

双歧杆菌对正常小白鼠免疫调节及肠道菌群的影响

孟祥晨, 霍贵成

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 应用动物实验方法, 研究婴儿双歧杆菌和长双歧杆菌对正常小白鼠免疫功能的调节作用以及对肠道菌群的影响。结果发现, 两菌株对正常小白鼠体重、脾/体重和肾/体重比无显著性影响; 对肝/体重比有增加趋势; 能显著增加血液中 IgA, IgG, C₃, C₄, IL-2, IL-6 和 IL-8 的含量 ($P < 0.05$), 婴儿双歧杆菌效果优于长双歧杆菌; 婴儿双歧杆菌可极显著增加 IgM 的含量 ($P < 0.01$)。两菌株均可显著增加双歧杆菌 ($P < 0.05$) 和乳杆菌的数量, 显著降低肠杆菌的数量 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 两菌株对正常 BALB/C 小白鼠的免疫功能具有一定的正相调节作用, 并具有良好调节肠道菌群能力, 婴儿双歧杆菌效果优于长双歧杆菌。

关键词: 双歧杆菌; 免疫调节; 肠道菌群

中图分类号: S852.4; S865.1+3

文献标识码: A

双歧杆菌可以作为非特异性免疫调节因子, 通过细菌本身或细胞壁成分刺激并激活宿主免疫细胞, 使其产生促分裂因子, 促进吞噬细胞活力或作为佐剂发挥作用; 此外也可以发挥特异性免疫作用。其免疫调节途径有两种, 即全身性免疫调节作用和肠道免疫调节作用^[1]。

Nicase 研究了双歧杆菌菌体破碎后的可溶性提取物对巨噬细胞样细胞株的免疫调节作用, 发现该提取物能显著降低巨噬细胞溶菌酶活性, 增强巨噬细胞吞噬聚丙烯酰胺颗粒和活的沙门氏菌的能力^[2]。Schiffirin 用人体志愿者试验研究了乳酸菌的免疫调节作用, 分别给志愿者饮用添加两歧双歧杆菌的发酵酸奶 3 周后, 检测血中淋巴细胞亚群没有改变, 而白细胞在体外吞噬大肠杆菌的能力两者均增强^[3]。Sekine 发现婴儿双歧杆菌细胞壁肽聚糖能激活中性粒细胞和巨噬细胞, 增强抗肿瘤活性^[4]。此外, 双歧杆菌的肽聚糖还能增强小鼠

淋巴细胞活性和自然杀伤细胞 (nature killer cell, NK 细胞) 活性并诱生干扰素。

已有的研究表明, 双歧杆菌能影响免疫功能的某些环节, 这些影响涉及到免疫应答的 3 个方面, 即体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫。尽管国内外文献大量报道了双歧杆菌对免疫系统的影响, 但其机理仍不清楚, 而且不同实验条件下, 所测定的实验结果也有出入。但据估计, 双歧杆菌免疫调节作用机理一方面是通过肠道的粘膜免疫引起系统性免疫应答^[1], 另一方面是通过双歧杆菌的易位作用。

虽然已经证明了双歧杆菌能影响免疫功能的某些环节, 但其机理仍不十分清楚, 其作用是通过定植进而改变非特异性免疫, 还是通过全肽聚糖 (whole peptidoglycan, WPG) 和脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 的潜在调节, 抑或二者兼而有之, 仍需要进一步证明。需要进一步确定哪一过程被调节, 起调节作用的机制是什么, 进而明确消化道在人和动物机体免疫调节中的作用, 以及双歧杆菌定植对免疫功能作用的发挥是必需的还是非必需的。本试验的目的是研究所分离双歧杆菌对免疫功能的调节作用, 同时研究肠道菌群变化与

收稿日期: 2003-08-27

基金项目: 国家自然科学基金 (39870573) 和黑龙江省自然科学基金 (C00-19) 资助项目。

作者简介: 孟祥晨(1970-), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师。从事畜产品科学与技术方面的研究。E-mail: xchmeng@hotmail.com

