

# 干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖的体外免疫活性研究

刘翠平, 吴正钧

(光明乳业股份有限公司乳业研究院, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

**摘要:** 分别以葡萄糖、乳糖为碳源制得干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖, 并对分别分离纯化得到的中性多糖组分体外细胞培养试验结果表明, G1、G2 (以葡萄糖为碳源经 LC2W 发酵分离纯化制备两种均一多糖) 和 L1、L2 (以乳糖为碳源经 LC2W 发酵分离纯化制备两种均一多糖) 均无细胞毒性, 在 5~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内, L1 对 B 淋巴细胞增殖的抑制作用比 G1 强, 具有明显的剂量效应, 其抑制作用与浓度呈负相关; 与此相反, 在 5~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内, G2 对 B 淋巴细胞增殖抑制作用比 L2 强, 表现为明显的剂量效应, 其抑制作用与浓度呈正相关。碳源的改变会影响干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖的组成, 并引起其生理活性产生差异。

**关键词:** 干酪乳杆菌 LC2W; 胞外多糖; 免疫

文章编号: 1673-9078(2013)4-715-718

## Immunomodulating Activity of Exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W

LIU Cui-ping, WU Zheng-jun

(Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co. Ltd., State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China)

**Abstract:** EPS synthesized by *L. casei* LC2W from different carbon sources (glucose or lactose) were fractionated. The neutral polysaccharides G1 and G2 were two kinds neutral polysaccharides synthesized by *L. casei* LC2W using glucose as carbon source. Another two kinds of neutral polysaccharides synthesized by *L. casei* LC2W using lactose as carbon sources were named as L1 and L2. All the two kinds of polysaccharides showed little cytotoxicity to lymphocytes cultured in vitro. On the contrary, all of the 4 EPS fractions demonstrated strong inhibitory activity for the proliferation of B-lymphocytes stimulated by bacterial lipopolysaccharides in vitro. In the range of 5~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the inhibitory activities of G1 and L1 to the proliferation of B-lymphocytes were negatively correlated to the concentration of EPS. And the inhibitory activities of G2 and L2 were positively correlated to the concentration of EPS. The carbon sources in the growth medium might be a decisive factor for the composition and even the bioactivity of the EPS synthesized by *L. casei* LC2W.

**Key words:** *Lactobacillus casei* LC2W, exopolysaccharides, structure, monosaccharide composition

乳酸菌产胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)指乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏多糖或荚膜多糖。LAB EPS 是由许多重复单位构成的带有分支结构的多糖, 其独特的物理流变学特性、使用安全性以及生理活性, 使它在食品和非食品工业倍受青睐, 尤其是它在医药领域所具有的巨大应用潜能正日益引起人们的广泛关注。如: 可以用做增稠剂、凝胶剂和稳定剂, 能降低胆固醇, 抗癌, 抗溃疡, 改善肠道微生态环境, 增强免疫力或作为益生元等<sup>[1~4]</sup>。

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 科技部“十二五”科技支撑计划(2012BAD28B07); 上海市科委科技开发项目(12DZ2281400)

作者简介: 刘翠平(1979-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术及乳制品研究

培养基组成尤其是碳源的改变对胞外多糖分子量、单糖组成和生物学活性均可能有影响<sup>[5~6]</sup>, 目前的研究还存在争议。本文通过体外细胞培养检测 EPS 的免疫活性, 并对改变碳源对其多糖组成和免疫活性的影响进行比较, 为干酪乳杆菌 LC2W EPS 的进一步研究和利用以及分析构效关系提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

均一多糖 G1、G2(以葡萄糖为碳源经 LC2W 发酵分离纯化制备)<sup>[7~9]</sup>; 均一多糖 L1、L2(以乳糖为碳源经 LC2W 发酵分离纯化制备); 脂多糖(LPS), 上海华美生物工程公司; 淋巴细胞分离液, 上海化学试剂公司; 脱氧胸嘧啶核苷(3H-TdR), 中科院北京原子能研究所; 二甲亚砜(DMSO), 天津化学试剂一厂;

