

# 耐氧双歧杆菌抗肿瘤机理的研究

史俊华 孙君江\* 葛培玲

(南京铁道医学院微生物学教研室, 南京 210009)

**摘要** 本文应用耐氧双歧杆菌治疗荷  $H_{22}$  肿瘤小鼠, 结果发现该菌可通过激活巨噬细胞活性, 增强  $T_h$  细胞功能, 发挥抗肿瘤效应。

**关键词** 耐氧双歧杆菌, 抗肿瘤效应, 溶菌酶, T 细胞亚群

---

本文系铁道部科技基金资助课题 J93Z034

1994-09-04 收稿

\* 南京市第一医院中心试验室

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人体肠道中的正常菌群,自1899年 Tissier 发现该菌以来,研究表明该菌具有生物学屏障作用,营养功能;可合成如维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>12</sub>、泛酸等,有控制内毒素血症、降低血氨作用,整肠作用;可恢复肠道菌群至正常水平;防止肠功能紊乱的发生,近年来,人们又发现该菌具有抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>,但抗肿瘤机制研究较少,另外,该菌系专性厌氧菌,给进一步研究应用带来了许多不便<sup>[4,5]</sup>,我们经过长期对一株双歧杆菌传代驯化发现已达到耐氧,我们用该菌进行了抗肿瘤研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌种

由本组从正常人类便中分离得到,根据镜检形态染色性及生化反应确定为双歧杆菌并定名 RM1B 株。

### 1.2 细菌培养基

1.2.1 1号2号液体、固体培养基均是从多种培养基配方中筛选出,加入不同还原剂而制成。

1.2.2 牛奶培养基:脱脂奶粉12g加入蒸馏水100ml,消毒备用。

### 1.3 肿瘤细胞株

瘤株 H<sub>22</sub> 肝癌由本室自行传代于小鼠腹腔,应用时抽腹水配成  $4 \times 10^5/0.2\text{ml}$  接种于小鼠右前腋下即为攻瘤鼠。

### 1.4 供试动物

昆明种小鼠,♀6—8周龄,体重  $20 \pm 2\text{g}$ ,本院动物中心提供。

### 1.5 四联球菌

本室保存菌株接种在普通营养平板后收集,4℃保存备用。

### 1.6 试剂

1.6.1 生理盐水:0.8%氯化钠溶液。

1.6.2 溶菌酶:上海东风制药厂产品,电泳纯,比活力 20000u/mg。

溶菌酶标准曲线制作:方法参考徐勤惠<sup>[6]</sup>等略改进,即用 0.067mol/L PBS pH6.4 制备 1%琼脂平板,90℃加入四联球菌使终浓度为

$10^{10}/\text{ml}$ ,凝固打孔(孔径 3mm,孔距 15mm),每孔加入溶菌酶标准品 10μl,作复孔,稀释度为 500、250、125、62.5、50、25、12.5、6.25μg/ml,37℃22h 后测溶菌环直径,以溶菌环直径为横坐标,溶菌酶浓度为纵坐标做标准曲线。

1.6.3. 抗小鼠 L<sub>3</sub>T<sub>4</sub><sup>+</sup>Ly<sub>2</sub><sup>+</sup> 单抗,抗大鼠 Ig-FI 二抗:(由北京医科大学免疫室提供)

### 1.7 耐氧双歧杆菌驯化过程及鉴定

1.7.1 驯化前耐氧性实验:将 RM1B 株接种在 2 号固体培养基上置干燥罐内,按下列四种方式分别培养①抽真空后充混合气体(氮 80%,氢 10%,二氧化碳 10%),重复 2 次②抽真空后只充混合气体一次③只抽真空不充混合气体④需氧培养。经 37℃72h 后只见①长出典型双歧杆菌菌落。②菌生长较差。③和④菌未生长。将 RM1B 株接种在牛奶培养基中 72h 只有①和②条件下发生凝乳现象。从牛奶培养基中取出少许涂片并进行革兰氏染色,观察为驯化前的典型的双歧杆菌(图1)。

