微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
2018, 58(1): 73-82
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170029

Research Article 研究报告

干酪乳杆菌干预对花生过敏小鼠模型的免疫调节作用

张秋香，胡梦莎，任晟诚，陈卫*

江南大学食品学院，食品科学与技术国家重点实验室，江苏 无锡 214122

摘要：【目的】研究干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) Zhang 在预防及治疗花生过敏方面的作用。【方法】构建小鼠花生过敏模型，饲喂 *L. casei* Zhang，并检测血清中 IgE、IgG1 和 IgG2a 抗体，粪便中组胺和 IgA 抗体，细胞因子和 $CD4^+Foxp3^+$ Tregs 细胞的含量。【结果】与模型组相比，口服 *L. casei* Zhang 的实验组小鼠血清过敏原特异性的 IgG2a 和粪便总 IgA 抗体水平有所上调，花生过敏症状及 Th2 型反应(血清总 IgE、特异性 IgE、粪便组胺和 IL-4 水平等指标)明显降低。*L. casei* Zhang 的摄入对血清 IgG1 抗体和其他细胞因子(IL-10、IL-12 及 IFN-γ)的表达水平没有明显影响，而 IFN-γ/IL-4 的比例及实验组脾脏和肠系膜淋巴结中 $CD4^+Foxp3^+$ Tregs 细胞的表达增加。【结论】*L. casei* Zhang 能促使 Th2 优势反应向 Th1 方向转变，从而起到预防和治疗花生过敏的作用。

关键词：花生过敏，干酪乳杆菌，Th1/Th2 平衡，调节性 T 细胞，免疫调节

花生是重要的营养食品，作为食品添加剂、风味剂和起泡剂等广泛存在于多种食物当中。同时，花生也是一种非常重要的过敏原[1]。花生过敏主要影响人群为婴幼儿，一般不易随着年龄的增长而产生免疫耐受。在欧美等发达国家，大约有6%的婴幼儿对花生过敏，成人发生率为 3%–4%，而且这一比例逐渐上升[2]。中国协和医科大学变态反应科曾对北京地区的食物过敏患者进行了一项调查，约有 4%的食物过敏患者对花生过敏[3]。对于严重花生过敏的患者来说，0.1%个花生即可引起临床症状，会引起致命性的休克并危及生命。

花生过敏反应是由 IgE 介导的一类过敏反应，表现为体内 Th1/Th2 免疫失衡，IL-4 和 IL-10 等 Th2 型细胞因子表达显著增强，刺激 B 细胞生成过量的 IgE 抗体[4]，临床上表现为水肿、心律不齐、哮喘、腹痛腹泻和过敏性休克等多种病症。目前对于花生过敏的治疗尚无良策，唯一途径就是严格控制饮食，避免摄入过敏食物。但由于食品配料多样化、食品标签制度不够完善、食品加工过程中存在交叉污染等原因，日常生活中总有不少

基金项目：国家自然科学基金(31200691，31125021)
*通信作者。Tel：+86-510-85326771；Fax：+86-510-85912155；E-mail：chenwei66@jiangnan.edu.cn
收稿日期：2017-01-14；**修回日期：**2017-05-22；**网络出版日期：**2017-07-10

患者误食花生制品。近年来，许多研究者希望借助益生菌调整肠道菌群平衡以及调节免疫的特性来预防及减缓过敏反应，取得了一定的成果。艾春青等发现嗜热链球菌 CCFM218 可诱导 IL-10 的表达而抑制 IL-4 的产生，增加特异性 IgG2a 的产生，从而缓解小鼠尘螨过敏反应症状[5]。牛乳过敏的婴儿服用 4 周的鼠李糖乳杆菌 LGG 后，可增加外周血单核细胞中 IFN-γ 的含量，使免疫反应向 Th1 方向偏移[6]。乳酸菌的抗过敏作用具有菌株特异性，有的乳酸菌不仅不具有抗过敏作用，反而会增加过敏反应的程度[7]。干酪乳杆菌张 *Lactobacillus casei* Zhang 是一株分离自内蒙古传统酸马奶的乳酸菌，具有良好的酸性和胆盐耐受性，对体液及细胞免疫系统具有明显的调节作用[8]。但 *L. casei* Zhang 调节 Th1/Th2 免疫反应平衡的能力尚未见报道，因此本研究以 *L. casei* Zhang 为研究对象，采用 Balb/c 小鼠为模型，研究其对花生过敏反应的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 周龄雌性 SPF (Specific pathogen free)级 Balb/c 健康小鼠 24 只，购于上海市斯莱克实验动物有限公司。实验动物饲料由上海斯莱克实验动物有限公司提供。动物实验流程均经过江南大学动物管理和使用委员会许可，所有小鼠被饲养于恒温恒湿的动物房内，严格遵循 12 h 白天和 12 h 黑夜的循环标准，标准配方商业化饲料喂养，自由进水。

