

Lactobacillus 菌株的益生功能评价

妥彦峰¹, 张伟钦², 张兰威³, 艾连中¹

(1. 光明乳业股份有限公司, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436) (2. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300) (3. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

摘要: 本研究评价了分离自传统发酵乳制品中 4 株 *L. paracasei* supsp. *paracasei* 菌株在模拟胃、肠液中的存活性, 在 HT-29 细胞上的粘附性, 对致病菌的抑制能力, 以及刺激外周血单核细胞 (PBMCs) 增殖的能力。其中菌株 *Lactobacillus paracasei* supsp. *paracasei* M5AL、J23AL 在模拟胃液存活率较高, 而菌株 *Lactobacillus paracasei* supsp. *paracasei* G15AL、T3AL 在胃液中暴露 3 h 即失去活性; 4 株菌在模拟肠液中存活率较高。菌株 *L. paracasei* supsp. *paracasei* M5AL 和 G15AL 在 HT-29 细胞上有较强粘附能力 (>40 bacteria cells per 100 HT-29 cells), 并抑制病原微生物 *E. coli* ATCC25922、*S. typhimurium* ATCC 14028、*S. sonnei* ATCC 25931 生长。4 株菌活菌体刺激 PBMCs 增殖, 具有潜在免疫调节功能。

关键词: *Lactobacillus*; 益生菌; 抑菌; 粘附; 免疫

文章编号: 1673-9078(2012)8-906-910

Assessment of the Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains

TUO Yan-feng¹, ZHANG Wei-qin², ZHANG Lan-wei³, AI Lian-zhong¹

(1. Bright Dairy Co., Ltd State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China)

(2. Department of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China)

(3. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The four *L. paracasei* supsp. *paracasei* strains were examined in vitro in a two-stage model system comprising simulated gastric and intestinal juices., adhesion capability to HT-29 cells, antagonistic activity against enteric pathogens and immunomodulating activity. The strains *L. paracasei* supsp. *paracasei* M5AL and J23ANL were able to survive in simulated gastro juice while the strains *L. paracasei* supsp. *paracasei* G15AL and T3AL lost viability exposed to simulated gastro juice for 3 h. The four strains had high viability in simulated small intestinal juice with little loss (<1.0 cycle reduction). The strain *L. paracasei* supsp. *paracasei* M5AL and G15AL had adhesive capability to HT-29 cells in vitro (>40 bacteria cells per 100 HT-29 cells). The strains *L. paracasei* supsp. *paracasei* M5AL and G15AL could inhibit the growth of the *E. coli* ATCC25922, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. sonnei* ATCC 25931. The live bacteria of the four strains could exert proliferative effect on PBMCs.

Key words: *Lactobacillus*; probiotics; antimicrobial activity; adherence; immunity

Metchnikoff 在 1908 年首次提出摄食发酵食品对人体具有保健功能, 而发酵食品的保健功能得益于其中的发酵微生物, 现已清楚发酵食品中的 *Lactobacillus* 菌株对人体具有多种保健功能, 如提高机体免疫力, 防止肠致病性微生物感染、儿童急性腹泻^[1]。

肠道共生微生物与人体健康休戚相关, 保持肠道共生微生物平衡、抑制病原微生物在肠道内过度繁殖能够保持机体健康^[2]。*Lactobacillus* 属菌株通过在肠道内产生有机酸降低肠道 pH 值、产生 H₂O₂ 及细菌素等抗菌物质抑制病原菌在肠道内增生, 从而维持肠道共生菌群平衡。

肠道正常菌群对于肠相关淋巴组织的发育和免疫平衡起到重要作用, *Lactobacillus* 属菌株通过维持肠道正常微生物菌群使机体免疫系统处于健康状态^[2]。现已证明包括 *Lactobacillus* 属菌株在内的乳酸菌可以增强非特异性免疫 (增强吞噬功能和自然杀伤细胞活力) 和特异性免疫 (增强抗体的产生, 增强细胞因子的表达, 使淋巴细胞增殖)^[3]。动物试验和人体试验均证明食用乳酸菌可以调节机体免疫功能^[4]。

