

研究报告

乳杆菌肽聚糖对 β -乳球蛋白致敏小鼠脾细胞 Th1/Th2 及 Treg/Th17 失衡的体外影响

李丹 李艾黎* 季晓梅 姚蕾 邵雪菲 戚晓熙

(东北农业大学 食品学院 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】观察嗜酸乳杆菌完整肽聚糖(Whole peptidoglycan, WPG)对致敏脾淋巴细胞 Th1/Th2 及 Treg/Th17 平衡的体外调节作用。【方法】通过腹腔注射 β -乳球蛋白(β -Lg)建立 BALB/c 小鼠牛乳过敏模型。造模成功后,分离致敏小鼠的脾淋巴细胞并分别与不同剂量的 WPG 共同孵育,酶联免疫法检测细胞上清液中抗体(总 IgE 和特异性 IgE), Th1/Th2 及 Treg/Th17 相关细胞因子(IFN- γ , IL-4, TGF- β , IL-17)水平,流式细胞术检测脾淋巴细胞中 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺的百分含量,荧光定量 PCR 法检测过敏小鼠脾细胞中 Th1/Th2 及 Treg/Th17 相关转录因子 T-bet、GATA-3、Foxp3 和 ROR γ t mRNA 的表达量。【结果】WPG 体外刺激致敏脾细胞后可显著抑制 IgE 的产生,上调 CD3⁺、CD4⁺细胞数及 CD4⁺/CD8⁺比值,下调 Th2 型因子(IL-4, GATA-3 mRNA)和 Th17 型因子(IL-17, ROR γ t mRNA)的表达,且与过敏组相比,中、高剂量 WPG 的作用效果显著($P<0.05$);另外, WPG 体外作用还上调了 Th1 型因子(IFN- γ , T-bet mRNA)及 Treg 型因子(TGF- β , Foxp3 mRNA)的表达,且具有剂量依赖性。【结论】嗜酸乳杆菌 WPG 体外刺激可有效纠正致敏脾淋巴细胞的 Th1/Th2 及 Treg/Th17 失衡。

关键词: 完整肽聚糖, 嗜酸乳杆菌, β -Lg 过敏, Th1/Th2, Treg/Th17

Effect of whole peptidoglycan from lactobacilli on the imbalance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in lymphocyte of bovine β -Lactoglobulin-sensitized mice *in vitro*

LI-Dan LI Ai-Li* JI Xiao-Mei YAO Lei GAO Xue-Fei QI Xiao-Xi

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

Abstract: [Objective] Aim of this study was to investigate the effect of whole peptidoglycan (WPG) from *Lactobacillus acidophilus* on regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 balance in sensitized splenocytes. [Methods] BALB/c mice were intraperitoneally injected with β -Lactoglobulin (β -Lg), the sensitized splenocytes were stimulated *in vitro* with different doses of WPG. Supernatants were collected and measured total IgE and β -Lg-specific IgE, Th1/Th2 and Treg/Th17 related cytokines (IFN- γ ,

基金项目: 乳品科学教育部重点实验室开放基金项目(No. 2012KLDSOF-07); 黑龙江省教育厅骨干教师基金项目(No. 1254G008)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190459; ✉: aili-mail@163.com

收稿日期: 2013-09-13; 接受日期: 2013-12-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

IL-4, TGF- β , IL-17) production by ELISA assay; the percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ subgroups in spleen cells were measured by flow cytometry, and the levels of T-bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t mRNA were measured by RT-PCR. **[Results]** Compared with the allergy group, treatment with medium and high dose of WPG significantly decreased IL-17, ROR γ t mRNA response. In addition, the numbers of CD3⁺ and CD4⁺ cells and the ratio of the secretion of total IgE and β -Lg-specific IgE, Th2-type (IL-4, GATA-3 mRNA) and Th17-type (CD4⁺/CD8⁺), Th1-type (IFN- γ , T-bet mRNA) and Treg-type (TGF- β , Foxp3 mRNA) response were increased in the splenocytes stimulated with WPG in a dose manner. **[Conclusion]** Treatment with WPG from *Lactobacillus acidophilus* could regulate the imbalance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in allergic spleen cells.