1.2 菌株和培养条件

本文所用菌株 *L. casei* Zhang 由内蒙古农业大学张和平教授赠送，于 MRS 培养基中 37 °C 静置培养。用于动物免疫时，在 37 °C 培养 16 h 后收集菌体，以冰预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次后，再以无菌 PBS 重悬，调整菌体浓度为 1×10^{10} CFU/mL。

1.3 花生粗蛋白的提取

参照文献[7]中的方法，稍有修改，具体步骤如下：100 g 去皮粉碎的花生(购于无锡市欧尚超市)中加入 250 mL 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液(pH 7.2)混匀。每隔 20 min 搅拌 1 min，2 h 后于 4 °C 以 3000 r/min 离心 30 min 收集水相。再次于 4 °C 下以 10000 r/min 离心 30 min，去除上层残留的脂肪和下层的不溶颗粒，留取中间层反复离心，得到澄清的花生粗蛋白(CPE)。SDS-PAGE 检测 CPE 蛋白的成分，以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Scientific Pierce，美国)检测 CPE 蛋白的浓度。

1.4 动物实验程序

24 只小鼠随机分为 4 组，分别为对照组、模型组、预防组和治疗组。整个实验过程分为预防、致敏、治疗和激发 4 个阶段，免疫程序见图 1。对照组小鼠只灌胃 PBS；模型组在预防和治疗阶段均灌胃 PBS，而在致敏阶段灌胃 6 mg CPE 和 10 μg 霍乱毒素(Cholera toxin，CT，Sigma)；预防组小鼠在预防阶段灌胃 0.2 mL *L. casei* Zhang (2×10^9 CFU)，而治疗组小鼠则在治疗阶段灌胃 0.2 mL *L. casei* Zhang。

1.5 花生过敏反应评分

激发后 30–60 min 内，对各组小鼠的花生过敏症状进行评价。根据文献[9]制定的过敏反应评分体系如下：0，无症状；1，搔扰头和鼻；2，腹泻，眼周、嘴部水肿，毛发直立，活动频率下降；3，口周紫绀，呼吸困难；4，刺激后无反应或仅有轻度反应，震颤及痉挛；5，死亡。

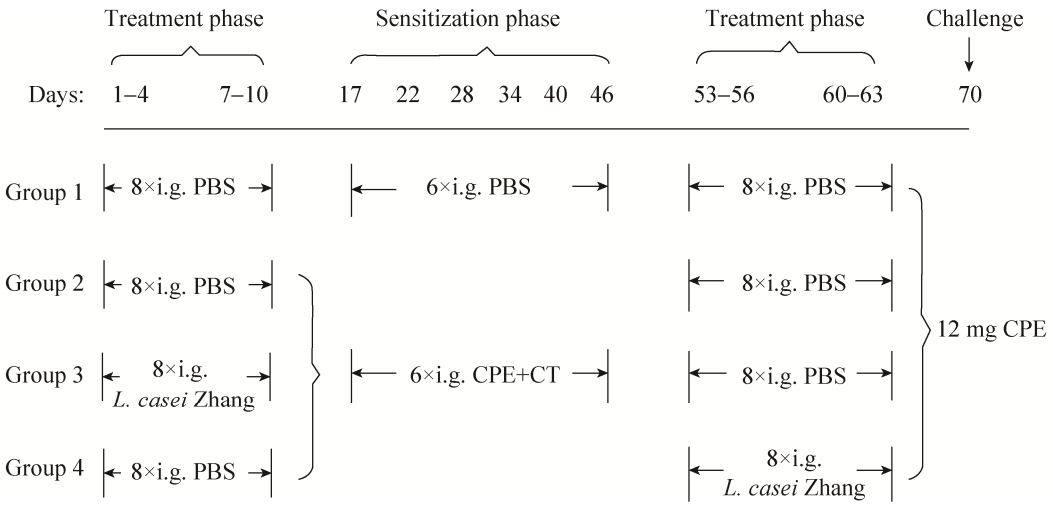

图 1. 免疫程序

Figure 1. The immunization protocol. Balb/c mice were randomly divided into 4 groups (n=6). Group 1: unsensitization group; Group 2: CPE-sensitization group, mice were sensitized i.g. with CPE together with CT over an 4-week period; Group 3: prophylactic group, i.e. *L. casei* Zhang administration prior to sensitization phase; Group 4: therapeutic group, i.e. *L. casei* Zhang administration after sensitizations phase.

