

• 论著 •

## 嗜酸乳杆菌对 U14 荷瘤小鼠免疫功能的影响\*

李秀真, 曹卉, 王晖, 薛庆节, 吕厚东, 陈廷\*\*

(济宁医学院病原生物学教研室, 山东济宁 272067)

**【摘要】** 目的 研究嗜酸乳杆菌(LA)对宫颈鳞癌 U14 荷瘤小鼠抑瘤作用及其免疫功能的影响。方法 建立 KM 小鼠 U14 移植瘤模型并随机分组检测各组抑瘤率和脾指数,以 MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞增殖活性,采用红细胞 C3b 受体花环及红细胞免疫复合物花环试验检测小鼠红细胞免疫粘附能力。结果 LA 对 U14 荷瘤小鼠的瘤体生长有显著抑制作用,抑瘤率 48.18%。LA 组和模型组脾指数分别为  $8.36 \pm 2.19$  和  $5.49 \pm 1.09$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 脾淋巴细胞增殖率分别为  $(25.10 \pm 4.33)\%$  和  $(12.90 \pm 3.14)\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); C3bRR 及 ICR 分别为  $(4.99 \pm 1.15)\%$ 、 $(2.63 \pm 1.84)\%$  和  $(3.67 \pm 1.20)\%$ 、 $(8.86 \pm 4.14)\%$ , 差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 LA 可通过增强机体红细胞免疫粘附功能和淋巴细胞免疫活性发挥对 U14 的抑瘤作用。

**【关键词】** 嗜酸乳杆菌; U14 荷瘤鼠; 红细胞免疫; 淋巴细胞增殖活性

**【中图分类号】** R378.99 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2013)09-0787-03

[Journal of Pathogen Biology. 2013 Sep; 8(9): 787-789.]

Effects of *Lactobacillus acidophilus* on immune function in U14-bearing mice

LI Xiu-zhen, CAO Hui, WANG Hui, XUE Qing-jie, LV Hou-dong, CHEN Ting (Department of Pathogen Biology, Jining Medical College, Jining 272067, Shandong, China)

**【Abstract】 Objective** To study the antitumor activity of *Lactobacillus acidophilus* (LA) and its effects on immune function in U14-bearing mice. **Methods** U14-bearing KM mice were randomly divided into 2 groups, one treated with *L. acidophilus* and a control group. The tumor inhibition rate and spleen index of each group were measured. An MTT assay was used to measure splenic lymphocyte proliferation. Erythrocyte immunity function was evaluated using the rosette-forming rate of erythrocyte C3b receptor (C3bRR) and of immunity complex (ICR). **Results** Treatment with *L. acidophilus* markedly inhibited tumor growth in U14-bearing mice, which had a tumor inhibition rate of 48.18%. The spleen index differed significantly ( $P < 0.05$ ) for mice treated with *L. acidophilus* ( $8.36 \pm 2.19$ ) and the control group ( $5.49 \pm 1.09$ ). Splenic lymphocyte proliferation was significantly greater ( $P < 0.01$ ) in mice treated with *L. acidophilus* ( $25.10 \pm 4.33$ )% compared to the control group ( $12.90 \pm 3.14$ )%. The rosette-forming rate of C3bRR and ICR differed significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) in mice treated with *L. acidophilus* ( $4.99\% \pm 1.15\%$  and  $2.63\% \pm 1.84\%$ ) compared to the control group ( $3.67\% \pm 1.20\%$  and  $8.86\% \pm 4.14\%$ ). **Conclusion** *L. acidophilus* combats tumors in U14-bearing mice by improving erythrocyte immune function and lymphocyte proliferation.

**【Key words】** *Lactobacillus acidophilus*; U14-bearing mice; erythrocyte immunity; lymphocyte proliferation activity

\*<sup>1\*\*2</sup> 肿瘤的发生是一个复杂的、多因素参与的过程,其中机体免疫功能下降是肿瘤发生发展的主要因素,因此,提高机体抗肿瘤免疫是肿瘤生物治疗的重要途径。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, LA)具有抑瘤作用。小鼠宫颈鳞癌 U14 移植瘤模型及动物实验显示,诱导 U14 肿瘤细胞凋亡是 LA 发挥抑瘤作用的机制之一<sup>[1~3]</sup>。本研究拟观察 LA 对 U14 的抑瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响,从抗肿瘤免疫角度探讨 LA 的抑瘤机制。