Keywords: Whole peptidoglycan, *Lactobacillus acidophilus*, β -Lactoglobulin allergy, Th1/Th2, Treg/Th17

β -乳球蛋白(β -Lg)过敏常诱发 T 细胞亚群失衡和特异性 IgE 抗体产生^[1]。成熟的 T 淋巴细胞可分为辅助性 T 细胞(CD4⁺)和细胞毒性 T 细胞(CD8⁺)两大亚群^[2]。辅助性 T 细胞(Helper T cell, Th)亚群根据其功能和分泌的细胞因子不同,又分为 Th1、Th2 及 Treg、Th17 细胞。以往研究认为过敏机体存在 Th2 占优势的 Th1/Th2 细胞失衡^[3]。最近研究证实 Treg/Th17 细胞平衡在炎症及自身免疫性疾病相关中的作用也不容忽视。Sakaguchi 等^[4]于 1995 年首次发现去除小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞会产生多种自身免疫疾病;其后研究也发现多种自身免疫性疾病机体存在 Treg 细胞数量减少及功能降低现象^[5-6], TGF- β 和 Foxp3 则是 Treg 细胞发育和功能维持的关键性调节基因^[7]。而 Th17 细胞是由 Harrington 等^[8]在 2005 年首次提出,也被证实与自身免疫及过敏性疾病的发生、发展有关^[9],在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮以及过敏哮喘等患者的血清及组织中均检测到了 IL-17 和 ROR γ t^[10-11]。因此,研究者提出 Treg/Th17 细胞比率失衡也可能是引发食物过敏的重要机制之一^[12-13]。

乳酸菌作为肠道微生态的共生菌,可通过改善宿主肠道菌群比例,增强肠道屏障功能以及减少炎症介质释放等多方面预防和治疗食物过敏^[14]。微生物相关保守分子(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP)是乳酸菌的重要免疫调节成分,肽聚糖(Whole peptidoglycan, WPG)是乳酸菌含量最丰富的 PAMP 之一^[15]。孙进等^[16]给予 BALB/c 小

鼠腹腔注射乳杆菌 WPG (25 mg/kg)后发现,其能有效刺激 Th1 型细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的表达,提示乳杆菌 WPG 引发的免疫反应有向 Th1 型发展的趋势。陈玉梅^[17]发现双歧杆菌 WPG 能增加食物过敏小鼠的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量,刺激细胞因子 IL-10 和 TGF- β 分泌。Matsumoto 等^[18]表明乳杆菌 WPG 可通过 TLR2/NF- κ B 通路抑制结肠炎小鼠生成 IL-6,进而抑制 Th17 细胞分化。但有关乳酸菌 WPG 调节 Treg/Th17 平衡与防治 β -Lg 过敏方面的研究未见报道。

笔者前期实验证实嗜酸乳杆菌 KLDS 1.7038 可有效缓解牛乳 β -Lg 过敏,但尚不清楚 WPG 是否为其抗过敏活性成分。因此本文应用不同剂量嗜酸乳杆菌 WPG 与过敏脾细胞进行体外培养,观察 WPG 对 Th1/Th2 及 Treg/Th17 相关细胞因子及转录因子的影响,探讨嗜酸乳杆菌 WPG 防治过敏性疾病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株:嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) KLDS 1.0738 由东北农业大学乳品科学教育部重点实验室分离保存。

1.1.2 实验动物:雌性清洁级 BALB/c 小鼠,6-8 周龄(体重约 22 \pm 2 g),购自哈尔滨兽医研究所。饲养环境温度 22 \pm 2 $^{\circ}$ C,湿度 50%-75%,标准小鼠饲料喂养。

1.1.3 主要试剂: MRS 培养基, 英国 Oxoid 公司; Triton-X 100, 上海索莱宝生物科技有限公司; β -乳球蛋白标品、弗式完全佐剂、蛋白酶等, 美国 Sigma 公司; RPMI1640 培养液, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料公司; 二甲基亚砷(DMSO), 天津 TBD 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; 单组分 TMB 显色液, 哈尔滨海基生物科技有限公司; IFN- γ 、IL-4、TGF- β 、IL-17 ELISA 试剂盒, 美国 R&D 公司; 流式(FITC)抗小鼠 CD3e 荧光染料、流式(PE)抗小鼠 CD4 荧光染料、流式(PE-Cy5)抗小鼠 CD8a 荧光染料, 美国 eBioscience 公司; 总 RNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; RNA 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒, 大连宝生物工程有限公司。