本文评价 4 株从传统发酵乳制品中分离获得的 *Lactobacillus* 菌株在模拟胃、肠道条件下的存活能力、肠上皮细胞上的粘附能力、对致病菌的抑制作用及对免疫细胞增殖的影响, 以期获得具有潜在益生功能的菌株。

收稿日期: 2012-06-04

基金项目: 科技部 973 科技计划项目 (2010CB735705); 教育部科学技术研究重点项目 (211203)

1 材料和方法

1.1 试验材料

组织细胞:本试验所用人结肠癌腺细胞 HT-29 购自中国医学科学院肿瘤研究所(北京)。

人外周血单核细胞(PBMCs):经健康志愿者同意,采集健康志愿者静脉血液,肝素钠管中保存。采用 Ficoll 密度梯度离心(1.077 g/mL)(400×g, 20 min)法处理血液,获得 PBMCs。将获得的 PBMCs 悬浮于 RPMI1640(GIBCO)完全细胞培养液中。用血球计数板测定 PBMCs 浓度,调节 PBMCs 浓度为 2×10^6 细胞/mL。

指示菌株(致病菌):本试验所用致病菌 *Escherichia coli* ATCC25922、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028、*Shigella sonnei* ATCC 25931 为哈尔滨工业大学食品学院乳品微生物实验室提供。

Lactobacillus 菌株:分离自西北地区牧民自制传统发酵乳制品,分别为 *L. paracasei* supsp. *paracasei* M5AL、*L. paracasei* supsp. *paracasei* J23ANL、*L. paracasei* supsp. *paracasei* G15AL、*L. coryniformis* supsp. *torquens* T3AL。乳杆菌在使用前 37 °C、厌氧条件传代培养 2 次,使活力恢复。

1.2 方法

1.2.1 *Lactobacillus* 菌株胃肠道耐受性试验

参照 Maragkoudakis^[5]的方法,进行 *Lactobacillus* 菌株耐受模拟胃、肠道液的实验。

模拟胃液的配制:将磷酸盐缓冲液(PBS) pH 调节为 2.0,并添加胃蛋白酶(1:3000)使浓度达到 3 mg/mL,即得模拟胃液。现用现配。

模拟小肠液的配制:将 PBS 缓冲液 pH 调节为 8.0,并添加胰酶使浓度达到 1 mg/mL,并添加 0.45%胆盐,即得模拟小肠液。

Lactobacillus 菌株传代 2 次,离心(5000 ×g, 10 min, 5 °C)获得菌泥,用 PBS (pH 7.2) 冲洗 3 次。

获得的菌泥重新悬浮于 5 mL 模拟胃液和模拟小肠液中,37 °C 培养。采用倾注平板法,在 0 h、3 h 测定模拟胃液中存活菌数(cfu/mL),在 0 h、4 h 测定模拟小肠液中存活的菌数(cfu/mL)。

每个菌株做 3 次重复,取平均值。以单位体积存活菌落数(cfu/mL)的 Log 值大小评价 *Lactobacillus* 在模拟胃、肠道液中的耐受能力。

1.2.2 *Lactobacillus* 菌株抑制病原微生物试验

抑菌试验指示病原微生物 *E. coli* ATCC25922、*S. typhimurium* ATCC 14028、*S. sonnei* ATCC 25931 在大豆蛋白胨培养液或固体培养基(TSA)37 °C、有氧条

件下培养 2 次,使活力恢复。

Lactobacillus 在 MRS 液体培养基中 37 °C 培养 18 h,离心(5000 ×g, 15 min, 4 °C)获得无菌上清液,用于抑菌性能的测定。

