嗜酸乳杆菌 S-层蛋白对感染大肠杆菌小鼠肠黏膜免疫功能的影响

张丹[1]，张丹丹[1]，章金叶[1]，郭宇星[1]，潘道东[1,2]
（1.南京师范大学食品科学与营养系，江苏南京 210097）（2.宁波大学海洋学院食品系，浙江宁波 315211）

摘要：研究嗜酸乳杆菌 S-层蛋白对感染致病性大肠杆菌小鼠肠黏膜免疫的影响。用 5 M 的氯化锂溶液对嗜酸乳杆菌的 S-层蛋白进行提取，获得脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌菌体。将 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为对照组、致病性大肠杆菌感染组、嗜酸乳杆菌预防组治疗组，脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌预防组和治疗组六组，实验进行 14 d。小鼠处死后取眼球血、小肠及肠黏膜，观察各组小鼠肠黏膜形态变化、肠黏膜功能因子表达的差异。致病性大肠杆菌感染组与对照组相比，肠黏膜形态明显改变，感染大肠杆菌的小鼠在灌胃嗜酸乳杆菌后各黏膜 SIgA 和 IL-10 含量明显升高，同时血清 IFN-γ、TNF-α 和 IL-1β 含量对比感染组有了显著下降，说明可以减缓炎症发生，并且比脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌治疗组对肠黏膜免疫保护效果好。嗜酸乳杆菌 S-层蛋白对于嗜酸乳杆菌定植于肠黏膜并形成生物屏障保护其免疫功能有着重要影响。

关键词：S-层蛋白；嗜酸乳杆菌；致病性大肠杆菌；肠黏膜免疫功能
文章篇号：1673-9078(2015)10-13-17 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.003

Effects of the S-layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* on Intestinal Mucosal Immune Function in Mice Infected with *Escherichia coli*

ZHANG Dan[1], ZHANG Dan-dan[1], ZHANG Jin-ye[1], GUO Yu-xing[1], PAN Dao-dong[1,2]
(1.Department of Food Science and Nutrition, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)
(2.Food Science & Engineering of Marine Science Faculty, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The influence of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal mucosal immune function in BALB/c mice infected with pathogenic *Escherichia coli* was investigated. *Lactobacillus acidophilus* cells without the S-layer protein was obtained using lithium chloride solution (5 M) to extract the S-layer protein from *Lactobacillus acidophilus*. The SPF grade BALB/c mice were randomly divided into six groups: control group, pathogenic *Escherichia coli*-infected group, *Lactobacillus acidophilus* prevention group, *Lactobacillus acidophilus* treatment group, *Lactobacillus acidophilus* without S-layer protein prevention group and *Lactobacillus acidophilus* without S-layer protein treatment group; the experiment was conducted for 14 days. After the mice were sacrificed, the eye blood, intestine, and intestinal mucosa of the mice were collected to examine the changes in morphology of the intestinal mucosa and the differences in the expression of functional factors in it. Compared with control group, the intestinal mucosal morphology changed significantly in pathogenic *Escherichia coli*-infected group. After the *Escherichia coli*-infected mice were administered *Lactobacillus acidophilus* by gavage, the SIgA and IL-8 contents in each mucosa were significantly increased, and the serum contents of TNF-α and IL-1β were significantly reduced compared with the infected group. The result indicated that *Lactobacillus acidophilus* can reduce the incidence of inflammation and has a better protective effect on the intestinal mucosal immune function than *Lactobacillus acidophilus* without the S-layer protein. The S-layer protein in *Lactobacillus acidophilus* plays an important role in its colonization in the intestinal mucosa and the formation of a biological barrier to protect the intestinal mucosal immune function.

