

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.16.002

植物乳杆菌 P-8 对小鼠免疫功能的调节作用研究 *

刘晓卉 潘姝杉 魏小倩 苗茸茸 徐平湘[△]

(首都医科大学基础医学院药理学系 北京 100069)

摘要 目的:不同类型的益生菌免疫调节功能各异。本文旨在评价植物乳杆菌 P-8(*Lactobacillus plantarum* P-8)对小鼠免疫功能的调控作用及机制。**方法:**C57BL/6J 小鼠每日灌胃给予不同剂量的植物乳杆菌 P-8(0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.5 mg/kg),连续 30 天,记录小鼠一般情况。给药结束后处死动物,测定小鼠脏器/体重比;小鼠碳廓清实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验评价各组小鼠的单核-巨噬细胞功能;血清溶血素测定、抗体生成细胞实验评价各组小鼠的体液免疫功能;脾淋巴细胞转化实验、迟发型变态反应实验评价各组小鼠的细胞免疫功能;NK 细胞的活性测定实验评价小鼠的 NK 细胞活性。**结果:**与对照组相比,低、中、高剂量组植物乳杆菌 P-8 对小鼠脏器/体重比值差异无统计学意义($P>0.05$);且植物乳杆菌 P-8 可显著提高小鼠的碳廓清能力、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力、半数溶血值、二硝基氟苯诱导的小鼠迟发型变态反应及 NK 细胞活力(P 均 <0.05)。**结论:**植物乳杆菌 P-8 可通过提高单核-巨噬细胞功能、体液免疫功能、细胞免疫功能及 NK 细胞活力增强小鼠的免疫功能。

关键词:植物乳杆菌 P-8;小鼠;免疫功能;剂量

中图分类号:R-33;R378.2;R378.992 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)16-3005-05

Immunomodulatory Effect of *Lactobacillus Plantarum* P-8 in Mice*

LIU Xiao-hui, PAN Shu-shan, WEI Xiao-qian, MIAO Rong-rong, XU Ping-xiang[△]

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: Different types of probiotics have different immunomodulatory functions. The present study aimed to evaluate the immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 in mice and its mechanism. **Methods:** Normal C57BL/6J mice received intragastric administration of *Lactobacillus plantarum* P-8 (0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, and 1.5 mg/kg) once daily for 30 days, while a control group received the same amount of water. The immunity of mice was evaluated by their organ ratios. The function of monocyte macrophage was evaluated by carbon clearance test and mouse peritoneal macrophage phagocytosis of chicken red blood cells. The humoral immunity of mice was evaluated by serum hemolysin assay and antibody producing cell assay. The cellular immunity was evaluated by ConA-induced mouse splenic lymphocyte transformation assay and delayed hypersensitivity induced by DNFB. NK cell activity was evaluated by NK cell activity assay. **Results:** Compared with the control group, *Lactobacillus plantarum* P-8 showed no significant effects on organ ratios of the mice. *Lactobacillus plantarum* P-8 significantly increased the murine macrophage carbon clearance function, mouse peritoneal macrophage phagocytosis of chicken red blood cells, hemolytic activity, delayed hypersensitivity induced by dinitrofluorobenzene, and NK cell activity. **Conclusions:** *Lactobacillus plantarum* P-8 exhibited potent immunomodulatory effects by increasing function of monocyte macrophage, cellular immunity, humoral immunity, and NK cell activity.

Key words: *Lactobacillus plantarum* P-8; Mouse; Immunomodulatory effect; Dose

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R378.2; R378.992 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)16-3005-05

前言

肠道微生物群不仅与肠道免疫的关系密切,而且影响了全身免疫系统。研究和筛选具有免疫调节功能的益生菌株已成为目前功能食品研究的热点^[1]。益生菌株可通过改善肠道微生物构成、产生抗炎因子、抑制病原菌群生长,从而预防和治疗一些消化道疾病。随着免疫性疾病发生率的提高,免疫功能增强相关的药品或保健食品也受到了普遍重视^[2,3]。

乳酸菌是益生菌当中使用最广泛的一种菌种,具有激活机

体保护性免疫反应的能力。研究表明,乳酸菌制剂不仅可以增强单核吞噬细胞活性而影响非特异性免疫应答,还可以通过加强体液免疫、刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖等机制增强特异性免疫应答,进而提高动物对各种病原体的抵抗力^[1,4]。