## 材料与方法

## 1 材料

**1.1 实验动物** 健康清洁级 KM 小鼠 40 只,雌雄各半,5~6 周龄,体重( $22 \pm 2$ )g,由山东鲁抗医药集团动

物中心提供(SCXK 鲁 2008D002)。

**1.2 肿瘤细胞株** 小鼠子宫颈鳞癌 U<sub>14</sub> 肿瘤细胞株由中国医学科学院基础医学研究所提供,于 KM 小鼠腹腔传代,制备成  $1 \times 10^6$ /ml 瘤细胞悬液备用。

**1.3 菌种** LA 标准菌株 AS1.2686 由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供,制备成  $2.5 \times 10^9$ /ml 细菌悬液备用。

**1.4 主要试剂** 顺铂(DDP),山东齐鲁制药厂生产,

\*【基金项目】山东省高等学校科研课题(No. J11LF03);济宁市科技局科研课题项目(No. 2004-7-11)。

\*\*【通讯作者】陈廷, E-mail: chenting3465@163.com

【作者简介】李秀真(1970-),女,山东人,医学硕士,副教授,主要从事病原生物学教学和科研工作。

E-mail: bode2020@163.com

批号 906012CE; 红细胞裂解液购于美国 Solarbio 公司; RPMI-1640 培养液购于美国 GIBCO 公司; MRS 肉汤购于青岛海博生物技术公司。

## 2 方法

**2.1 KM 小鼠移植瘤模型建立<sup>[4]</sup>与分组** 10 只 KM 小鼠作为正常对照组; 30 只 KM 小鼠于右侧背部皮下注射瘤细胞  $2 \times 10^5$ /只(0.2 ml), 随机分为模型组、阳性对照组(DDP 组)和 LA 组 3 组。种瘤 24 h 后正常对照组和模型组腹腔注射 PBS 液 0.2 ml, LA 组注射 LA 菌液  $5 \times 10^8$ /只(0.2 ml), 连续 10 d; DDP 组于种瘤后 24 h、72 h 腹腔注射顺铂 0.2 mg/只(0.2 ml)(即顺铂 10 mg/kg 鼠体重, 经折算<sup>[2]</sup>相当人体用顺铂量  $50 \text{ mg/m}^2$  体表面积), 其余每天腹腔注射 PBS 液 0.2 ml。

**2.2 荷瘤鼠红细胞免疫粘附功能测定** 停止注射 LA 2 d 后对各组小鼠称体重, 摘眼球取血, 参照文献<sup>[5,6]</sup>的方法制备  $1.2 \times 10^7$ /ml 红细胞悬液和  $1 \times 10^8$ /ml 补体致敏及非致敏酵母菌液。将红细胞悬液与补体致敏酵母菌液等量混合, 置  $37^\circ\text{C}$  水浴 30 min; 加入 0.25% 戊二醛, 混匀, 涂片, 干燥; 用 1:2 稀释的瑞氏染液染色 4 min 水洗, 自然干燥, 显微镜下观察花环形成情况。免疫复合物花环试验除换用非致敏酵母菌液外, 其余步骤相同。

**2.3 荷瘤鼠抑瘤率与脾指数测定** 处死小鼠, 用 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌取脾脏, 称重, 计算脾指数[脾指数 = 脾重(mg)/体重(g) × 10]; 剥离瘤体, 称重, 计算抑瘤率[抑瘤率(%) = (1 - 实验组平均瘤重/模型组平均瘤重) × 100]。

**2.4 MTT 法测定荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖活性** 用注射器内芯在 200 目尼龙网上轻研脾脏, 制成细胞悬液; 加入 5 ml 红细胞裂解液, 以 1 000 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 10 min, 弃上清; 加入 RPMI-1640 培养液重悬脾淋巴细胞液, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml, 接种于 24 孔培养板, 每孔 100  $\mu\text{l}$ 。试验设对照孔和 ConA 刺激孔, 对照孔加入 1640 培养液 100  $\mu\text{l}$ , ConA 刺激孔需加入 ConA 100  $\mu\text{l}$ (10 mg/L)。培养板置 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  条件下培养 72 h, 培养结束前 4 h 每孔加入 MTT 溶液(终浓度为 5 g/L) 10  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 同上离心, 轻轻吸弃上清液, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 100  $\mu\text{l}$ , 于振荡器震荡 10 min, 避光放 15 min, 用酶标仪测各孔吸光度( $A_{570}$ ), 计算脾淋巴细胞增殖率。脾淋巴细胞增殖率(%) = (刺激孔 A 值/对照孔 A 值 - 1) × 100%。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS19.0 统计软件分析实验数据。数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $\alpha = 0.05$ 。

