

# 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响及机制研究

聂颖兰, 焦 玥, 吴晓霞\*

(中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700)

**摘要:** **目的** 研究鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) R9639 对小鼠免疫功能的调控作用。**方法** 分别灌胃给予小鼠 2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 30 d 后, 测定小鼠脏器/体重比; 抗体生成细胞实验和血清溶血素测定实验评价其对小鼠体液免疫功能的影响; 脾淋巴细胞转化实验和迟发型变态反应实验评价其对小鼠细胞免疫功能的影响; 小鼠碳廓清实验和小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验评价其对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响; 自然杀伤(natural killer, NK)细胞活性测定实验评价其对小鼠 NK 细胞活性的影响。**结果** 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠胸腺/体重比值、脾脏/体重比值均无显著影响( $P>0.05$ )。与对照组相比, 5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组半数溶血素值(half value of hemolysin,  $HC_{50}$ )明显升高( $P<0.05$ )、迟发型变态反应显著增强( $P<0.05$ )、小鼠的碳廓清能力显著提高( $P<0.05$ ); 15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组小鼠 NK 细胞活性显著增强( $P<0.05$ )。**结论** 鼠李糖乳杆菌 R9639 可通过增强体液免疫、细胞免疫、单核-巨噬细胞功能及 NK 细胞活性来增强小鼠的免疫功能。

**关键词:** 鼠李糖乳杆菌 R9639; 小鼠; 免疫功能; 剂量

## Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on immune function in mice and its mechanism

NIE Ying-Lan, JIAO Yue, WU Xiao-Xia\*

(Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the regulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on immune function in mice. **Methods** The mice were treated with *Lactobacillus rhamnosus* R9639 at doses of 2.5, 5.0 and 15.0 mg/kg, respectively, by gavage for 30 days, and then the organ/body weight ratio was measured; the antibody-producing cell assay and serum hemolysin assay were conducted to evaluate their effects on the humoral immune function of mice; spleen lymphocyte transformation test and delayed allergic reaction test were used to evaluate their effects on cellular immune function of mice; the carbon clearance test of mice and the phagocytosis of chicken red blood cells by peritoneal macrophages of mice were used to evaluate the effects on the function of mononuclear-macrophage cells in

基金项目: 中国中医科学院自主业务选题资助项目(zz2018013)

Fund: Supported by the Independent Business Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (zz2018013)

\*通信作者: 吴晓霞, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为中医基础理论。E-mail: xiaoxia2311@sina.com

\*Corresponding author: WU Xiao-Xia, Master, Assistant Professor, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. E-mail: xiaoxia2311@sina.com

mice; and natural killer (NK) cell activity assay was used to evaluate its effect on NK cell activity in mice. **Results** *Lactobacillus rhamnosus* R9639 had no significant effect on the thymus/body weight ratio and spleen/body weight ratio of mice ( $P>0.05$ ). Compared with the control group, the half value of hemolysin ( $HC_{50}$ ) was significantly increased ( $P<0.05$ ) and the delayed-type allergic reaction was significantly enhanced ( $P<0.05$ ) in the 5.0 and 15.0 mg/kg *Lactobacillus rhamnosus* R9639 groups, as well as the carbon clearance of mice ( $P<0.05$ ); and the NK cell activity of mice in the *Lactobacillus rhamnosus* R9639 group at 15.0 mg/kg was significantly increased ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** *Lactobacillus rhamnosus* R9639 can enhance the immune function of mice by enhancing humoral immunity, cellular immunity, monocyte-macrophage function and NK cell activity.

**KEY WORDS:** *Lactobacillus rhamnosus* R9639; mouse; immunomodulatory effect; dose

## 0 引言

功能完备的免疫系统是机体预防感染及肿瘤发生的必要条件。免疫器官、免疫细胞、免疫分子等是机体免疫系统的主要构成部分。免疫器官主要由脾、胸腺、淋巴结、骨髓等组成。免疫细胞中的自然杀伤(natural killer, NK)细胞与非特异性免疫密切相关, T 细胞与细胞免疫有关, 而 B 细胞与体液免疫有关<sup>[1-2]</sup>。随着免疫相关疾病发生率的升高, 人们对增强免疫功能的关注越来越多, 相关的药品或保健食品也越来越受重视。

