

# Effect of *Bifidobacterium lactis* GKK2 on OVA-Induced Asthmatic Mice

Yu-Hsin Hou<sup>1</sup>, Shih-Wei Lin<sup>1</sup>, Chang Zhao<sup>2</sup>, Hung-Chieh Lu<sup>2</sup>, Yen-Lien Chen<sup>1</sup>, Wen-Hsin Lin<sup>3</sup>, Chin-Chu Chen<sup>1,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Grape King Bio Ltd., Taoyuan Taiwan

<sup>2</sup>Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

<sup>3</sup>School of Pharmacy, China Medical University, Taichung Taiwan

<sup>4</sup>Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

<sup>5</sup>Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan

<sup>6</sup>Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan Taiwan

Email: \*gkbiocn@grapeking.com.cn

Received: Apr. 2<sup>nd</sup>, 2019; accepted: Apr. 15<sup>th</sup>, 2019; published: Apr. 22<sup>nd</sup>, 2019

## Abstract

Asthma is a chronic bronchitis that can cause respiratory failure and even lead to life-threatening in severe conditions. The present study is to evaluate *Bifidobacterium lactis* GKK2 ability in improving allergic problems and regulating related allergic factors in a mouse model of OVA-allergic asthma. Balb/c mice were divided into four groups as follows: control group, OVA-allergic asthma group, OVA-allergic asthma with GKK2-100 group (0.123 mg/day/kg) and OVA-allergic asthma with GKK2-300 group (0.41 mg/day/kg). Results showed that after OVA-allergic asthma mice were given both doses of *B. lactis* GKK2, their airway resistance, eosinophil, and OVA-specific IgE were significantly lower than those of OVA-induced asthmatic mice. In the IFN- $\gamma$  and IgG2a, administration of *B. lactis* GKK2 can also effectively increase the content of IFN- $\gamma$  and IgG2a in OVA-induced asthmatic mice and reduce allergic reactions.

## Keywords

*Bifidobacterium lactis* GKK2, Probiotics, Allergic Asthma

# 乳双歧杆菌GKK2对OVA诱导气喘小鼠之影响

侯毓欣<sup>1</sup>, 林诗伟<sup>1</sup>, 赵 敞<sup>2</sup>, 卢弘捷<sup>2</sup>, 陈炎炼<sup>1</sup>, 林文鑫<sup>3</sup>, 陈劲初<sup>1,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

<sup>2</sup>上海葡萄王企业有限公司, 上海

<sup>3</sup>中国医药大学药学系, 台湾 台中

\*通讯作者。

<sup>4</sup>国立台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

<sup>5</sup>实践大学食品营养与保健生技学系, 台湾 台北

<sup>6</sup>中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

Email: gkbioen@grapeking.com.cn

收稿日期: 2019年4月2日; 录用日期: 2019年4月15日; 发布日期: 2019年4月22日

## 摘要

气喘为气管道的慢性发炎性疾病, 急性发作严重时可能会造成呼吸衰竭, 甚至导致生命危险。本篇研究目的为评估自国内人体内筛选出之乳双歧杆菌GKK2改善OVA诱导之小鼠过敏情形及有效调节相关过敏因子。实验将Balb/c小鼠分为四组: 生理食盐水组、OVA诱导气喘组、OVA诱导小鼠给予GKK2-100组(0.123 mg/day/kg)及OVA诱导小鼠给予GKK2-300组(0.41 mg/day/kg)。实验结果显示, OVA致敏小鼠经给予乳双歧杆菌GKK2低高两剂量组后, 其呼吸道阻力、嗜酸性球(eosinophil)及OVA特异性IgE皆较OVA诱导气喘小鼠组别显著降低许多。在IFN- $\gamma$ 及IgG2a方面, 给予乳双歧杆菌GKK2, 则能有效增加致敏小鼠体内IFN- $\gamma$ 及IgG2a的含量, 降低过敏反应。