1.6 粪便和血清样品采集

激发 30 min 后，收集各组小鼠的粪便。称取 0.1 g 粪便重悬于 1 mL 的 PBS 中，充分振荡后于 4 °C 下 7000 r/min 离心 5 min，取上清，于–20 °C 保存。

收集粪便后，摘除小鼠眼球取血。室温静置 2 h 后，于 4000 r/min 离心 10 min，小心取出上层血清于–20 °C 保存。

1.7 血清中总 IgE 抗体、IgG 抗体和单核细胞趋化蛋白-1 含量的检测

血清中总 IgE 抗体、总 IgG 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的含量采用 ELISA 试剂盒进行检测，参照说明书进行。

其中 MCP-1 是一种单核细胞趋化因子，能激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱粒，这两类细胞脱粒后释放标志物组胺。

1.8 血清中特异性 IgE、IgG1 和 IgG2a 抗体的检测

参照文献[10]的方法进行。用包被缓冲液将提取的 CPE 蛋白稀释到 10 μg/mL，在 96 孔板中每孔加入 100 μL，4 °C 包被过夜。洗涤后，于 37 °C 以封闭缓冲液封闭 2 h。再次洗涤，加 100 μL 适度稀释的小鼠血清(IgE 以 1:20 稀释，IgG1 以 1:10^5 稀释，IgG2a 按照 1:10^3 稀释)于已包被的反应孔中，分别设置空白对照和阴性对照(对照组血清，同比例稀释)，置 37 °C 孵育 1 h。分别加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgE、IgG1 和 IgG2a 二抗(1:6000)，37 °C 孵育 1 h。随后向反应孔中加入新鲜配置的 TMB 底物溶液，室温暗处放置反应 15 min 显色，以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450 nm 处检测吸光度。

1.9 粪便中组胺和 IgA 抗体的检测

小鼠粪便中组胺和 IgA 的含量使用 ELISA 试剂盒进行检测，具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.10 细胞因子的检测

参考文献[10]的方法进行。实验结束后断颈处死小鼠，分离得到小鼠脾脏及肠系膜淋巴结

(MLN)细胞，以完全 RPMI-1640 培养液(含 10%胎牛血清，1%青霉素/链霉素，1%谷氨酰胺)稀释成细胞悬浮液，将细胞悬浮液及终浓度为 200 μg/mL 的 CPE 加入到 96 孔培养板中，使每孔中细胞含量为 5×10^6 cells/mL，每个样品设 3 个重复。同时设置仅含完全 RPMI-1640 培养液的阴性对照孔，阳性对照孔添加终浓度 1 μg/mL 的 LPS。将 96 孔细胞培养板放入 37 °C、5% CO_2 培养箱饱和湿度条件下孵育 72 h，于 3000 r/min 离心 10 min 取上清，–70 °C 保存备用。IL-4、IL-10、IL-12 (p70)以及 IFN-γ 含量的检测均按照试剂盒说明书操作。

1.11 $CD4^+Foxp3^+$ Tregs 细胞的含量检测

参照文献[11]的方法进行。$CD4^+Foxp3^+$标记的 Tregs 细胞采用小鼠染色试剂盒进行染色，具体的方法及操作参照说明书，染色后的细胞用流式细胞仪进行分析。

1.12 数据处理

数据以均值±标准差表示。数据统计学差异采用 SPSS 20.0 软件进行 one-way ANOVA 分析，Duncan's 多重检验，$P<0.05$ 被认为有显著差异。

2 结果和讨论

2.1 花生粗蛋白提取

按照 1.3 中方法对去皮后的花生进行粉碎、蛋白抽提等操作，提取的花生粗蛋白用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行检测，其蛋白浓度为 28 mg/mL。

CPE 蛋白 SDS-PAGE 的电泳条带分布在 14–116 kDa 之间(图 2)。结合文献[12]可知，66 kDa 下方较粗的条带可能为 Ara h 1，其分子量约为 64 kDa；45 kDa 下方 3 条蛋白条带可能为 Ara h 3 (分子量在 42–45 kDa 之间)；Ara h 2 的条带位于

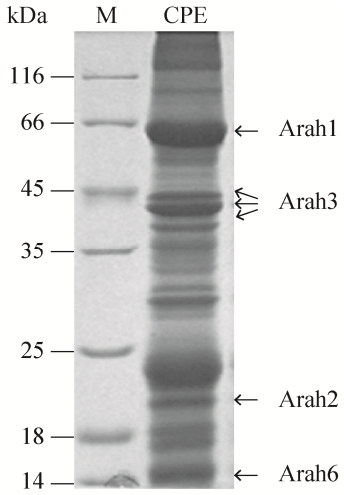

图 2. 花生粗蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 2. SDS-PAGE analysis of crude peanut extract.

18–25 kDa 之间，大小约为 19 kDa；位于 14 kDa 附近的条带可能为 Ara h 6。其中 Ara h 1 和 Ara h 2 被认为是最主要的花生过敏原，大约 90%的花生过敏患者对其过敏；Ara h 3 和 Ara h 6 分别能被 45%、63%的花生过敏患者所识别，也是主要的花生过敏原[13–14]。用含有这些主要过敏原的 CPE 对 Balb/c 小鼠进行致敏，为成功建立花生过敏模型提供了可能。

2.2 花生过敏症状评分

经 CPE 激发后，观察各组小鼠的过敏症状并评分，结果如图 3 所示。对照组小鼠行动灵活，偶有骚挠鼻子，粪便正常。而模型组小鼠过敏症状较为明显，出现频繁挠头搔耳、眼周水肿、腹泻等症状，其中 1 只小鼠还出现口周紫绀、呼吸困难的现象。

