] Paubert-Braquet M, Gan XH, Gaudichon C, Hedef N, Serikoff A, Bouley C, Bonavida B, Braquet P. Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei* strains. *International Journal of Immunotherapy*, 1995, 11 (4): 153–161.
- [9] De Petrino SF, De Jorrrat MEBB, Meson O, Perdigon G. Protective ability of certain lactic acid bacteria against an infection with *Candida albicans* in a mouse immunosuppression model by corticoid. *Food and Agricultural Immunology*, 1995, 7 (4): 365–373.
- [10] Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F,

DonnetHughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 66 (2) : S515–S520.

- [11] Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*, 2000, 78 (1) : 67–73.
- [12] Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019) : Optimization and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 54 (11) : 849–855.
- [13] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K.

Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: An 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 2000, 356 (9244) : 1795–1799.

- [14] Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (6) : 3031–3034.
- [15] Donohue DC, Salminen S, Marteau P. Safety of probiotic bacteria. In: Salminen S, von Wright A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1998, 369–383.
- [16] 郭兴华, 曹郁生, 东秀珠. 益生乳酸细菌: 分子生物学及生物技术. 北京: 科学出版社, 2008, 124–125.

Effect of *Bifidobacterium* on the immunity in BALB/c mice

Jinbo Fan^{*}, Yu Hou, Suzhen Zhou, Xitong Cai

Research Institute of Food Science, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] We studied the system immunofunctions of two *Bifidobacterium* strains isolated from food. [Methods] There were 10 SPF BALB/c mice in each group. The control group was given only sterile skim milk. The positive control group was given sterile skim milk containing commercial strain BB-12. The treatment group was given sterile skim milk containing different dosages of *B. adolescentis* BB-2 or *B. longum* BB-3. The immune parameters including cellular immunity (delayed-type hypersensitivity [DTH], splenic lymphocyte proliferation and natural killer [NK] cell activity), humoral immunity (serum hemolytic activity in immunized animals), and nonspecific immunity (peritoneal macrophages phagocytosis) were measured. [Results] Ingestion of *B. adolescentis* BB-2 or *B. longum* BB-3 could increase the DTH response. Macrophage phagocytosis was also enhanced, while activities of the NK cells and levels of the serum hemolysin were also significantly higher than that in the control group. There was a significant increase in splenic lymphocyte proliferation in bifidobacteria treated mice compared to the control. [Conclusion] Ingestion of *B. adolescentis* BB-2 or *B. longum* BB-3 could enhance both innate and acquired immunity in healthy BALB/c mice.

Keywords: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, Cellular immunity, Humoral immunity, Immune enhancement

(本文责编: 张晓丽)

^{*} Corresponding author. Fax: +86-416-3719190; E-mail: jinbo_fan@hotmail.com

Received: 5 June 2014/Revised: 8 October 2014