1.1.4 仪器和设备: CHRIST ALPHA 1-4 型冻干机, 德国 Marin Christ 公司; Model 680 型酶标仪, 美国 Beckman 公司; HF90 型 CO₂ 培养箱, 香港力康发展有限公司; LD4-2 型低速离心机, 北京医用离心机厂; AE-30 倒置生物显微镜, 中国麦克奥迪实业集团有限公司; Cell Analyzer1000 流式细胞分析仪, 美国 GE Healthcare 公司; 7500 Fast Real-Time PCR 系统, 美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 嗜酸乳杆菌的培养及 WPG 的制备: 受试乳杆菌接种于 MRS 液体培养基中 37 °C 静置培养 18 h, 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌泥, 再用 0.9% 无菌生理盐水重悬, 100 °C 热处理 30 min, 验明无活菌存在, 且其仍保持正常细菌形态后, 再多次洗涤至菌泥呈乳白色。嗜酸乳杆菌细胞壁 WPG 的提取参照 Sekine 法^[19], 取热致死细菌加入 0.5% Triton X-100 溶液, 80–85 °C 连续搅拌 1 h, 经酶解、脱脂、酸化及透析处理后冷冻干燥。参照李莹^[20]的方法, 经溶菌酶溶解试验、总糖含量测定(407 g/kg)、氨基己糖含量测定(18 g/kg)、蛋白含量测定(544 g/kg)和脂肪含量测定(26 g/kg), 鉴定该提取物为乳杆菌

WPG, 置于-20 °C 保存。

1.2.2 过敏脾淋巴细胞模型的建立及 WPG 的干预作用^[21]: 采取随机分组方法将小鼠分设为阴性组和阳性组, 每组各 6 只。阳性组小鼠分别于第 0 和 7 天腹腔注射 0.2 mL/只的过敏原(1 mL 弗氏佐剂+1 mL 1 g/L β -Lg), 阴性组给予腹腔注射无菌生理盐水 0.2 mL/只。于第 14 天参照 Li 等^[22]方法检测小鼠全血嗜酸粒细胞及血清总 IgE 含量, 进而判定 β -Lg 过敏模型是否成功建立。建模成功后, 处死阳性组小鼠无菌取出脾脏, 用注射器芯在 200 目筛网上挤压研磨, 加入红细胞裂解液除去红细胞, 用 RPMI1640 培养液调节细胞数为 2×10^6 个/mL 备用。

在无菌 96 孔板中, 设空白调零组(只加培养液 200 μ L/孔)、阳性对照组[终浓度为 2×10^6 个/mL 的淋巴细胞悬液 180 μ L/孔和终浓度为 5 mg/L 的 β -Lg (C)], 不同剂量 WPG 受试组[终浓度为 2×10^6 个/mL 的淋巴细胞悬液 180 μ L/孔和终浓度分别为 10 mg/L (L)、100 mg/L (M)或 1 000 mg/L (H)的 WPG, 并加入 5 mg/L β -Lg], 每孔总体积为 200 μ L, 每组设 3 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.2.3 流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞亚群的分化表达^[23]: WPG 刺激脾细胞 24 h 后收集细胞, 用流式缓冲液重悬至 10^6 cells/100 μ L, 取 100 μ L 细胞重悬液置入流式管中分别与 FITC 标记的 CD3、PE 标记的 CD4、PEcy5 标记的 CD8 抗体反应(4 °C 避光, 30 min)。加入预冷 PBS 缓冲液 2 mL 洗涤 2 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。将细胞重悬浮于 500 μ L 预冷的 PBS 缓冲液中, 通过流式细胞仪检测其表面抗原分子的表达情况。

1.2.4 ELISA 法检测过敏小鼠脾细胞上清中细胞因子的分泌水平^[24]: WPG 与脾细胞共孵育 2 d 后, 吸取细胞上清液, 严格按照各 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 在波长 450 nm 处用酶标仪测定各孔的吸光度(A)值, 根据标准曲线计算 IFN- γ 、IL-4、TGF- β 和 IL-17 的浓度。继续孵育至第 14 天, ELISA