益生菌是有益于宿主健康的微生物菌株。多项动物实验和临床实验模型证实益生菌适用于治疗多种疾病, 如肥胖症、糖尿病、癌症、心血管疾病、炎症性肠病等, 并且其可协助治疗的疾病种类仍在持续增长中<sup>[3-5]</sup>。活的益生菌、益生菌灭活菌体、菌体细胞壁成分、细胞质成分及其代谢产物均可以提高机体免疫力<sup>[6-7]</sup>。

乳酸菌是益生菌中应用最广泛的一种, 可通过增强吞噬细胞的功能、活化补体等提高实验动物的免疫力, 已成为近年来医学、药学、食品等领域的研究热点<sup>[8]</sup>。鼠李糖乳杆菌菌株(*Lactobacillus rhamnosus*)最初是从人的肠道中被分离出来的, 是一种革兰氏阳性菌, 属于乳杆菌属、鼠李糖乳杆菌种<sup>[9-10]</sup>。鼠李糖乳杆菌菌株能够耐受胃液而进入肠道, 并成功黏附在肠道黏膜层, 进而发挥其益生功能, 维护肠道菌群平衡和肠道稳态平衡<sup>[11]</sup>。鼠李糖乳杆菌 R9639, 又称为鼠李糖乳杆菌 Probio-M9, 是从健康母乳中分离得到的一种性能优异的益生菌<sup>[12]</sup>。乳酸菌菌株对免疫系统的作用常因菌株而异。鼠李糖乳杆菌 R9639 对免疫功能的影响尚未见报道, 本研究旨在重点研究鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响及作用机制, 为其进一步开发利用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

C57BL/6J 小鼠(雄性, 18~22 g, 北京维通利华实验动

物技术有限公司)。

Hank's 液、RPMI1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 二硝基氟苯(2,4-dinitro fluoro benzene, DNFB)(纯度 99%)、刀豆蛋白 A (ConA, 纯度 99%)(美国 Sigma 公司); 都氏试剂、脾细胞分离液、0.4% 台盼兰溶液(北京索莱宝科技有限公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)试剂、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(英国 abcam 公司); NP40(纯度大于 98%)、0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)(碧云天生物科技有限公司); 印度墨汁(纯度 98%)、YAC-1 细胞、20%鸡红细胞(上海源叶生物科技有限公司); 鼠李糖乳杆菌 R9639 菌粉(活菌数 2000 亿/g)(金华银河生物科技有限公司)。

称取冷冻干燥保存的鼠李糖乳杆菌 R9639 菌粉, 用双蒸水溶解后备用。

### 1.2 仪器与设备

MS3 基本型旋涡混合器(德国 IKA 公司); 30L/H 去离子水发生器(美国密理博 Millipore 公司); Multiskan MK3 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); 721 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 奥林巴斯 CX33 显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物及给药

遵循《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)针对增强免疫力评价的管理办法, 研究鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响<sup>[13]</sup>。将小鼠随机分为 8 个免疫组, 每个免疫组都随机分为 4 个实验组, 每组 10 只小鼠, 分别为生理盐水组、鼠李糖乳杆菌活菌菌粉 R9639 低、中、高剂量组(2.5、5.0、15.0 mg/kg)。灌胃容量为 0.1 mL/10 g, 空白对照组给予相应体积的双蒸水。每天灌胃 1 次, 连续 30 d。给药结束后, 分别进行如下实验。

#### 1.3.2 免疫脏器指数的测定

实验当天称重结束后颈椎脱臼处死, 无菌取出小鼠的脾脏、胸腺, 参照文献方法计算免疫脏器指数<sup>[14]</sup>。

### 1.3.3 抗体生成细胞检测

收集绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC), 用生理盐水配成 2% (V:V) 的细胞悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫。用 Jerne 改良玻片法检测抗体生成细胞, 空斑数/ $10^6$  脾细胞表示抗体生成细胞的个数<sup>[15]</sup>。

### 1.3.4 血清溶血素测定

同 1.3.3 方法免疫小鼠 4 d 后, 摘除眼球血于离心管中, 收集血清。参照文献方法计算半数溶血素值(half value of hemolysin,  $HC_{50}$ )<sup>[16]</sup>。

