

双歧杆菌对 RAW264.7 细胞的免疫刺激作用

张振玲 池根億*

(山东省劳动卫生职业病防治研究所 济南 250062)

摘要: 为了检测双歧杆菌是否能增强巨噬细胞免疫因子的产生,用 RAW264.7 细胞作为巨噬细胞模型,将 8 种不同的经热处理杀死的双歧杆菌分别与培养的 RAW264.7 细胞温育。所有的双歧杆菌均能诱导 TNF- α 及 IL-6 的产生,且产生 TNF- α 及 IL-6 的量与双歧杆菌的剂量及诱导时间有关,在 24h 之内,与对照组相比,8 种双歧杆菌均能增强 TNF- α 和 IL-6 的产生,但是如果双歧杆菌与 RAW264.7 细胞温育时间短(只有 14h),低剂量的双歧杆菌(10 μ g/mL 和 50 μ g/mL)就不能诱导 TNF- α 和 IL-6 的产生。双歧杆菌刺激 RAW264.7 细胞吞噬作用也与细胞因子的产生有关,能刺激细胞因子增强的菌株也能使细胞的吞噬能力增强,反之亦然。

关键词: 双歧杆菌,吞噬作用,细胞因子,巨噬细胞

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0250-04

STIMULATING EFFECT OF BIFIDOBACTERIA ON RAW264.7 CELLS

ZHANG Zhen-Ling GEUN-Eog Ji*

(Inst. of Shandong Labor Hygiene and Occupational Medicine, Jinan 250062)

Abstract: To test whether *Bifidobacteria* isolated from normal people can augment immune response in macrophage models, we cultured macrophagelike cells RAW264.7 in the presence of 8 strains heat-killed *Bifidobacteria*. All *Bifidobacteria* can induce pronounced tumor necrosis factor- α and Interleukin-6 production in a concentration and time dependent fashion. At the duration of 24h incubation, all of the strains can increase TNF- α and IL-6 production significantly compared to controls. But at the duration of 14h incubation, some strains don't induce TNF- α and IL-6 production at low concentration (10 μ g/mL and 50 μ g/mL). Only at high concentration (250 μ g/mL) can induce TNF- α and IL-6 production. The effect of *Bifidobacteria* on phagocytosis is also related with cytokine production. The strain which has strong effect on cytokine production also has strong effect on phagocytosis, and vice versa.

Key words: *Bifidobacteria*, Phagocytosis, Cytokine, Macrophage

在最近几年,食用双歧杆菌的作用越来越受到人们的关注。对这些菌株如何控制病原菌的复杂机理也越来越清楚。现在,许多研究都想证明双歧杆菌对人体免疫系统起着有益的作用。已有研究表明,双歧杆菌能提高巨噬细胞和淋巴细胞的活性,促进抗体的产生,并能促进

脾脏及肠淋巴结(peyer's patch)的有丝分裂反应,且有促进自然杀伤细胞的功能。这些结果表明,双歧杆菌对宿主免疫反应能起有益的促

* 韩国汉城大学食品营养系,汉城151-742

收稿日期:1999-02-08,修回日期:1999-05-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

进作用。本研究的目的:观察并检测人类粪便中分离出的双歧杆菌对培养的巨噬细胞的影响:①是否能增强 TNF- α 和 IL-6 的产生。②是否能诱导吞噬作用。

1 材料与方法

1.1 菌种

双歧杆菌都是从正常的韩国人粪便中分离出来的,并贮存在韩国 Maeil 食品公司的研究中心及美国密歇根州立大学的食物营养系。所有的菌种都是用含有 5% (W/V) 半乳糖的 MRS (Difco, Detroit, MI) 培养基, 37 $^{\circ}$ C 下试管培养至晚对数期。然后将细胞离心,用 PBS 及蒸馏水各洗两次, Speed-vac 将其抽干。然后按所需浓度将其溶解在 Hanks' 缓冲盐溶液 (Sigma Chemical CO., St. louis, MO) 中。95 $^{\circ}$ C 热浴将菌杀死,分装贮存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2 化学试剂

纯品 TNF- α 和 IL-6 及 biotinylated TNF- α 和 IL-6 是由 pharmingen (San Diego, CA) 提供。DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 和小牛血清白蛋白是由 Gibco 实验室 (Chagrin Falls, IL) 提供。TMB (Tetramethylbenzidine) 是由 Fluka 化学公司 (Ronkonkoma NY) 提供。Hanks' 缓冲盐溶液由 Sigma 公司 (St. louis, MO) 提供。荧光素结合的大肠杆菌是由 Molecular probes (Eugene, OR) 公司提供。台盼蓝是由柠檬酸缓冲液 (pH4.4) 配制成 250 μ g/mL 的浓度。