法检测上清液中总 IgE 和 β -Lg 特异性 IgE (β -Lg-sIgE)水平。

1.2.5 RT-PCR 法检测过敏小鼠脾细胞转录因子的表达水平^[25]: WPG 刺激脾细胞 24 h 后收集细胞, 严格按照细胞 RNA 提取试剂盒说明书要求提取细胞 RNA, 经紫外分光光度计检测 $OD_{260/280}$ 的比值 1.8–2.0 为适宜。参照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。RT-PCR 反应体系如下: 总体积 20 μ L, 2 \times SYBR Premix Ex Taq 10 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, 用 ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 特异性引物序列如下: T-bet, Forward: 5'-TCA ACCAGCACCAGACAGAG-3', Reverse: 5'-AAC ATCCTGTAATGGCTTGTG-3'; GATA-3, Forward: 5'-CTTATCAAGCCCAAGCGAAG-3', Reverse: 5'-CCCATTAGCGTTCCTCCTC-3'; Foxp3, Forward: 5'-TTTCCAAGAACGGGCATTA-3'; Reverse: 5'-T GTGGCTGACTGAGGGTGT-3'; ROR γ t, Forward: 5'-AGAAAGAAAAGGGGAAGTGG-3', Reverse: 5'-CTATTGTGGCTGCTGAGTTC-3'; β -Actin, Forward: 5'-CGCAAAGACCTGTATGCCAAT-3', Reverse: 5'-GGGCTGTGATCTCCTTCTGC-3'。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。

1.3 数据处理

实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所获数据采用统计软件包 SPSS 17.0 处理。组间比较采用单因素方差分

析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 建立过敏动物模型的评价指标

建模结束后, 阳性组小鼠血清总 IgE 含量达到 $137.33 \pm 1.90 \mu\text{g/L}$, 显著高于阴性组的 $56.5 \pm 4.73 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$); 且阳性组小鼠全血嗜酸粒细胞个数为 $(4.80 \pm 3.30) \times 10^9$ 个/L, 阴性组嗜酸粒细胞个数仅为 $(0.70 \pm 0.75) \times 10^9$ 个/L, 两组间差异显著 ($P < 0.05$)。以上指标提示 β -Lg 过敏模型成功建立。

2.2 WPG 对致敏小鼠脾淋巴细胞分泌抗体水平的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 经中、高浓度嗜酸乳杆菌 WPG 体外刺激可显著降低过敏小鼠脾细胞上清中总 IgE 和 β -Lg-sIgE 抗体水平 ($P < 0.05$), 但低浓度 WPG 对总 IgE 和 β -Lg-sIgE 抗体的抑制作用不明显 ($P > 0.05$)。

2.3 WPG 对致敏小鼠脾淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺亚群的影响

如表 1 所示, 与过敏组相比, 中及高浓度组 WPG 干预可促进 CD3⁺和 CD4⁺细胞数显著升高, 而 CD8⁺T 细胞数在高剂量组中明显减少 ($P < 0.05$)。CD4⁺/CD8⁺比值变化与多种自发性免疫疾病密切相关, 本实验的中及高浓度 WPG 组的 CD4⁺/CD8⁺比值显著高于过敏组 ($P < 0.05$), 而低浓度组 WPG 的 CD4⁺/CD8⁺比值变化不明显。

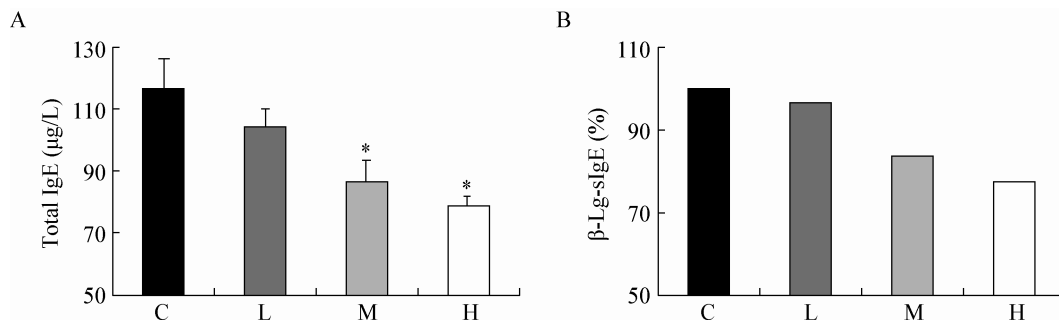


图 1 嗜酸乳杆菌 WPG 刺激小鼠致敏脾淋巴细胞分泌的总 IgE 和 β -Lg-sIgE

Figure 1 The production of total and β -Lg-specific IgE in sensitized splenocytes stimulated with *L. acidophilus* WPG

Note: *: $P < 0.05$ vs control group.