采用琼脂扩散法^[6]测定 *Lactobacillus* 菌株培养上清液对病原菌生长繁殖的抑制作用。调整指示菌浓度为 1×10^7 cfu/mL,取 1 mL 指示菌悬液注入灭菌培养皿中,然后向培养皿中注入 45 °C 保温的 TSA 琼脂(15%)培养基,快速混匀,无菌操作台中室温保持 30 min 待培养基凝固。培养基凝固后,无菌条件下在培养基上打孔(直径 5 mm)。取 *Lactobacillus* 培养上清液 50 μL 加入孔中,作为抑菌试验孔;向孔中加入 50 μL 新鲜 MRS 培养液(pH 6.5)作为对照孔。将培养皿在 37 °C 条件下培养 18 h。培养结束后,记录培养基上小孔周围抑菌圈的直径,作为 *Lactobacillus* 培养上清液抑制指示菌生长的指标。

每株菌做 3 次重复,取平均值。以抑菌圈的大小表示菌株抑制病原菌能力的强弱。

1.2.3 *Lactobacillus* 粘附能力的测定

根据 Gropal^[7]描述的方法,研究 *Lactobacillus* 在 HT-29 细胞上的粘附性能。

RPMI1640 完全培养液培养 HT-29 细胞,在 CO₂ 培养箱中(37 °C, 5% CO₂, 100%湿度)培养,每 48 h 换液一次,连续培养至活力恢复。台盼兰染色确定 HT-29 细胞活力,活细胞数≥95%可用于后续试验。

HT-29 细胞重悬于 RPMI1640 完全培养液中,血球计数板测定细胞浓度,将细胞浓度调整为 1×10^5 细胞/mL。将洁净的经干热灭菌的玻璃盖玻片放在 6 孔组织培养板中,向孔中加入 1 mL 上述 HT-29 细胞悬液,在 CO₂ 培养箱中(37 °C, 5% CO₂, 100%湿度)培养,每 24 h 更换培养液一次,至 HT-29 细胞在玻璃盖玻片上形成连续单层细胞。*Lactobacillus* 在 MRS 液体培养基中 37 °C 培养 18 h,倾注平板法计数,用 MRS 培养液调节菌数为 2×10^8 cfu/mL。取 1 mL 该菌液,并加入 1 mL RPMI1640 培养液制成 2 mL 细菌悬浮液。吸出 6 孔组织培养板中 HT-29 细胞培养液,用 PBS 缓冲液(pH 7.2)冲洗 HT-29 细胞 2 次。然后将上述 2 mL 细菌 RPMI1640 悬浮液加入到培养孔中。组织培养板继续在 CO₂ 培养箱中(37 °C, 5% CO₂, 100%湿度)培养 2 h,然后将细菌悬浮液吸出,用 PBS (pH 7.2) 冲洗 HT-29 细胞 5 次,用甲醇固定,革兰氏染色,于 100 倍油镜下显微镜检。计数 20 个视野中 HT-29 细胞所粘附的细菌数。每株菌做 3 次重复。

菌株粘附能力的评价标准:每 20 个视野中菌株的数量少于 40 为无粘附能力;粘附的菌株数量在

41~100, 具有粘附能力; 粘附的菌株数量超过 100 为强粘附能力。

1.2.4 目标乳杆菌菌株成分对人 PBMCs 增殖的影响

采用 Iliev^[8]描述的方法测定 *Lactobacillus* 菌体成分对 PBMCs 增殖的影响。

调节 PBMCs 浓度为 2×10^6 细胞/mL, 重悬于 RPMI1640 完全培养液中。取 100 μ L 上述 PBMCs 悬浮液加入 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。

用 RPMI1640 完全培养液分别将 *Lactobacillus* 热灭活菌体细胞、活菌体细胞、菌体细胞壁、基因组 DNA 配制为悬浮液, 加入 96 孔培养板中, 每孔总体积为 110 μ L, 最终浓度见表 1。阳性对照孔加入脂多糖 (LPS) 和伴刀豆蛋白 A (ConA), 浓度分别为 1 μ g/mL 和 2 μ g/mL。阴性对照孔只加入 PBMCs, 完全 RPMI1640 补足 110 μ L。试验孔、阳性对照孔、阴性对照孔各做 6 个平行。在 CO₂ 培养箱 (5% CO₂、95% 空气, 100% 湿度, 37 $^{\circ}$ C) 培养 72 h。培养终止前 4 h, 培养板每孔中加入 MTT 溶液 (5 mg/mL, PBS, pH 7.4) 20 μ L, 继续培养 4 h。向每孔中加入 150 μ L 酸化异丙醇 (SDS, 20 g; 1 M HCl, 2 mL; H₂O, 100 mL) 终止培养; 避光 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h, 以溶解甲贲 (Formazan)。然后用酶标仪测定培养板在 490 nm 处吸光度值。