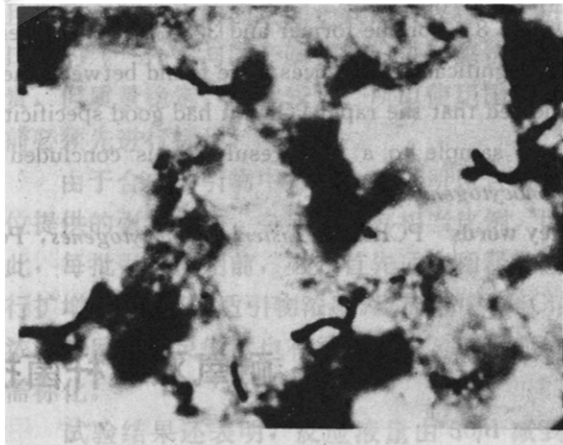


图1 驯化前双歧杆菌形态(×1500)

1.7.2 驯化过程:2号培养基+10%牛奶,抽真空充混合气体,重复二次,37℃24—48h 培养→2号培养基+10%牛奶,抽真空充混合气一次,37℃24—48h 培养→2号培养基+10%牛奶,只抽真空不充气。如此反复 20—30 代后,转入在需氧条件下培养与只抽真空交替培养达 10 余代时即可见到,在 2 号培养基+10%牛奶培养 12—18h 的试管壁上出现点状凝乳现象。

待逐渐减少牛奶量至仅用 2 号培养基在需氧条件下即生长良好。再进行耐氧试验, 看到无论在 20% 大豆胨中或 10% 牛奶中 37℃ 培养 18—24h 即分别发生酪化或凝乳现象。

**1.7.3 驯化双歧杆菌的收集:**经驯化的双歧杆菌接种在 2 号液体培养基中, 37℃ 培养 12h 后, 25000r/min × 10min 用生理盐水洗三次, 放 4℃ 冰箱备用。

**1.7.4 驯化的耐氧双歧杆菌的鉴定:**菌株由中科院微生物研究所根据菌的形态、染色及生化反应鉴定为两歧型双歧杆菌。

**1.7.5 驯化后的双歧杆菌在固体平板上的菌落与驯化前形态相似, 经革兰氏染色镜下形态如图 2 所示。**



图 2 驯化后双歧杆菌形态 (×1500)

## 1.8 抗肿瘤试验方法

将动物分成三组: ①正常对照组②阳性对照组: 将瘤株 H<sub>22</sub> 肝癌在动物右前腋下注入 4 × 10<sup>5</sup>/0.2ml 后隔日腹腔注射生理盐水 0.2ml③治疗组: 注入肿瘤后隔日腹腔注射双歧杆菌 4 × 10<sup>9</sup>/0.2ml, 待注入肿瘤后 10d、20d 时分别处死动物, 进行下列指标检测: ①用 Hanks 液洗出腹腔细胞作为巨噬细胞, 使其浓度为 2 × 10<sup>6</sup>/ml, 取 10μl 加入琼脂板孔中, 37℃ 湿合内 22h 取出测溶菌环直径, 从标准曲线上查出溶菌酶活力。②取脾脏称重计算脾脏指数 (SI) = 脾重 × 100 ÷ 小鼠体重 (g)。③T 细胞亚群计数方法参照试剂盒说明, 即 L<sub>3</sub>T<sub>+</sub>Ly2<sup>+</sup> 加上后 4℃ 30' 洗 3 次后加 Ig-FI 二抗 37℃ 30min 洗三次荧光显微镜观察, 分别记录带有明显环状荧光圈的细胞数的百分比。④将动物体内形成的肿瘤完整剥出, 称重, 计算抑瘤率 = (阳性对照平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) ÷ 阳性组平均瘤重 × 100。

## 2 结果

### 2.1 双歧杆菌对脾脏的刺激作用

从表 1 中可见攻瘤后 10d 和 20d 的小鼠脾重, 治疗组较正常对照组有明显增加 (P < 0.01), 而较阳性对照组虽有增加但无统计学意义。

表 1 双歧杆菌对动物脾脏的刺激作用

	攻瘤后 10d			攻瘤后 20d		
	N <sub>1</sub> (只)	脾重 (g)	SI	N <sub>2</sub> (只)	脾重 (g)	SI
正常对照组	6	0.112 ± 0.04	0.40	5	0.110 ± 0.03	0.39
阳性对照组	7	0.180 ± 0.03	0.67	5	0.206 ± 0.03	0.73
治疗组	5	0.280 ± 0.03**	1.04	12	0.309 ± 0.08*	1.11