### 1.3.5 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验

给药结束后, 将小鼠脱臼处死, 无菌取脾, 制成每毫升  $3 \times 10^6$  个细胞的混悬液。取 24 孔板, 实验孔每孔加 75  $\mu$ L ConA(终浓度: 7.5  $\mu$ g/mL)+1.0 mL 细胞悬液, 对照孔每孔加 75  $\mu$ L 无菌水+1.0 mL 细胞悬液, 3~5 个复孔, 继续培养 72 h, 测定实验孔和对照孔在 570 nm 处的光密度(optical density, OD)值<sup>[15]</sup>。

### 1.3.6 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应(耳肿胀法)

取 1% DNFB 溶液均匀涂在脱毛后的小鼠腹部皮肤上。5 d 后, 将 1% DNFB 溶液均匀涂在每组小鼠的右耳上。24 h 后处死小鼠, 采用打孔器取相同大小的左右耳片进行称重。左耳作为对照, 以左右耳片的重量差表示迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)的程度<sup>[17]</sup>。

### 1.3.7 小鼠碳廓清实验

取稀释后的印度墨汁, 0.1 mL/10 g 经尾静脉注入小鼠体内。分别于注射后第 2、10 min 眼球取血 20  $\mu$ L, 与 2 mL 0.1%  $Na_2CO_3$  溶液混匀。721 分光光度计检测 600 nm 处的 OD 值,  $Na_2CO_3$  溶液作为空白对照。按照文献方法计算吞噬指数  $\alpha$ <sup>[18]</sup>。

### 1.3.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

制备 20% 鸡红细胞悬液, 经腹腔注入小鼠体内, 1 mL/只。30 min 后处死小鼠, 固定于鼠板。腹腔注入生理盐水 2 mL/只, 吸取腹腔液, 滴到载玻片, 细胞培养箱孵育 30 min。经生理盐水洗涤、丙酮-甲醇溶液(1:1, V:V)固定、4% Giemsa-磷酸缓冲液染色、蒸馏水洗涤后晾干<sup>[16]</sup>。油镜下观察并计数, 计算吞噬百分率。

### 1.3.9 NK 细胞活性测定

无菌取脾, 制成每毫升  $2 \times 10^7$  个细胞的单细胞悬液,

用作效应细胞。收集对数生长期的 YAC-1 细胞, 制成每毫升  $4 \times 10^5$  个细胞的单细胞悬液, 用作靶细胞。参照文献方法计算 NK 细胞活性(%)<sup>[16]</sup>。

### 1.3.10 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准偏差表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件分析, 多组间比较采用单因素方差分析(one way analysis of variance, ANOVA)检验, 成对组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠脏器/体重比值测定结果

实验期间, 各组小鼠生活状况良好。各组小鼠的给药前体重和实验结束体重均未发现显著性差异(见表 1), 说明 2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠均无显著毒性( $P > 0.05$ )。鼠李糖乳杆菌 R9639 不同剂量组对小鼠免疫脏器指数的影响结果见表 1。连续给予 2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 30 d 后, 与空白对照组相比, 各组小鼠的脾脏/体重比值与胸腺/体重比值差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。这表明高中低 3 个浓度的鼠李糖乳杆菌对小鼠的脏器/体重比值无明显影响, 初步证明了其安全性。

### 2.2 对小鼠体液免疫功能的影响结果

#### 2.2.1 对小鼠抗体生成细胞的影响

2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组与空白对照组的空斑数(/ $10^6$  脾细胞)分别为  $26 \pm 8$ 、 $31 \pm 5$ 、 $30 \pm 4$ 、 $32 \pm 4$ ; 各剂量组与空白对照组相比差异均无统计学意义( $P > 0.05$ , 表 2)。这表明, 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠抗体生成细胞的能力无明显影响。

#### 2.2.2 对小鼠半数溶血素值的影响

$HC_{50}$  值常用来评价 SRBC 细胞发生溶血反应产生溶血素的能力<sup>[16]</sup>。2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组与空白对照组的  $HC_{50}$  分别为  $61.24 \pm 12.25$ 、 $74.61 \pm 16.27$ 、 $89.47 \pm 17.25$ 、 $54.14 \pm 10.41$ ; 其中, 与空白对照组相比, 5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组的  $HC_{50}$  显著升高( $P < 0.05$ , 表 2)。这表明, 中高剂量下鼠李糖乳杆菌 R9639 均可显著增强 SRBC 细胞发生溶血反应产生溶血素的能力。