2.4 WPG 对致敏小鼠脾淋巴细胞产生 Th1/Th2 型细胞因子和转录因子的影响

如图 2 所示,与过敏组相比,WPG 干预显著上调了 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的产生及相关转录因子 T-bet mRNA 的表达($P<0.05$),且具有剂量依赖性。与此相反,Th2 型细胞因子 IL-4 及相关转录因子 GATA-3 mRNA 的表达在中、高剂量 WPG 组中显著降低($P<0.05$)。

2.5 WPG 对致敏小鼠脾淋巴细胞产生 Treg/Th17 型细胞因子和转录因子的影响

如图 3 所示,与过敏组相比,不同浓度的 WPG 体外干预后均能显著增加 TGF- β 的分泌及 Foxp3 基因的表达($P<0.05$)。另外,中及高浓度组 WPG

干预显著下调 IL-17 的产生及 ROR γ t 的表达($P<0.05$),但低浓度 WPG 抑制 IL-17 及 ROR γ t 的作用与过敏组相比不显著($P>0.05$)。

2.6 WPG 对 Th1/Th2 和 Treg/Th17 细胞平衡的影响

由于 Th1/Th2 和 Treg/Th17 细胞的比例与其转录因子 T-bet、GATA-3 及 Foxp3、ROR γ t 水平密切相关,因此本实验以 T-bet/GATA-3 及 Foxp3/ROR γ t 基因比值为代表,研究嗜酸乳杆菌 WPG 对致敏脾淋巴细胞 Th1/Th2 和 Treg/Th17 平衡的影响。如图 4 所示,相比过敏组,中、高剂量 WPG 体外干预显著上调 T-bet/GATA-3 及 Foxp3/ROR γ t 基因比例($P<0.05$),但低剂量 WPG 组的作用效果与过敏组相比差异不显著($P>0.05$)。

表 1 不同浓度 WPG 对过敏小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响
Table 1 Impact of WPG on CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cell in sensitized splenocytes

Group	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
C	46.37±1.06	25.78±0.23	17.61±0.52	1.47±0.06
L	47.50±1.41	26.03±0.16	16.98±0.26	1.53±0.03
M	49.97±0.56*	27.16±0.58*	16.90±0.19	1.61±0.05*
H	50.70±0.86*	27.95±0.96*	16.61±0.54*	1.68±0.03*

Note: *: $P<0.05$ vs control group.

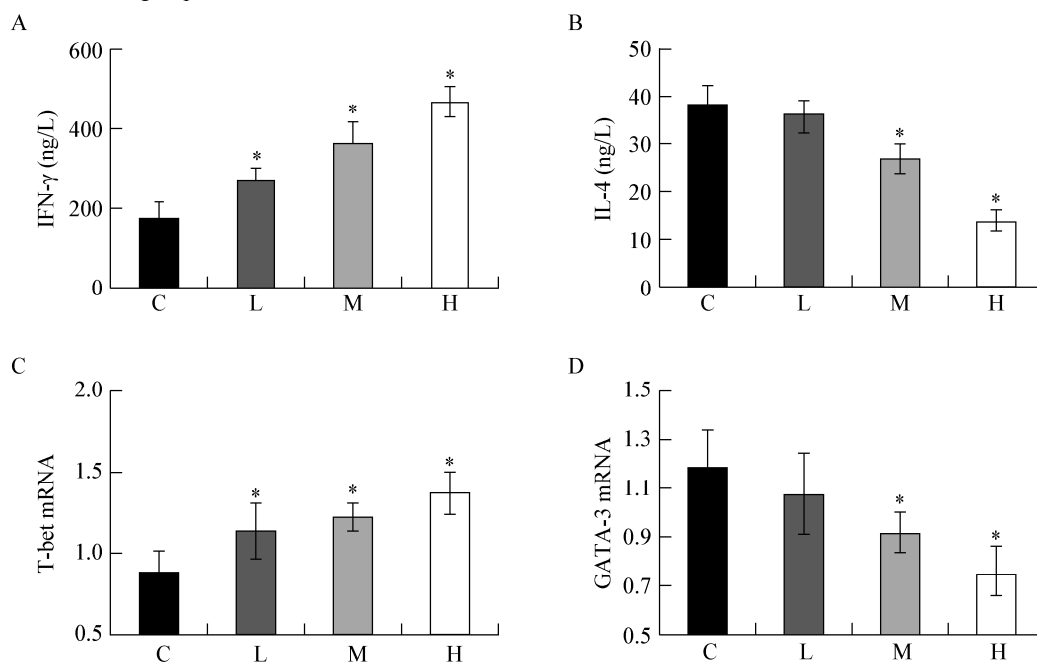


图 2 不同浓度 WPG 对 Th1/Th2 型细胞因子及转录因子表达量的影响

Figure 2 Impact of different doses of WPG on Th1/Th2 related cytokines and transcription factors expression

Note: *: $P<0.05$ vs control group.

