

复合乳酸菌粉冲剂增强免疫力作用的研究

朱韶娟^{1,2}, 张立彦¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州雅芳保健品制造有限公司, 广东广州 510900)

摘要: 研究了复合乳酸菌粉(嗜酸乳杆菌+乳双歧杆菌+低聚木糖)的益生菌冲剂在增强儿童免疫力方面的作用, 研究方法依照《保健食品检验与评价技术规范》(2003版)之“增强免疫力功能检验方法”。结果表明: 对SPF级昆明种小鼠经口每日分别给予该复合益生菌产品0.25、0.50、1.50 g/kg·BW, 相当于人推荐日服量的5、10、30倍共4周, 实验显示: 绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应试验和ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化增殖试验结果呈阳性, 说明该样品具有增强细胞免疫功能作用($P<0.05$); 同时受试动物NK细胞活性试验结果呈阳性, 说明该样品具有显著增强NK细胞活性作用($P<0.01$)。实验证明摄入该复合益生菌产品具有增强免疫力的功能作用。

关键词: 复合乳酸菌; 低聚木糖; 增强免疫力

文章编号: 1673-9078(2013)1-77-80

Study on Enhancement of Complex Probiotics Granules on Children Immunity

ZHU Shao-juan^{1,2}, ZHANG Li-yan¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Avon Healthcare Products Manufacturing (Guangzhou) Ltd., 510900, China)

Abstract: The efficacy of probiotics (*Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis*) and xylooligosaccharide complex granules on enhancing junior immunity was studied. According to “Technical standards for testing & assessment of health food (2003) - Method for the assessment of enhancing immunity function”, the test results indicates that, after 4 weeks mice (SPF grade from Kunming) test with daily dosage of 0.25, 0.50, 1.50 g/kg·BW (comparatively as 5, 10, 30 times of recommended human daily dosage) by oral. Both the results were positive for the test of mice. Delayed hypersensitivity induced by SRBC and conversion proliferation reaction of mice splenic lymphocyte. It can claim that the product could enhance the cell immunity ($P<0.05$). It is positive for NK cell activity test. The sample could enhance NK cell activity significantly ($P<0.01$). It showed that the product had the function of enhancing immunity.

Key words: probiotics complex; xylooligosaccharide; enhancing immunity

益生菌的增强免疫力作用已被广泛认同。最常见的益生菌是乳杆菌和双歧杆菌, 它们是人类肠道重要的生理菌, 对机体有多种其它正常生理菌无法比拟的生理作用: 调节肠道菌群、增强免疫力等等。嗜酸乳杆菌是乳杆菌的一种, 乳双歧杆菌是双歧杆菌的一种, 前者存在于大肠部, 后者存在于非严格厌氧环境的小肠部位, 两者配合使用时效果更好, 能更好地发挥产品调节肠道菌群、增强免疫力的功效。

嗜酸乳杆菌通过促进和激活机体感染防护免疫反应而起到增强机体免疫防御系统的作用。牛生洋等研究认为, 嗜酸乳杆菌能分泌多种蛋白酶, 促进蛋白质的消化吸收; 嗜酸乳杆菌在肠道内定殖, 相当于自然免疫, 能激活机体巨噬活性, 诱发特异性和非特异性免疫反应, 提高抗感染的能力; 同时嗜酸乳杆菌通过

自身及其代谢物与其他细菌之间的相互作用, 调整菌群之间的关系, 维持和保证菌群最佳优势组合及各种组合的稳定, 阻止致病菌的定殖和入侵, 拮抗致病菌和有害微生物的生长及其毒素的粘附^[1]。

本报道基于上述研究成果, 旨在研究一种复合乳酸菌粉与低聚木糖的产品在增强儿童免疫力方面的作用, 并根据实验数据及结果进一步探讨其作用机理。

1 材料与amp;方法

1.1 实验样品

益生菌冲剂, 自制, 主要原料为复合乳酸菌粉(嗜酸乳杆菌+乳双歧杆菌, 丹尼斯克菌种, 具体比例为: 嗜酸乳杆菌23%, 乳双歧杆菌2%, 其余为稀释剂)和低聚木糖。1.5 g/袋的铝箔袋装, 推荐食用方法为每天1次, 每次1袋, 温开水冲饮。

收稿日期: 2012-09-07

1.2 实验方法

1.2.1 增强免疫力实验方法^[2]