表 1 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠脏器/体重比值的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on mice organ to body weight ratios ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别               | 初始体重/g           | 终末体重/g           | 脾脏/体重比值/(mg/g)  | 胸腺/体重/(mg/g)    |
|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 空白对照组            | 19.78 $\pm$ 1.14 | 29.69 $\pm$ 1.18 | 2.63 $\pm$ 0.76 | 2.35 $\pm$ 0.92 |
| 低剂量组(2.5 mg/kg)  | 20.56 $\pm$ 1.07 | 30.18 $\pm$ 1.29 | 2.67 $\pm$ 1.25 | 2.53 $\pm$ 1.12 |
| 中剂量组(5.0 mg/kg)  | 19.97 $\pm$ 1.46 | 29.87 $\pm$ 1.35 | 2.75 $\pm$ 1.01 | 2.60 $\pm$ 0.98 |
| 高剂量组(15.0 mg/kg) | 20.74 $\pm$ 1.20 | 30.45 $\pm$ 1.37 | 3.05 $\pm$ 0.84 | 2.47 $\pm$ 0.75 |

表2 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠血清溶血素与抗体生成细胞的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on hemolytic activities and number of antibody producing cells ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别               | 空斑数<br>(/10 <sup>6</sup> 脾细胞) | HC <sub>50</sub> |
|------------------|-------------------------------|------------------|
| 空白对照组            | 32±4                          | 54.14±10.41      |
| 低剂量组(2.5 mg/kg)  | 26±8                          | 61.24±12.25      |
| 中剂量组(5.0 mg/kg)  | 31±5                          | 74.61±16.27*     |
| 高剂量组(15.0 mg/kg) | 30±4                          | 89.47±17.25*     |

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ,下同。

## 2.3 对小鼠细胞免疫功能的影响结果

### 2.3.1 对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化的影响

鼠李糖乳杆菌 R9639 不同剂量组及对照组对 ConA 促进脾淋巴细胞增殖作用结果见表 3。与空白对照组相比,2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组光密度差值差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明,鼠李糖乳杆菌 R9639 对 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖无影响。

### 2.3.2 对小鼠 DTH 的影响

2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组与空白对照组的耳廓肿胀度分别为 12.42±1.17、14.87±1.24、16.05±1.75、11.14±1.04 mg;其中,与空白对照组相比,5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组的耳廓肿胀度均有所增高且差异显著( $P<0.05$ )。DNFB 诱导小鼠 DTH 常用来评价药物对小鼠细胞免疫功能的影响<sup>[12]</sup>。这一结果表明,高中剂量的鼠李糖乳杆菌 R9639 能显著增强再次注射 SRBC 前后动物的耳廓肿胀度,提示鼠李糖乳杆菌 R9639 能提高机体对外来抗原的识别及清除能力。

表3 鼠李糖乳杆菌 R9639 对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖能力及耳廓肿胀度的影响结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on ConA-induced lymphocyte proliferation and auricle swelling in mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别                   | 脾淋巴细胞增殖能力(OD <sub>570 nm</sub> ) |           |           | 廓肿胀度<br>/mg |
|----------------------|----------------------------------|-----------|-----------|-------------|
|                      | ConA(-)                          | ConA(+)   | OD 差值     |             |
| 空白对照组                | 0.51±0.12                        | 0.98±0.10 | 0.47±0.11 | 11.14±1.04  |
| 低剂量组<br>(2.5 mg/kg)  | 0.52±0.10                        | 0.96±0.08 | 0.44±0.09 | 12.42±1.17  |
| 中剂量组<br>(5.0 mg/kg)  | 0.51±0.09                        | 0.98±0.12 | 0.47±0.06 | 14.87±1.24* |
| 高剂量组<br>(15.0 mg/kg) | 0.53±0.08                        | 1.03±0.11 | 0.50±0.10 | 16.05±1.75* |

## 2.4 对单核-巨噬细胞功能影响结果

### 2.4.1 对小鼠碳廓清功能的影响

小鼠碳廓清实验常用来反映单核-巨噬细胞的吞噬能

力<sup>[17-18]</sup>。鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠碳廓清功能的影响结果见表 4。2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组与空白对照组的吞噬指数  $\alpha$  分别为 6.35±0.91、7.87±0.57、8.92±0.74、5.15±0.78;其中,5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组小鼠的吞噬指数  $\alpha$  显著高于空白对照组( $P<0.05$ )。这一结果表明,5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 能显著增强小鼠碳廓清能力。