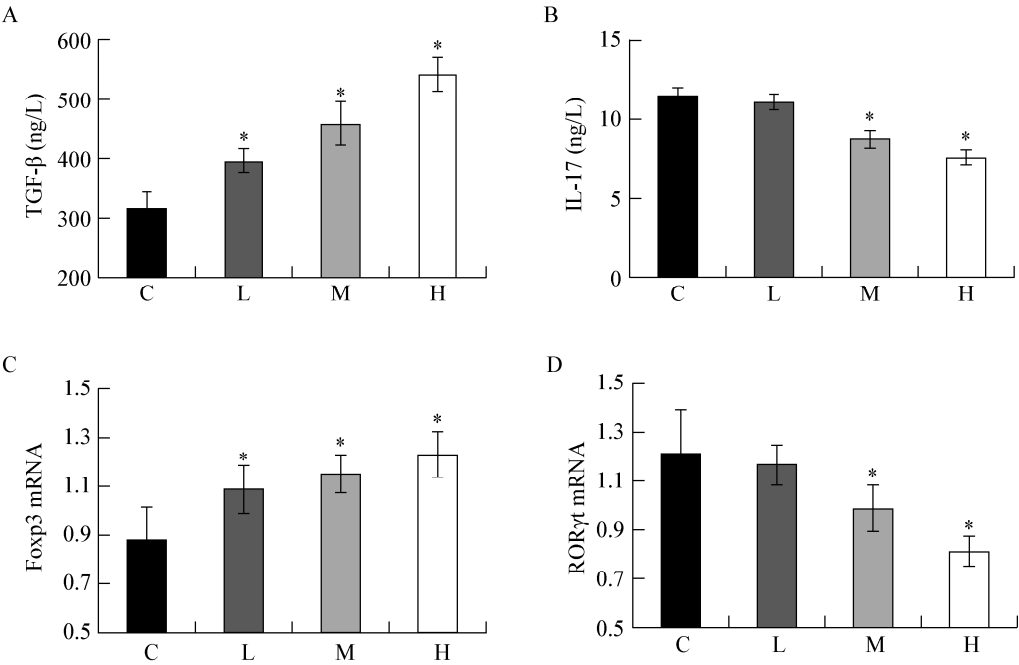


图3 不同浓度 WPG 对 Treg/Th17 型细胞因子及转录因子的表达量的影响

Figure 3 Impact of different doses of WPG on Treg/Th17 related cytokines and transcription factors expression

Note: *: $P < 0.05$ vs control group.

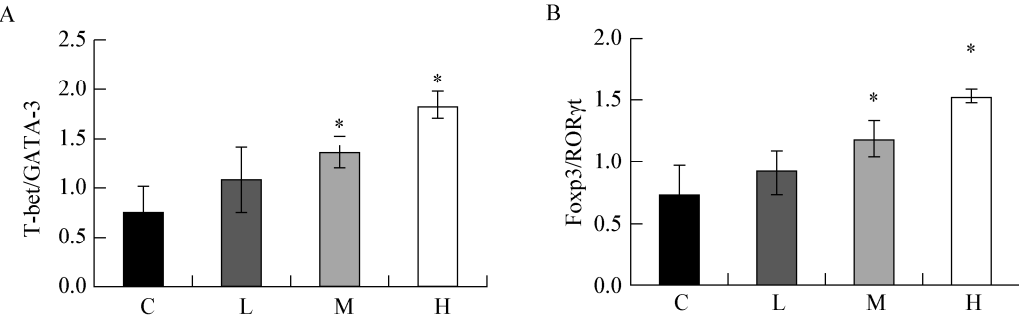


图4 不同浓度 WPG 对 Th1/Th2 和 Treg/Th17 细胞平衡的影响

Figure 4 Impact of different doses of WPG on the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17 cells

Note: *: $P < 0.05$ vs control group.