\*P < 0.05 \*\*P < 0.01 "N<sub>1</sub>" "N<sub>2</sub>" 示动物数, 下同

### 2.2 双歧杆菌抑瘤作用

从表 2 可见攻瘤 10d 和 20d 抑瘤率分别为

78.8% 和 63.9%, 说明在双歧杆菌应用后对肿瘤有明显抑制作用。

表 2 双歧杆菌对肿瘤的抑制率

	攻瘤后 10d			攻瘤后 20d		
	N <sub>1</sub> (只)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	N <sub>2</sub> (只)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
阳性对照组	6/7	0.190±0.10		5/5	1.56±0.50	
治疗组	2/5	0.040±0.08**	78.8	12/12	0.56±0.20*	63.9

\*P<0.05    \*\*P<0.01    “N<sub>1</sub>” “N<sub>2</sub>” 表示本组发病动物数/处死动物数

2.3 双歧杆菌对巨噬细胞活性的影响

胞活性明显高于正常对照组及阳性对照组，有统计学意义。

从表 3 可见，用双歧杆菌后动物的巨噬细

表 3 双歧杆菌对巨噬细胞活性的影响

	攻瘤后 10d		攻瘤后 20d	
	N <sub>1</sub> (只)	溶菌酶活力 (μg/ml)	N <sub>2</sub> (只)	溶菌酶活力 (μg/ml)
正常对照组	6	17.9±2.6	5	17.6±4.4
阳性对照组	7	20.7±5.8	5	28.1±5.1
治疗组	5	46.2±8.7**	12	82.9±32.8*

\*P<0.05    \*\*P<0.01

2.4 双歧杆菌对 T 细胞亚群的影响

性对照组为高 (P<0.05)。从表中可见 L<sub>3</sub>T<sub>H</sub><sup>+</sup>/Ly2<sup>+</sup> 比例早期(10d) 治疗组与正常对照组无明显区别，而在攻瘤后 20d 时应用双歧杆菌的治疗组 L<sub>3</sub>T<sub>H</sub><sup>+</sup> 高于阳性对照组，两组 L<sub>3</sub>T<sub>H</sub><sup>+</sup>/Ly2<sup>+</sup> 分别为 1.2 和 0.8 (均 P<0.01)，说明双歧杆菌可通过提高荷瘤鼠 T<sub>H</sub> (T 辅助细胞) 数量延缓机体免疫功能的进一步下降。

表 4 结果提示，动物在注入瘤细胞后 (即攻瘤后) 10d 阳性对照组 L<sub>3</sub>T<sub>H</sub> 细胞较正常对照组明显降低 (P<0.05)，而治疗组与正常对照组之间无明显差别。攻瘤 20d 阳性对照组与正常对照组相比，进一步降低，而治疗组 L<sub>3</sub>T<sub>H</sub> 细胞虽较正常对照组稍有降低 (P<0.05) 但较阳

表 4 双歧杆菌对 T 细胞亚群的影响

	攻瘤后 10d				攻瘤后 20d			
	N (只)	L <sub>3</sub> T <sub>H</sub> <sup>+</sup>	Ly2 <sup>+</sup>	Ratio	N <sub>2</sub> (只)	L <sub>3</sub> T <sub>H</sub> <sup>+</sup>	Ly2 <sup>+</sup>	Ratio
正常对照组	6	23.2±1.4	16.7±2.0	1.4±0.2	5	21.7±1.1	19.5±1.4	1.1±0.04
阳性对照组	7	15.2±3.7*	19.2±3.5	0.8±0.1	5	13.2±1.8**	15.6±2.5	0.8±0.08**
治疗组	5	20.3±1.6	19.7±3.2	1.1±0.1	12	17.8±2.4	16.0±3.1	1.2±0.1

\* 正常对照组/阳性对照组    \*\* 阳性对照组/治疗组    Ratio=L<sub>3</sub>T<sub>H</sub><sup>+</sup>/Ly2<sup>+</sup>