植物乳杆菌 P-8 (*Lactobacillus plantarum* P-8, IMAU1012)是从内蒙古巴彦淖尔市乌拉特中旗草原上牧民家庭自然发酵牛乳样品中分离筛选出的 1 株性能优良的益生菌^[7,8]。与同类菌株相比,P-8 能更有效地抑制大肠杆菌 *E. coli* O157:H7 的体外生长^[9]。在一项植物乳杆菌 P-8 的 28 天口服给药的临床试验

* 基金项目:北京市自然科学基金面上项目(7172029)

作者简介:刘晓卉(1989-),女,学士学位,主管技师,研究方向:分子药理学,E-mail: liuxiaohui2013@aliyun.com

[△] 通讯作者:徐平湘,女,副主任技师,研究方向:中药药理学,E-mail: syxpx88@163.com,电话:010-83950410

(收稿日期:2021-10-31 接受日期:2021-11-26)

中,P-8 在第 2 周就显著升高老年人的粪便中分泌型免疫球蛋白 a(sIgA)水平,并增加肠道中的双歧杆菌菌的数量^[10]。且 P-8 对脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)等条件致病菌也有一定的抑制作用^[10]。该菌株具有优异的耐受胃酸、肠液和胆盐能力,已成为目前国内重点研究开发的益生菌之一^[11-13]。

由于不同菌株细胞壁构成不同,其对免疫细胞的影响也就不同^[14,15]。此外,不同的乳酸菌产生的胞外多糖等代谢产物亦不同,其对免疫力的影响也不同^[16]。故,不同类型的乳酸菌株的免疫调节功能各异^[15-17]。但目前植物乳杆菌 P-8 对小鼠免疫功能的影响尚未见系统研究,本文重点研究了植物乳杆菌 P-8 对小鼠免疫功能的调节作用,为其开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基、胎牛血清、Hank's 液购自美国 Gibco 公司;二硝基氟苯(DNFB)、刀豆蛋白 A(ConA)购自 Sigma 公司;淋巴细胞分离液、0.4%台盼兰溶液购自北京索莱宝科技有限公司;MTT 试剂、LDH 检测试剂盒购自 abcam 公司;1% NP40、0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)购自碧云天生物科技有限公司;印度墨汁、YAC-1 细胞、20%鸡红细胞购自上海源叶生物科技有限公司。植物乳杆菌 P-8 菌株(活菌数 2000 亿/g,批号:2021012301)来自金华银河生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及给药 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(雄性,18-22 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010)。饲养环境:室温(23±2)℃,相对湿度:40%~70%。本研究所有动物实验均已通过伦理审查(伦理批号:SRSWLL-2021091802)。称取冷冻干燥保存的植物乳杆菌 P-8 菌株,用双蒸水溶解后备用。小鼠随机分为 8 个免疫组,每组 40 只。每个免疫组分为双蒸水组、植物乳杆菌 P-8 低、中、高剂量组(0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.5 mg/kg),每组 10 只。分别灌胃给药,0.1 mL/10 g,每天 1 次,30 d。每日记录小鼠的一般状态,每周称重。

1.2.2 免疫脏器指数的测定 实验结束后,处死小鼠,无菌取脾脏、胸腺,将周围组织剥离干净,用滤纸吸净血液,分别称重,并计算胸腺或脾脏与体重的比值。

1.2.3 小鼠碳廓清实验 将印度墨汁经生理盐水 4 倍稀释后,0.1 mL/10 g 经尾静脉注入小鼠体内。分别于第 2、10 min 从内眦静脉各取血 20 μL,加至 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。用 721 分光光度计在 600 nm 波长处测定光密度值(OD),以 Na₂CO₃ 溶液为空白对照。计算吞噬指数 α^[18,19]。

1.2.4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法) 将 20%鸡红细胞悬液腹腔注射入小鼠体内,1 mL/只。间隔 30 min,脱臼处死小鼠,固定于鼠板。腹腔注入 2 mL 生理盐水,将鼠板转动 1 min,吸出腹腔洗液滴于 2 片载玻片上,37℃孵育 30 min。分别经生理盐水漂洗、1:1 丙酮-甲醇溶液固定、4%(v/v)Giemsa-磷酸缓冲液染色、蒸馏水漂洗后晾干。油镜下计数巨噬细胞,每张片计数 100 个,按下式计算吞噬百分率^[20]。