小鼠实验预防组与治疗组小鼠过敏症状较模型组轻微，频繁骚挠头鼻的行为普遍存在，但每组均仅有 1 只小鼠出现腹泻症状。结果表明，不论是预防组还是治疗组，灌胃 *L. casei* Zhang 均能显著减缓小鼠花生过敏症状。

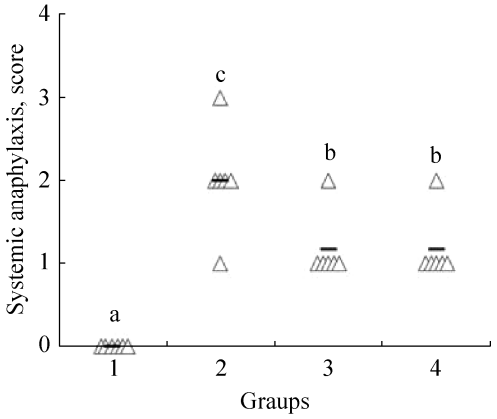

图 3. 花生过敏症状评分

Figure 3. Anaphylactic symptom scores. Symbols (△) indicate individual mouse (n=6). Bars indicate the medians. Group 1: unsensitization group; Group 2: CPE-sensitization group; Group 3: prophylactic group, i.e. *L. casei* Zhang administration prior to sensitization phase; Group 4: therapeutic group, i.e. *L. casei* Zhang administration after sensitizations phase. Bars indicate the medians. Different letters (a–c) represent significant differences between groups (P<0.05).

食物过敏模型建立成功与否的最大障碍是动物对摄入的抗原有强烈的免疫耐受倾向。对小鼠的各项研究表明，口服耐受与小鼠品系、周龄、抗原性质和剂量、使用的佐剂种类与剂量都有密切的关系[15]。霍乱毒素是一种有效的免疫佐剂，可激活 Th2 细胞产生 IL-4 和 IgE 抗体[16]。本实验选择 4 周龄雌性 Balb/c 小鼠，使用花生粗蛋白为免疫原，并以 CT 为佐剂，成功建立了小鼠花生过敏模型。

2.3 干酪乳杆菌对小鼠血清特异性抗体表达的影响

血清特异性 IgE 抗体水平是目前公认的检测 I 型过敏反应的最有效评价指标[17]。在小鼠体内，Th2 反应主要产生 IgE 和 IgG1 型抗体，而 Th1 反应则产生 IgG2a 型抗体[18]。为分析 *L. casei* Zhang 对过敏反应的抑制效果，本研究分别对小鼠血清中 CPE 特异性 IgE、IgG1 及 IgG2a 抗体的含量进行检测。相比对照组，模型组小鼠体内 CPE 特异性 IgE 的表达水平显著升高(表 1)，说明小鼠产生了明显的过敏反应。摄入 *L. casei* Zhang 明显降低了预防组和治疗组小鼠体内特异性 IgE 的表达水平，两者之间并无显著差异。Ai 等[5]的结果表明，表达过敏原的重组乳酸菌可以抑制过敏小鼠体内特异性 IgE 的表达，并表明这种抑制作用与重组菌株诱导产生的特异性 IgG2a 存在密切关系。在本研究中，预防组及治疗组的小鼠血清中特异性 IgE 表达下降的同时，特异性 IgG2a 的表达水平有明显的上调(表 1)。

特异性 IgG 抗体可以通过抑制特异性 IgE 与过敏原的结合、抑制过敏原信号的传递以及嗜碱性粒细胞中炎症因子的释放等途径缓解或抑制过敏反应，临床研究也发现过敏原特异性免疫治疗可以使过敏患者血清中 IgG 抗体的水平明显增加[19]。但在本研究中，尽管模型组和实验组中 CPE 特异性 IgG1 抗体水平远远高于对照组，但预防组和治疗组 CPE 特异性 IgG1 抗体水平与模型组相比无显著差异。Ren 等[10]的实验结果也发现重组乳酸菌对过敏小鼠体内特异性 IgG1 的表达并没有明显的影响。

表 1. 小鼠血清特异性抗体的水平

Table 1. Serum specific antibody levels in mice

Groups	CPE-specific antibody (OD_{450})		
	CPE-specific IgE	CPE-specific IgG1	CPE-specific IgG2a
Group 1	0.06±0.02[a]	0.06±0.04[a]	0.06±0.05[a]
Group 2	0.72±0.17[c]	1.22±0.15[b]	0.21±0.10[b]
Group 3	0.42±0.12[b]	0.96±0.48[b]	0.36±0.12[c]
Group 4	0.52±0.13[b]	0.96±0.40[b]	0.37±0.16[c]

Different letters (a–c) represent significant differences between groups (P<0.05).