免疫调节作用间的相互关系。

1 试验材料与方法

1.1 双歧杆菌菌株

婴儿双歧杆菌 *B. infantis*, (BI), 长双歧杆菌 *B. longum*, (BL), 为实验室内分离与鉴定。

1.2 实验动物

1.2.1 实验动物的来源

BALB/C 纯种雄性小白鼠, 购于上海中英合资西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.2.2 实验动物要求

6~8 周龄, 体重 20 g 左右。分组时同种品系随机分组。

1.2.3 实验动物饲养

供食方式: 自由采食 8 mm×20 mm 颗粒饲料。饲料配方及营养含量见表 1, 2。

表 1 饲料配方

Table 1 Ingredients of feeds

原料名称 Ingredient	比例 (%) Proportion	原料名称 Ingredient	比例 (%) Proportion	原料名称 Ingredient	比例 (%) Proportion
玉米 Corn	45	鱼粉 Fish flour	1	骨粉 Bone meal	2
豆饼 Soybean cake	20	酵母 Yeast	0.2	蛋氨酸 Methionine	0.2
面粉 Wheat flour	20	食盐 NaCl	1	多维 Multi-vitamin	0.02
麸皮 Wheat bran	10	植物油 Plant oil	0.5		

表 2 饲料营养含量

Table 2 Nutrients composition of feeds

名称 Name	含量 Content	名称 Name	含量 Content	名称 Name	含量 Content	名称 Name	含量 Content
消化能 Digest energy	13.06 MJ·kg ⁻¹	粗纤维 Fiber	4.20%	总磷 Total phosphorous	0.64%	蛋氨酸+胱氨酸 Methionine+cystine	0.79%
粗蛋白 Protein	17.70%	钙 Calcium	0.82%	赖氨酸 Lysine	0.82%	苏氨酸 Threonine	0.59%
				精氨酸 Arginine	0.98%	异亮氨酸 Isoleucine	0.61%

饮水采用瓶式自动饮水器, 自由饮用凉开水。

1.2.4 实验动物分组及处理

供试菌株: 两株双歧杆菌-婴儿双歧杆菌 (*B. infantis*, BI) 和长双歧杆菌 (*B. longum*, BL)。这两

株双歧杆菌分别在 TPY 液体培养基中培养 36 h, 取出后在 4 ℃, 12 000 g×15 min 的条件下离心收集菌体, 用无菌蒸馏水将菌液的浓度调至 10¹⁰ cfu·mL⁻¹。具体分组及处理情况见表 3。

表 3 分组及处理情况

Table 3 Groups and trial procedure

组别 Group	鼠的数量 (只) Number of sample	实验时间 Period of experiment	处理方式 Treatment	灌胃剂量 Dosage
对照组 Control	16	30 d	每日灌胃无菌蒸馏水, 全程 30 d	0.2 mL/只鼠
第一组 First group	17	30 d	每日灌胃婴儿双歧杆菌菌液, 全程 30 d	0.2 mL/只鼠
第二组 Second group	17	30 d	每日灌胃长双歧杆菌菌液, 全程 30 d	0.2 mL/只鼠

1.2.5 实验动物的管理

饲养室温度为 20±2 ℃，湿度为 60%，每日采光时间为 14 h，白天每隔 2 h 通风一次，夜间每隔 4 h 通风一次。用不锈钢食盒及塑料水瓶分笼饲养，每笼 4~5 只，自由摄食和饮水，每天早晚各添加饲料一次。实验开始和结束时各称体重一次。

1.3 实验方法

按照 1.2.4 实验动物分组及处理情况进行实验，实验期间按照 1.2.5 实验动物的管理方法进行实验。实验结束时，对小白鼠进行摘眼球取血，制备血清，用于测定免疫指标-白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)，IL-6，IL-8，肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)，IgA，IgG，IgM，补体 C₃，补体 C₄；对取血后的小白鼠进行解剖，取内脏 (胸腺、脾脏及肾脏)，计算脏/体比；取结肠和盲肠处的内容物进行小白鼠肠道菌群分析，包