1.2.5 血清溶血素测定 取生理盐水配成的 2%(v/v)绵羊红

细胞(SRBC)悬液,0.2 mL 每只经腹腔注入至小鼠体内进行免疫。4 天后,摘除眼球取血,收集血清。按照文献方法计算半数溶血值(HC₅₀)^[18]。

1.2.6 抗体生成细胞检测 同 1.2.5 方法免疫小鼠,4 天后处死小鼠,无菌取脾,磨碎后制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 5×10⁶ 个/mL。用 Jerne 改良玻片法检测抗体生成细胞^[22]。

1.2.7 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验 给药结束后,脱臼处死,无菌取脾,用 RPMI1640 完全培养基重悬成 3×10⁶ 个/mL 的单细胞悬液。将脾细胞悬液加至 24 孔培养板中,每孔 1.0 mL,一孔为实验组加 75 μL ConA/孔(终浓度为 7.5 μg/mL),另一孔为对照组加 75 μL 无菌水。按文献方法测定 570 nm 处的 OD 值^[23]。

1.2.8 二硝基氟苯诱导小鼠 DTH(耳肿胀法) 取 50 μL 1% 二硝基氟苯(DNFB)溶液,均匀涂抹在脱毛后的小鼠腹部皮肤进行致敏反应。5 d 后,取 20 μL 1% DNFB 溶液均匀涂抹右耳上。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。以两耳片的重量之差表示 DTH 的程度^[19]。

1.2.9 NK 细胞活性测定 无菌取脾,制成 2×10⁷ 个/mL 的单细胞悬液。收集 YAC-1 细胞,制成 4×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液。按文献方法测定 NK 细胞活性(%)^[20]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行数据分析。各组结果以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析(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

2.1 小鼠脏器/体重比值测定结果

实验期间,各实验组及对照组小鼠一般状况良好,未出现死亡。给药 30 天前,各组小鼠的初始体重与终末体重差别范围在 8.73-9.98 g,各组间初始体重和终末体重均未发现显著性差异(P>0.05,见表 1),提示低、中、高剂量组植物乳杆菌 P-8 对健康小鼠均无明显毒性。不同剂量的植物乳杆菌 P-8 对小鼠免疫脏器指数的影响结果见表 1。连续给予不同剂量植物乳杆菌 P-8 30 d 后,各剂量组小鼠的脾脏/体重比值、胸腺/体重比值与空白对照组相比差异均无统计学意义(P>0.05)。这表明植物乳杆菌 P-8 对小鼠的免疫器官的重量无显著影响,进一步证明了其安全性。

2.2 对单核-巨噬细胞功能影响结果

单核-巨噬细胞是具有抗感染、抗肿瘤和免疫调节作用的免疫细胞,反映了机体非特异性免疫反应的强弱^[20]。不同剂量植物乳杆菌 P-8 组小鼠注入 0.1 mL/10 g 印度墨汁 2、10 min 后取血检测其碳廓清功能。表 2 为不同剂量的植物乳杆菌 P-8 对小鼠碳廓清功能的影响结果。低、中、高三个剂量组与空白对照组的吞噬指数 α 分别为 6.24±0.84、7.76±0.49、8.62±0.85、5.82±1.01;其中,中、高剂量组小鼠的吞噬指数 α 与空白对照组相比具有统计学差异(P<0.05)。

给予小鼠低、中、高剂量的植物乳杆菌 P-8 30 d 后,腹腔注射 20%鸡红细胞悬液 1 mL/只,30 min 后处死小鼠,吸取腹腔巨噬细胞检测其吞噬指数和吞噬百分率。给予低、中、高剂量的植物乳杆菌 P-8 30 d 后,低、中、高三个剂量组与空白对照组的

小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率分别为 $20.24 \pm 4.76\%$ 、 $27.01 \pm 5.04\%$ 、 $30.21 \pm 3.41\%$ 、 $17.01 \pm 4.25\%$ ；其中，中、高剂量组的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 表 2)。

以上结果均表明植物乳杆菌 P-8 能有效增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力,提示小鼠非特异性免疫能力显著增强。