2.4 干酪乳杆菌对小鼠血清总 IgE 抗体及粪便 IgA 抗体的影响

花生过敏是 IgE 介导的过敏反应，血清中 IgE 抗体是过敏反应发生的关键作用因子。与小鼠过敏症状的变化相对应，本研究中模型组小鼠的血清总 IgE 含量达到 2053.7 ng/mL(表 2)，超过对照组的 8 倍，而预防组和治疗组小鼠血清的总 IgE 含量分别降至模型组的一半左右，说明 *L. casei* Zhang 可显著降低花生过敏小鼠血清中总 IgE 水平，这与 Kim 等[20]的结果相似。

IgA 抗体在胃肠道防护中起着至关重要的作用，是肠粘膜主要的保护性抗体。肠道中 IgA 抗体含量较高能降低肠道炎症和 IgE 介导的过敏性疾病的发生率，而含量低或选择性 IgA 缺乏都容易引起过敏反应，同时 IgA 还能诱导机体对食物过敏原产生口服耐受[21]。由表 2 可知，模型组与对照组中 IgA 抗体水平基本接近，并没有明显的差别(P>0.05)；而经过 *L. casei* Zhang 的处理，小鼠粪便中 IgA 的含量较对照组和模型组均有明显的上升，表明 *L. casei* Zhang 可以顺利通过小鼠的胃部进入肠道，引发肠道黏膜的免疫应答，从而使相应的 IgA 抗体水平有所提高。

2.5 干酪乳杆菌对小鼠血清 MCP-1 和粪便组胺含量的影响

MCP-1 是一种单核细胞趋化因子，能激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱粒并释放组胺。组胺是引起过敏反应的重要介质，进入体液循环中能引起机体全身毛细血管扩张、血管通透性升高，产生局部水肿；使肺的气管平滑肌收缩，引起呼吸道狭窄进而呼吸困难[22]。与对照组相比，模型组小鼠血清中 MCP-1 的含量显著增加(P<0.05)。而摄入 *L. casei* Zhang 明显降低了预防组和治疗组血清中 MCP-1 的含量(图 4-A)。组胺含量的变化趋

表 2. 小鼠血清总 IgE 抗体和粪便总 **IgA** 抗体的水平

Table 2. Serum total IgE and fecal total IgA antibody levels in mice

Groups	Total IgE/(ng/mL)	Total IgA/(ng/mL)
Group 1	235.9±48.6[a]	68.9±0.6[a]
Group 2	2053.7±68.4[c]	69.8±4.5[a]
Group 3	1142.9±50.3[b]	81.5±2.2[b]
Group 4	1275.2±70.7[b]	81.6±1.4[b]

Different letters (a–c) represent significant differences between groups (P<0.05).

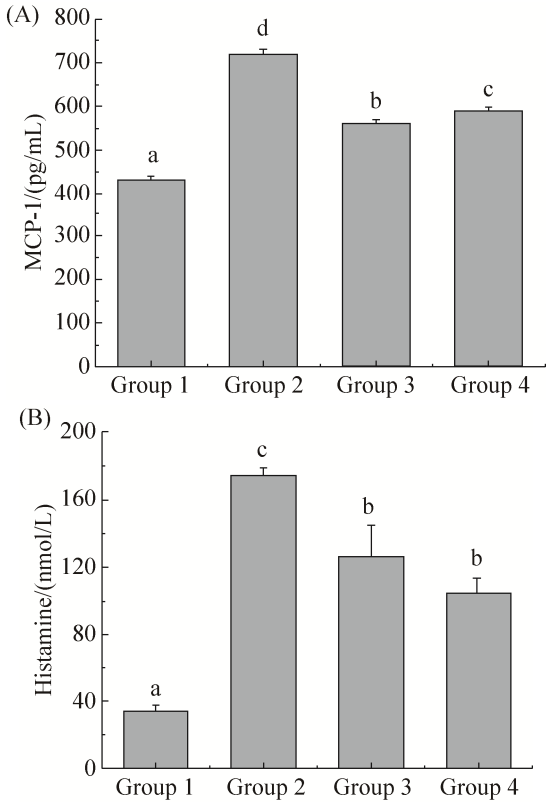

图 4. ***L. casei* Zhang 对小鼠血清 MCP-1(A)和粪便组胺(B)含量的影响**

Figure 4. Effects of *L. casei* Zhang on the serum MCP-1 (A) and fecal histamine (B) levels. Group 1: unsensitization group; Group 2: CPE-sensitization group; Group 3: prophylactic group, i.e. *L. casei* Zhang administration prior to sensitization phase; Group 4: therapeutic group, i.e. *L. casei* Zhang administration after sensitizations phase. Different letters (a–d) represent significant differences between groups (P<0.05).