括双歧杆菌、乳杆菌和肠杆菌的选择性计数。

1.3.1 血清的制备

血液收集于 2.5 mL 离心管中，放在离心管架上，37 ℃温箱中放置 2 h。血液凝固后用针将血块与管的边缘分开，放入 4~8 ℃冰箱中过夜，使血清充分析出。用无菌注射器取出血清，如有红细胞则需离心沉淀，将血清装于离心管中，-20 ℃低温保存，待测免疫指标。

1.3.2 肿瘤坏死因子的测定 (TNF)

试剂盒：缓冲液、抗 TNF 血清 (冻干品)、¹²⁵I-TNF (冻干品)、TNF 标准品、PR 分离剂。

本试剂盒采用液相竞争法，标记的 TNF 和待测样品中的 TNF 竞争性与特异性抗体结合，以 PR 试剂作为分离剂，操作简便，准确性和灵敏度高。

取聚苯乙烯试管编号，按表 4 操作。

加入分离剂后充分混匀，室温放置 20 min，4 ℃，

表 4 TNF RIA 加样程序 (μL)

Table 4 Procedure in determining TNF

试剂 Reagent	NSB	S ₀	S ₁ -S ₅	样品 Sample
缓冲液 Buffer	200	100	-	-
TNF 标准 Standard TNF	-	-	100	-
待测样品 Check sample	-	-	-	100
¹²⁵ I-TNF	100	100	100	100
抗 TNF 血清 Anti-TNF serum	-	100	100	100
充分混合后，4 ℃放置 24 h。				
PR 分离剂 Separative reagent of PR	500	500	500	500

3 500 r·min⁻¹ 条件下离心 25 min，吸弃上清液，在自动 γ 计数器上测放射性。由自动 γ 计数器预先编制程序，直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

1.3.3 白细胞介素-2 的测定 (IL-2)

试剂：IL-2 标准品、IL-2 抗血清 (冻干品)、¹²⁵I-IL-2、缓冲液 (PBS) (冻干品)、分离剂 (PR)。

本实验采用平衡法，取聚苯乙烯试管编号，按表 5 操作。

充分混匀，室温放置 20 min 后，4 ℃，3 500

r·min⁻¹ 条件下离心 25 min，吸弃上清液，在 γ 计数器上测定 cpm 值。由自动 γ 计数器预先编制程序，直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

1.3.4 白细胞介素-6 的测定 (IL-6)

试剂盒：IL-6 缓冲液、抗 IL-6 血清 (冻干品)、¹²⁵I-IL-6 (冻干品)、IL-6 标准品、PR 分离剂。测定原理、方法及结果计算同 1.3.3。

1.3.5 白细胞介素-8 的测定 (IL-8)

试剂盒：缓冲液 (PBS)、抗 IL-8 血清 (冻干品)、IL-8 标准品、¹²⁵I-IL-8 (冻干品)、PR 分离剂。

表 5 IL-2 RIA 加液程序 (μL)
Table 5 Procedure in determining IL-2

试剂 Reagent	T	NBS	S ₀	S ₁ ~S ₅	样品 Sample
缓冲液 Buffer	-	200	100	-	-
标准液 Standard IL-2	-	-	-	100	-
待测样品 Check sample	-	-	-	-	100
抗血清 Anti IL-2 serum	-	-	100	100	100
¹²⁵ I-IL-2	100	100	100	100	100
充分混合后, 4 °C 放置 24 h。					
PR 分离剂 Separative reagent of PR	-	500	500	500	500

测定原理、方法及结果计算同 1.3.3。

1.3.6 血清中免疫球蛋白 (IgA, IgG, IgM) 及补体 (C₃, C₄) 含量的测定

利用美国 Beckman 公司生产的 Array 360 System 进行测定。

原理：某一特定抗原与其相应的抗体反应，形成抗原-抗体免疫复合物颗粒。用 ARRAY 360 系统检测悬浮于缓冲液中的抗原-抗体免疫复合物颗粒。在抗体过量的前提下，通过光束时，悬浮颗粒所产生的散射光速率变化强弱与抗原浓度成正比。速率峰值经微电脑处理转换成抗原浓度。该测定方法具有敏感、精确、快速和简便的特点。全自动操作，一次可对 40 份标本进行 20 种免疫特定蛋白项目的检测。