表 1 植物乳杆菌 P-8 对小鼠脏器 / 体重比值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 1 Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on mice organs ratios to body weight ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Groups	Initial weight(g)	Final weight(g)	Spleen/weight(mg/g)	Thymus/weight(mg/g)
Negative control	20.32 ± 1.41	29.09 ± 1.12	2.54 ± 0.61	2.63 ± 0.92
Low dose (0.25 mg/kg)	20.41 ± 1.04	29.14 ± 1.28	2.49 ± 1.02	2.58 ± 1.08
Medium dose (0.5 mg/kg)	19.95 ± 1.80	29.57 ± 1.67	3.05 ± 1.07	2.86 ± 0.49
High dose (1.5 mg/kg)	20.25 ± 1.05	30.23 ± 2.05	3.14 ± 0.88	2.54 ± 0.85

表 2 植物乳杆菌 P-8 对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on the function of monocyte macrophage of the mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Groups	Phagocytic index of carbon clearance test (α)	Phagocytic rate of mononuclear-macrophages (%)
Negative control	5.82 ± 1.01	17.01 ± 4.25
Low dose (0.25 mg/kg)	6.24 ± 0.84	20.24 ± 4.76
Medium dose (0.5 mg/kg)	$7.76 \pm 0.49^*$	$27.01 \pm 5.04^*$
High dose (1.5 mg/kg)	$8.62 \pm 0.85^*$	$30.21 \pm 3.41^*$

Note: Compared with the negative control, $*P < 0.05$.

2.3 对小鼠体液免疫功能的影响结果

HC₅₀ 的测定可评价 SRBC 细胞发生溶血反应产生溶血素的能力^[20,21]。给予小鼠低、中、高剂量的植物乳杆菌 P-8 30 d 后,腹腔注射 2% 的 SRBC 细胞进行免疫,4 天后取血清检测 HC₅₀。低、中、高三个剂量的植物乳杆菌 P-8 对小鼠血清溶血素的影响结果见表 3。低、中、高三个剂量组与空白对照组样品的 HC₅₀ 分别为 70.40 ± 15.53 、 95.65 ± 17.32 、 109.43 ± 14.60 、 56.76 ± 12.54 ;统计结果表明,三个剂量组的 HC₅₀ 与空白对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 3)。

空斑的数量是反映机体的体液免疫功能的重要指标。给予小鼠低、中、高剂量的植物乳杆菌 P-8 30 d 后,取各组小鼠脾细胞制成 5×10^6 个 / mL 的悬液。Jerne 改良玻片法检测抗体生成细胞数。抗体生成细胞检测结果表明,低、中、高三个剂量组与空白对照组的空斑数(/10⁶ 脾细胞)分别为 28 ± 7 、 30 ± 6 、 31 ± 8 、 35 ± 5 ;统计结果表明,三个剂量组的空斑数与空白对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

以上结果表明,给予植物乳杆菌 P-8 能显著提高小鼠体液免疫功能。

表 3 植物乳杆菌 P-8 对小鼠血清溶血素与抗体生成细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 3 Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on hemolytic activity and number of antibody producing cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Groups	HC ₅₀	Plaque number (/10 ⁶ spleen cells)
Negative control	56.76 ± 12.54	35 ± 5
Low dose (0.25 mg/kg)	$70.40 \pm 15.53^*$	28 ± 7
Medium dose (0.5 mg/kg)	$95.65 \pm 17.32^*$	30 ± 6
High dose (1.5 mg/kg)	$109.43 \pm 14.60^*$	31 ± 8

Note: Compared with the negative control, $*P < 0.05$.

2.4 对小鼠细胞免疫功能的影响结果

T 淋巴细胞受到 ConA 刺激后会转化为母细胞持续增殖。通过 MTT 法检测其细胞增殖能力可以反应细胞免疫功能的强弱。不同剂量植物乳杆菌 P-8 作用于脾淋巴细胞 (3×10^6 个 / 孔) 72 h 后,ConA 对各组脾淋巴细胞增殖的影响结果见表 4。与对照组相比,低、中、高三个剂量组 OD 差值与空白对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

小鼠耳廓肿胀度可反应小鼠细胞免疫功能的强弱。1% DNFB 溶液均匀涂抹各组小鼠右耳 24 h 后,打孔器取相同大小的左右耳片进行称重。不同剂量植物乳杆菌 P-8 对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应结果见表 4。低、中、高三个剂量组与空白对照组的耳廓肿胀度分别为 11.21 ± 1.07 、 13.43 ± 1.51 、 14.96 ± 2.12 、 10.95 ± 1.12 mg;其中,中、高剂量组与空白对照组相比均有所增高且差异显著 ($*P < 0.05$ 或 $**P < 0.01$)。