势与 MCP-1 大致相同(图 4-B)，模型组小鼠粪便中组胺的含量为 173.9 nmol/L，是对照组中含量的 5 倍，而预防组和治疗组粪便中的组胺水平分别下降了 27.3%和 39.7%。这些结果表明 *L. casei* Zhang 能抑制肥大细胞和嗜碱性粒细胞的脱粒反应，减缓花生过敏反应。

2.6 干酪乳杆菌对过敏小鼠体内细胞免疫反应的影响

体液免疫中抗体的产生及表达水平的改变与细胞因子的表达之间存在着密切的联系。为探究 *L. casei* Zhang 是否通过调节过敏小鼠体内的细胞免疫反应抑制 IgE 介导的过敏反应，本研究对分离自不同组小鼠的脾脏和肠系膜淋巴结(MLN)中 T 细胞的反应能力进行了检测，其中 IL-4 是典型的 Th2 型细胞因子，IL-12 和 IFN-γ 是 Th1 型细胞因子，而 IL-10 是由调节性 T 细胞(Tregs)产生的细胞因子。如表 3 所示，实验组小鼠脾脏细胞释放的 IL-4 细胞因子水平明显低于模型组。同时，尽管释放的 Th1 型细胞因子并没有显著的变化，但是 IFN-γ/IL-4 的比例明显增加($P<0.05$)。小鼠 MLN 细胞中这些细胞因子的变化趋势与脾脏中大致相同(表 4)。此外，各组小鼠脾脏和 MLN 细胞释放的 IL-10 细胞因子水平的变化不明显。

其他研究者也发现服用益生菌或重组乳酸菌导致的小鼠过敏反应的降低与脾脏或肠系膜淋巴结内减少的 Th2 细胞因子的表达有关，这是因为 IL-4 可以促进 B 细胞的扩增及 IgE 的表达[23]。Shahid 等[24]指出，IFN-γ/IL-4 的比例可以用于评价 Th1 细胞与 Th2 细胞之间的平衡。在恢复 Th1/Th2 平衡的过程中，抑制 Th2 型细胞因子可能比促进 IFN-γ 的分泌发挥着更重要的作用。结合本实验结果，表明 *L. casei* Zhang 能下调 Th2 型细胞因子，促使花生过敏小鼠体内的 Th2 型免疫反应向 Th1 型反应转变。

表 3. 脾脏中细胞因子的水平

Table 3. Cytokine production of CPE-stimulated splenocytes

Groups	Cytokines/(pg/mL)				
	IL-4	IL-12 (p70)	IFN-γ	IFN-γ/IL-4	IL-10
Group 1	162.2±2.8^{a}	27.1±0.2^{a}	880.8±36.8^{a}	5.4±0.1^{a}	459.5±30.3^{a}
Group 2	255.3±8.1^{b}	31.2±2.1^{ab}	1304.6±42.6^{b}	5.1±0.1^{a}	586.0±18.0^{b}
Group 3	179.8±12.5^{a}	35.6±1.6^{b}	1227.6±66.3^{b}	6.8±0.3^{b}	627.2±40.2^{b}
Group 4	190.2±3.9^{a}	35.6±3.1^{b}	1264.6±65.0^{b}	6.7±0.2^{b}	634.0±49.9^{b}

Different letters (a, b) represent significant differences between groups ($P<0.05$).

表 4. 肠系膜淋巴结中细胞因子的水平

Table 4. Cytokine production of CPE-stimulated MLN cells

Groups	Cytokines/(pg/mL)				
	IL-4	IL-12 (p70)	IFN-γ	IFN-γ/IL-4	IL-10
Group 1	161.2±5.3^{a}	23.9±1.6^{a}	935.8±49.7^{a}	5.8±0.1^{ab}	475.4±11.7^{a}
Group 2	259.2±7.8^{b}	36.6±0.2^{b}	1364.7±144.7^{b}	5.3±0.4^{a}	570.5±2.0^{b}
Group 3	199.6±6.7^{a}	35.6±1.6^{b}	1286.5±25.6^{b}	6.5±0.1^{bc}	634.3±24.5^{b}
Group 4	185.4±17.7^{a}	39.1±4.6^{b}	1261.2±65.0^{b}	6.8±0.3^{c}	676.9±31.9^{bc}

Different letters (a–c) represent significant differences between groups ($P<0.05$).

2.7 干酪乳杆菌对脾脏和肠系膜淋巴结中 CD4$^+$Foxp3$^+$ Tregs 细胞表达的影响

益生菌对过敏反应的抑制作用与其对粘膜免疫系统中 Tregs 的诱导表达之间关系密切。先前的研究证实肠系膜淋巴结中的调节性 T 细胞是外周黏膜免疫耐受形成过程中不可或缺的重要组成部分，在维持机体免疫平衡、抑制有害免疫反应及维持对无害抗原的免疫耐受中扮演着重要的角色[25]。流式分析结果显示，与对照组相比，CPE 的刺激对脾脏和肠系膜淋巴结中 CD4$^+$Foxp3$^+$ Tregs 细胞的表达水平影响不明显，预防组和治疗组脾脏中 CD4$^+$Foxp3$^+$细胞的表达则分别达到了 15.22%和 15.70% (图 5-A)。与脾脏中结果类似，致敏后摄入 *L. casei* Zhang 增加了肠系膜淋巴结 CD4$^+$细胞中 Foxp3$^+$细胞的比例(13.01%，图 5-B)，但在预防组中的变化不明显。