细胞增殖系数 (SI) = (试验孔吸光度值 - 试剂空白吸光度值) / (细胞空白吸光度值 - 试剂空白吸光度值)。

表1 不同剂量 *Lactobacillus* 菌体成分与人 PBMCs 共同培养

Table 1 PBMCs cocultured with cellular components of the strains at different dosages

细菌成分	活菌体 PBMCs	热灭活完整菌体:PBMCs	细胞壁/ (μ g protein/mL)	菌体DNA/ (μ g DNA/mL)
剂量	1:1	1:1	10	25
	10:1	10:1	20	50
	100:1	100:1	40	100

1.2.5 统计分析

本研究中, 每个试验做 3 次重复。采用统计分析软件 SPSS14.0 for Windows Evaluation Version (SPSS Inc, Chicago, USA) 对数据进行分析处理, 通过方差分析 (ANOVA) 计算处理间差异显著性, 显著水平为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 菌株在模拟胃肠液中存活结果

益生菌株需要以活菌体形态进入肠道, 才能更好的发挥其对人体有益的功能。人的胃每天会分泌大约 3 L pH 2.0 的胃液, 因此益生菌株须具有一定的耐受低 pH 能力才能通过胃、以活菌体形态进入肠道。菌株

J23ANL、M5AL、G15AL、T3AL 在模拟胃液、肠液中的存活情况见表 2。

表2 初筛菌株耐受模拟胃肠液试验结果 (log cfu/mL)

Table 2 Viable counts of the *Lactobacilli* strains in the simulated gastric and small intestinal juice

菌株	0 h 菌落数	胃液 1 h	胃液 3 h	肠液 4 h
M5AL	9.36	6.23	5.28	8.95
J23ANL	8.97	5.86	5.49	8.71
G15AL	8.91	6.16	0.00	8.73
T3AL	9.16	5.99	0.00	8.77

4 株 *Lactobacillus* 菌株耐受模拟胃液 (pH 2.0, 含 3 mg/mL 胃蛋白酶) 的能力具有较大的差异。*Lactobacillus* 在 0 h 每毫升菌落单位 (cfu/mL) 的 log 值在 8.0~10.0 之间, 在模拟胃液中暴露 1 h 后, 所有菌株每毫升菌落单位的 log 值均有所下降, log 值下降的范围在 2.75~3.17 之间; 当菌株在模拟胃液中暴露的时间增加到 3 h, log 值继续下降, 下降的范围在 3.48~9.16 之间, 菌株 G15AL、T3AL 在模拟胃液中暴露 3 h 后, 不能检测到活菌的存在。

菌株在模拟胃液中暴露时间越长, 存活的菌数越少, 有些菌株甚至在暴露 3 h 后全部死亡, 低 pH 值和胃蛋白酶的存在对 *Lactobacillus* 具有杀伤作用, 这与文献报道的结果是相似的。

Lactobacillus 在 pH 8.0、含 3 mg/mL 胆盐、1 mg/mL 胰酶的模拟小肠液中暴露 4 h, 每毫升菌落单位的 log 值下降的程度较小, 在 0.18~0.41 之间。与模拟胃液相比, 模拟小肠液对大部分菌株的存活影响较小, 说明胰酶和胆盐对 *Lactobacillus* 的存活影响较小, 菌株能够在模拟小肠液中存活。