### 2.4.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响

给予 2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 30 d 后,3 个剂量鼠李糖乳杆菌 R9639 组的吞噬率(%)与空白对照组相比差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,表 4)。这表明,鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬能力无影响。

表4 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on the function of monocyte macrophage of the mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别               | 小鼠碳廓清实验吞噬指数( $\alpha$ ) | 单核-巨噬细胞功能吞噬率/% |
|------------------|-------------------------|----------------|
| 空白对照组            | 5.15±0.78               | 19.72±3.58     |
| 低剂量组(2.5 mg/kg)  | 6.35±0.91               | 20.20±4.04     |
| 中剂量组(5.0 mg/kg)  | 7.87±0.57*              | 23.54±3.57     |
| 高剂量组(15.0 mg/kg) | 8.92±0.74*              | 20.47±4.47     |

## 2.5 对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞是常见的免疫淋巴细胞,具有非特异性抗肿瘤、抗病毒作用<sup>[19]</sup>。2.5、5.0、15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组与空白对照组的 NK 细胞活性(%)分别为 28.87±14.16、32.47±10.14、36.14±9.47、30.47±10.22;其中,15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 组的 NK 细胞活性(%)显著高于对照组( $P<0.05$ )。本研究结果表明 15.0 mg/kg 的鼠李糖乳杆菌 R9639 能显著影响 NK 细胞的活性。

表5 鼠李糖乳杆菌 R9639 对 NK 细胞活性的影响结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on NK cell activity ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别               | NK 细胞活性/%   |
|------------------|-------------|
| 空白对照组            | 30.47±10.22 |
| 低剂量组(2.5 mg/kg)  | 28.87±14.16 |
| 中剂量组(5.0 mg/kg)  | 32.47±10.14 |
| 高剂量组(15.0 mg/kg) | 36.14±9.47* |

## 3 结论与讨论

鼠李糖乳杆菌具有显著的抗肠道致病菌、抗病毒作用

以及调节免疫功能的能力<sup>[20-23]</sup>。研究显示, 鼠李糖乳杆菌主要通过调节肠通透性和炎性小体对斑马鱼酒精肝脏起保护作用<sup>[24]</sup>。同时, 鼠李糖乳杆菌可降低早产儿小肠结肠炎发病率, 缓解小儿营养不良, 并通过上调 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 抑制剂以保护肠道免受 TLRs 介导产生的免疫损伤<sup>[25]</sup>。细菌细胞壁肽聚糖、脂磷壁酸或胞外多糖等成分激活免疫系统的巨噬细胞、NK 细胞等免疫效应细胞, 产生免疫反应<sup>[26-28]</sup>。鉴于不同益生菌株细胞壁结构的不同, 会对免疫功能产生不同的影响<sup>[29]</sup>, 本研究系统研究了鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响, 以促进其更好的开发应用。

动物的胸腺和脾脏是起免疫反应的主要器官, 通常用胸腺指数和脾指数初步反应免疫器官的发育和免疫细胞的功能状况<sup>[30]</sup>。本研究结果表明, 各剂量鼠李糖乳杆菌 R9639 组小鼠脾脏指数和胸腺指数无差异, 初步证明了其安全性。但其急性毒性、遗传毒性、亚慢性毒性等尚需进一步的体内外实验验证。

接下来通过脾淋巴细胞转化增殖实验、小鼠碳廓清实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验、DNFB 诱导小鼠 DTH 实验、抗体生成细胞实验、血清溶血素测定、NK 细胞活性实验等来综合判定鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响。结果表明, 鼠李糖乳杆菌 R9639 能增强体液免疫、细胞免疫和单核-巨噬细胞功能及 NK 细胞活性来增强小鼠的免疫功能。

DNFB 诱导小鼠 DTH 常用来评价药物对小鼠细胞免疫功能的影响<sup>[12]</sup>。近年来关于乳酸菌对 DTH 的影响已有一些报道, *L. casei* 活菌体细胞可增强鼠体内抗原特异性的 DTH 效应<sup>[5]</sup>。本研究结果表明, 鼠李糖乳杆菌 R9639 能显著增强再次注射 SRBC 前后动物的耳肿胀度, 提示鼠李糖乳杆菌 R9639 能提高机体对外来抗原的识别及清除能力。NK 细胞是常见的免疫淋巴细胞, 具有非特异性抗肿瘤、抗病毒作用。益生菌细胞壁肽聚糖的主要成分是胞壁酰二肽, 可激活巨噬细胞释放白介素 1 和白介素 6, 诱导淋巴细胞产生干扰素  $\gamma$ , 增强 NK 细胞的杀伤作用<sup>[19-20]</sup>。本研究结果也表明鼠李糖乳杆菌 R9639 能显著影响 NK 细胞的活性, 其确切机制有待于进一步研究。