Tregs 细胞在调控免疫应答方面有着很重要的作用，Tregs 数量及功能的不足可能是过敏免疫耐受缺陷的重要因素[26]。Tregs 细胞主要分为 2 种类型，一种是天然存在的 Tregs，即 nTregs；另一种是诱导的 Tregs，包括 Tr1 和 Th3 两种。Foxp3 是 nTregs 的特异性标志，转录因子 Foxp3 几乎专一表达于小鼠 nTregs[27]。Feleszko 等[28]的研究表明，早期接触 *L. rhamnosus* LGG 可减轻小鼠的过敏性哮喘症状，并伴随 T 细胞中 Foxp3 的表达增加。本研究结果也表明，*L. casei* Zhang 能增加 CD4+Foxp3+Tregs 细胞的数量。结合前面的脾脏与 MLN 中细胞因子产生的结果进一步证实，*L. casei* Zhang 可以使 Th2 型免疫反应向 Th1 型方向转变，从而减缓过敏反应。

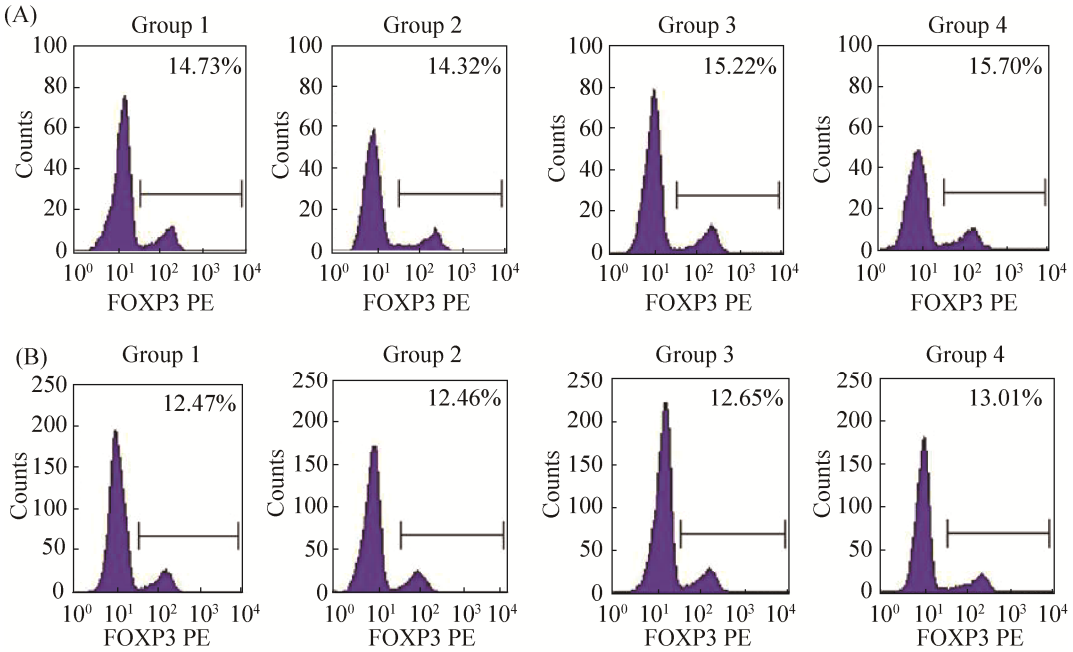

图 5. 小鼠脾脏(A)和 MLN(B)中 CD4$^+$Foxp3$^+$ Tregs 细胞的比例

Figure 5. The percentage of Foxp3$^+$ cells in CD4$^+$ T-cell population was analyzed by flow cytometry in spleen (A) and MLN (B) from mice of each group. Representative histograms gated on CD4$^+$ cells from one of three independent experiments were shown. Numbers indicate the percentages of cells in the gate.

3 结论

本研究成功建立小鼠的花生过敏模型，并利用该动物模型研究 *L. casei* Zhang 对花生过敏的影响。结果表明，口服 *L. casei* Zhang 可减轻小鼠过敏症状，并通过降低小鼠血清中总 IgE 抗体、CPE 特异性 IgE 抗体、MCP-1 和粪便中组胺水平，增加血清中 IgG2a 抗体起到抑制 Th2 型免疫反应的作用。同时，体外细胞实验结果也证实，实验组脾脏和MLN细胞释放的Th2细胞因子水平显著下调，IFN-γ/IL-4 的比例明显升高，表明 *L. casei* Zhang 可以使 Th2 型免疫反应向 Th1 型方向转变，从而减缓过敏反应。此外，*L. casei* Zhang 对于花生过敏能发挥一定的预防及治疗作用，但预防组及治疗组之间的差异不明显。

参 考 文 献

[1] Al-Muhsen S, Clarke AE, Kagan RS. Peanut allergy: an overview. *Canadian Medical Association Journal*, 2003, 168(10): 1279–1285.

[2] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(2 Suppl): S116–S125.

[3] Li H, Zhang HY. Analysis of sensitizing components for peanut allergen. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2001, 21(S2): 12–15. (in Chinese)
李宏, 张宏誉. 花生过敏原致敏组分分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(S2): 12–15.

[4] Burks AW. Peanut allergy. *The Lancet*, 2008, 371(9623): 1538–1546.