大多数 *Lactobacillus* 属菌株具有较强耐酸能力, 可以在 pH 4.6 条件下存活, 发酵乳制品的最终 pH 值为 4.6。人体胃液在未进食的条件下 pH 值是 1, 进食后, 达到 4.5, 食物在胃中消化约需 3 h。在 pH 1 条件下, 大多数 *Lactobacillus* 属菌株在 1 h 后便死亡; 而在 pH 2.5~4 条件下, 大多数 *Lactobacillus* 属菌株 3 h 后仍然存活。益生菌一般同牛乳一同食用, 牛乳中酪蛋白可以在胃环境中保护菌株免受低 pH 的影响, 而且胃液本身与模拟胃液相比, 对菌株也有一定的保护作用, 主要由胃液中的粘蛋白起到保护作用^[9]。

本研究中的 *Lactobacillus* 菌株在模拟胃液中存活率较低, 而在模拟小肠液中有较高的存活率。因此在 *Lactobacillus* 菌株暴露在胃环境时, 需要对其进行保护, 可以同牛乳或其它食品共同服用, 以缓冲胃酸对菌株的损伤, 而 pH 值较高的肠道环境不会对菌株的活力造成不利的影响。本研究中 *Lactobacillus* 在真实胃环

境中的存活率以及蛋白质等食物成分对其在真实胃环境中存活的影响将做进一步的研究。

2.2 菌株抑制病原菌试验结果

表3 初筛菌株培养上清液抑制病原菌结果

Table 3 Antimicrobial activity against pathogens by the supernate of the *Lactobacillus*

菌株	指示菌			菌株	指示菌		
	<i>E.coli</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>S.sonnei</i>		<i>E.coli</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>S.sonnei</i>
M5AL	+	++	++	G15AL	++	++	++
J23ANL	++	++	-	T3AL	+	-	-

注：“+”表示抑菌圈大小；+，1~2 mm；++，2~3 mm；对照孔未见明显抑菌圈。

菌株 G15AL、M5AL 对病原菌 *E.coli*、*S.typhimurium* 和 *S.sonnei* 生长均有抑制作用。菌株 J23ANL 只对 *E.coli* 和 *S.typhimurium* 有较强的抑制作用；而菌株 T3AL 仅对 *E.coli* 生长有抑制作用。

本研究中 4 株初筛的 *Lactobacillus* 发酵 MRS 培养基的上清液对致病菌 *E.coli*、*S.typhimurium* 和 *S.sonnei* 生长繁殖起到了不同程度的抑制作用，因此具有潜在的抗致病菌感染机体的能力。作为对照的新鲜 MRS 培养液 (pH6.5) 未抑制上述致病菌繁殖，因此认为 *Lactobacillus* 菌株产生了某种抑菌物质。*Lactobacillus* 菌株主要通过产生有机酸、过氧化氢和细菌素类抑菌物质抑制病原菌的增殖。在食用 *Lactobacillus* 菌株后，往往观察到粪便 pH 值的降低，这说明菌株在肠道内产生了有机酸，降低了肠道 pH 值，从而抑制肠道内病原菌生长繁殖。某些乳酸菌能够产生 II-型细菌素，抑制食品中常见腐败菌、致病菌 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*E.coli* 和 *B.cereus* 的繁殖。

Lactobacillus 菌株通过抑制肠道病原菌繁殖，保持持肠道正常菌群平衡，从而维持肠道免疫平衡，临床试验证实某些益生菌对儿童感染性腹泻、复发性 *Clostridium difficile* 感染及某些炎性肠道疾病具有一定疗效。本研究中 4 株 *Lactobacillus* 菌株不同程度的抑制致病菌 *E.coli*、*S.typhimurium* 和 *S.sonnei* 生长繁殖，可能会对预防和治疗炎性腹泻等肠道疾病起到一定有益作用，其产生的抑菌物质还有待进一步研究。

2.3 菌株体外粘附试验

菌株 J23ANL、M5AL、G15AL、T3AL 在 HT-29 细胞上的粘附指数见表 4。菌株 M5AL 在 20 个视野粘附的菌数超过 100，因此认为这两株菌具有较强的粘附能力。菌株 G15AL 粘附的菌数在 40~100 之间，具有一定的粘附能力。而菌株 J23ANL 和 T3AL 粘附的菌数小于 40，因此认为基本无粘附能力。

