

研究报告

长双歧杆菌 TTF 菌株增强机体免疫活性研究*

李平兰 马长伟 江志杰 张 麓 戴蕴青

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 通过长双歧杆菌 TTF 活菌、菌体破碎物和发酵上清液 3 种处理物灌胃正常小鼠和免疫功能低下小鼠试验发现, 长双歧杆菌 TTF 的 3 种受试物对环磷酰胺 (Cy) 造成的免疫功能低下小鼠模型 (IDMM) 3 项免疫指标均有显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 影响, 且在本试验选取的 3 个剂量范围内基本呈量效关系。*B. longum* TTF 的 3 种受试物对 IDMM 的非特异性免疫功能的影响普遍大于对小鼠的细胞免疫和体液免疫的影响; 对正常小鼠免疫功能影响的水平低于其对 IDMM 各项免疫指标的影响, 且无论活菌、菌体破碎物、发酵上清液均不会改变小鼠自身正常的免疫功能。急性毒性试验表明, *B. longum* TTF 3 种处理物对健康小鼠无急性毒性。就 3 种处理物来讲, 发酵上清液组的效果高于菌体破碎物和活菌。

关键词: 长双歧杆菌, 活菌, 菌体破碎物, 发酵上清液, 免疫作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0001-05

Study on Intensifying Immune Activity of *Bifidobacterium longum* TTF*

Li Ping-Lan MA Chang-Wei JIANG Zhi-Jie ZHANG Chi DAI Yun-Qing

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: By feeding living bacteria (LB), intracellular cell-free (IE) and spent culture supernatant (SCS) of *Bifidobacterium longum* TTF to mice, we found that LB, IE and SCS could significantly influence the immune ability of IDMM to different degrees. There is an approximate amount-effect relation within the dose range chosen in this study. Their effects on nospecial immunity are generally greater than on special immunity. The influence of LB, IE and SCS on normal mice is not as evident as on IDMM. They all can't change the normal immune ability. Short time toxicological tests showed that LB, IE and SCS were innocuous to normal mice. Their influence ability to the immune ability of IDMM could be ranked as SCS > IE > LB.

Key words: *Bifidobacterium longum*, Living bacteria, Intracellular cell-free extracts, Spent culture supernatant (SCS), Immune function

双歧杆菌具有多种生理功能, 是目前公认的益生菌。作为一类理想的微生态调节剂, 双歧杆菌是通过激活宿主细胞介导的特异性或非特异性免疫而引起延缓衰老、抗感染、抗肿瘤的作用。目前有关双歧杆菌的研究主要集中在新菌株的选育、生物学特性研究及新产品的开发上, 对其发挥生理功能特性的机理尤其是在增强机体免疫力和保持机体的免疫平衡方面的研究报道较少。作者以实验室筛选的一株来源于世界第四长寿区——我国广西巴马百岁以上长寿老人肠道的优良长双歧杆菌 TTF 菌株为试材^[1],

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA248041)

通讯作者 Tel: 010-62737664; E-mail: plli@sohu.com

收稿日期: 2005-04-27, 修回日期: 2005-09-08

采用动物活体试验方法对该菌的活菌体、菌体破碎物和发酵上清液进行免疫活性测定,通过比较免疫功能低下小鼠模型免疫脏器指数及 TTF 不同处理物对正常小鼠免疫功能相关指标的影响来探讨双歧杆菌 TTF 菌株不同处理物是否具有增强机体免疫活性的能力和增强免疫活性能力的大小,为进一步研究其增强机体免疫活性的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验动物:选用近交系小鼠 BALB/C,六周龄,体重 18~22g,雌雄各半,每组 14 只,购于北京军事科学研究所动物研究所。

受试物:受试物为双歧杆菌 TTF 活菌体 (LB)、菌体破碎物 (IE) 和发酵液上清液 (SCS),双歧杆菌 TTF 菌株培养用改良 MRS 培养基。

受试剂量:受试剂量均为每只小鼠灌胃 0.2mL/d。

受试时间:14d。

豚鼠、绵羊红细胞:豚鼠和绵羊红细胞 SRBC 购于第二军医大学惠山试验动物场。

环磷酰胺 (Cy):购于江苏恒瑞制药公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

亨盖特厌氧装置、超声波细胞破碎仪、超净工作台、全自动高压灭菌锅、电热恒温培养箱、恒温水浴锅、高速离心机等。

1.3 3 种受试物的制备

1.3.1 长双歧杆菌 TTF 的培养^[2]:将 TTF 接种于改良 MRS 液体培养基中,37℃ 厌氧培养 48h,菌液 4,000r/min 离心 10min,分离得到培养上清组。菌体用去离子水迅速洗涤两次,再用去离子水重悬,调整菌悬液浓度为 1×10^9 cfu/mL,所得菌悬液分为两组,一组作为活菌组,另一组用于菌体破碎物的制备。