Key words: S-layer protein; *Lactobacillus acidophilus;* pathogenic *Escherichia coli*; intestinal mucosal immune function

收稿日期：2014-12-16
基金项目：国家自然科学基金（31471598、41276121、31101314）；江苏省自然科学基金（BK20141447）；江苏省高校自然科学基金 13KJB550013
作者简介：张丹(1990-)，女，硕士研究生，研究方向为乳品科学
通讯作者：潘道东(1964-)，男，教授，研究方向为乳品科学

乳酸菌作为重要的益生菌，在改善动物胃肠道生理平衡和保护肠黏膜生物功能方面起到不可忽视的作用[1]。乳酸菌发挥保护作用的重要因素在于其对肠道上皮细胞的黏附定植作用，从而保护上皮细胞减轻各种病原微生物的损害作用[2]。嗜酸乳杆菌是具有良好

黏附能力的一类乳酸菌，部分已被作为活菌制剂逐渐应用于功能性食品。

大量研究发现，在革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及一些古细菌的细胞壁表面均发现存在一种表层蛋白（S- layer protein），主要由单分子蛋白亚基构成[3]，在支撑乳酸菌黏附上皮细胞的众多黏附素中，S-层蛋白起着重要作用[4]。早在 1979 年就有研究者利用高浓度尿素对 S-层蛋白进行提取[5]，到了 2004 年，Garrote 等[6]利用氯化锂进行 S-层蛋白的提取工作，达到分离利用的目的。实验提取的 S 层蛋白分子量约为 43 ku。乳酸杆菌对肠道细胞的黏附作用是最常见的研究其免疫功能的体外实验，主要模型有 Caco-2 及 HT-29 细胞；本实验对其体内模型进行了设计，在对比不同情况下的嗜酸乳杆菌对肠黏膜免疫功能的保护作用的基础上，对 S-层蛋白在免疫方面的潜在可能性做了初步探究，可以避免小鼠肠道消化酶对 S-层蛋白的降解从而影响其效果。

为了更系统全面的了解以嗜酸乳杆菌为代表的乳酸菌对上皮细胞的黏附保护其生物功能的可能机理，我们采用经氯化锂脱除 S-层蛋白和未经氯化锂处理的嗜酸乳杆菌对小鼠灌胃后产生的生理学效应及其对肠黏膜免疫因子的变化进行比较，以期为阐明 S-层蛋白在嗜酸乳杆菌黏附小肠上皮细胞保护肠黏膜功能的可能机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验菌体的制备

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus CICC6074*)购自北京北纳创联生物技术研究院，由 Maria[7]等的方法，将室温培养至 OD_{600} 达到 1.0 的菌体，5000 r/min 离心 20 min，收集菌体沉淀，上述菌体用无菌 PBS 洗涤 3 次，用 5 M 的 LiCL(pH 2.0)于冰水混合浴中处理菌体 15 min，收集上清液(12000 r/min，15 min)，透析获得 S-层蛋白粗品，沉淀即为脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌，将菌体梯度稀释进行平板菌落计数，获得浓度为 1~2×10^8 CFU/mL 的菌液。

致病性大肠杆菌（*Enter pathogenic Escherichia coli, EPEC O86:K61*）购自北京北纳创联生物技术研究院，同样梯度稀释获得浓度为 1~2×10^8 CFU/mL 的菌液。

1.1.2 实验动物

60 只 SPF 级 6 周龄 BALB/c 雄性小鼠，购自扬州大学比较医学中心，合格证号 2012-0004，体质量为 18~22 g。

1.1.3 主要试剂和仪器

无菌 PBS 南京凯基生物科技公司；阿莫西林胶囊，中大药房；Elisa 测定试剂盒，南京建成生物工程研究所；10%甲醛、无水乙醇、二甲苯等生化试剂均为国产分析纯。

GL-22M 高速冷冻离心机，湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅，国华电器有限公司；DG5033A 华东电子酶标仪，南京华东电子集团医疗装备有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌感染小鼠实验模型的建立

参照王斌等[8]的方法以及熊涛[1]的黏附性能研究试验确定的最佳黏附菌浓为 10^8 CFU/mL，建立实验方案如下：实验选用 18~22 g 雄性小鼠 60 只，随机分成 6 组，每组 10 只。对照组：每天用等渗生理盐水 0.2 mL 灌胃 1 次，连续 14 d，其他组在适应性喂养期间每天用阿莫西林 15~40 g/kg 灌胃 1 次，连续 3 d；EPEC 感染组（模型组）：在实验结束前 3 d 每天用 EPEC 0.2 mL 灌胃 1 次，菌液浓度为 1~2×10^8 CFU/mL；对照和脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌预防组：适应性饲养 5 d 后用浓度为 1~2×10^8 CFU/mL 的嗜酸乳杆菌经口灌服连续 6 d，每天 0.2 mL，第 12 d 用浓度大约为 1~2×10^8 CFU/mL 的 EPEC 经口灌服 0.2 mL；对照和脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌治疗组：对照饲养 5 天，结束前 3 d 用浓度大约为 1~2×10^8 CFU/mL 的 EPEC 经口灌服 0.2 mL，1h 后灌服浓度为 1~2×10^8 CFU/mL 的嗜酸乳杆菌，连续 3 d。饲养过程中观察腹泻及小鼠活动情况。