刀豆蛋白 A (ConA), 苜蓿蓝, 噻唑蓝 (MTT), 2,5-二苯基恶唑(PPO), 1,4-双-2-15-苯基恶唑苯(POPOP)均购自 Sigma 公司。

### 1.2 主要仪器

400AT 型全自动酶标仪, 澳大利亚 EAR 公司; 2770TR 液闪仪, 美国 PACKARD 公司; Waters 600 型高压液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 G1、G2 与 L1、L2 的纯度鉴定

多糖的纯度与其结构分析和功能评价直接相关, 因此, 对分离纯化后的多糖进行纯度鉴定也是必要环节。由于多糖是大分子化合物, 它的纯度只代表某一多糖的相似链长的平均分布, 通常意义上的纯品指一定相对分子量范围的多糖的均一组分。高效液相色谱 (HPLC) 是最经典的检测多糖纯度和分子量的方法, 本研究用高效液相色谱 (HPLC) 对分离纯化后的中性糖组分 G1、G2 和 L1、L2 进行了纯度鉴定。

高效液相色谱条件:

色谱仪: Waters 2690

检测器: Waters 2410 示差折光检测器; 色谱柱:

Waters UltrahydrogelTM Linear ( $\varnothing$  7.80 mm $\times$ 300 mm ID)两柱串连流动相: 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>; 柱温: 45 °C; 流速: 0.90 mL/min; 进样量: 20  $\mu$ L。

#### 1.3.2 不同碳源来源 EPS 体外免疫活性研究

无菌从小鼠取脾脏, 制成脾细胞悬液。用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, PBS 洗涤 2 次, 用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  cells/mL 的脾淋巴细胞悬液。96 孔培养板每孔加入 150  $\mu$ L 脾淋巴细胞悬液和 50  $\mu$ L 不同浓度的多糖样品, 用有丝分裂原刀豆蛋白 A (ConA, 5  $\mu$ g/mL) 诱导 T 淋巴细胞增殖, 脂多糖 (LPS, 10  $\mu$ g/mL) 诱导 B 淋巴细胞增殖, 设阴性对照组 (只含脾淋巴细胞悬液) 和阳性对照组 (添加有丝分裂原), 细胞毒性检验时不添加有丝分裂原。每实验组设 3 孔重复, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养 72 h。

#### 1.3.3 细胞毒性检验

采用 MTT 法<sup>[10]</sup>, 培养结束前 4 h, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT (5 g/L), 继续培养 4 h。培养结束后加二甲亚砜 150  $\mu$ L。酶联免疫检测仪于 570 nm 测定 A<sub>570</sub> 值。

#### 1.3.4 细胞增殖检验

<sup>3</sup>H-TdR 掺入法<sup>[11]</sup>, 培养结束前 8 h, 每孔内加入 20  $\mu$ L <sup>3</sup>H-TdR (370 kBq/mL)。培养结束后将各管细胞收集在 49 型玻璃纤维滤纸上, 将纸烘干并置于 PPO-POPOP 闪烁液内过夜, 测用液闪仪各管 cpm 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 G1、G2 与 L1、L2 的纯度鉴定