1.2.1.1 实验动物

选用SPF级昆明种雌性小白鼠48只, 6~8周龄(体重18~22 g)。

1.2.1.2 剂量与分组

实验按人体每日推荐量(以儿童体重30 kg计, 推荐量为0.05 g/kg·BW)的5倍(0.25 g/kg·BW)、10倍(0.5 g/kg·BW)和30倍(1.5 g/kg·BW)分成对照组和低、中、高剂量组共四组, 每组12只。

1.2.1.3 灌喂方法

实验时分别称取样品0.50、1.00、3.00 g, 用纯净水配制成20 mL的样液, 分别供低、中、高三个剂量组动物灌胃使用。动物在实验室条件下适应三天后, 以下每个实验均为随机将48只鼠分为四组, 每组12只, 每日灌胃给予受试物, 给样量根据每周体重增减调整, 连续灌胃四周。对照组灌服无菌纯净水。

1.2.2 小鼠迟发型变态反应试验(足跖厚度增加法)

实验结束前的第4天免疫动物, 用2% (v/v) 绵羊红细胞腹腔注射0.2 mL致敏动物, 5天后测定左后足跖部厚度, 接着于该处皮下注射20% (v/v) 绵羊红细胞(20 μL/每鼠), 注射后24小时测定左后足跖部厚度三次, 得平均值。

1.2.3 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验(MTT法)

淋巴细胞增殖反应: 将细胞悬液分两孔加入24孔培养板中, 每孔1 mL, 一孔75 μL ConA 液(相当于7.5 μg/mL), 另一孔作为对照, 置5% CO₂, 37 °C培养72 h。培养结束前4小时, 每孔吸去上清液0.7 mL, 加入0.7 mL无血清RPMI 1640培养液, 同时加入MTT (5 mg/mL) 50 μL/孔, 继续培养4 h。培养结束后, 每孔加入1mL异丙醇, 吹打混匀, 使紫色结晶溶解, 分加于96孔培养板中, 作3个孔的平行样, 以570 nm波长测定光密度值。

1.2.4 NK细胞活性测定(LDH法)

NK细胞活性检测: 取浓度为4×10⁵个/mL的YAC-1靶细胞和效应细胞各100 μL(效靶比50:1), 加入U型96孔培养板; 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100 μL, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和1% NP₄₀各100 μL; 上述各项均设三个复孔, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养4小时, 然后将96孔培养板以1500 rpm离心5分钟, 每孔吸取上清100 μL置平底96孔培养板中, 同时加入LDH基质液100 μL, 反应3分钟, 每孔加入1 mol/L HCl 30 μL, 在酶联仪492 nm处测定光密度值。

1.3 实验数据统计

用SPSS 10.0软件包进行统计分析, 结果采取均值±

标准差形式。

2 结果与讨论

2.1 动物实验

2.1.1 益生菌冲剂对小鼠体重的影响

益生菌冲剂对小鼠体重的影响: 迟发型变态反应组见表1, 淋巴细胞转化、NK活性测定组见表2。

表1 益生菌冲剂对小鼠体重的影响(第I批动物, n=12)

组别	剂量/ (g/kg·BW)	初始体 重/g	中期 体重/g	终期体 重/g	增重 /g
对照组	0.00	20.00±1.20	30.80±3.10	35.10±4.00	15.10±3.70
低剂量	0.25	20.00±1.20	29.50±2.40	34.10±2.60	14.10±3.10
中剂量	0.50	20.00±1.10	29.50±1.50	33.70±1.70	13.70±2.30
高剂量	1.50	19.90±1.20	30.00±1.50	34.50±1.80	14.60±2.30
F值		0.02	0.91	0.62	0.54
P值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表2 益生菌冲剂对小鼠体重的影响(第II批动物, n=12)

组别	剂量/ (g/kg·BW)	初始体 重/g	中期体 重/g	终期 体重/g	增重 /g
对照组	0.00	20.80±1.00	30.40±2.40	34.70±2.80	13.90±3.20
低剂量	0.25	20.70±1.00	29.80±1.20	34.10±2.10	13.40±2.10
中剂量	0.50	20.70±1.00	28.90±1.50	33.30±1.60	12.60±1.60
高剂量	1.50	20.70±0.90	29.60±1.70	33.80±1.80	13.10±2.20
F值		0.01	1.43	0.88	0.68
P值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