1.2.2 小鼠血清的制备

处死小鼠后取血 2~3 mL，4 ℃，2500 r/min 离心 10 min，吸取血清。

1.2.3 病理学观察

实验结束前 1 d，停止喂食，只供水。处死小鼠后每组 10 只小肠段 2 cm，10%甲醛固定制成石蜡切片，HE 染色后观察小鼠肠黏膜上皮结构变化。

1.2.4 小鼠肠黏膜 SIgA 测定

处死小鼠后，取小鼠幽门下 5 cm 至回盲部约 10 cm 小肠段，平铺于滤纸上，纵行剪开，无菌 PBS 反复冲洗肠腔后用载玻片清刮黏膜表面黏液，收集冻存。采集完毕后，取出复溶，取上清液及标准品，按试剂盒操作，用 ELISA 方法检测 SIgA。

1.2.5 小鼠血清 IFN-γ 测定

按照 Elisa 测定试剂盒说明书进行。

1.2.6 小鼠血清 TNF-α 测定

按照 Elisa 测定试剂盒说明书进行。

1.2.7 小鼠血清白细胞介素 1β（IL-1β）测定

按照试剂盒说明书进行。

1.2.8 小鼠血清白细胞介素-10（IL-10）测定

按照试剂盒说明书进行。

1.2.9 实验数据分析

采用 DPS13.5 统计软件对实验数据进行统计学分析，单因素方差分析，结果以 x±sd 表示

2 结果与讨论

2.1 灌胃后小鼠的一般情况

对照组中的小鼠无不良反应，基本保持活泼好动，进食正常；感染组在注射 EPEC 后，小鼠明显活动减少，显得疲劳无力，蜷缩在一起，进食减少；灌胃嗜酸乳杆菌预防组和治疗组比感染组活动相对较多，而灌胃脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌预防组和治疗组的小鼠明显没有对照嗜酸乳杆菌灌胃组的小鼠活泼有力，部分小鼠行动迟缓，反应迟钝。

2.2 组织学观察

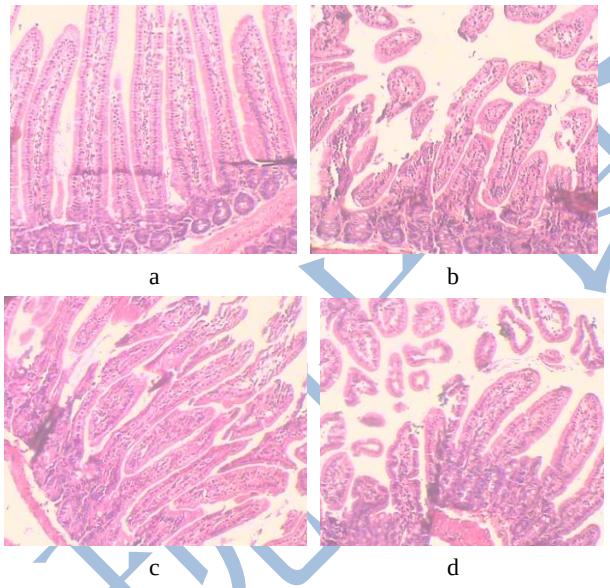


图 1 光镜下观察小鼠肠黏膜组织形态学变化（H-E，×200）

Fig.1 Changes in morphology of mouse mucosal tissues observed using light microscopy after H-E staining