1.3.7 消化道微生物区系分析

①样品采集：取肠内容物 0.1 g 加入盛有 9.9 mL 灭菌稀释液的试管中，盖好胶塞，震荡 2 min，充分混合样液；

②稀释：用稀释液按 10 倍梯度递减稀释；

③滴种：选择适宜稀释度滴种，一个稀释度加 10 μL 的样，每个稀释度滴 3 点；

④培养：待滴种的样滴吸干后，分别进行需氧和厌氧培养；

EMB 用来选择性计数肠杆菌，放 37 °C 温箱中

培养 24~48 h；

BS 和 LBS 分别用来选择性计数双歧杆菌和乳杆菌，放 37 °C 厌氧培养箱培养 48~72 h；

⑤观察结果并记录：根据菌落的可数性选择记录的稀释度；对在培养平板上生长的菌落根据需氧、厌氧、菌落形态、革兰氏染色及菌体形态，初步判定是否为预检测的目的菌，在上述判定的基础上，对分离菌作生化实验鉴定。

所获取的数据用 SAS 软件进行方差分析和邓肯氏极大复差法进行多重比较，检验误差水平为 0.05 和 0.01 水平。

2 结果与讨论

2.1 双歧杆菌对正常小白鼠免疫功能的调节作用

正常小白鼠分别用 BI 和 BL 灌胃 30 d，其免疫指标的变化情况见表 6。

由表 6 的数据可见，与对照组相比，两株菌对小白鼠脾/体重、肾/体重有降低趋势，但差异不显著。

相对于对照组说，两处理组都能增加小白鼠血液中 IgA 和 IgG 的含量，并且差异极显著 ($P < 0.01$)。虽然 BI 对这两个指标的影响均高于 BL，但不具有统计学意义。对于血液中 IgM 的含量，BI 组较对照组增加显著；而 BL 组与对照组相

表6 小白鼠肠道菌群的变化*

Table 6 Changes in the intestinal microflora of mouse

项目 Item	对照组 Control	婴儿双歧杆菌组 BI group	长双歧杆菌组 BL group
样本量 n Number of sample	9	9	10
脾重/体重 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Spleen/weight	5.66±3.56	4.93±0.89	5.31±1.86
肾重/体重 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Kidney/weight	15.56±0.72	15.40±1.09	15.56±1.07
IgA $\text{mg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	1.17±0.09 ^(b)	1.54±0.47 ^(a)	1.20±0.12 ^(b)
IgG $\text{mg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	1.09±0.17 ^(b)	1.52±0.51 ^(a)	1.07±0.17 ^(b)
IgM $\text{mg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	3.14±1.51 ^{ab}	3.87±1.80 ^a	2.52±0.47 ^b
C ₃ $\text{mg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	1.03±0.13 ^(b)	1.74±0.77 ^(a)	1.12±0.20 ^(b)
C ₄ $\text{mg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	0.73±0.09 ^(b)	1.25±0.53 ^(a)	0.85±0.21 ^(b)
IL-2 $\text{ng}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	3.26±0.22 ^(b)	3.83±0.33 ^(a)	3.66±0.48 ^(a)
IL-6 $\text{pg}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	47.86±18.69 ^(b)	76.09±17.02 ^(b)	102.62±31.20 ^(a)
IL-8 $\text{ng}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$	0.61±0.08 ^(b)	0.57±0.08 ^(b)	0.79±0.11 ^(a)

* 同行数据角标完全不同表示差异显著, 检验误差为 0.05 水平, 括号内标注的为 0.01 水平。

The same line data angle sign completely different expression difference is remarkable, the examination error is 0.05 level, the parenthesis internal standard note is 0.01 level.