1.3.2 菌体破碎物的制备:将 TTF 菌体悬液经 65℃ 处理 40 min 后,用超声波粉碎仪在 2kHz 条件下处理,每处理 2min、间隔 1min,超声粉碎 40min 后以 7,800r/min 离心 10min,得上清即菌体破碎物产物。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 免疫功能低下小鼠模型 (Immunodeficiency mice model, IDMM) 的建立:环磷酰胺 (Cy) 腹腔注射,每天 50mg/kg,连续 3d, IDMM 建立后进行后续试验。

1.4.2 试验的分组及给药:小鼠随机分组,每组 14 只,雌雄各半。采用灌胃给药,每日 1 次,每次 0.2mL,连续 14d,第 15d 进行各种免疫指标的测定。对照组灌胃生理盐水。

1.4.3 小鼠免疫脏器指数 (Immune organ index, IOI) 的测定:摘眼球放血处死小鼠,剥取胸腺和脾脏,并将周围组织剥离干净后称重,按下式计算免疫脏器指数:

$$\text{IOI} = \text{胸腺或脾脏平均重量 (mg)} / \text{平均重量 (g)}$$

1.4.4 非特异性免疫功能的评价 (巨噬细胞吞噬试验-碳粒廓清试验):用生理盐水稀释 5 倍的中华碳素墨汁尾静脉注射小鼠 0.2mL/只,分别在注射 2min 和 8min 后用预先被肝素溶液湿溶的吸管从眼眶后静脉丛取血 20μL,溶于 2mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,摇匀后在波长 680nm 下测吸光度值。最后将小鼠颈椎脱臼处死,称取肝脏和脾脏重量。以下式计算碳颗粒廓清指数 (Clearance index of carbon particles, CICIP) 和校正廓清指数 (Adjusted clearance index of carbon particles, ACICIP):

$$\text{CICIP} = \lg A_1 - \lg A_2 / t_1 - t_2$$

$$ACICP = CICP \times \text{体重} / (\text{肝脏重} + \text{脾脏重})$$

式中 A_1 、 A_2 分别表示在时间 t_1 和 t_2 时所取血样的吸光度值; $t_1 - t_2$ 表示两次取样的时间差。

1.4.5 细胞免疫功能的评价 (迟发性超敏反应—足趾增厚法): 给药第 7d, 用 2% (v/v) 绵羊红细胞腹腔注射小鼠, 0.2mL/d/只, 第 14d 测量右后足趾厚度。在测量部位皮下注射 20% 绵羊红细胞, 20 μ L/只, 24h 后测量右后足趾厚度。以上测量均取 3 次平均值, 计算足趾变化厚度 (Difference of foodpad thickness, DOFT)。

1.4.6 体液免疫功能的评价 (血清溶血素含量的测定—绵羊红细胞免疫法): 给药第 7d, 用 2% (v/v) 绵羊红细胞腹腔注射试验小鼠, 0.2mL/只, 第 14d 眼球取血于离心管内, 放置 1h 后待血清充分析出后, 2,000r/min 离心 10min, 将收集到的血清用生理盐水稀释 500 倍。吸取 1mL 稀释血清置反应管中, 加入 0.5mL 10% 的绵羊红细胞和 1mL 稀释的豚鼠血清, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴保温 20min, 冰浴终止反应, 2,000r/min 离心 10min。取 1mL 上清液加 3mL 都氏试剂, 混匀后静置 10min, 540nm 处比色测吸光度值, 以不加血清的空白管为对照。另取 0.25mL 绵羊红细胞用都氏试剂稀释至 4mL, 摇匀后静置 10min, 离心后取上清液于 540nm 处测吸光值, 作为绵羊红细胞半数溶血时的吸光度。按下式计算半数溶血值 (Half-hemolysis concentration, HC_{50}):

$$HC_{50} = \text{样品吸光度值} \times \text{稀释倍数} / \text{绵羊红细胞半数溶血时的吸光度值}。$$

2 结果与讨论

2.1 双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液对 IDMM 免疫脏器指数的影响

双歧杆菌作为一种生物反应调节剂刺激免疫系统是多角度多水平的, 它可以对免疫器官、组织、免疫活性细胞、细胞因子及有关基因等各个层次进行微妙而精细的调节。脾脏与胸腺是体内主要的免疫器官, 脾脏及胸腺等的重量及其功能对巨噬细胞的吞噬功能、细胞免疫和体液免疫等免疫功能具有重要的影响。一般来讲, 免疫力低下的动物个体其免疫器官的重量往往会低于健康个体^[3,4]。表 1 列出了双歧杆菌活菌、菌体破碎物和发酵上清液 3 种处理物对小鼠免疫脏器指数的影响。