注：a.对照组，b.感染组，c.嗜酸乳杆菌治疗组，d.脱除 S-层蛋白嗜酸乳杆菌治疗组。

光镜观察小鼠肠黏膜形态结果：由于预防组与治疗组形态差异较小，固此处只对比有无 S-层蛋白对黏膜形态的影响。对照组小鼠肠黏膜结构完整，小肠绒毛排列紧密、有规则；与对照相比较，EPEC 感染组小鼠肠黏膜脱落现象明显，绒毛密度稀疏，且有不同程度的脱落，排列紊乱，并有萎缩现象，说明造模成功。C 组在一定程度上对比感染组上皮细胞脱落现象较轻，绒毛高度有所增加，排列较为整齐，感染症状明显减轻，而 D 组虽对比感染组结构有所改善，但其排列也较紊乱，绒毛结构不完整，其效果远不如嗜酸乳杆菌本身对小鼠肠黏膜的保护作用，由此可见，S-层蛋白对于感染大肠杆菌小鼠肠黏膜有较好的保护作用。

2.3 小鼠肠黏膜 SIgA 含量测定结果

肠黏膜中的 SIgA 可抑制细菌、病毒等病原体的黏附，阻断其定值及繁殖，防止感染的发生，在肠黏膜屏障中起着关键作用[9]。当感染大肠杆菌时，肠道发生病变，小鼠免疫低下，损伤肠上皮细胞，引起肠道 SIgA 的减少。

表 1 不同组别小鼠 SIgA 含量（x±s，n=10）

Table 1 SIgA content of the mice in different groups

组别	N	SIgA 含量/(μg/mL)
对照组	10	7.27 ± 0.0413^{a}
模型组	10	5.20 ± 0.0667^{b}
有 S-层蛋白菌预防组	10	6.51 ± 0.0325^{c}
有 S-层蛋白菌治疗组	10	6.99 ± 0.1326^{d}
无 S-层蛋白菌预防组	10	5.40 ± 0.2657^{e}
无 S-层蛋白菌治疗组	10	5.98 ± 0.1824^{e}

注：数据右上角标注的小写字母表示 $p<0.05$ 水平，不同字母表示差异显著，相同字母表示差异不显著。

朱晓等[10]研究表明，嗜酸乳杆菌对胃道具有较好的耐药性，而经过 LiCl 处理后的菌体也具有较好的完整性，经过胃道后存活数仅下降 1-2 个数量级，保证了进入肠道的活菌数。研究[11]表明 S-层蛋白的形成是一个非常缓慢的过程，进入胃肠道后其形成量极其有限，与未经处理的菌体表面的 S-层蛋白差异显著($P<0.05$)，同时 S-层蛋白的存在有利于益生菌自身的生长及抑菌能力。

由表 1 可知，模型组及其他各组的小鼠 SIgA 含量均显著低于对照组，且差异具有统计学意义($P<0.05$)，证明造模成功。给予嗜酸乳杆菌灌胃组的小鼠 SIgA 含量相对脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌灌胃组分别升高了约 20.37%($P<0.05$)，16.67%($P<0.05$)含量对比模型组都有较大程度的提高，结果表明嗜酸乳杆菌对于感染大肠杆菌的小鼠肠黏膜功能起到一定程度的保护作用，有助于减轻炎症，并且该作用可能与 S-层蛋白有关。

2.4 小鼠血清免疫因子含量测定结果

血清干扰素 IFN-γ 和抗肿瘤因子 TNF-α 是重要的免疫因子，主要由巨噬细胞和淋巴细胞产生，通过刺激单核细胞等产生 IL-1、IL-6、IL-8 等因子，介导炎症反应[12]。白细胞介素 IL-1β 的生物学作用与肿瘤坏死因子(TNF)基本相似，参与免疫调节，其水平与炎症反应有关。

由表 2 可知：模型组和其他处理组小鼠血清 IFN-γ 含量均高于对照组，具有显著性差异(P<0.05)。给予嗜酸乳杆菌灌胃预防组和脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌灌胃之间没有显著性差异，但与嗜酸乳杆菌治疗组差异显著，说明治疗组在一定程度上可能更有利于嗜酸乳杆菌发挥保护作用。嗜酸乳杆菌治疗组的 IFN-γ 水平对比模型组，降低了 17.92%(P<0.05)，接近对照组水平，结果表明嗜酸乳杆菌对感染大肠杆菌的小鼠肠黏膜的保护作用可能与黏附方式也有关。