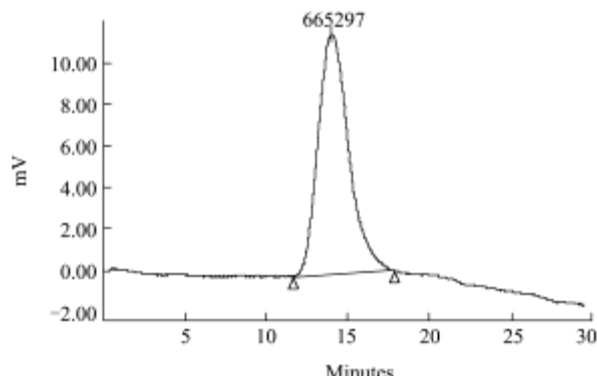


图 1 G1 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of G1

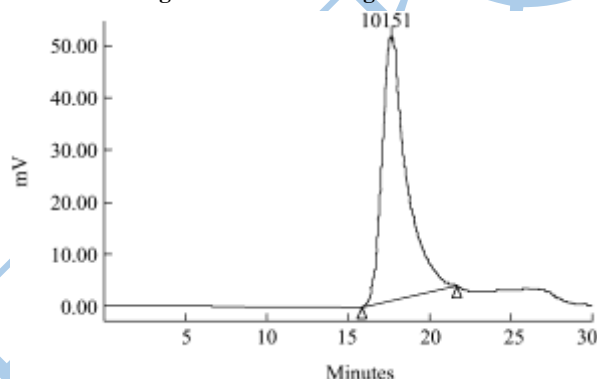


图 2 G2 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of G2

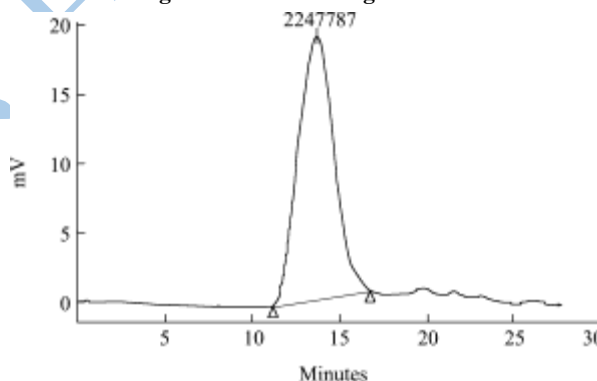


图 3 L1 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of L1

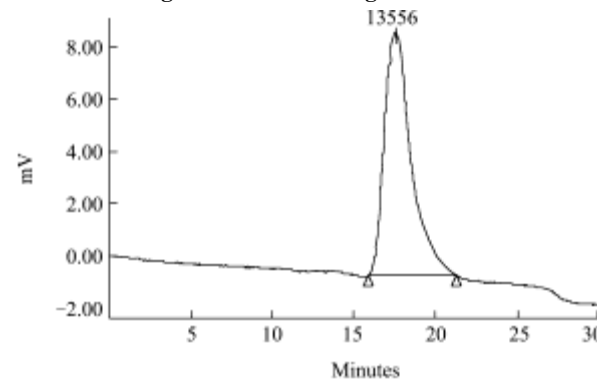


图 4 L2 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of L2

由图 1 至图 4 可以看出,干酪乳杆菌 LC2W 分别以两种碳源发酵产胞外多糖,经离子柱和凝胶柱分离纯化后得到的中性糖 G1、G2 和 L1、L2 经过 HPLC 后峰形均呈单一对称峰,都是均一多糖。四种均一多糖的平均相对分子量如表 1 所示。

表 1 G1、G2 和 L1、L2 的平均相对分子量

Table 1 Average molecular weights of G1, G2, L1 and L2

多糖均一组分	平均相对分子量/Da
G1	$6.65 \times 10^5$
G2	$1.01 \times 10^4$
L1	$2.25 \times 10^6$
L2	$1.36 \times 10^4$

## 2.2 不同碳源来源 EPS 体外免疫活性研究

免疫是机体免疫系统识别自身与异己抗原,并通过免疫应答排除抗原性异物,以维持机体生理平衡的功能,免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成。免疫细胞种类繁多,泛指所有参与免疫应答的细胞及其前身,有的在免疫应答中起协助、调节作用,有的直接发挥吞噬、杀伤等免疫作用,免疫细胞主要包括单核巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞、粒细胞、红细胞等<sup>[12-13]</sup>。

细胞培养是现代生物技术繁荣的重要组成部分,在医药科研实践中正被广泛应用,对药物的筛选与机理研究有很大帮助,细胞培养的特点是所需样品量少、

细胞培养周期短,非常适合分离纯化物质的活性检测。本试验通过体外 T/B 淋巴细胞的增殖反应来初步分析胞外多糖 G1、L1、G2 和 L2 的免疫调节功能,初步研究改变碳源对其免疫活性的影响。