表 1 双歧杆菌活菌、菌体破碎物和发酵上清液对 IDMM 免疫脏器指数的影响

试验组	剂量 (mL/只/d)	胸腺重 (mg/g)	脾脏重 (mg/g)
IDMM (CK)	-	1.90 \pm 0.02	4.80 \pm 0.45
活菌体 (LB)	0.1	2.06 \pm 0.01 *	5.31 \pm 0.31
	0.2	2.06 \pm 0.02 *	5.35 \pm 0.38
	0.4	2.18 \pm 0.06 **	5.46 \pm 0.46 *
菌体破碎物 (IE)	0.1	2.01 \pm 0.04 *	5.41 \pm 0.42
	0.2	2.06 \pm 0.06 *	5.42 \pm 0.28
	0.4	2.16 \pm 0.07 **	5.62 \pm 0.46 **
发酵上清液 (SCS)	0.1	2.10 \pm 0.01 **	5.34 \pm 0.36
	0.2	2.18 \pm 0.04 **	5.50 \pm 0.47 *
	0.4	2.26 \pm 0.08 **	6.08 \pm 0.38 **

* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 分别与 IDMM control 比较

表 1 结果表明, 双歧杆菌的 3 种处理物对 IDMM 免疫脏器指数都有影响, 其中 3 组受试物的高剂量组对 IDMM 免疫脏器指数的影响均达到显著和极显著水平 ($P < 0.05$)

和 $P < 0.01$), 且在实验选取剂量范围内有明显的量效关系。根据以上结果, 我们可以初步认为双歧杆菌无论是活菌、菌体破碎物和发酵上清液均具有增强免疫功能的作用, 其中 SCS 组的效果高于 LB 组和 IE 组。

2.2 双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液对 IDMM 免疫活性的影响

我们知道, 作为非特异性的免疫功能之一, 吞噬细胞是免疫系统维持自身内环境稳定的重要手段, 也是机体产生免疫应答的基础, 大多数抗原经巨噬细胞处理成超抗原后, 免疫原性大大增加。因此, 吞噬是非特异性免疫的关键环节。VI 型超敏反应, 即 DTH 主要是由于 T 淋巴细胞介导的免疫损伤, 不需要抗体或补体的参与, 其反应程度直接体现了机体细胞免疫功能的强弱。血清溶血实验则是体液中抗体、补体等免疫因子溶胞作用的强弱的具体体现。

本试验采用碳粒廓清实验研究双歧杆菌 LB、IE 和 SCS 对 IDMM 非特异性免疫功能的影响。以绵羊红细胞作为抗原, 通过 DTH 和血清溶血试验, 考察双歧杆菌 LB、IE 和 SCS 对 IDMM 细胞免疫功能和体液免疫功能的影响, 试验结果见表 2。

表 2 双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液对 IDMM 免疫活性的影响

试验组	剂 量 (mL/只/d)	校正廓清指数 (ACICP)	足趾变化厚度 DOFT (μm)	半数溶血值 HC ₅₀
IDMM (CK)	-	3.74 \pm 0.03	113 \pm 8.1	224.36 \pm 7.4
活菌体 (LB)	0.1	3.78 \pm 0.06	123 \pm 10.2	234.62 \pm 15.2
	0.2	3.96 \pm 0.04**	131 \pm 11.5	242.23 \pm 10.3
	0.4	4.00 \pm 0.05**	140 \pm 11.4*	249.76 \pm 9.0*
菌体破碎物 (IE)	0.1	3.76 \pm 0.02	121 \pm 12.3	235.62 \pm 14.3
	0.2	3.90 \pm 0.04*	132 \pm 8.6	239.88 \pm 11.5
	0.4	4.01 \pm 0.05**	138 \pm 10.3*	247.98 \pm 13.1*
发酵上清 (SCS)	0.1	3.88 \pm 0.04*	134 \pm 7.7*	241.66 \pm 13.2
	0.2	4.01 \pm 0.04**	142 \pm 15.1*	249.23 \pm 10.2*
	0.4	4.12 \pm 0.08**	141 \pm 11.3*	253.22 \pm 12.2*

* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 分别与 IDMM control 比较

由表 2 可以看出, 各处理对 IDMM 免疫功能均有不同程度的显著影响, 且在本试验选取的低、中、高 3 个范围内基本上是呈量效关系。其中对小鼠的非特异性免疫功能的影响普遍大于对小鼠的细胞免疫和体液免疫的影响。就 3 种处理物而言, $\text{SCS} > \text{LB} > \text{IE}$; 就 3 个受试剂量而言, 中剂量效果为佳。

