

一种双歧杆菌胞外多糖免疫调节功能研究

李伟欣 陈倩 李平兰* 程静

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 根据保健食品功能评价规范-功能学评价程序研究一种双歧杆菌胞外多糖 (*Bifidobacterium* spp. exopolysaccharide, EPS)的免疫调节功能。通过脾淋巴细胞增殖反应、绵羊红细胞诱导小鼠迟发型变态反应(DTH)、血清溶血素测定以及巨噬细胞吞噬实验探讨该EPS的免疫调节活性。EPS分别以高、中、低剂量组连续口服给药 10 天, 结果发现低剂量的EPS[100 mg/(kg·d)]可以促进脾淋巴细胞增殖; 高、中、低剂量对绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应均无促进作用; 但是, EPS 高、中、低剂量组均能明显提高小鼠血清半数溶血值HC₅₀以及增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬能力。根据规范可知, 该双歧杆菌EPS 具有一定的免疫调节活性。

关键词: 双歧杆菌, 胞外多糖, 免疫

Study on Immunoregulation Effect of Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium* spp.

LI Wei-Xin CHEN Qian LI Ping-Lan* CHENG Jing

(Food Science and Nutrition Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The immunoregulation effect to polysaccharides from *Bifidobacterium* spp. was investigated on the base of functional assessment standards of health food. Effects of the EPS on immunity were investigated by promoted the proliferation of spleen lymph cells, delayed type hypersensitivity reaction, the HC₅₀ value and macrophage function assay in mice. Data showed that the EPS could obviously increase the ratio of swallowed chicken red blood cell by macrophage and the HC₅₀ value in mice. However, no significant effect was found on the delayed type hypersensitive induced by sheep red blood cell, for only the low dose of 100 mg/(kg·d) EPS promoted the proliferation of spleen lymph cells. *Bifidobacterium* spp. EPS can certain immunomodulating function.

Keywords: *Bifidobacterium*, Exopolysaccharide, Immunomodulating

双歧杆菌是动物肠道内的生理性细菌之一, 它粘附于肠道黏膜上皮细胞后, 定居形成稳定的菌群, 从而发挥其生理功能, 主要体现在对宿主的生物屏障和生物拮抗作用、其产生的有机酸促进维生素 D 及钙铁离子的吸收作用、增强免疫延缓机体衰老作

用和抑制肿瘤作用等。

双歧杆菌胞外多糖 (*Bifidobacterium* spp. exopolysaccharide, EPS)是双歧杆菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液或荚膜多糖。相关文献报道, 双歧杆菌的大部分生理功能都可能与其所分泌

的胞外多糖存在密切关系。多糖类化合物作为生命物质的组成成分之一,广泛参与了细胞的各种生命现象及生理过程的调节,但由于其结构十分复杂,迄今人们对其功能还未认识清楚。大量药理及临床研究表明,多糖类化合物是一种免疫调节剂,能激活免疫受体,提高机体的免疫功能,在用于癌症的辅助治疗中,具有毒副作用小,安全性高,抑瘤效果好等优点^[1-3]。目前,尚未有对双歧杆菌EPS的研究。本实验室从世界第四长寿区——我国广西巴马百岁以上长寿老人肠道内分离得到一株高产EPS的双歧杆菌菌株,并已对其合成条件进行了优化,使其产量高达1000 mg/mL以上^[4]。本文研究了该EPS对动物免疫功能的影响,对更深入的了解双歧杆菌的生理功能并为人们所利用具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌种:双歧杆菌,由中国农业大学食品科学与营养工程学院微生物教研组提供,分离自广西巴马长寿老人肠道。

1.1.2 试剂:RPMI1640培养基(Gibco公司),小牛血清/胎牛血清(杭州四季青公司),人参多糖注射液(阳性对照,山西普德药业有限公司,批号:20060901),北京蜂王精口服液(阳性对照,北京双鹤药业公司,批号:201056),ConA(美国Sigma公司),MTT(美国Sigma公司),SDS(美国Sigma公司)。

1.1.3 试验动物:BALB/c小鼠和ICR小鼠[6~8周龄,雌雄各半,维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2002-2003],豚鼠[维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2002-2003]。

1.1.4 仪器设备:飞鸽牌TGL-16C高速离心机(16000 r/min/17000 × g),平凡牌TGL-20M高速冷冻离心机, SCL-1300型垂直流洁净工作台, AL-9908S溶剂过滤器,细胞培养板, CO₂培养箱, ACSC alibur流式细胞仪, 752型紫外分光光度计, 酶标检测仪, XDS-1B倒置生物显微镜, 莱卡LEICA DM2000显微镜(正置), Anymicro DSSTM YT-7M Digital Shoot System镜头。