各剂量组各期体重与对照组相应时期体重比较, 差异均无显著性意义, 表明益生菌冲剂对小鼠的体重生长无明显影响。

2.1.2 益生菌冲剂对小鼠脾脏重量和胸腺重量的影响

表3 益生菌冲剂对小鼠胸腺、脾脏重量的影响(n=12, x+s)

组别	剂量/ (g/kg·BW)	脾脏/体重 比值/(mg/g)	P值	脾脏/体重 比值/(mg/g)	P值
对照组	0.00	4.46±0.74		3.96±0.64	
低剂量	0.25	4.28±0.58	>0.05	3.80±0.67	>0.05
中剂量	0.50	4.53±0.78	>0.05	3.84±0.72	>0.05
高剂量	1.50	4.17±0.61	>0.05	3.98±0.37	>0.05
F值		0.70(P>0.05)		0.27(P>0.05)	

各剂量组脏器/体重比值与对照组比较, 差异均无显著性意义(见表3)。表明益生菌冲剂对小鼠的脾脏重量和胸腺重量无明显影响。

2.1.3 益生菌冲剂对小鼠免疫力的影响

2.1.3.1 益生菌冲剂对小鼠的迟发型变态反应的影响

绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应试验（足跖增厚法），其高剂量组足跖增厚值与对照组比较，差异有显著性意义(见表4)。

表4 益生菌冲剂对小鼠迟发型变态反应的影响 (x+s)

Table 4 Influence of complex probiotics on delayed hypersensitivity of mice

组别	剂量/ (g/kg·BW)	动物数 /只	足跖增 厚/mm	P值 (与对照组比)
对照组	0.00	12	0.46±0.17	
低剂量	0.25	12	0.49±0.18	>0.05
中剂量	0.50	12	0.60±0.16	>0.05
高剂量	1.50	12	0.64±0.18	<0.05
F值			3.02(P<0.05)	

2.1.3.2 益生菌冲剂对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应的影响

对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应，其高剂量组光密度差值高于对照组，差异有显著性意义（见表5）。表明益生菌冲剂的脾淋巴细胞转化试验结果为阳性，受试样品具有增强细胞免疫功能作用。

表5 益生菌冲剂对小鼠脾淋巴细胞转化反应的影响 (x+s)

Table 5 Influence of complex probiotics on conversion reaction of mice splenic lymphocyte

组别	剂量/ (g/kg·BW)	动物数 /只	光密度 差值	P值 (与对照组比)
对照组	0.00	12	0.46±0.06	
低剂量	0.25	12	0.48±0.04	>0.05
中剂量	0.50	12	0.50±0.06	>0.05
高剂量	1.50	12	0.526±0.03	<0.05
F值			2.84(P<0.05)	

2.1.3.3 益生菌冲剂对受试动物NK细胞活性的影响:

表6 益生菌冲剂对小鼠NK细胞活性的影响 (n=11, x+s)

Table 6 Influence of complex probiotics on NK cells activity of mice

组别	剂量 (g/kg·BW)	NK细胞 活性/%	NK细胞活 性转换值	P值 (与对照组比)
对照组	0.00	8.11±1.73	0.29±0.03	
低剂量	0.25	8.16±2.08	0.29±0.04	>0.05
中剂量	0.50	12.04±2.78	0.35±0.04	<0.01
高剂量	1.50	11.17±2.13	0.34±0.03	<0.01
F值			9.14(P<0.01)	

中、高剂量组的NK细胞活性高于对照组，差异均有显著性意义（见表6）。表明益生菌冲剂对受试动物NK细胞活性试验结果为阳性，受试样品具有增强NK细胞活性作用。

$$\text{NK细胞活性转换值: } X = \text{Sin}^{-1}(p)^{1/2}$$

2.1.4 小结

依据《保健食品检验与评价技术规范》(2003版)中增强免疫力功能评价标准判断，该益生菌冲剂具有增强免疫力功能作用。

3 讨论

最常见的益生菌是乳杆菌和双歧杆菌，它们是人类肠道重要的生理菌，对机体有多种其它正常生理菌无法比拟的生理作用，包括增强免疫力等^[1]。嗜酸乳杆菌^[4]和乳双歧杆菌具有以下功能作用：在肠道定植，激活机体巨噬活性，诱发免疫反应；同时通过自身及其代谢产物与其他细菌间相互作用，维持和保证菌群最佳优势组合，阻止致病菌定植，拮抗致病菌和有害微生物生长及其毒素吸附；通过激活巨噬细胞可提高非特异性及特异性免疫反应、自然杀伤细胞活力，增强细胞因子表达水平，促进免疫球蛋白特别是分泌型IgA的表达，从而发挥产品增强免疫力的功效^[1,5-9]。