2.3 双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液对正常小鼠免疫活性的影响

通常情况下, 免疫系统通过免疫反应排除异己维持机体正常生物活动, 免疫功能的不足或低下会对机体健康产生极为不利的影响。另一方面, 免疫亢进则容易引起病理性的功能紊乱, 出现变态免疫反应, 如各种过敏反应和器官移植的排斥反应等。因此, 对于那些具有提高免疫力的功能性物质来讲, 除了能够弥补机体免疫功能的不足以外, 还应同时保证正常机体的生理平衡。只有这样, 才能达到防病强身的目的^[5]。因此, 研究双歧杆菌 TTF 的不同处理物对正常小鼠免疫功能的影响具有重要的意义。本试验仍从非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫 3 方面考察双歧杆菌对正常小鼠免疫功能的影响, 具体结果见表 3。

表 3 双歧杆菌 3 种处理物对正常小鼠 (Normal mice, NM) 免疫活性的影响

处理组	剂 量 (mL/d/只)	校正廓清指数	足趾变化厚度	半数溶血值
		ACICP	DOFT (μm)	HC ₅₀
NM (CK)	-	3.98 \pm 0.12	158 \pm 12.5	354.56 \pm 11.14
活菌体 (LB)	0.1	3.95 \pm 0.12	162 \pm 11.3	354.86 \pm 18.35
	0.2	4.01 \pm 0.16	174 \pm 15.3	364.56 \pm 15.68
	0.4	4.08 \pm 0.13	168 \pm 13.2	372.32 \pm 14.48
菌体破碎物 (IE)	0.1	3.95 \pm 0.12	162 \pm 15.4	361.47 \pm 19.16
	0.2	4.01 \pm 0.16	177 \pm 12.3	369.43 \pm 18.42
	0.4	4.08 \pm 0.13	159 \pm 10.5	374.56 \pm 16.66
发酵上清液 (SCS)	0.1	4.05 \pm 0.11	168 \pm 15.2	353.51 \pm 18.18
	0.2	4.08 \pm 0.13	178 \pm 14.3	376.66 \pm 15.15
	0.4	4.11 \pm 0.18	185 \pm 11.3 *	379.26 \pm 14.64

* 表示 $P < 0.05$, 分别与 NM control 比较

由表 3 可以看出, 双歧杆菌的 3 种处理物及 3 种剂量对正常小鼠的各项免疫指标均有增强作用, 除 SCS 组的高剂量组的足趾变化厚度 (DOFT) 达显著性差异外 ($P < 0.05$), 其他均无统计上的显著影响。该结果也表明, 从总体上来讲, 双歧杆菌的 3 种处理物对正常小鼠各项免疫功能影响的显著性水平低于其对 IDMM 各项免疫指标的影响。3 种双歧杆菌的处理物在试验的 3 种剂量下不会影响正常小鼠自身正常的免疫功能。

2.4 双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液的急性毒性试验^[6]

正常小鼠禁食 16h 后, 自然饮水, 以 0.4mL/只的剂量对正常小鼠灌胃双歧杆菌活菌体、菌体破碎物和发酵上清液, 2h 1 次, 共 5 次。在为期 1 周的观察中, 未发现小鼠有中毒症或死亡。本实验所选剂量为人可能服用量的 10 倍以上。因此, 可认为试验样品无急性毒性。

3 结论

(1) 长双歧杆菌 TTF 的 LB、IE 和 SCS 对 IDMM 3 项免疫指标均有不同程度的显著影响, 在本试验选取的 3 个剂量范围内基本呈量效关系。就 3 种处理物的效果而言, SCS > LB 和 IE。

(2) 长双歧杆菌 TTF 的 LB、IE 和 SCS 对 IDMM 的非特异性免疫活性的影响普遍大于对小鼠的细胞免疫和体液免疫的影响。

(3) 长双歧杆菌 TTF 的 LB、IE 和 SCS 对正常小鼠免疫活性影响的水平低于其对 IDMM 各项免疫指标的影响。且无论 LB、IE 还是 SCS 均不会改变小鼠自身正常的免疫功能。

(4) 急性毒性试验表明, 长双歧杆菌 TTF 的 3 种处理物对健康小鼠无急性毒性。

参 考 文 献

[1] 李平兰, 江志杰, 马长伟. 微生物学通报, 2005, 32 (3): 7~12.
[2] Meei Y L, Chang F J. Digestive Diseases and Sciences, 2000, 45 (8): 1617~1622.
[3] 郑健仙. 功能性食品 (第三卷). 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
[4] 周 俭. 保健食品设计原理及其应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
[5] 李益新. 生物化学与生物物理进展, 1986, 2: 45~49.
[6] 杨晓泉. 食品毒理学. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.