比稍有下降, 但不具有统计学意义。对于补体 C₃ 来说, BI 组与对照组相比, 差异极显著 ($P<0.01$); 而 BL 组与对照组相比, 稍有增加, 但差异不显著。

对于白细胞介素-2 (IL-2) 和白细胞介素-8 (IL-8), 不论是 BI 组还是 BL 组与对照组相比, 差异都极显著 ($P<0.01$), 但两菌株之间差异不显著。

对于白细胞介素-6 (IL-6) 来说, BI 组和 BL 组与对照组相比, 差异均显著 ($P<0.05$); 并且两菌株之间, BL 组显著高于 BI 组 ($P<0.05$)。

分析以上结果认为: BI 和 BL 对小白鼠对脾/体重比和肾/体重比无显著影响; 两处理组能显著增加血液中 IgA, IgG, C₃, C₄, IL-2, IL-8 等的含量 ($P<0.05$), 并且 BI 的影响效果优于 BL; 对于 IgM, BI 的影响效果显著高于对照组 ($P<0.01$), BL

的影响效果与对照组差异不显著; 对于 IL-6, BL 的影响效果显著高于对照组和 BI 组 ($P<0.05$), BI 的影响效果显著高于对照组 ($P<0.05$)。综合以上几个指标可以看出: 正常 BALB/C 小白鼠的免疫功能在一定程度上受两株双歧杆菌的影响, 并且 BI 的效果优于 BL。

2.2 双歧杆菌对正常小白鼠肠道菌群的影响

实验中分别分析了小白鼠结肠和盲肠内容物中双歧杆菌、乳杆菌和肠杆菌菌数变化情况, 结果见表 7。由表 7 可以看出, 盲肠中微生物的数量均稍高于结肠。对于小白鼠结肠内容物来说, BI 组和 BL 组与对照组相比, 双歧杆菌数量显著增加 ($P<0.05$); 肠杆菌数量显著下降 ($P<0.05$), 而乳杆菌有轻微增长趋势, 但差异不显著。两菌株之间对肠道菌群的影响无显著性差异。

表 7 小白鼠肠道菌群的变化*

Table 7 Changes in the intestinal microflora of mouse

项目 Item	样本量(n) Number of sample	乳杆菌 <i>Lactobacillus</i>	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	肠杆菌 <i>Enterobacteriaceae</i>
结肠内容物 Colon content				
对照组 Control	10	8.88±0.50	7.63±0.51 ^(b)	6.20±0.35 ^a
婴儿双歧杆菌组 BI group	14	9.07±0.23	8.24±0.31 ^(a)	5.88±0.25 ^b
长双歧杆菌组 BL group	12	8.95±0.28	7.88±0.45 ^(ab)	5.89±0.26 ^b
盲肠内容物 Appendix content				
对照组 Control	10	9.00±0.36	7.86±0.37 ^(b)	6.20±0.21 ^(a)
婴儿双歧杆菌组 BI group	14	9.15±0.34	8.18±0.13 ^(a)	5.87±0.20 ^(b)
长双歧杆菌组 BL group	12	9.23±0.31	8.23±0.27 ^(a)	5.75±0.26 ^(b)

* 同列数据角标完全不同表示差异显著, 检验误差为 0.05 水平, 括号内标注的为 0.01 水平。

The same row data angle sign completely different expression difference is remarkable, the examination error is 0.05 level, the parenthesis internal standard note is 0.01 level.

已有的一些研究表明^[5-7], 喂给动物双歧杆菌发酵乳能改变肠道菌群的组成和数量。其中双歧杆菌数量增加, 而肠杆菌的数量下降, 与本试验结果具有一致性, 但外源双歧杆菌对肠道菌群的调整机制仍不明了^[5]。通过对双歧杆菌标记的研究, 发现其数量的增加是由于摄取的双歧杆菌, 然而 Bouhnik 却认为这是双歧杆菌繁殖的结果^[7]。虽然双歧杆菌对肠道菌群调整的机制还不明确, 但有人推测可能与乙酸和乳酸的产生有关^[8], 但在中, 婴儿双歧杆菌的产酸能力是最弱的, 而其对肠道菌群的调节能力却优于长双歧杆菌, 所以可认为, 双歧杆菌在肠道菌群调整中的作用不仅仅是由于其产生的乙酸和乳酸, 仍存在其它机制, 有待于进一步深入研究。