表 4 植物乳杆菌 P-8 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 4 Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on ConA-induced mouse splenic lymphocyte transformation ability and delayed hypersensitivity induced by DNFB ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Groups	Proliferation of spleen cells (OD570 nm)			Degree of swelling (mg)
	ConA(-)	Con(+)	Differential OD values	
Negative control	0.54 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.12	0.45 $\pm$ 0.09	10.95 $\pm$ 1.12
Low dose (0.25 mg/kg)	0.50 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.08	11.21 $\pm$ 1.07
Medium dose (0.5 mg/kg)	0.52 $\pm$ 0.07	0.98 $\pm$ 0.14	0.46 $\pm$ 0.06	13.43 $\pm$ 1.51*
High dose (1.5 mg/kg)	0.55 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.13	14.96 $\pm$ 2.12**

Note: Compared with the negative control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.5 对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞是机体重要的免疫细胞,其活化后可合成和分泌多种细胞因子,发挥免疫调节及靶细胞杀伤作用。靶细胞(4×10^4 个/孔)和效应细胞(2×10^6 个/孔)作用 4 h 后,LDH 法检测 NK 细胞活性^[18]。植物乳杆菌 P-8 低、中、高三个剂量组与空白对照组的 NK 细胞活性(%)分别为 30.32 $\pm$ 10.65 %、32.35 $\pm$ 10.03 %、36.67 $\pm$ 9.36 %、26.12 $\pm$ 10.34 %;统计分析发现,高剂量组 NK 细胞活性显著增高(* $P<0.05$)。

表 5 植物乳杆菌 P-8 对 NK 细胞活性的影响结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effects of *Lactobacillus plantarum* P-8 on NK cell activities ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Groups	NK cell activity (%)
Negative control	26.12 $\pm$ 10.34
Low dose (0.25 mg/kg)	30.32 $\pm$ 10.65
Medium dose (0.5 mg/kg)	32.35 $\pm$ 10.03
High dose (1.5 mg/kg)	36.67 $\pm$ 9.36

Note: Compared with the negative control, * $P<0.05$.

3 讨论

益生菌可维持肠道菌群平衡,改善机体免疫失衡,稳固肠道粘膜屏障功能,在预防肠道病原微生物感染等方面发挥着重要作用^[24,25]。乳酸杆菌能够调节肠道微生物区系的平衡,在增强机体抵抗力方面具有不可低估的作用^[26,27]。研究证实,不同乳酸杆菌株对免疫功能的影响也就不同,其机制也不同^[24-28]。本研究旨在评估植物乳杆菌 P-8 对机体免疫能力的影响,为其开发和利用提供实验依据。

脾脏指数和胸腺指数是衡量机体免疫功能的初级指标。托娅等研究表明,乳杆菌 casei Zhang 能够增加小鼠脾脏指数,进而提高其免疫力^[29]。植物乳杆菌 NCU116 能显著提高小鼠的脾脏指数和胸腺指数,并提高小鼠细胞因子的分泌水平^[30]。本研究中低、中、高剂量的植物乳杆菌 P-8 组小鼠的脾脏指数和胸腺指数与对照组相比均未发现显著性差异。这表明植物乳杆菌 P-8 对小鼠的脾脏和胸腺的质量无明显影响,但其对小鼠免疫功能的应该尚待进一步评价。

不同的乳酸菌的细胞壁肽聚糖、脂磷壁酸或胞外多糖等结构不同,其对免疫系统的巨噬细胞、NK 细胞等效应细胞产生的效应也不同^[31,32]。故,不同菌株的对动物细胞免疫功能、体液免

疫功能及吞噬细胞的功能影响不同。单核-巨噬细胞是具有抗感染、抗肿瘤和免疫调节作用的免疫细胞,反映了机体非特异性免疫反应的强弱^[33]。当机体受到病原体或异物侵入时,这些巨噬细胞能向这些部位募集,并通过胞吞作用吞噬并消化分解异物^[34]。已有研究表明,植物乳杆菌中 KLDS 1.0318、Lp6 等均能够增强小鼠巨噬细胞吞噬中性红能力^[15,35]。本研究表 2 结果显示,与对照组相比,给予 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg 剂量植物乳杆菌 P-8 的小鼠,表现出显著较高的碳廓清功能和较强的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率。这一结果表明中、高剂量植物乳杆菌 P-8 能有效增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力,提示小鼠非特异性免疫能力显著增强。