低聚木糖通过增殖双歧杆菌、调节肠道菌群，并因此抑制肠内有害物质形成、减少有害物质的吸收、刺激肠道免疫应答反应、增强肠道粘膜抗感染能力，改善和维护肠粘膜的屏障功能。

熊衍文等认为，嗜酸乳杆菌对上皮细胞有粘附作用，能够抑制肠侵袭性大肠杆菌对上皮细胞的粘附作用，具有非特异性的免疫刺激作用。实验使用口服链霉素处理的BALB/c小鼠模型，在大肠杆菌O157:H788-2364感染前或后，在不同时间经口给以嗜酸乳杆菌，观察试验小鼠的临床症状、肠道和肾脏的病理改变、排菌时间以及粪便中志贺毒素对Vero细胞的毒性作用等。结果发现口服嗜酸乳杆菌可以明显降低感染了大肠杆菌O157:H7小鼠的死亡率，降低通过粪便排泄病原菌的时间，以及降低粪便标本对Vero细胞的毒性作用。结论嗜酸乳杆菌可以保护试验动物免受大肠杆菌O157:H7的感染，能够明显预防疾病的发生^[10]。

王雪明等实验也显示嗜酸乳杆菌增强机体免疫力方面有明显效果^[11]。Wagner等研究显示嗜酸乳杆菌的摄入激发免疫系统缺乏的小鼠抗体和细胞对白假丝酵母的应激反应，降低白色念珠菌感染程度，其血清中免疫球蛋白IgM、IgA和IgG比胸腺免疫缺乏小鼠对照组更多^[12]。

乳双歧杆菌作为双歧杆菌的一种，与其他双歧杆菌属的菌种一样具有明显的增强免疫力功能。双歧杆菌是人肠道正常菌群中占优势的益生菌，被机体摄入后可激活宿主的免疫系统，对机体有明显的免疫促进作用，可以促进新生儿免疫系统的成熟，也可以促进

肠粘膜局部和系统的免疫功能,对特异性和非特异性的免疫应答均有调节作用。通过免疫调节作用加强肠道的各条防线,发挥抗感染和抗肿瘤作用,维持机体健康状态时免疫功能的正常水平,促进免疫功能在疾病状态时的增强。

给健康儿童食用含双歧杆菌的食品21 d后,其粪便中的IgA水平显著增加,提高了胃肠道粘膜的免疫和抗感染能力^[13]。给小鼠腹腔注射双歧杆菌,发现动物脾脏LAK、NK细胞活性,以及腹腔局部巨噬细胞来源的IL-1、IL-6和TNF等细胞因子活性增强,从而提高了宿主机体的特异性和非特异性免疫功能。

杨美芬等通过双歧杆菌对儿童机体免疫反应的作用及其机制的研究,认为双歧杆菌作为人体肠道的正常菌群中占有优势的益生菌,被宿主摄入后可激活宿主的免疫系统,对特异性和非特异性的免疫应答均有调节作用,尤其在儿童其免疫调节作用更显示出它的重要性,双歧杆菌对儿童的免疫调节作用及其机制主要是通过①对IgA影响②对IgE影响③对巨噬细胞影响④对淋巴细胞影响⑤转位作用等产生增强免疫力作用^[14]。

本品所进行的系列功能试验结果也进一步证实了配方原料组合具有增强少年儿童免疫力的作用。本研究所采用的益生菌冲剂主要是由复合乳酸菌粉(嗜酸乳杆菌+乳双歧杆菌)及低聚木糖组成,主要功效成分是复合乳酸菌粉(嗜酸乳杆菌+乳双歧杆菌)。据测定,产品中每100克含嗜酸乳杆菌 $\geq 3.0 \times 10^{11}$ cfu,双歧杆菌 $\geq 3.3 \times 10^{10}$ cfu。本人在另一篇针对本品调节肠道菌群作用的研究中^[15],在14 d动物实验和15 d人体实验中,双歧杆菌和乳杆菌数量均有极显著增加,证明摄入该复合乳酸菌产品也具有很好的调节肠道菌群的保健作用。