1.3 RAW264.7 细胞的培养

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 (American type tissue collection) 培养在 DMEM 培养液中, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中温育培养。用台盼蓝检查活细胞, 用血细胞计数仪对细胞进行计数。将细胞按 1×10^6 cells/mL 的浓度培养在 96 孔平底组织培养板上 (Costar, Cambridge, MA), 然后将双歧杆菌按不同浓度分别加入到每个孔中, 温育不同时间后, 将上清液吸出, 酶联免疫法分析 IL-6、TNF- α , 并测定其吞噬能力。

1.4 TNF- α 和 IL-6 的检测

TNF- α 和 IL-6 的定量检测是根据 Dong *et al.* (1994) 的 ELISA 方法进行的。试验反应中止后, 在 450nm 的波长下, 用联机的酶联免疫仪的 Vmax 软件 (molecular devices) 进行测定及数据统计处理。

1.5 吞噬作用的检测

吞噬作用采用 Chok P. Wan *et al.* (1993) 的方法, 双歧杆菌和 RAW264.7 细胞在 96 孔板上培养不同的时间后, 将上层培养液吸出。将 Hanks' 温育的带荧光的大肠杆菌悬浮液用超声波破碎机打碎, 每孔中分别加入 100 μ L 完全分离的大肠杆菌 (浓度为 1×10^7 大肠杆菌/mL), CO₂ 培养箱中温育不同时间后, 将上层缓冲液吸出, 每孔加入 100 μ L 的台盼蓝将胞外荧光猝灭。用只含荧光粒子的板孔 (不含巨噬细胞) 作对照, 以确定台盼蓝是否能将全部荧光粒子猝灭。1min 后, 将台盼蓝吸出, 在 485 ± 20 nm 激发光和 530 ± 30 nm 发射光的波长下用荧光显微板自动读数仪测定荧光强度。

1.6 数据统计分析

数据用 Sigma 统计分析系统的 Student-Newman-Keuls (SNK) 软件进行分析。

2 结果与讨论

(1) 双歧杆菌刺激 RAW264.7 细胞产生 TNF- α 和 IL-6 的结果见表 1、2。双歧杆菌和 RAW264.7 细胞温育 14h, 低剂量的双歧杆菌 (10 μ g/mL 和 50 μ g/mL) 不能有效地刺激 TNF- α 和 IL-6 的产生。双歧杆菌和 RAW264.7 细胞温育 24h, 则所有的双歧杆菌在 3 个浓度剂量下 (10 μ g/mL, 50 μ g/mL, 250 μ g/mL) 均能有效刺激 TNF- α 及 IL-6 的产生, 但各菌株对 RAW264.7 的刺激性强弱不同。能刺激产生较高 TNF- α 的菌株也能刺激产生较高 IL-6, 反之亦然。菌株 1、5、11、20 表现出相对较强的刺激性, 而菌株 7、9、12、23 则表现出相对较弱的刺激性。

(2) 双歧杆菌的吞噬作用: 表 3 表明了双歧杆菌对 RAW264.7 细胞吞噬作用的影响, 不同的菌株对 RAW264.7 细胞吞噬作用的影响差

表1 双歧杆菌刺激RAW264.7细胞产生IL-6的结果^[a]

| 双歧杆菌浓度 (μg/mL) | | IL-6浓度 (ng/mL) | | | | | | | |
|----------------|----|--------------------|-------|------|------|--------------------|------|------|-------|
| | | 14h ^[b] | | | | 24h ^[c] | | | |
| | | 0 | 10 | 50 | 250 | 0 | 10 | 50 | 250 |
| 双歧杆菌菌株 | 1 | ND | 0.037 | 0.25 | 1.03 | ND | 0.71 | 4.14 | 14.11 |
| | 5 | ND | 0.02 | 0.22 | 1.36 | ND | 0.29 | 2.14 | 18.39 |
| | 11 | ND | 0.02 | 0.92 | 2.05 | ND | 0.41 | 1.44 | 7.69 |
| | 20 | ND | 0.09 | 0.22 | 1.53 | ND | 0.20 | 1.84 | 6.63 |
| | 7 | ND | 0.02 | 0.02 | 0.07 | ND | 0.01 | 0.02 | 1.85 |
| | 9 | ND | ND | ND | 0.07 | ND | 0.02 | 0.09 | 2.05 |
| | 12 | ND | ND | ND | 0.08 | ND | 0.05 | 0.12 | 3.03 |
| | 23 | ND | ND | ND | 0.25 | ND | 0.11 | 0.26 | 1.69 |