### 2.2.1 不同碳源来源 EPS 细胞毒性实验结果

表 2 胞外多糖 G1、L1、G2 和 L2 细胞毒性检测

Table 2 Determination of cell toxicity for EPS G1, L1, G2 and L2

L2				
组别	测定浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	OD 平均值 $\pm$ SD	P 值	细胞 毒性
对照	-	$0.249 \pm 0.002$	-	
G1	5	$0.276 \pm 0.048$	0.43	无
	20	$0.240 \pm 0.049$	0.79	无
	80	$0.257 \pm 0.046$	0.78	无
L1	5	$0.314 \pm 0.062$	0.21	无
	20	$0.349 \pm 0.048$	0.07	无
	80	$0.280 \pm 0.029$	0.21	无
G2	5	$0.234 \pm 0.040$	0.59	无
	20	$0.238 \pm 0.025$	0.53	无
	80	$0.348 \pm 0.029$	0.06	无
L2	5	$0.299 \pm 0.031$	0.11	无
	20	$0.275 \pm 0.011$	0.051	无
	80	$0.360 \pm 0.061$	0.09	无

表 3 胞外多糖 G1、L1、G2 和 L2 对 T/B 淋巴细胞增殖反应的影响

Table 3 Effects of G1, L1, G2 and L2 on proliferation of T/B lymphocyte

组别	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	T 淋巴细胞		B 淋巴细胞	
		CPM 平均值 $\pm$ SD	增强/抑制率/%	CPM 平均值 $\pm$ SD	增强/抑制率/%
阴性对照	-	$284 \pm 85$	-	$418 \pm 187$	-
阳性对照	-	$11560 \pm 640$	-	$5356 \pm 154$	-
G1	5	$13048 \pm 405$	13	$4510 \pm 405^{**}$	-16
	20	$13591 \pm 672$	18 <sup>**</sup>	$4352 \pm 243^{**}$	-19
	80	$11329 \pm 118$	-2	$3963 \pm 540^{**}$	-26
L1	5	$9379 \pm 854$	-19 <sup>**</sup>	$3356 \pm 199^{**}$	-37
	20	$9737 \pm 454$	-16 <sup>*</sup>	$3888 \pm 870^{**}$	-27
	80	$11379 \pm 264$	-2	$4087 \pm 884^{**}$	-24
G2	5	$10677 \pm 137$	-8	$4018 \pm 407^{**}$	-25
	20	$10930 \pm 872$	-5	$3485 \pm 710^{**}$	-35
	80	$8516 \pm 170$	-26 <sup>**</sup>	$2669 \pm 175^{**}$	-50
L2	5	$11653 \pm 698$	1	$3978 \pm 381^{**}$	-26
	20	$11453 \pm 270$	-1	$3866 \pm 404^{**}$	-28
	80	$11388 \pm 47$	-1	$3963 \pm 392^{**}$	-26

注: \*\*表示差异极显著,  $P < 0.01$ ; \*表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

1983 年, Mosmann 首创 MTT 比色法, 并将之应用于肿瘤细胞的生长和增殖活力的研究<sup>[4]</sup>。MTT 法

以其实验周期短、操作简便、灵敏度高、重复性好而得到迅速发展和广泛应用, 在细胞生物学、辐射生物

学和免疫学等研究领域具有重要地位。MTT 比色法的原理在于活细胞内线粒体脱氢酶能使黄色的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中(死细胞无此功能),经二甲亚砜(DMSO)溶解后,利用酶联免疫检测仪在一定波长下测定的吸光度与活细胞线粒体的代谢能力呈正相关,进而反映细胞的增殖活性。如表 2 所示,经 MTT 比色法测定可知,胞外多糖 G1、L1、G2 和 L2 对体外培养的小鼠脾淋巴细胞均未显示细胞毒性,与对照组相比,在添加不同浓度的 G1、L1、G2 和 L2 时,其测定 OD 值之间没有显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.2.2 不同碳源来源 EPS 对 T、B 淋巴细胞增殖反应的影响比较

$^3\text{H-TdR}$  方法与 MTT 法相比灵敏度高、稳定性好,经济实惠。 $^3\text{H-TdR}$  方法基于细胞增殖周期中 DNA、RNA 合成增加, $^3\text{H-TdR}$  能被作为原料摄入细胞,测定细胞内  $^3\text{H-TdR}$  放射量,反映了细胞增殖情况<sup>[15]</sup>。