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌粗EPS的制备:双歧杆菌活化2代, 3%接种量(8.4×10^9)接种于产糖优化培养基中, 37°C恒温培养24 h; 将发酵液减压蒸发至原体积1/3,

6000 r/min离心10 min; 发酵上清液浓缩后加入3倍体积95%乙醇, 4°C沉淀过夜, 6000 r/min离心10 min, 蒸馏水溶解, Sevag法除蛋白(EPS: Sevag试剂=1:2(V/V), 氯仿:正丁醇=4:1(V/V)), 8000 D~14000 D孔径透析袋对去离子水透析48 h, 冷冻干燥后即得EPS干粉^[5]。

1.2.2 动物分组及给药:小鼠(清洁级)随机分为5组, 每组8只。1组为正常对照组; 2组为阳性对照组, 人参多糖(Ginseng polysaccharide, GPS)腹腔注射50 mg/kg, 连续7 d, 或北京蜂王精(Antitheses)口服20 mg/kg, 连续10 d; 3, 4, 5组分别为双歧杆菌EPS高、中、低剂量组(400 mg/kg、200 mg/kg、100 mg/kg), 口服给药, 连续10 d。

1.2.3 小鼠脾淋巴细胞增殖反应:末次给药后1 h, 分别取出各组小鼠脾脏, 无菌条件下配制成 5×10^6 mL的脾细胞悬液, 加入96孔细胞培养板, 每孔100 μL, 再分别加入完全RPMI 1640 + ConA(5 μg/mL)溶液或不加ConA的RPMI 1640培养基100 μL, 37°C恒温培养72 h。培养终止前4 h, 加入MTT(5 mg/mL), 每孔20 μL。轻轻吸出上清, 每孔加入100 μL细胞裂解液, 培养过夜, 充分溶解MTT, 于酶标仪570 nm处测其光吸收值。

1.2.4 绵羊红细胞诱导小鼠迟发型变态反应(Delayed Type Hypersensitivity Reaction, DTH):每只小鼠腹腔注射2% SRBC 0.2 mL进行免疫, 免疫后第4天, 用游标卡尺测量小鼠左后足趾部厚度, 然后在每只鼠测量部位皮下注射20% SRBC 20 μL, 24 h后测量左后足趾部厚度, 同一部位测量3次, 取平均值。攻击前后足趾部厚度的差值即可用来表示DTH程度。

1.2.5 血清溶血素测定:采用半数溶血值的方法进行测定。每只小鼠腹腔注射2% SRBC 0.2 mL进行免疫, 免疫后第5天, 摘除眼球取血, 分离血清。用生理盐水将血清稀释300倍后取1 mL加入试管, 依次添加0.5 mL 10% SRBC和1 mL 1:8倍稀释的豚鼠补体液, 37°C水浴30 min, 2000 r/min离心10 min, 取1 mL上清, 加3 mL都氏试剂; 同时, 取0.25 mL 10% SRBC, 加都氏试剂至4 mL, 充分混匀, 静置10 min后, 作为空白对照。于540 nm处检测其光吸收值。

$$HC_{50} = (\text{样品光密度值} / \text{SRBC 半数溶血时的光密度值}) \times \text{稀释倍数}$$

1.2.6 小鼠单核巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验: 实验前 4 d 每只小鼠腹腔注射 2% 压积绵羊红细胞 0.2 mL, 激活巨噬细胞。处死小鼠后, 腹腔注射含 10% 小牛血清的 Hank's 液 4 mL/只, 轻揉腹部 20 次, 以充分洗出腹腔巨噬细胞, 轻轻吸取 2 mL 腹腔液于试管内待用。取腹腔液 0.5 mL 与 0.5 mL 1% 鸡红细胞混匀, 滴片, 37°C 孵育 15 min 后用生理盐水冲掉未贴壁细胞, 于甲醇液中固定 1 min, 染色 15 min, 晾干, 显微镜下计数并计算吞噬率。

$$\text{吞噬百分率}(\%) = (\text{吞噬鸡红细胞的吞噬细胞数} / 100 \text{ 个巨噬细胞数}) \times 100\%$$

1.2.7 统计学分析: 所有数据用 $x \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

根据保健食品功能评价规范-功能学评价程序规定: 采用正常或免疫功能低下的模型动物进行实验, 细胞免疫功能(小鼠脾淋巴细胞转化实验, 迟发型变态反应实验)、体液免疫功能(抗体生成细胞检测, 血清溶血素测定)、单核-巨噬细胞功能(小鼠碳