3 讨论

WPG 作为乳杆菌细胞壁中的重要组分，在乳酸菌免疫赋活功能中发挥重要的作用^[26-27]，但有关其抗牛乳过敏的机制尚待阐明。本实验中不同剂量嗜酸乳杆菌 WPG 体外干预 β -Lg 过敏小鼠脾淋巴细胞不仅可有效降低总 IgE 和 β -Lg-sIgE 水平，还优化了 CD4⁺/CD8⁺ 比值，且与 WPG 浓度呈正相关，与盛琴^[28]的研究结果相一致。提示 WPG 可通过提

高机体 T 淋巴细胞亚群含量维持机体免疫力，进而缓解过敏性疾病的发生。

本实验还发现 WPG 干预显著上调了过敏小鼠脾细胞中 Th1 型细胞因子 IFN- γ ，并抑制了 Th2 型细胞因子 IL-4 的产生，且其调节作用与 WPG 剂量成正相关，这与赵丽丽^[29]的研究结果一致。转录因子 T-bet 和 GATA-3 可特异性调控 Th0 细胞分化成 Th1/Th2 细胞。本试验中，T-bet 基因的表达随

WPG 剂量的增加呈促进趋势,而 GATA-3 的表达与此相反,且随 WPG 剂量的增加 T-bet/GATA-3 基因比例呈上升趋势,进一步揭示了嗜酸乳杆菌 WPG 干预对过敏小鼠 Th1/Th2 细胞失衡具有一定的调节作用。

最近研究证实 Treg/Th17 细胞比率失衡也是引发食物过敏的重要机制之一。Treg 和 Th17 细胞在功能上互相拮抗,在正常情况下两者保持平衡。TGF- β 可促进 Th0 细胞向 Treg 细胞分化,诱导特异性转录因子 Foxp3 的产生,维持机体的免疫耐受^[30]。而在感染炎症时,产生的炎性因子 IL-6 会抑制 Treg 细胞的增殖,并与 TGF- β 共同诱导 Th17 细胞的分化,并特异性转录因子 ROR γ t 和细胞因子 IL-17^[31]。在本实验中也发现过敏脾细胞存在 Th17 优势偏倚,表现为标志性细胞因子 IL-17 及转录因子 ROR γ t mRNA 的增加,提示 β -Lg 过敏时 Treg/Th17 细胞的动态平衡受到破坏。

我们在体外实验中观察到不同剂量 WPG 干预能够增加致敏脾细胞中 Treg 相关因子 TGF- β 和 Foxp3 的表达,且存在量效关系,表明 WPG 能够有效提高 Treg 细胞数量。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增多可有效抑制效应性 T 细胞增殖及下调免疫反应,促使机体产生免疫耐受。Zhang 等^[32]和 Jang 等^[33]证实灌服益生菌可通过提高过敏小鼠体内 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量,进而减轻过敏症状。另外,Jan 等^[34]通过细胞实验证实乳杆菌通过降低 IL-17 水平抑制 Th17 细胞分化,从而缓解过敏性哮喘。我们也发现乳杆菌 WPG 能通过抑制 ROR γ t 和 IL-17 降低致敏淋巴细胞中的 Th17 优势偏倚,表明乳杆菌对过敏机体的调节作用可能与其细胞壁 WPG 密切相关;而其调节作用不如 Treg 明显,提示 WPG 可能主要诱导过敏机体中 Treg 细胞的优势表达,使其转录因子 Foxp3 与 Th17 细胞转录因子 ROR γ t 结合,并抑制 IL-17 分泌使 Th17 细胞分化受阻,进而纠正了过敏细胞中 Treg/Th17 的比例失衡。这与笔者前期用嗜酸乳杆菌对 β -Lg 过敏

小鼠灌胃后的调节作用相仿^[22]。另外,脾细胞中的 Foxp3/ROR γ t 比例也随 WPG 剂量的增加而逐步上调,进一步揭示了 WPG 对过敏小鼠 Treg/Th17 细胞失衡的干预作用受其剂量调控。