本研究表明, 鼠李糖乳杆菌 R9639 可显著增强小鼠的免疫功能, 这为其作为免疫增强剂的开发和利用提供了数据支持。

## 参考文献

- BERTHELOT JM, SIBILIA J. Trained immunity and autoimmune disease: Did eve sin before adam? [J]. *Joint Bone Spine*, 2019, 86(3): 293-295.
- SMITH DR. Herd Immunity [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2019, 35(3): 593-604.
- 王淑梅, 邸维, 妥彦峰, 等. 益生菌的免疫调控作用研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(5): 23-26.
- WANG SM, DI W, TUO YF, *et al.* Research progress on immune regulation of probiotics [J]. *J Cere Oils*, 2021, 34(5): 23-26.
- YOUSEFI B, ESLAMI M, GHASEMIAN A, *et al.* Probiotics importance and their immunomodulatory properties [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8008-8018.
- FM A, PYDA A, AWB B, *et al.* A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2019, 555: 1-10.
- PIQUE N, BERLANGA M, MINANA-GALBIS D. Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2534.
- CARLA P, GEORGIOS S, ALESSIO T, *et al.* Proneurogenic and neuroprotective effect of a multi strain probiotic mixture in a mouse model of acute inflammation: Involvement of the gut-brain axis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105795.
- 谢玉锋, 王龙飞, 刘洋, 等. 功能性乳酸菌在食品中的应用及展望[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(5): 4-6.
- XIE YF, WANG LF, LIU Y, *et al.* Application and perspective of functional lactic acid bacteria in food [J]. *J Cere Oils*, 2021, 34(5): 4-6.
- STAGE M, WICHMANN A, JORGENSEN M, *et al.* Genomic and phenotypic stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in an industrial production process [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(6): e02780.
- LI N, PANG B, LI J, *et al.* Mechanisms for *Lactobacillus rhamnosus* treatment of intestinal infection by drug-resistant *Escherichia coli* [J]. *Food Funct*, 2020, 11(5): 4428-4445.
- XU H, HIRAISHI K, KURAHARA LH, *et al.* Inhibitory effects of breast milk-derived *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 on colitis associated carcinogenesis by restoration of the gut microbiota in a mouse model [J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1143.
- 徐瑞波, 高广琦, 白晓晔, 等. 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 的特异性荧光原位杂交探针设计及应用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11): 230-235.
- XU RB, GAO GQ, BAI XH, *et al.* Design and application of specific fluorescence *in situ* hybridization probe for *Lactobacillus rhamnosus* probio-M9 [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(11): 230-235.
- 王为兰, 陈开旭, 刘军, 等. 阿魏菇提取物抗肿瘤功效及三萜类成分的提取[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(7): 206-216.
- WANG WL, CHEN KX, LIU J, *et al.* Antitumor effects of enthnol extract of *Aweigu* and extraction of triterpenoids [J]. *Biotechnol Bull*, 2016, 32(7): 206-216.
- 刘冬英, 刘臻, 张丽婧, 等. 免疫防御蛋白粉对小鼠免疫功能的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1945-1949.
- LIU DY, LIU Z, ZHANG LJ, *et al.* Effect of immune defence protein powder on immune function in mice [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(5): 1945-1949.
- 吴琼, 张丽艳, 黄颖, 等. 参芪茯苓片拆方对小鼠免疫功能的影响[J]. *贵州中医药大学学报*, 2021, 43(1): 29-33.
- WU Q, ZHANG LY, HUANG Y, *et al.* Effect of Shenqifuling tablet on immune function in mice [J]. *J Guizhou Univ Tradit Chin Med*, 2021, 43(1): 29-33.
- 高雅馨, 于有强, 朱巧莎, 等. 天然生物大分子及其复合物在食品微凝胶传递体系中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 323-329.
- GAO YX, YU YQ, ZHU QS, *et al.* A literature review on the application of natural biomacromolecules and their complexes in food microgel