廓清实验, 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验)和 NK 细胞活性 4 项指标任 2 项结果为阳性, 可判定该受试样品具有增强免疫力功能的作用, 且这 4 项指标所含的 2 组实验结果均为阳性, 或任一组实验的 2 个剂量结果为阳性, 可判定该指标结果为阳性。

2.1 小鼠脾淋巴细胞增殖反应

已有分子水平的研究表明, 多糖主要通过淋巴细胞表面的多糖受体相结合而影响其信息传递过程, 进而影响淋巴细胞基因表达及表观功能。目前已经发现 4 类多糖受体, 主要存在于巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞、细胞毒 T₂ 细胞和中性粒细胞等的表面^[6]。

由表 1 可知, 双歧杆菌 EPS 低剂量组在不加 ConA 和添加 ConA 时均可促进脾淋巴细胞增殖, 其他剂量促进作用不明显。这可能是由于该 EPS 与 T 淋巴细胞上的受体结构不相符, 因而应答作用不显著。也有大量研究表明, 中药多糖的免疫调节作用通常呈现一定的量效关系, 一般在小剂量时具有免疫增强作用^[7], 因此, 可进一步研究 EPS 更低剂量的作用效果。

表 1 EPS 对淋巴细胞增殖反应的影响($n=8$)
Table 1 The effect of EPS on lymph cell proliferation ($n=8$)

组别 Group	未添加 ConA None ConA	P	添加 ConA ConA	P
CK	0.162±0.009		0.972±0.073	
GPS(50 mg/kg)	0.179±0.021*	0.044	1.141±0.139*	0.019
EPS(400 mg/kg)	0.143±0.041	0.314	1.061±0.111	0.101
EPS(200 mg/kg)	0.149±0.034	0.275	0.930±0.080	0.332
EPS(100 mg/kg)	0.214±0.058*	0.019	1.101±0.078*	0.038

Note: *: Significantly different ($P < 0.05$) compared with untreated controls; **: Significantly different ($P < 0.01$) compared with untreated controls.

2.2 绵羊红细胞诱导小鼠迟发型变态反应

近年来, 大量研究结果表明, 多糖不仅能提高正常小鼠的迟发型变态反应, 还能恢复免疫功能低下小鼠的迟发型变态反应^[8-10]。

由表 2 可知, 双歧杆菌 EPS 高、中、低剂量组对绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应均无促进作用, 但随着剂量的降低也呈现出一定的促进趋势。

综合 2.1 和 2.2 实验结果可知, 该 EPS 细胞免疫功能测定结果为阴性。

2.3 血清溶血素测定

经研究发现, 有些多糖通常只对单核-巨噬细胞和 B 淋巴细胞增殖分化有促进作用, 对 T 淋巴细胞

表 2 EPS 对绵羊红细胞诱导小鼠迟发型变态反应的影响($n=8$)
Table 2 The effect of EPS on delayed type hypersensitivity in mice induced by SRBC ($n=8$)

组别 Group	迟发型变态反应 Delayed type hypersensitivity reaction	P
CK	0.020±0.012	
GPS(50 mg/kg)	0.056±0.030**	0.003
EPS(400 mg/kg)	0.026±0.013	0.476
EPS(200 mg/kg)	0.029±0.018	0.289
EPS(100 mg/kg)	0.037±0.016	0.086

Note: *: Significantly different ($P < 0.05$) compared with untreated controls; **: Significantly different ($P < 0.01$) compared with untreated controls.

作用不明显,其主要的机理是因为这些免疫细胞上有多糖受体,会由此激发第二信使作用于基因表达过程,最终表现出一定的生理功能^[11,12]。

由表3可知, EPS 高、中、低3个剂量组均能明显提高小鼠血清半数溶血值 HC_{50} ,即可促进小鼠血清抗体的产生,且随着剂量的降低,增强作用越明显。实验结果表明该EPS体液免疫功能测定结果为阳性。

表3 对小鼠半数溶血值的影响($n=8$)
Table 3 The effect on HC_{50} in mice ($n=8$)

组别 Group	血清半数溶血值 HC_{50}	<i>P</i>
CK	163.97±19.2	
Antitheses(20 mg/kg)	183.95±12.47*	0.0299
EPS(400 mg/kg)	183.38±15.68*	0.0292
EPS(200 mg/kg)	184.52±19.33*	0.0259
EPS(100 mg/kg)	185.92±14.3*	0.0243

Note: *: Significantly different($P < 0.05$) compared with untreated controls; **: Significantly different($P < 0.01$) compared with untreated controls.