## 结果

### 1 LA 对荷瘤 KM 鼠红细胞免疫粘附功能的影响

高倍镜下观察红细胞呈红色, 酵母菌呈蓝色。计数 200 个红细胞, 红细胞结 2 个及以上酵母菌计为花环, 换算成百分率, 即红细胞 C3b 受体花环率(C3bRR)和免疫复合物花环率(ICR), 结果见表 1。组间比较 C3bRR 差异有统计学意义( $F = 3.44, P < 0.05$ ), ICR 差异有统计学意义( $F = 11.94, P < 0.01$ )。LA 组与模型组比较 C3bRR 和 ICR 差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 1 LA 对荷瘤 KM 鼠红细胞免疫粘附功能的影响  
Table 1 Influence of LA on the erythrocyte immunologic function of U14-bearing KM mice

组别 Group	小鼠数量 No. of mice	C3bRR ( $\bar{x} \pm s$ ) %	ICR ( $\bar{x} \pm s$ ) %
正常对照 Normal	10	4.66 ± 1.33	4.79 ± 2.21
模型组 Modle	10	3.67 ± 1.20 <sup>#</sup>	8.86 ± 4.14 <sup>#</sup>
LA	10	4.99 ± 1.15 <sup>*</sup>	2.63 ± 1.84 <sup>**</sup>
DDP	10	3.82 ± 0.66	11.61 ± 5.33 <sup>##</sup>

注(Notes): 1) 与模型组比较(Compared with the modle group), \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; 2) 与正常对照组比较(Compared with the normal control group), #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ 。

### 2 LA 及模型组的抑瘤作用

各组 KM 鼠瘤重及抑瘤率见表 2。LA 组、DDP 组及模型组 U14 荷瘤 KM 鼠瘤重差异有统计学意义( $F = 5.04, P < 0.05$ ); LA 组与 DDP 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。LA 组抑瘤率为 48.18%。

表 2 荷瘤 KM 鼠瘤重及抑瘤率  
Table 2 Influence of LA on the tumor weight and the tumor-inhibiting rate of U14-bearing KM mice

组别 Group	小鼠数量 No. of mice	瘤重 Tumor weight ( $\bar{x} \pm s$ ) g	抑瘤率 Tumor-inhibiting rate(%)
模型组 Modle	10	1.10 ± 0.64	—
LA	10	0.57 ± 0.34 <sup>*</sup>	48.18
DDP	10	0.48 ± 0.40 <sup>*</sup>	56.37

注(Notes): 与模型组比较(Compared with the modle group), \*  $P < 0.05$ 。

### 3 LA 对荷瘤 KM 鼠脾指数的影响

各组 KM 鼠的脾指数见表 3, LA 组、DDP 组、模型组及正常对照组 KM 鼠脾指数差异有统计学意义( $F = 4.23, P < 0.05$ ), LA 组与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 4 LA 对荷瘤 KM 鼠脾淋巴细胞增殖率的影响

各组 KM 鼠脾淋巴细胞增殖率见表 4, 组间比较差异有统计学意义( $F = 21.68, P < 0.01$ )。LA 组与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表3 LA对荷瘤KM鼠脾指数的影响  
Table 3 Influence of LA on the spleen indexes of U14-bearing KM mice

组别 Group	小鼠数量 No. of mice	脾指数 Spleen indexes( $\bar{x} \pm s$ )
正常对照 Normal	10	6.14 ± 1.94
模型组 Modle	10	5.49 ± 1.09
LA	10	8.36 ± 2.19*
DDP	10	6.83 ± 2.15

注(Notes): 与模型组和正常对照组比较(Compared with the modle group, and the normal control group), \* $P < 0.05$ 。

表4 LA对荷瘤KM鼠脾淋巴细胞增殖率的影响  
Table 4 Effect of LA on spleen lymphocytes activity of U14-bearing KM mice

组别 Group	小鼠数量 No. of mice	脾淋巴细胞增殖率 Spleen lymphocytes activity(%)
正常对照 Normal	10	26.40 ± 4.30
模型组 Modle	10	12.90 ± 3.14#
LA	10	25.10 ± 4.33**
DDP	10	17.80 ± 5.22* #