- delivery system [J]. Food Sci, 2019, 40(15): 323–329.
- [17] 马小双, 蒋倩, 李文艳. 白及粗多糖功效研究[J]. 绿色科技, 2019, 20: 153–155.  
MA XS, JIANG Q, LI WY. Function of Baiji crude polysaccharide [J]. Green Technol, 2019, 20: 153–155.
- [18] 邱涵, 吕晓君. 石斛枸杞颗粒对小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽医药, 2019, 23(3): 458–462.  
QIU H, LV XJ. Effect of Shihugouqi granule on immune function in mice [J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(3): 458–462.
- [19] 宋红卫, 张惠喜, 朱丽君, 等. 紫锥菊提取物对环磷酰胺免疫抑制小鼠免疫功能影响研究[J]. 饲料博览, 2019, 1: 30–33.  
SONG HW, ZHANG HX, ZHU LJ, et al. Study of echinacea extract on immune function effects in cyclophosphamide immunosuppressive mice [J]. Feed Rev, 2019, 1: 30–33.
- [20] DUBE Y, KHAN A, MARIMANI M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* cell-free extract targets virulence and antifungal drug resistance in *Candida albicans* [J]. Can J Microbiol, 2020, 66(12): 733–747.
- [21] SONG H, ZHANG J, QU J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules inhibit *Escherichia coli* biofilm formation in coculture [J]. Biotechnol Lett, 2019, 41(8-9): 1007–1014.
- [22] STIVALA A, CAROTA G, FUOCHI V, et al. *Lactobacillus rhamnosus* AD3 as a promising alternative for probiotic products [J]. Biomolecules, 2021, 11(1): 94.
- [23] NADKARNI MA, DESHPANDE NP, WILKINS MR, et al. Intra-species variation within *Lactobacillus rhamnosus* correlates to beneficial or harmful outcomes: Lessons from the oral cavity [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 661.
- [24] BRUCH-BERTANI JP, URIBE-CRUZ C, PASQUALOTTO A, et al. Hepatoprotective effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG through the modulation of gut permeability and inflammasomes in a model of alcoholic liver disease in zebrafish [J]. J Am Coll Nutr, 2020, 39(2): 163–170.
- [25] CUNA A, YU W, MENDEN HL, et al. NEC-like intestinal injury is ameliorated by *Lactobacillus rhamnosus* GG in parallel with SIGIRR and A20 induction in neonatal mice [J]. Pediatr Res, 2020, 88(4): 546–555.
- [26] 托娅, 张和平. 一株分离自内蒙古传统酸马奶中的乳酸杆菌 *Lactobacillus casei*. Zhang 对小鼠免疫功能的影响[J]. 中外医疗, 2008, 11: 39–42.  
TUO Y, ZHANG HP. Effect of *Lactobacillus casei*. Zhang isolated from traditional milk in Neimenggu on immunologic function of mice [J]. China Foreign Med Treat, 2008, 11: 39–42.
- [27] 蒙月月, SATHI CHOWDHURY, SHUVAN KUMARSARKER, 等. 植物乳杆菌 KLDS 1.0318 对小鼠免疫调节作用初步研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 303–308.  
MENG YY, SATHI C, SHUVAN K, et al. Preliminary study on the immunomodulatory function of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318 in mice [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(7): 303–308.
- [28] CUNA A, YU W, MENDEN HL, et al. NEC-like intestinal injury is ameliorated by *Lactobacillus rhamnosus* GG in parallel with SIGIRR and A20 induction in neonatal mice [J]. Pediatr Res, 2020, 88(4): 546–555.
- [29] 任大勇, 秦艳青, 李昌, 等. 乳酸菌免疫调节功能研究进展[J]. 猪业观察, 2015, 2: 94–97.  
REN DY, QIN YQ, LI C, et al. Research progress of immune modulation function of lactic acid bacteria [J]. Swine Ind Outlook, 2015, 2: 94–97.
- [30] 沙玥彤, 蔡胡强, 綦振亮, 等. 常青素对小鼠免疫功能的影响及机制研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2020, 54(6): 569–575.  
SHA YT, CAI HQ, QI ZL, et al. Effects of Changqingsu on immune function in mice and its mechanism [J]. J Harbin Med Univ, 2020, 54(6): 569–575.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介

聂颖兰, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为药物分析。

E-mail: nyl100@163.com

吴晓霞, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为中医基础理论。

E-mail: xiaoxia2311@sina.com