在肠道粘附定殖是益生菌在肠道中发挥益生作用一个重要前提条件。目前普遍采用人肠上皮细胞系模拟人肠上皮细胞，包括 HT-29 细胞、Caco-2 细胞和

4 株 *Lactobacillus* 初筛菌株培养上清液对病原菌 *E.coli*、*S.typhimurium*、*S.sonnei* 生长的抑制结果见表 3。

HT29-MTX 细胞，研究菌株在肠上皮细胞上的粘附和定殖能力^[9]。

表4 初筛菌株在HT-29细胞上粘附指数

Table 4 Adhesion index on HT-29 cells of the *Lactobacillus* strains

菌株	粘附指数	菌株	粘附指数
M5AL	148.3±30.1	G15AL	83.8±33.5
J23ANL	28.6±1	T3AL	33.4±16.4

注：100 倍油镜下随机 20 个视野中 HT-29 细胞所粘附的菌数；数值为每 100 个细胞所粘附的菌数。

Lactobacillus 菌株的粘附性具有菌株特异性而与菌株来源的关系不明显。本研究中，同样是从发酵食品中分离获得的 *Lactobacillus* 菌株其在 HT-29 细胞上的粘附能力不尽相同。

Ramiah^[10]研究发现菌株 *Lactobacillus plantarum* 423 的菌体表面蛋白在其与 Caco-2 细胞的粘附中起到重要作用，去除菌株 *L.plantarum* 423 的菌体表面蛋白，其粘附性减少 40%。本试验中各菌株粘附性能的差异也许与其菌体表面蛋白等物质的差异有关。

益生菌的粘附定殖能力对其发挥免疫调节功能有重要作用。益生菌同肠粘膜上皮细胞特异性接触，可以激发肠相关淋巴组织的发育^[4]。*Lactobacillus* 菌株的粘附性能与其免疫调节作用之间有一定的关系，有强粘附性的 *Lactobacillus* (如 *Lactobacillus* GG、*L.rerteri* 等)比弱粘附性的 *Lactobacillus* (如 *L.delbrueckii spp.bulgarica*)能更好地增加抗轮状病毒 IgA 的分泌，并能提高 IgA 特异性抗原呈递细胞的水平^[11]。

2.4 *Lactobacillus* 活菌体细胞刺激人 PBMCs 的增殖

4 株 *Lactobacillus* 活菌体细胞刺激人 PBMCs 增殖的结果见表 5。当活菌体细胞与 PBMCs 的比例为 1:1 和 10:1 时，所有菌株对人 PBMCs 的增殖系数均显著 ($P < 0.05$) 高于 LPS、ConA 对 PBMCs 的增殖系数。菌体细胞与 PBMCs 的比例为 100:1 时，菌株 J23ANL 不能诱导人 PBMCs 显著增殖，菌株 G15AL、T3AL 对人 PBMCs 增殖的影响显著 ($P < 0.05$) 高于 LPS、

ConA 对 PBMCs 增殖的影响。

表5 不同剂量活菌体细胞对PBMCs增殖的影响

Table 5 Effect of different dose of live bacteria on PBMCs proliferation

菌株	strain:cell=1:1	strain:cell=10:1	strain:cell=100:1
G15AL	2.70±0.15 ^{a, A}	2.17±0.18 ^{a, B}	2.76±0.08 ^{a, A}
J23ANL	2.55±0.08 ^{ba, A}	1.60±0.03 ^{cd, B}	0
M5AL	2.35±0.03 ^{b, A}	1.62±0.27 ^{cd, B}	1.38±0.01 ^{dA}
T3AL	2.11±0.21 ^{c, A}	1.82±0.12 ^{bc, B}	1.65±0.01 ^{b, B}
LPS	1.53±0.08 ^d	1.53±0.08 ^d	1.53±0.08 ^e
ConA	1.28±0.02 ^e	1.28±0.02 ^e	1.28±0.02 ^d

注：同一行数字右上角标注不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$)；同一列数字右上角标注不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