[5] Ai CQ, Zhang QX, Ren CC, Wang G, Liu XM, Tian FW, Zhao JX, Zhang H, Chen YQ, Chen W. Protective effect of *Streptococcus thermophilus* CCFM218 against house dust mite allergy in a mouse model. *Food Control*, 2015, 50: 283–290.

[6] Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala MO, Savilahti E. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-γ production in infants with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 114(1): 131–136.

[7] Meijerink M, Wells JM, Taverne N, de Zeeuw Brouwer ML, Hilhorst B, Venema K, van Bilsen J. Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization model. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 65(3): 488–496.

[8] Ya T, Zhang QJ, Chu FL, Merritt J, Bilige M, Sun TS, Du RT, Zhang HP. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunology*, 2008, 9(1): 68.

[9] Li XM, Srivastava K, Huleatt JW, Bottomly K, Burks AW, Sampson HA. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *The Journal of Immunology*, 2003, 170(6): 3289–3295.

[10] Ren CC, Zhang QX, Wang G, Ai CQ, Hu MS, Liu XM, Tian FW, Zhao JX, Chen YQ, Wang M, Zhang H, Chen W. Modulation of peanut-induced allergic immune responses by oral lactic acid bacteria-based vaccines in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(14): 6353–6364.

[11] Ai CQ, Zhang QX, Ding JR, Wang G, Liu XM, Tian FW, Zhao JX, Zhang H, Chen W. Mucosal delivery of allergen peptides expressed by *Lactococcus lactis* inhibit allergic responses in a BALB/c mouse model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 1915–1924.

[12] Koppelman SJ, Hefle SL, Taylor SL, de Jong GAH. Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative *in vitro* study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(12): 1711–1721.

[13] Van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LMJ. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clinical & Experimental Allergy*, 2004, 34(9): 1422–1428.

[14] Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, Knulst AC, Knol EF. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clinical & Experimental Allergy*, 2004, 34(4): 583–590.

[15] Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106(1): 150–158.

[16] Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 103(2): 206–214.

[17] Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology*, 2004, 127(1): 300–309.

[18] Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermúdez-Humarán LG, Corthier G, Wal JM, Langella P, Adel-Patient K. Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(3): 226–233.

[19] Daniel C, Repa A, Wild C, Pollak A, Pot B, Breiteneder H, Wiedermann U, Mercenier A. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid

bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy*, 2006, 61(7): 812–819.

[20] Kim H, Kwack K, Kim DY, Ji GE. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2005, 45(2): 259–267.

[21] Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T, Korpela R, Poussa T, Savilahti E. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2010, 21(1): 67–73.

[22] Bachert C. Histamine - a major role in allergy? *Clinical & Experimental Allergy*, 1998, 28(S6): 15–19.

[23] Schwarzer M, Repa A, Daniel C, Schabussova I, Hrncir T, Pot B, Stepankova R, Hudcovic T, Pollak A, Tlaskalova-Hogenova H, Wiedermann U, Kozakova H. Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy*, 2011, 66(3): 368–375.

[24] Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased interferon-γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, 165(9): 1290–1293.

[25] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, 133(5): 775–787.

[26] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009, 123(4): 735–746.

[27] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003, 4(4): 330–336.

[28] Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, Steinhausen S, Avagyan A, Jaudszus A, Ahrens B, Groneberg DA, Wahn U, Hamelmann E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 2007, 37(4): 498–505.

Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* on a murine model of peanut allergy

Qiuxiang Zhang, Mengsha Hu, Chengcheng Ren, Wei Chen*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the immunomodulatory potential of *Lactobacillus casei* Zhang on preventive and therapeutic effects. **[Methods]** A murine model of peanut allergy was established and fed with *L. casei* Zhang. Then we measured the levels of IgE, IgG1 and IgG2a antibodies in blood serum, histamine and IgA antibody in feces, and cytokines and $CD4^+Foxp3^+$ Tregs cells. **[Results]** Intragastric administration with *L. casei* Zhang, prior or after allergic sensitization, increased levels of serum allergen-specific IgG2a and fecal total IgA antibodies. Additionally, systemic anaphylactic symptoms and Th2 responses such as total and specific IgE antibodies, histamine release and IL-4 production were decreased. In contrary, *L. casei* Zhang had no obvious influence on the serum IgG1 antibody and other cytokines (IL-10, IL-12 and IFN-γ). Successful immunomodulation by pre- and post-treatment were further demonstrated by the increase of IFN-γ/IL-4 ratio *in vitro* and enrichment of $CD4^+Foxp3^+$ Tregs in spleen and mesenteric lymph nodes. **[Conclusion]** *L. casei* Zhang could shift the Th2 dominant response to a Th1 response, which finally play a role in preventing and treating peanut allergy.

Keywords: peanut allergy, *Lactobacillus casei*, Th1/Th2 balance, regulatory T cells, immunomodulatory effects

(本文责编：李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200691, 31125021)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85326771; Fax: +86-510-85912155; E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

Received: 14 January 2017; Revised: 22 May 2017; Published online: 10 July 2017