4 结论

4.1 有研究表明,儿童调节性的T细胞功能不完善,细胞因子的分泌与成年人之间有明显的差别,sIgA的分泌量到6岁以后,才能达到成年人的水平。且粘膜屏障的功能差,不能有效地阻抑抗原性物质的大量入侵^[16]。相对于正常儿童,免疫能力低下的儿童容易发生疾病,其中厌食、腹泻、肺炎是儿童的多发问题。虽然有儿童免疫能力通过经历疾病后获得提高的说法,但不可否认,过度的非健康状态对儿童肯定是不利的。适当的食品类营养素、益生菌等补充供给,对于免疫力低下的儿童是有利而无害的。同时益生菌的增强免疫力作用已被广泛认同。正常人的消化道粘膜的表面积可达300 m²,这相当于近3/4个篮球场的面积,与消化道

相关的淋巴组织(GALT)将消化道变为人体内最大的免疫器官。每米小肠内存在 10^{10} 个可产生免疫球蛋白的细胞,约占人体所有产生免疫球蛋白细胞的80%。因而消化道不同部位的免疫细胞可激发多种免疫反应,部分乳杆菌和双歧杆菌属细菌在不同程度上被认为是免疫刺激剂或“生物反应调节剂”^[16]。

4.2 嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌在儿童身体中普遍存在,嗜酸乳杆菌有较好的耐酸性,使其能较好地通过人体的胃部到达肠部而保持活性,双歧杆菌是人体内重要的益生菌优势菌群,它和人体的健康息息相关。但儿童因为处于成长期,体内各器官脏腑未发育成熟,抵抗环境变化能力较弱,易受外界感染而致肠道菌群失调及腹泻,从而导致儿童发病率和死亡率居高不下,所以一旦出现肠道菌群失调,就应及时加以调理和改善,例如可以通过服用具有增强免疫力功能的益生菌制剂来恢复并维护肠道健康。

参考文献

- [1] 牛生洋,赵瑞香,孙俊良.嗜酸乳杆菌在乳品中的应用[J].安徽农业科学,2005,33(12):2397-2399
- [2] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范(2003版):22-34
- [3] 杜鹏,霍贵成.国内外益生菌制品发展现状[J].食品科学,2004,25(5):194-198
- [4] M E Sanders, T R Klanehammert. Invited Review: The Scientific Basis of Lactobacillus acidophilus NCFM Functionality as a Probiotic [J]. J.Dairy Sci., 2001, 84: 319-331
- [5] 肖仔君,陈惠音,杨汝德.嗜酸乳杆菌及其应用研究进展[J].广州食品工业科技,2003,19(B11):90-92
- [6] 刘振民,唐晓峰,任彬彬.嗜酸乳杆菌的生理特性及应用[J].中国乳业,2003,5:28-30
- [7] 张延伸,马燕.双歧杆菌的生物特性及其保健功能[J].解放军预防医学杂志,2005,23(5):386-389
- [8] 罗予,蔡访勤.双歧杆菌调节机体肠道菌群和免疫刺激作用研究[J].解放军预防医学杂志,2006,35(8):48-52
- [9] 金京顺.双歧杆菌的特殊生理保健功能[J].上海医学,2005,28(3):245-248
- [10] 熊衍文,李振军,徐建国.嗜酸乳杆菌对链霉素处理小鼠感染大肠杆菌O157:H7的预防和治疗作用的观察[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(6):435-438
- [11] 王雪明,李楠.嗜酸乳杆菌治疗幽门螺杆菌感染的疗效[J].中国新药与临床杂志,2002,21(4):237-239
- [12] R DOUG Wagner, C Pierson, T Wamer, et al. Biotherapeutic Effects of Probiotic Bacteria on Candidiasis in Immuno-deficient Mice [J]. Infect. Immun., 1997, 65: 4165-4172

- [13] 张延伸,马燕.双歧杆菌的生物特性及其保健功能[J].解放军预防医学杂志,2005,23(5):386-389
- [14] 杨美芬,黄永坤,李海林.双歧杆菌对儿童的免疫调节作用及其机制[J].国外医学-儿科学分册,2005,32(5):299-301
- [15] 朱韶娟.复合乳酸菌粉调节肠道菌群作用的研究[J].现代食品科技,2011,27(12):1451-1453,1483
- [16] 张扬,袁杰利.肠道益生菌对机体免疫系统的影响[J].中国微生物生态学杂志,2003,15(4):246-248
- [17]

现代食品科技