脾脏淋巴细胞中包括了 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,两者含量基本相近。ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原,仅促进 T 淋巴细胞的增殖,对 B 淋巴细胞不起作用,相反 LPS 仅能诱导 B 淋巴细胞增殖。在无细胞毒的情况下,T/B 淋巴细胞的增强/抑制百分比在  $\pm 15\%$  以上,就表示有作用。

如表 3 所示,胞外多糖 G1、L1、G2 和 L2 对经 ConA 激活的体外小鼠 T 淋巴细胞个别浓度有明显的增殖/抑制作用,而对 LPS 激活的 B 淋巴细胞增殖均表现为明显的抑制作用( $P<0.01$ ) (表 3)。

在 5~80  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内,G1 与 L1 相比,对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖抑制 L1 具有明显的剂量效应,抑制作用比 G1 强,其抑制作用与浓度呈负相关;G2 与 L2 相比,对经 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖抑制 G2 具有明显的剂量效应,其抑制作用与浓度呈正相关。

## 3 结论

通过细胞毒性实验和细胞增殖实验对干酪乳杆菌 LC2W 以葡萄糖和乳糖为碳源合成的均一胞外多糖 G1、G2 和 L1、L2 的体外免疫活性进行了研究,研究表明,G1、G2 和 L1、L2 均无细胞毒性,在 5~80  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内,L1 对 B 淋巴细胞增殖的抑制作用比 G1 强,具有明显的剂量效应,其抑制作用与浓

度呈负相关;与此相反,在 5~80  $\mu\text{g/mL}$  的浓度内,G2 对 B 淋巴细胞增殖抑制作用比 L2 强,表现为明显的剂量效应,其抑制作用与浓度呈正相关。总之,干酪乳杆菌 LC2W 以不同碳源合成的胞外多糖对应组分在免疫活性上存在明显差异,剂量效应浓度还需进一步细化分析,这种差异可能与其单糖组成摩尔比及结构相关,待进一步分析构效关系研究确定。

## 参考文献

- [1] 郭本恒.益生菌[M].北京:化学工业出版社,2004
- [2] 侯爱香,周传云.乳酸菌胞外多糖的研究进展[J].现代食品科技,2006,22(2):282-284
- [3] 董伟,唐彦君,刘宁,等.植物乳杆菌胞外多糖对小鼠树突状细胞分泌的调控[J].中国乳品工业,2011,39(6):14-16
- [4] 孟利,张兰威.乳酸菌胞外多糖的生理功能及其在食品中的应用[J].现代食品科技,2005,21(4):133-136
- [5] Van Den Berg D J C, Robijn G W, Janssen A C. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 2840-2844
- [6] Gasse M A, Schmidt K A, Frank J F. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgarius* [J]. *J Food Sci*, 1997, 62: 171-173, 207
- [7] 刘翠平,郭本恒,吴正钧,等.营养因子对干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖合成的影响[J].工业微生物,2008,38(2):11-14
- [8] 刘翠平,吴正钧,王荫榆,等.响应面法优化干酪乳杆菌 LC2W 合成胞外多糖的培养条件[J].食品与发酵工业,2008,34(12): 85-89
- [9] 刘翠平,叶蕾,吴正钧,等.干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖提取工艺研究[J].华北农学报,2008,23(增刊):118-121
- [10] 许德义,贾宏彬.大鼠杏仁核 5-HT<sub>3</sub> 受体参与免疫调制[J].生理学报,2001,53(5):349-354
- [11] 郭曲练,张阳德,邹望远,等.鞘内泵入吗啡对大鼠细胞免疫功能的影响[J].中华麻醉学杂志,2005,25(2):118-121
- [12] 季晓辉,张建琼.医学免疫学与医学微生物学[M].北京:科学出版社,1999
- [13] 杨汉民.细胞生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1998
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65: 55-63
- [15] 李勇,韩本立,李昆,等.细胞生长抑制测定 TGF- $\beta_1$  生物活性 [J].第三军医大学学报,1998,21(2):138-140