2.4 小鼠单核巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

由表4可知,双歧杆菌 EPS 高、中、低3个剂量组均能明显增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬能力,说明该 EPS 单核-巨噬细胞功能测定结果为阳性。

表4 EPS 对巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响($n=8$)
Table 4 The effect of EPS on macrophage swallowing CRBC ($n=8$)

组别 Group	吞噬百分率(%) Percentage of macrophage phagocytosis (%)	<i>P</i>
CK	19.4±5.46	
GPS(50 mg/kg)	40.0±10.58**	0.004
EPS(400 mg/kg)	27.5±3.27*	0.014
EPS(200 mg/kg)	38.0±9.65**	0.005
EPS(100 mg/kg)	31.3±7.27*	0.012

Note: *: Significantly different($P < 0.05$) compared with untreated controls; **: Significantly different($P < 0.01$) compared with untreated controls.

对比可知,尤以中剂量组作用最为明显,与阳性对照的人参多糖作用强度相当,这可能是由于 EPS 某些基团可通过分子间相互作用促进巨噬细胞与鸡红细胞的相互识别与接触,因此,一定的 EPS 含量表现出对吞噬能力的促进作用;但是,如

果 EPS 浓度太大,会在2种细胞外形成较为完整的粘液层,在一定程度上阻止细胞通讯,因而高剂量组的促进作用不如中剂量组明显。

3 讨论

多糖对机体的免疫调节作用主要通过以下几种方式进行^[13]:

1) 激活网状内皮系统:活性多糖可显著增强网状内皮系统的活性,并增加红细胞抗体的生成。

2) 激活巨噬细胞:巨噬细胞(本身表面是糖蛋白)与多糖的识别可以产生肿瘤细胞坏死因子和干扰素,从而杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无影响。

3) 激活 T 和 B 淋巴细胞:多糖可以激活这两种细胞,使之参与抗肿瘤的作用。

4) 激活补体:血液补体蛋白和多糖的相互识别作用能够使蛋白活化,诱发增加补体蛋白的抵御吞噬病原的能力。

同类研究已证实不同的多糖具有不同的免疫促进作用。香菇多糖作为T细胞定位的佐剂和辅助T细胞刺激参与机体免疫反应。银耳多糖则能促进淋巴细胞的转化,增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,提高体液免疫力。黑木耳多糖可有效地提高小鼠巨噬细胞的吞噬指数和百分率。药理实验证明,茶多糖具有增强免疫功能,促进单核巨噬细胞系统吞噬功能的作用^[14]。

在有微生物存在的自然环境中,多糖具有多种生物功能,可在发病和共生中起重要作用。目前已有文献报道指出,乳酸菌的部分生理功能与其代谢所产生的 EPS 紧密相关,双歧杆菌作为一类公认安全的乳酸菌,其生物学活性也可能与其代谢的多糖有关。

T细胞和B细胞是两种重要的淋巴细胞,在体内细胞免疫和体液免疫过程中分别担负着重要作用。有研究表明,大部分多糖对淋巴细胞具有双向调节作用,低浓度时表现为促进作用,高浓度出现反向抑制^[15-18]。本研究结果显示低剂量的双歧杆菌 EPS[100 mg/(kg·d)]可以促进脾淋巴细胞增殖,但 EPS高、中、低剂量对绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应均无促进作用,随着剂量的降低呈现递增的促进趋势,因此, EPS 细胞免疫功能测定结果为阴性; EPS各剂量组均能明显提高小鼠血清半数溶血值 HC_{50} ,表明该剂量的EPS可促进小鼠血清抗