注(Notes): 1) 与模型组比较(Compared with the modle group), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 2) 与正常对照组比较(Compared with the normal control group), # $P < 0.01$ 。

## 讨论

乳杆菌是一类重要的益生菌,对膀胱癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤有抑制作用<sup>[7~9]</sup>,其可能的抑瘤机制包括:①改善宿主内环境平衡,预防癌前病变发生;②诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[1]</sup>;③乳杆菌及其有效活性成分(肽聚糖、CPG基序等)激活机体的抗肿瘤免疫功能<sup>[10~12]</sup>。但其抑瘤机制较为复杂,尚需继续深入研究,其中乳杆菌的抗肿瘤免疫功能一直是研究热点。

抗肿瘤免疫包括特异性免疫与非特异性免疫。肿瘤特异性免疫以细胞免疫为主。由于脾淋巴细胞增殖能力的强弱在某种程度上反映了淋巴细胞免疫功能的高低,因此检测脾淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究的常用方法。脾脏是动物体内重要的免疫器官,脾指数变化也能反映机体免疫机能状态。本研究结果显示,LA能使U14荷瘤鼠脾脏重量与脾指数明显回升,并超过正常KM鼠,同时促进荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖活性,显示LA具有增强机体细胞免疫功能作用。

自Siegel等<sup>[13]</sup>等提出红细胞免疫系统的新概念以来,红细胞免疫作为非特异性免疫重要组成部分受到关注,同时红细胞免疫在抗肿瘤免疫中的作用也值得深入研究和探讨。红细胞作为血循环中数量最大的天然免疫细胞,其细胞膜表面具有多种免疫分子,其中C3b受体是重要的膜表面免疫分子,发挥着清除循环免疫复合物,调理吞噬作用和对B/NK细胞的免疫调节作用,并可通过C3b受体识别肿瘤抗原与肿瘤细胞

粘附,利于阻止肿瘤细胞经血行播散,检测红细胞C3b受体花环率及红细胞免疫复合物花环率能够反映红细胞天然免疫功能<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示U14荷瘤KM鼠红细胞C3b受体数量与免疫粘附活性显著下降,通过腹腔注射LA能显著提高荷瘤鼠C3b受体数量,并增强其C3b受体清除循环免疫复合物活性,表明LA具有激活机体红细胞天然免疫的功能,可能联合增强荷瘤机体的细胞免疫应答共同参与对U14的抑瘤作用。

## 【参考文献】

- [1] 李秀真,朱万孚,曹卉,等. 乳酸杆菌诱导小鼠宫颈鳞癌U14细胞凋亡的动物实验[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2004, 24(4): 268-71.
- [2] 李秀真. 乳酸杆菌抗肿瘤作用研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2004, 31(4): 252-4.
- [3] 李秀真. 新型疫苗佐剂-细菌CPG寡核苷酸[J]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 2004, 27(3): 97-101.
- [4] 高进. 肿瘤学基础与研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 67-97.
- [5] 郭峰. 红细胞免疫功能的初步研究[J]. 中华医学杂志, 1982, 62(12): 715.
- [6] 郭峰. 红细胞免疫及其调节功能测定方法[J]. 免疫学杂志, 1990, 6(1): 60-5.
- [7] Seow SW, Cai S, Rahmat JN, et al. Lactobacillus rhamnosus GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors[J]. Cancer Sci, 2010, 101(3): 751-8.
- [8] Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro[J]. Nutr Cancer, 2012, 64(6): 871-8.
- [9] Dallal MMS, Mojarrad M, Salehipour Z, et al. Effects of probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei on the behavior of colorectal tumor cells[J]. Tehran Univ Med J, 2012, 70(4): 220-7.
- [10] 凌宗欣,文姝,唐立,等. 乳杆菌DM9811发酵液提取物中RNA组分对人结肠癌细胞系HT-29增殖影响及分子机制研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1065-8.
- [11] Kim Y, Oh S, Yun HS, et al. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells[J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 51(2): 123-30.
- [12] 王红艳,吴晓燕,张旭艳,等. 热灭活嗜酸乳杆菌黏附于HeLa细胞后肿瘤细胞免疫学性状的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1510-3.
- [13] Siegel L. The RBC-cell immune system[J]. Lancet 1981, 11(8216): 556.
- [14] 郭峰,钱宝华,张乐之. 现代红细胞免疫学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 21-3, 62.

【收稿日期】 2013-04-23 【修回日期】 2013-08-27