3 讨论

3.1 1984 年 Oldman<sup>[7]</sup>根据 BRM (Biological Response Modifier) 理论提出了治疗肿瘤的四代方法——生物疗法。通过本文结果表明，耐

氧双歧杆菌通过增强巨噬细胞活性，恢复荷瘤宿主 T<sub>H</sub>/T<sub>S</sub>，在一定程度上延缓了肿瘤的发生发展，因此该菌有望成为 BRM 家族中的一名新成员。

3.2 溶菌酶广泛分布于机体的体液、分泌液及

巨噬细胞中,我们参照徐勤惠<sup>[6]</sup>的直接检测巨噬细胞内的溶菌酶更能直接反应巨噬细胞的活性,对徐氏方法应用四联球菌细胞壁改进为用全菌做底物,方法简便、可靠、宜于推广。

**3.3 小鼠的  $L_3T_4^+$ 、 $Ly2^+$  细胞亚群相当于人类的  $CD_4^+$  ( $T_h/T_{DTH}$ ) 和  $CD_8^+CD_{11}^+$  ( $T_s$ ) 细胞亚群,**  $T_h$  细胞通过辅助体液免疫应答产生 IL-2  $\gamma$ -IFN 等细胞因子,在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用。Richard 报道  $CD_4^+$  通过在肿瘤部位启动 DTH 反应可活化巨噬细胞等炎症细胞,从而杀死肿瘤细胞<sup>[8,9]</sup>。患肿瘤机体常出现  $CD_4^+CD_8^+$  及  $CD_4^+/CD_8^+$  的改变。荷瘤鼠应用耐氧双歧杆菌治疗后早期 (10d)  $CD_4^+CD_8^+/CD_8^+$  于正常对照组无区别,晚期  $CD_4$  细胞比例下降,表明双歧杆菌可通过提高荷瘤机体  $T_h$ ,延缓 T 细胞免疫功能的进一步降低,这与 Yamaza Ki 报道的结果一致<sup>[3]</sup>。

**3.4 双歧杆菌是机体中的一种正常菌群,对机体的消化、吸收、营养、抗感染免疫和抗肿瘤方面均有促进作用<sup>[10,11]</sup>,但双歧杆菌系专性厌氧菌,为进一步研究开发应用带来了困难,我们经多年驯化的这株两歧型双歧杆菌,形态已由分叉形变为直杆形,但生化反应及菌落特点**

仍保持原始性状。本研究证实耐氧双歧杆菌有明显的增强机体免疫水平和抗肿瘤作用,为双歧杆菌进一步开发应用提供了科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] Kazunori Sekine, Tomohiro Toida, Minoru Saito, et al. Cancer Res, 1985, 4: 1300--1307.
- [2] Mac Donald I. steroids, 1978, 32: 245--246.
- [3] Reddy B S. 3rd International Bifidobacterium Conference, Japan; 1990.
- [4] Mayer J B. Z Kinderheilk (Engl. Abstract), 1964, 91: 222.
- [5] 许本发, 王艳萍, 陈莹. 食品科学, 1994, 2: 3--5.
- [6] 徐勤惠, 杨平平, 张天袁, 等. 中国实验临床免疫学杂志, 1992, 4 (4): 1--4.
- [7] Oldman R K. Cancer Treat Rep, 1984, 68 (1): 221--232.
- [8] Prat M, Bretti S, Amedeo M. Int J Cancer, 1983, 31: 757.
- [9] Prat M, Bretti S, Amedeo M. J Immunol, 1987, 138: 1530.
- [10] 康白主编. 微生物学, 大连: 大连出版社, 1988, 374--383.
- [11] 杨景云主编. 医学微生物学, 佳木斯: 佳木斯医学院出版社, 1991, 184.

## STUDY ON THE ANTITUMOR EFFECT OF OXYGEN-RESISTANT BIFIDOBACTERIUM

Shi Junhua Sun Junjiang Ge Peiling

(Department of Bacteriology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

**Abstract** In this study, a strain of Oxygen-resistant *Bifidobacterium* was used to treat  $H_{22}$  tumor-bearing mice. It was found that the *Bifidobacterium* may play an antitumor effect by activating macrophage and improving  $T_h$  cells' function.

**Key words** Oxygen-resistant *Bifidobacterium*, Antitumor effect, Lysozyme, T cell subsets