菌株菌体细胞与人 PBMCs 的比例为 1:1 时，PBMCs 的增殖系数显著 ($P<0.05$) 高于菌体细胞与人 PBMCs 的比例为 10:1 时的增殖系数。菌株 J23ANL、M5AL 和 T3AL 对人 PBMCs 增殖的影响有随菌体作用浓度增加而效果减小的趋势。当菌体细胞与人 PBMCs 的比例为 100:1 时，菌株 J23ANL 不能诱导人 PBMCs 增殖。

本研究中4株 *Lactobacillus* 菌株活菌体细胞使人 PBMCs 发生显著增殖，即这4株菌各菌体成分可以使免疫细胞发生增殖。Valeur^[4]报道志愿者在食用益生菌株 *Lactobacillus reuteri* ATCC55730后，其十二指肠内B-淋巴细胞数量和回肠内CD4+T-淋巴细胞数量显著增加，菌株 *L. reuteri* ATCC55730 藉此发挥其益生功能。

在本研究中，*Lactobacillus* 菌株活菌体诱导人 PBMCs 的增殖系数随着细胞成分作用浓度的增大而减小。Ghadimi^[12]报道益生菌株活菌体与人 PBMCs 共同培养，当活菌体与人 PBMCs 比例为10:1时，对人 PBMCs 的免疫调节效果最佳，而非活菌体作用浓度越高免疫调节效果越好，免疫调节的效果主要与人 PBMCs 上的病原菌相关分子模式受体（如TLRs 和NLRs）的平均数量有关。4株不同 *Lactobacillus* 菌株使人 PBMCs 增殖能力存在差异性。革兰氏阳性菌细胞壁是某一种菌或某一株菌的独特构造，是被免疫细胞识别的特异配体，诱发不同的免疫应答，因此 *Lactobacillus* 菌株的免疫调节功能往往具有菌株特异性。

3 结论

本研究中，菌株 J23ANL、M5AL、G15AL、T3AL 活菌体细胞使人 PBMCs 增殖，且当菌体浓度增大时，对人 PBMCs 增殖系数减小。4 株菌活菌体具有诱导外周血单核细胞增殖，因此认为该 4 株菌具有潜在的免

疫调节功能，还需要通过刺激免疫细胞产生细胞因子及增强自然杀伤细胞活力研究其免疫调节功能。其中菌株 M5 模拟胃、肠道环境耐受性及在肠上皮细胞上的粘附性较好，且抑制肠致病菌生长，因此认为菌株 M5 具有潜在的益生功能。还需要通过动物试验研究其益生功能。

参考文献

- [1] 王海波,马微,钱程,等.益生菌的研究现状及发展趋势[J].现代食品科技,2006,22(3):286-288
- [2] 闫磊,王鑫,曾庆祝,等.双歧杆菌的功能特性及其应用前景[J].现代食品科技,2007,23(3):86-89
- [3] Gill H S. Stimulation of the immune system by lactic cultures [J]. Int. Dairy J. 1998, 8(5): 535-544
- [4] Valeur N, Engel P, Carbajal N, et al. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract [J]. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70(2): 1176-1181
- [5] Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products [J]. Int. Dairy J. 2006, 16(3): 189-199
- [6] Ammor S, Tauveron G, Dufour E, et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds [J]. Food Control., 2006, 17(6): 454-461
- [7] Gopal P K, Prasad J, Smart J, et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Int. J. Food Microbiol., 2001, 67(3): 207-216
- [8] Iliev I D, Kitazawa H, Shimosato T, et al. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern [J]. Cell Microbiol., 2005, 7(4): 403-414
- [9] Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells [J]. J. Dairy Sci. 1987, 70(1): 1-12
- [10] Ramiah K, Carol A van Reenen, Leon MT Dicks. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis* [J]. Res. Microbiol. 2008, 159(6): 470-475
- [11] Kirjavainen P V, Tuomola E M, Crittenden R G, et al. In vitro

- adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli [J]. *Infect Immun.* 1999, 67(5): 2653-2655
- [12] Ghadimi D, Fölster-Holst R, De Vrese M, et al. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on T_H1/T_H2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects [J]. *Immunobiology.* 2008, 213(8): 677-692