此外, 通过本研究还发现, 所试验的两株双歧杆菌在免疫调节能力和肠道菌群调节能力上具有一致性, 因此有可能是双歧杆菌通过调节肠道菌群的组成, 即增加有益菌的数量、降低有害菌的数量, 来提高机体肠道非特异性免疫防御机能, 进而对整个机体的免疫功能产生影响。

前人在研究双歧杆菌肠道免疫调节作用中发现, 消化道不仅是营养物质消化吸收的场所, 而且是免疫反应的最前线。拥有正常肠道菌群的完整肠粘膜上皮是避免病原菌、抗原和其它异物由肠腔侵入的屏障。除此之外, 肠粘膜还是有效摄取抗原的场所, 这是因为在肠绒毛上皮内特别是肠淋巴结群 (Peyer's patches) 内具有专门的抗原呈递机制, 对诱导特异性免疫应答至关重要。

3 结 论

a. 所试验的两株双歧杆菌对正常小白鼠的免疫功能在一定程度上具有正相调节作用, 同时可以改善小白鼠肠道菌群的结构和数量。其中婴儿双歧杆菌的效果优于长双歧杆菌。

b. 双歧杆菌有可能通过通过调节肠道菌群来提高机体肠道非特异性免疫防御机能, 进而对整个机体的免疫功能产生影响。

参 考 文 献

- [1] 康白. 双歧杆菌 [M]. 大连: 大连海事大学出版社, 1998.
- [2] Nicase P. Influence of intestinal bacteria flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF- α) production by mouse peritoneal macrophages[J]. Eur Cyt Network, 1993, (4): 133-138.
- [3] Schiffrin E J. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 74: 1187-1195.
- [4] Sekine K, Ohta, Onishi M, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation(WPG) of *Bifidobacterium infantis* [J]. Biol Pharm Bull 1995, 18(1): 148-153.
- [5] Benno Y. Impact of *Bifidobacterium logum* on human fecal microflora [J]. Microbiology Immunology, 1996, 36: 683-694.
- [6] Ballongue J. Action sur la flora intestinale de laitiers fermentes on *Bifidobacterium* [J]. Lait, 1993, 73: 249-256.
- [7] Bouhnik Y. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium*

sp. Ingested in fermented milk [J]. *Gastroenterology*, 1992, 102: 875-878.

[8] Kantha D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology [J]. *Nutrition Research*, 1999, 19(10): 1559-1597.

The effect of *Bifidobacterium* on immunity and intestinal microflora of normal mouse

MENG Xiang-cheng, HUO Gui-cheng

(Food College, Northeast Agricultural University, Harbin Heilongjiang 150030, PRC)

Abstract: The immunomodulation of *B. infantis* and *B. longum* on the immunity of normal mouse, together with the effect of *B. infantis* and *B. longum* on the intestinal microflora were investigated. It was found that two strains had no significant effects on weight, spleen/weight and kidney/weight. There was increase trend in respect of live/weight. IgA, IgG, C₃, C₄, IL-2, IL-6 and IL-8 in serum increased significantly ($P < 0.05$). Meanwhile the effects of *B. infantis* were better than that of *B. longum*. IgM increased significantly ($P < 0.01$) when mouse were treated with *B. infantis*. The amounts *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in colon and appendix contents were improved significantly ($P < 0.05$), and the amounts of *Enterobacteriaceae* went down significantly ($P < 0.05$) when mouse were treated with *Bifidobacterium*. The results showed that immune functions of normal mouse treated with *B. infantis* and *B. longum* were positively modulated to certain extent and the two strains had good ability of modulation on intestinal microflora. The effects of *B. infantis* were better than that of *B. longum*.

Key words: *Bifidobacterium*; immunomodulation; intestinal microflora