综上所述,嗜酸乳杆菌 WPG 能在一定程度上调节过敏机体的 CD4⁺/CD8⁺比值、Th1/Th2 及 Treg/Th17 细胞平衡,提示益生菌的细胞壁 WPG 可能为其发挥抗过敏效用的活性成分。有关 WPG 使用的合适剂量及作用时间尚需通过动物实验进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 岳喜庆,吴超,郭晨.牛乳中主要蛋白过敏原研究现状[J].食品研究与开发,2008,19(10):147-150.
- [2] Szpechcinski A, Kopinski P, Giedronowicz D, et al. Simple flow cytometric protocol of CD4⁺/CD8⁺ lymphocyte ratio assessment in bronchoalveolar lavage fluids from patients with interstitial lung diseases[J]. Analytical and Quantitative Cytology and Histology, 2011, 33(5): 289-296.
- [3] Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis[J]. Immunobiology, 2007, 212(6): 441-452.
- [4] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance cause various autoimmune diseases[J]. Journal of Immunology, 1995, 160(3): 1151-1164.
- [5] Habibagahi M, Habibagahi Z, Jaberipour M, et al. Quantification of regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology International, 2011, 31(9): 1219-1225.
- [6] Banica L, Besliu A, Pistol G, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases[J]. Autoimmunity, 2009, 42(1): 41-49.
- [7] Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation[J]. Microbes and Infection, 2009, 11(5): 594-598.
- [8] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nature Immunology, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [9] Ciprandi G, Castellazzi AM, Fenoglio D, et al. Peripheral TH-17 cells in children with allergic rhinitis: preliminary report[J]. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2010, 23(1): 379-382.
- [10] Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, et al. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T

- helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin[J]. Immunity, 2008, 29(1): 68-78.
- [11] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF- β induced foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function[J]. Nature, 2008, 453(7192): 236-240.
- [12] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. Nature Immunology, 2007, 8(4): 345-350.
- [13] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(7): 490-500.
- [14] Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2008, 10(1/2): 37-54.
- [15] Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1359-1374.
- [16] 孙进, 常桂芳, 乐国伟, 等. 乳杆菌肽聚糖调节小鼠免疫细胞基因表达的通路分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(6): 553-556.
- [17] 陈玉梅. 双歧杆菌完整肽聚糖治疗食物过敏小鼠及对调节性 T 细胞影响的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2011.
- [18] Matsumoto S, Hara T, Nagaoka M, et al. A component of polysaccharide peptidoglycan complex on *Lactobacillus* induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer[J]. Immunology, 2008, 128(1 Suppl): e170-e180.
- [19] Sekine K, Toida T, Saito M, et al. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from with a *Bifidobacterium infantis* higher efficacy on the regression of an established tumor in mice[J]. Cancer Research, 1985, 45(3): 1300-1307.
- [20] 李莹. 婴儿双歧杆菌完整肽聚糖的提取及其理化特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2009.
- [21] 马冬雪, 孟祥晨, 高学军, 等. 乳杆菌对牛乳 β -乳球蛋白致敏小鼠淋巴细胞分泌 Th1/Th2 型细胞因子和抗体的体外影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1063-1069.
- [22] Li AL, Meng XC, Duan CC, et al. Suppressive effects of oral administration of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* on T helper-17 immune responses in a bovine β -lactoglobulin-sensitized mice model[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2013, 36(2): 202-207.
- [23] 王彩云. 牛磺胆酸对小鼠免疫细胞功能的调节作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2008.
- [24] Schaub B, Bellou A, Gibbons FK, et al. TLR2 and TLR4 stimulation differentially induce cytokine secretion in human neonatal, adult, and murine mononuclear cells[J]. Journal of Interferon Cytokine Research, 2004, 24(9): 543-552.
- [25] Shi Y, Jin Y, Guo W, et al. Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma[J]. Inflammation Research, 2012, 61(12): 1369-1378.
- [26] Kawashima T, Hayashi K, Kosaka A, et al. *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses[J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(12): 2017-2024.
- [27] Sashihara T, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(8): 2846-2855.
- [28] 盛琴. 枯草芽孢杆菌肽聚糖的提取及其对小鼠免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2011.
- [29] 赵丽丽. 双歧杆菌完整肽聚糖对哮喘模型小鼠骨髓来源树突状细胞免疫调节作用的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2009.
- [30] Zhou X, Kong N, Zou H, et al. Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases[J]. Autoimmunity, 2011, 44(1): 43-50.
- [31] Su ZJ, Yu XP, Guo RY, et al. Changes in the balance between Treg and Th17 cells in patients with chronic hepatitis B[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 76(4): 437-444.
- [32] Zhang LL, Chen X, Zheng PY, et al. Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2010, 25(5): 928-934.
- [33] Jang SO, Kim HJ, Kim YJ, et al. Asthma prevention by *Lactobacillus Rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells[J]. Allergy Asthma Immunology Research, 2012, 4(3): 150-156.
- [34] Jan RL, Yeh KC, Hsieh MH, et al. *Lactobacillus gasseri* suppresses Th17 pro-inflammatory response and attenuates allergen-induced airway inflammation in a mouse model of allergic asthma[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 108(1): 130-139.