小鼠体内产生的抗体溶血素在补体的参与下,与 SRBC 共同孵育发生溶血反应,释放血红蛋白,而通过测定血红蛋白含量能反应动物产生溶血素的能力^[36]。本研究测定了小鼠的血清溶血素,与对照组相比,给予植物乳杆菌 P-8 能显著提高小鼠 HC50 水平,且随着其剂量增高而提升。而根据以 DNFB 诱导小鼠 DTH 的实验结果显示,中、高剂量组植物乳杆菌 P-8 小鼠耳肿胀程度均较空白对照组显著增高,说明 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg 剂量下植物乳杆菌 P-8 小鼠迟发超敏反应显著增高,并随着剂量增加小鼠的反应也增强。以上结果提示,中、高剂量组植物乳杆菌 P-8 可显著提高小鼠的细胞免疫功能和体液免疫功能。DNFB 诱导的小鼠迟发型变态反应是检测小鼠细胞免疫功能的另一个重要指标。近年来,关于乳酸菌对迟发型变态反应的影响已有一些报道^[32],但本文中我们并未发现 BLL 对 DNFB 诱导的小鼠迟发型变态反应的影响,主要原因可能是菌株不同引起的。

NK 细胞是机体重要的免疫细胞,它不依赖于抗体也不需要抗原刺激和致敏就能杀伤靶细胞。NK 细胞活化后可合成和分泌多种细胞因子,发挥免疫调节及靶细胞杀伤作用^[37]。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 IL-1 和 IL-6,诱导淋巴细胞产生 IFN- γ ,增强 NK 细胞的杀伤作用^[38]。研究表明,干酪乳杆菌就能通过活化 T 细胞,促进细胞毒性 T 细胞的产生,增强 NK 细胞的活性^[14]。本研究中我们发现,高剂量植物乳杆菌 P-8 可显著增强 NK 细胞的活性,提示,植物乳杆菌 P-8 可提高机体靶细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。

以上结果表明,植物乳杆菌 P-8 主要是通过提高单核-巨噬细胞功能、体液免疫功能、自身细胞免疫功能及 NK 细胞活性来增强小鼠的免疫功能。本研究为植物乳杆菌 P-8 的开发和利用提供了重要的基础实验依据。

参考文献(References)