注: [a][b][c]RAW264.7细胞在加入不同浓度双歧杆菌后分别培养14h、24h后测得上清液中IL-6含量, ND微量测不出

表2 双歧杆菌刺激RAW264.7细胞产生TNF-α的结果^[a]

| 双歧杆菌浓度 (μg/mL) | | TNF-α浓度 (ng/mL) | | | | | | | |
|----------------|----|--------------------|----|-----|------|--------------------|------|------|-------|
| | | 14h ^[b] | | | | 24h ^[c] | | | |
| | | 0 | 10 | 50 | 250 | 0 | 10 | 50 | 250 |
| 双歧杆菌菌株 | 1 | ND | ND | 7.9 | 16.8 | ND | 35.6 | 55.4 | 122.0 |
| | 5 | ND | ND | 3.8 | 10.9 | ND | 13.7 | 52.2 | 91.8 |
| | 11 | ND | ND | 5.0 | 11.1 | ND | 17.5 | 30.5 | 83.3 |
| | 20 | ND | ND | 2.0 | 6.8 | ND | 16.7 | 33.7 | 78.2 |
| | 7 | ND | ND | ND | 4.3 | ND | 1.6 | 16.9 | 47.5 |
| | 9 | ND | ND | 0.5 | 4.0 | ND | 2.3 | 15.9 | 50.4 |
| | 12 | ND | ND | ND | 3.7 | ND | 2.5 | 13.7 | 42.9 |
| | 23 | ND | ND | ND | 3.2 | ND | 2.4 | 13.9 | 35.6 |

注: [a][b][c]RAW264.7细胞在加入不同浓度双歧杆菌后分别培养14h、24h后测得上清液中TNF-α含量, ND-微量测不出

距很大。菌株1、5、11、20对细胞的吞噬作用表现出较强的刺激性, 而菌株7、9、12、23则对吞噬作用的刺激较弱, 这与其对细胞因子的刺激

作用相一致。

(3) 讨论: 巨噬细胞在宿主的免疫调节及机体防御机能方面起重要的作用。RAW264.7

表3 双歧杆菌刺激RAW264.7细胞吞噬作用的结果^[a]

| 双歧杆菌浓度 (μg/mL) | | 荧光强度 (与对照组倍比) ^[b] | | | | | |
|----------------|----|------------------------------|------|------|--------------------|------|------|
| | | 14h ^[c] | | | 24h ^[d] | | |
| | | 10 | 50 | 250 | 10 | 50 | 250 |
| 双歧杆菌菌株 | 1 | 1.59 | 2.45 | 3.51 | 2.16 | 4.15 | 5.20 |
| | 5 | 1.65 | 2.57 | 3.02 | 2.24 | 4.38 | 5.45 |
| | 11 | 1.40 | 2.58 | 3.05 | 2.53 | 4.07 | 5.15 |
| | 20 | 1.58 | 2.68 | 3.01 | 2.34 | 5.03 | 6.25 |
| | 7 | 1.37 | 1.62 | 2.03 | 0.67 | 1.76 | 4.14 |
| | 9 | 1.09 | 1.44 | 1.68 | 0.83 | 2.04 | 4.56 |
| | 12 | 1.04 | 1.37 | 1.95 | 0.51 | 2.34 | 3.61 |
| | 23 | 0.79 | 1.71 | 1.96 | 1.08 | 1.86 | 2.85 |

注: [a][c][d]RAW264.7细胞在加入不同浓度的双歧杆菌后分别培养14h、24h后测其吞噬荧光标记的大肠杆菌能力, [b]实验数据与对照组数据之比

细胞是巨噬细胞系细胞,我们用这一细胞系检测双歧杆菌对巨噬细胞的刺激作用。我们的实验结果证明,细胞因子的产生及吞噬作用的强弱均与双歧杆菌的菌种有关。能刺激 RAW264.7 细胞分泌较高 TNF- α 和 IL-6 的菌种,也能促使巨噬细胞的吞噬能力大大增强。这与有关报道 TNF- α 、TNF- γ 和 IL-1 β 和 TGF- β 能提高吞噬作用相一致,但与 IL-6 对吞噬作用无影响并不一致。这需要进一步研究。

双歧杆菌作用于没受脂多糖 LPS (Lipopolysaccharide) 刺激的 RAW264.7 细胞后, TNF- α 和 IL-6 产生的量大大高于对照组。这表明双歧杆菌象 LPS 一样,对巨噬细胞有同样的激活作用。Hatcher *et al.* 报道长双歧的提取物与 LPS 有相似的作用,均能降低溶菌酶的产生。双歧杆菌激活巨噬细胞的机制以及双歧杆菌中的何种成分激活巨噬细胞还有待进一步研究。

食品及药品中的双歧杆菌诱导产生适量的

细胞因子对机体维持免疫平衡及增强机体抵抗力非常有益。然而,值得注意的是:高浓度的 TNF- α 可引起一系列病症,如:组织损伤、血管凝固、极度瘦弱 (cachexia) 等,但是,只要控制好双歧杆菌在食品及药品中的量,必将对人体免疫功能及身体健康起到有益的促进作用。

参 考 文 献

- [1] Abbas A K, Lichtman A H, Probe J S. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders CO., 1994, 240~246.
- [2] Chok P W, Park Choon S, Lau Benjamin H S. J Immunological Method, 1993, 162:1~7.
- [3] Dong W, Azcona-Olivera J I, Brooks K H *et al.* Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 127:282~290.
- [4] Hatcher G E, Lambrecht R S. J Dairy Sci, 1993, 76: 2485~2490.
- [5] Yasui H, Ohwaki M. J Dairy Sci, 1991, 74:1187~1193.