表 2 不同组别小鼠血清 IFN-γ、TNF-α 和 IL-1β 含量（x±s，n=10）

Table 2 Serum IFN-γ, TNF-α and IL-1β content of the mice in different groups

组别	N	IFN-γ 含量/(ng/L)	TNF-α 含量/(ng/L)	IL-1β 含量/(ng/L)
对照组	10	102.74±1.8029^{c}	70.91±1.7380^{d}	4.37±0.0392^{d}
模型组	10	125.16±2.4525^{a}	90.74±7.6358^{a}	7.13±0.5492^{a}
有 S-层蛋白菌预防组	10	114.22±1.7211^{abc}	75.85±4.5675^{bc}	5.12±0.3063^{c}
有 S-层蛋白菌治疗组	10	106.17±0.7281^{bc}	73.53±1.5451^{c}	4.85±0.5353^{cd}
无 S-层蛋白菌预防组	10	118.99±5.4673^{abc}	80.35±3.5085^{b}	5.64±0.5630^{b}
无 S-层蛋白菌治疗组	10	116.79±2.0846^{abc}	77.89±0.7255^{b}	5.47±0.0668^{b}

注：数据右上角标注的小写字母表示 p<0.05 水平，不同字母表示差异显著，相同字母表示差异不显著。

另外模型组、嗜酸乳杆菌灌胃组及脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌灌胃组小鼠血清 TNF-α 含量都显著性高于对照组，差异显著(P<0.05)。由两种状态的嗜酸乳杆菌灌胃组的比较可以看出，脱除 S-层蛋白后，小鼠血清 TNF-α 含量显著性较高，预防组和治疗组分别升高了 6.67%(P<0.05)，5.48%(P<0.05)；而经过嗜酸乳杆菌灌胃的小鼠 TNF-α 含量比模型组分别降低了 18.89%(P<0.05)和 14.44%(P<0.05)。结果表明 S-层蛋白在嗜酸乳杆菌对小鼠肠黏膜的保护作用中起一定作用。

经过造模后小鼠血清白细胞介素 1β 含量均高于对照组，差异显著(P<0.05)。致病性大肠杆菌感染后小鼠血清 IL-1β 含量高于对照组 55.70%(P<0.05)，而经过灌胃嗜酸乳杆菌治疗后，其含量降低了 32.39%(P<0.05)，脱除了 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌治疗后，其含量降低了 22.53%，治疗效果相对较弱；这与 IFN-γ、TNF-α 水平类似，表明 S-层蛋白可能介导嗜酸乳杆菌对大肠杆菌的抑制作用。

2.5 小鼠血清白细胞介素-10（IL-10）

血清白细胞介素 IL-10 具有抑制哮喘的发病的作用，主要是由单核-巨噬细胞、T 细胞、B 细胞产生，对于 TNF-α、IL-6 等前炎症细胞因子的分泌有一定抑制作用，还有利于体内炎症因子与抗炎因子的平衡[13]。

由表 3 可知，模型组及其他各组的小鼠血清白细胞介素 IL-10 含量均显著低于对照组，且差异具有统计学意义(P<0.05)，证明造模成功。给予嗜酸乳杆菌灌胃组的小鼠血清 IL-10 含量相对脱除 S-层蛋白的嗜酸乳杆菌灌胃组分别升高了约 6.97%(P<0.05)，9.60%(P<0.05)含量对比模型组都有较大程度的提高，分别提高了 42.46%(P<0.05)，33.18%(P<0.05)。结果表明嗜酸乳杆菌对于感染大肠杆菌的小鼠肠黏膜功能起到一定程度的保护作用，有助于抗炎因子的分泌，抑制炎症因子的表达，调节两者的平衡，减轻炎症反应，并且该作用可能与 S-层蛋白有关。

表 3 不同组别小鼠血清 IL-10 含量（x±s，n=10）

Table 3 Serum IL-10 content of the mice in different groups

组别	N	IL-10 含量/(pg/mL)
对照组	10	183.88±1.0518^{a}
模型组	10	123.53±4.4630^{e}
有 S-层蛋白菌预防组	10	172.20±2.7941^{b}
有 S-层蛋白菌治疗组	10	175.97±2.4813^{b}
无 S-层蛋白菌预防组	10	157.11±1.5909^{d}
无 S-层蛋白菌治疗组	10	164.51±3.3094^{c}