体的产生,以低剂量组最为明显,因此, EPS 体液免疫功能测定结果为阳性。由此显示,双歧杆菌EPS对T、B淋巴细胞的免疫调节作用呈现一定的剂量依赖效应,即随着剂量的降低,增强作用越明显,这也印证了多糖免疫调节作用的趋势。传统上认为,多糖可作为B淋巴细胞有丝分裂原及巨噬细胞的激活剂,它能够刺激巨噬细胞释放出T淋巴细胞活化因子^[19]。Neumann在体外试验中也发现,脂多糖能够提高大西洋鲑巨噬细胞过氧化物阴离子的产量并增强其嗜菌作用^[20]。因此,多糖不仅可以选择性提高抑制性淋巴细胞的活性而增强其耐受力,而且可以通过B淋巴细胞反应的多细胞活性而增强T辅助淋巴细胞的功能,最终使特异性免疫和非特异性免疫均得以加强。从结果中可以观察到, EPS高、中、低剂量组均能明显增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬功能,因此, EPS单核-巨噬细胞功能测定结果为阳性,即具有增强非特异性免疫的功能。

综合以上可知,双歧杆菌 EPS 可以加强动物体内的特异性和非特异性免疫,即具有一定的免疫调节功能,且其作用效果在一定范围内与浓度有关。在此基础上可以开展对其其他生理活性的探讨和研究,使双歧杆菌胞外多糖的应用价值能够推广,并为新型发酵用菌种及食品功能因子的开发提供理论依据和新的资源。

参 考 文 献

[1] Adriana Arena, Teresa Lu, Bernadette P, *et al.* Bernadette pavone antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology*, 2006, (6): 8-13.

[2] XueSong Wang, Qun Dong, JianPing Zuo, *et al.* Structure and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Carbohydrate Research*, 2003, **338**: 2393-2402.

[3] 欧阳天贲, 李小定, 荣建华. 真菌多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究进展. *天然产物研究与开发*, 2006, **18**(3): 524-528.

[4] 欧阳清波, 李平兰. 长双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)合

成条件的优化. *中国乳品工业*, 2005, **33**(3): 12-15.

[5] 欧阳清波, 李平兰, 李伟欣, 等. 双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)的分离、纯化及纯度鉴定. *食品工业与发酵*, 2005, **31**(6): 127-130.

[6] 顾笑梅, 王富生, 孔 健, 等. 乳酸菌 Z222 产胞外多糖(EPS I)对免疫细胞功能的影响. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, **23**(6): 442-445.

[7] 江振友, 林 晨. 灵芝多糖对小鼠细胞免疫功能调节作用的实验研究. *微生物学杂志*, 2003, **23**(2): 51-54.

[8] 郑鸿雁, 闵伟红, 昌友权, 等. 玉米须多糖调节免疫功能研究. *食品科技*, 2004, **25**(10): 291-293.

[9] 杨 勇, 刘会平. 乳酸菌胞外多糖的研究进展. *中国乳品工业*, 2006, **34**(10): 55-58.

[10] 许启泰, 张 瑜, 杜钢军, 等. 嗜酸乳杆菌胞外多糖对小鼠免疫功能的影响. *中国药理学通报*, 2004, **20**(12): 1401-1403.

[11] 孙才华, 谷新利, 卢 慧. 免疫活性多糖作用机制的研究进展. *中兽医医药杂志*, 2006, **4**: 19-21.

[12] 王 阳, 王伯初, 王 菁, 等. 多糖的免疫调节功能研究进展. *重庆大学学报*, 2004, **27**(3): 104-113.

[13] 陈小燕, 高泽立. 多糖的研究进展—多糖对机体免疫功能的影响. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2006, **15**(5): 540-543.

[14] 夏新奎, 杨海霞. 活性多糖研究综述. *信阳农业高等专科学校学报*, 2007, **17**(1): 130-133.

[15] 何彦丽, 苏俊芳. 中药多糖抗肿瘤免疫药理研究的新思路—对树突状细胞的影响. *中国中西医结合杂志*, 2003, **23**(1): 73-76.

[16] 黄林清, 周世文, 张诗平, 等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响. *解放军药学报*, 2002, **18**(1): 11-13.

[17] 王 玲, 杜守英, 钱玉昆. 枸杞多糖的免疫调节研究进展. *上海免疫学杂志*, 1995, **15**(2): 118-121.

[18] Jin M, Kim S, Kim BK. Induction of B cell proliferation and NF-kappa B activation by a water soluble from *Lentinus lepideus*. *International Journal of Immunopharmacology*, 1996, **18**(8/9): 439-448.

[19] 石 军, 李俊婷, 陈安国. 微生物多糖的免疫增强作用研究进展. *山东饲料*, 2002(**12**): 4-6.

[20] Neumann NF, Fagan D, Belosevic M. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Development and Comparative Immunology*, 1995, **19**(6): 473-482.