- [1] 陈莹, 江剑平. 益生菌在保健食品中的应用研究进展 [J]. 保健医学研究与实践, 2020, 17(6): 89-92
- [2] 王淑梅, 邱维, 晏彦峰, 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
- [3] 柯程仁, 叶兰仙. 青少年肠道菌群特征及益生菌对其抑郁症影响的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(9): 855-859
- [4] Wicērs G, Belkhir L, Enaud R, et al. How Probiotics Affect the Microbiota[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 9: 454
- [5] 庄伟伟, 朱雅琴, 曾献春. 儿童肠道中乳酸菌的分离、鉴定及其降解 3- 甲基吡啶的功能研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 2: 144-149
- [6] Song Y, He Q, Zhang J, et al. Genomic variations in probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 in the human and rat gut [J]. Front Microbiol, 2018, 5(9): 893
- [7] Dan T, Chen H, Li T, et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability [J]. Front Microbiol, 2019, 9(10): 3133
- [8] Bao Y, Zhang Y, Li H, et al. In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk [J]. Ann Microbiol, 2012, 62: 1311-1320
- [9] Wang Y, Lv X, Li X, et al. Protective Effect of *Lactobacillus plantarum* P-8 on Growth Performance, Intestinal Health, and Microbiota in *Eimeria*-Infected Broilers[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 705-758
- [10] Lew LC, Hor YY, Yusoff NAA, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study[J]. Clin Nutr, 2019, 38(5): 2053-2064
- [11] Chen K, Liu Y, Cheng Y, et al. Supplementation of *Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* Extract Alleviates Oxidative Damage Induced by Weaning in the Lower Gut of Young Goats [J]. Animals (Basel), 2020, 10(4): 548
- [12] Liu H, Zhao F, Zhang K, et al. Investigating the growth performance, meat quality, immune function and proteomic profiles of plasmal exosomes in *Lactobacillus plantarum*-treated broilers with immunological stress[J]. Food Funct, 2021, 12(23): 11790-11807
- [13] Liu C, Han F, Cong L, et al. Evaluation of tolerance to artificial gastroenteric juice and fermentation characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from human[J]. Food Sci Nutr, 2021, 10(1): 227-238
- [14] Hou XL, Yu LY, Liu J, et al. Surface-displayed porcine epidemic diarrhoea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria [J]. Vaccine, 2007, 26(1): 24-31
- [15] 蒙月月, Sathi Chowdhury, Shuvankumarsarker, 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
- [16] Qi SR, Cui YJ, Liu JX, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG components, SLP, gDNA and CpG, exert protective effects on mouse macrophages upon lipopolysaccharide challenge [J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 70(2): 118-127
- [17] Tian JX, Kang YH, Chu GS, et al. Oral Administration of *Lactobacillus Casei* Expressing Flagellin A Protein Confers Effective Protection against *Aeromonas Veronii* in Common Carp, *Cyprinus Carpio*[J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 33
- [18] 文涛, 王文思, 杨鸿武, 等. 林下山参冻干粉对小鼠的免疫调节作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(18): 2181-2184
- [19] 吴月国, 赵铮蓉, 张萍, 等. 紫皮石斛西洋参颗粒的研制及增强免疫力功能评价[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 131-135
- [20] 刘臻, 刘冬英, 胡志航, 等. 铁皮石斛粉对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(21): 3041-3044
- [21] 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
- [22] 邓浩, 刘影, 于金玲, 等. 复方鹿茸多糖增强小鼠免疫力的实验研究[J]. 食品安全导刊, 2014, 23: 72-76
- [23] 沙玥彤, 蔡胡强, 蔡振亮, 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): 569-574
- [24] Zafar H, Saier MH Jr. Comparative Genomics of the Transport Proteins of Ten *Lactobacillus* Strains [J]. Genes (Basel), 2020, 11(10): 1234
- [25] Slattey C, Cotter PD, O'Toole PW. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir [J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1252
- [26] Dean SN, Leary DH, Sullivan CJ, et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 877
- [27] Nilsen T, Swedek I, Lagenaur LA, et al. Novel Selective Inhibition of *Lactobacillus iners* by *Lactobacillus*-Derived Bacteriocins [J]. Appl Environ Microbiol, 2020, 86(20): e01594-20
- [28] Rajab S, Tabandeh F, Shahraky MK, et al. The effect of *lactobacillus* cell size on its probiotic characteristics [J]. Anaerobe, 2020, 62: 102103
- [29] 托娅. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 免疫调节和抗肿瘤作用及机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008
- [30] 谢俊华. 植物乳杆菌 NCU116 对肠道健康的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2016
- [31] Ispirli H, Kaya Y, Dertli E. Bifidogenic effect and in vitro immunomodulatory roles of melibiose-derived oligosaccharides produced by the acceptor reaction of glucanase E81 [J]. Process Biochemistry, 2020, 91: 126-131
- [32] Waard RD, Claassen E, Bokken G, et al. Enhanced immunological memory responses to *listeria monocytogenes* in rodents, as measured by Delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *lactobacillus casei* shirota ingestion[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2003, 10(1): 59-65
- [33] Wu F, Ding XY, Li XH, et al. Correlation between elevated inflammatory cytokines of spleen and spleen index in acute spinal cord injury[J]. J Neuroimmunol, 2020, 344: 577264
- [34] Cheng Y, Liu Y, Tan J, et al. Spleen and thymus metabolomics strategy to explore the immunoregulatory mechanism of total withanolides from the leaves of *Datura metel* L. on imiquimod-induced psoriatic skin dermatitis in mice[J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34(9): e4881
- [35] 孙进, 乐国伟, 侯丽霞, 等. 一株植物乳杆菌内化于小鼠回肠派伊尔结及其免疫调节作用的研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(1): 49-52
- [36] Timmons GA, O'Siorain JR, Kennedy OD, et al. Innate Rhythms: Clocks at the Center of Monocyte and Macrophage Function [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1743
- [37] Guillerey C. NK Cells in the Tumor Microenvironment [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1273: 69-90
- [38] Valipour B, Velaei K, Abedelahi A, et al. NK cells: An attractive candidate for cancer therapy [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (11): 19352-19365