注：数据右上角标注的小写字母表示 p<0.05 水平，不同字母表示差异显著，相同字母表示差异不显著。

3 结论

3.1 肠道是人体最大的免疫器官，正常情况下，肠道菌群对宿主的寄生作用以及菌群之间的相互关系，具有重要的生物学意义。肠道菌群的平衡对于保证肠黏膜生物屏障有着至关重要的作用，它们与宿主的许多生理、生化反应及重要的免疫功能息息相关。但是，

在抗生素、放射性损伤、炎症等慢性疾病时，由该菌群组成的防御体系会遭到破坏，导致菌群失调，肠道屏障功能减弱，从而引起更为严重的感染[14]。

3.2 模型组小鼠血清中 IFN-γ、TNF-α 及白细胞介素 IL-1β 含量较空白对照组明显升高，白细胞介素 IL-10 的降低说明小肠上皮黏膜组织发生明显病理损伤,嗜酸乳杆菌灌胃后可显著降低上述异常升高的指标、改善病理损伤，但是脱除 S-层蛋白后，该作用相对减弱，S-层蛋白介导了抗炎因子的产生过程和促炎因子的抑制过程。

3.3 进入肠道内的嗜酸乳杆菌能有效黏附定植于肠黏膜，并形成具有保护作用的生物屏障，减轻炎症的反应，有利于保护小肠的生理生化功能，同时，S-层蛋白的存在，更加有助于这种黏附功能的实现，但具体的保护机理研究还未涉及，随着研究的深入，我们相信 S-层蛋白的功能研究有着较为广阔的前景。

参考文献

[1] 熊涛,黄巧芬,李萍.植物乳杆菌NCU116的模拟人体肠道上皮细胞黏附性能[J].食品科学,2013,34 (15):252-254
XIONG Tao, HUANG Qiao-fen, LI Ping. Lactobacillus NCU116 Simulate the Human Intestinal Epithelial Cell Adhesion Properties [J]. Food Science, 2012, 34(15): 252-254

[2] Lora VH, Jeffrey LG. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J].Science, 2011, 292(5519): 1115-1118

[3] SLEYTR U B, SARA M, PUM D, et al. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers [J]. Prog. Surf. Sci., 2001, 68(4): 231-278

[4] JAKAVA-VILJANENM, PALVA A. Isolation of surface layer protein carrying Lactobacillus species from porci -ne intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3/4): 264-273

[5] MASUDA K, KAWATA T. Ultra structure and partial characterization of a regular array in the cell wall of Lact-obacillus brevis [J]. Microbiology Immunol., 1979, 23(10): 941-950

[6] GARROTE G L, DELFEDERICO L, BIBILONI R, et al. Lactobacillus isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins [J]. Dairy Res., 2004, 71(2): 222-228

[7] Maria Guadalupe Martinez, Mariano Prado Acosta, et al. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 422: 590-595

[8] 王斌,李京京,李秋蓉,等.乳杆菌对致病性大肠杆菌感染小鼠肠黏膜屏障功能的影响[J].肠外与肠内营养,2007, 14(6): 321-325
WANG Bin, LI Jing-jing, LI Qiu-rong, et al. Effect of Lactobacillus in the Intestinal Barrier Function on enter-Pathogenic Escherichia coli Infected Mice [J]. Parenteral and Enteral Nutrition, 2007, 14(6): 321-325

[9] Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, et al. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensally flora in the rat [J]. Gut, 2001, 48(4): 503-505

[10] 朱晓,胡斌,等.乳酸菌表层蛋白的分离及其结构和性质[J].食品发酵与工业,2011,37(10):19-23
ZHU Xiao, HU Bin, et al. The properties,structure and functions of lactic acid bacteria S-layer proteins [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(10): 19-23

[11] Xueyan Chen, et al. The S-layer protein of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for Competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Smlmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115: 307-312

[12] Brandt age P. Role of secretary antibodies in the defense against infections [J] .Into. J. Med. Microbiology, 2003, 293(1): 3-10

[13] 刘彬.皮炎康颗粒对小鼠血清 IFN-γ、IL-4 的影响研究[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(7):261-263
LIU Bin. Studies of Dermatitis Granule's Impact on Serum IFN-γ , IL-4 [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 14(7): 261-263

[14] Hudault SG, AL Servin. Escherichia coli strains colonizing the gastrointestinal tract protect gem free mice against Salmonella typhimurium infection [J]. Gut, 2010, 49(7):47-54