## 关键词

乳双歧杆菌GKK2, 益生菌, 过敏性气喘

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

全世界有将近 40%人口有过敏问题, 而随着人们生活及饮食型态的改变、工作压力增加, 以及社会环境的改变, 过敏疾病的患病率逐年增加。过敏问题如过敏性鼻炎、过敏性气喘、异位性皮肤炎及荨麻疹等, 皆为现代人常见的过敏性疾病[1]。近年来因工业化及都市化, 世界各地气喘之盛行率不断增加。过敏性气喘常伴随着其他过敏性疾病, 如异位性皮肤炎或过敏性鼻炎, 造成患病者许多不适症状。

过敏为人体内免疫细胞对外来物质或病原体的过度反应, 其中, 体内的免疫细胞——T 细胞扮演着重要的角色。T 细胞中的辅助型 T 细胞分为 Th1 及 Th2, 正常状态下, 体内的 Th1 与 Th2 处于平衡状态, 当 Th1 与 Th2 失衡, 且偏向 Th2 细胞的免疫反应, 就容易产生过敏反应。Th2 细胞会分泌 IL-4、IL5、IL13 等免疫物质, 引发 B 细胞分泌过敏相关抗体 IgE, 以及刺激肥大细胞(mast cell)、嗜酸性球(eosinophil)等释放, 进而造成各种过敏症状; Th1 细胞则会分泌 INF- $\gamma$ 、IL2 等, 能够帮助抗过敏抗体 IgG2a 产生, INF- $\gamma$  则具有抑制 Th2 细胞反应的作用[2]。而过敏性气喘是由于外来刺激物或过敏原刺激呼吸道, 使呼吸道发炎肿胀造成呼吸道狭窄, 当黏液增多使得呼吸道阻塞, 进而引起呼吸道的过度反应。因此, 为有效改善过敏问题, 需降低体内引发过敏相关物质的产生, 且提升缓解过敏之细胞激素及抗过敏抗体含量。

益生菌(Probiotics)已被证实是肠内的有益细菌, 具有抑制坏菌的整肠功能, 也能改善人体免疫能力[3]。研究发现肠道黏膜表面的乳酸杆菌(lactobacilli)及比菲德氏菌(bifidobacteria)具有改变胃肠道微生物的状态[4], 调节肠道的通透性[5], 增加肠道 IgA 的反应性[6]及调节免疫系统[7] [8]等生理功能。

动物或人体之免疫系统主要分为细胞性免疫和体液免疫系统两部份[9]。在乳酸菌相关的研究结果中,发现少数益生性乳酸菌可促进  $\text{INF-}\gamma$  的表现,进而抑制过敏相关的 IL-4、IL-5 及特异性 IgE 的表现量,此种现象表示乳酸菌可以调降 Th2 的免疫反应,进而达到减缓过敏症状的效果[10] [11]。亦有研究指出,给予 8 周乳酸菌,患有过敏的儿童体内 IL-10 分泌增加,缓解过敏[12]。近年来临床试验的结果发现早期摄取益生菌,可减少婴儿异位性皮肤炎的产生或症状减轻,相对地减少过敏性气喘的发生[13]。在临床流行病学研究的研究中亦证实婴儿在早期接受乳酸菌一段时间后其产生异位性湿疹的比例明显下降[3]。

本研究目的为评估乳双歧杆菌(*B. lactis*) GKK2 对以 OVA 致敏之小鼠相关过敏免疫反应的影响。探讨乳双歧杆菌(*B. lactis*) GKK2 是否能改善致敏小鼠体内过敏相关物质分泌,且增加减缓过敏反应物质的产生。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验菌株

乳双歧杆菌(*B. lactis*) GKK2: 葡萄王公司自婴儿肠道分离筛选获得,经 16S rRNA 鉴定为乳双歧杆菌。

### 2.2. 乳双歧杆菌 GKK2 益生菌冻干粉制备

GKK2 培养于 1 L MRS 培养基中,经 37°C、16 小时培养后,以 5000 rpm、25°C、离心 10 分钟取得菌泥,混入 20%脱脂乳粉后冷冻干燥而得。

### 2.3. 乳双歧杆菌 GKK2 菌数测定

以 Guava<sup>®</sup> easyCyte™进行乳双歧杆菌 GKK2 菌数测定,测定 GKK2 之总菌数、活菌数及死菌数。

### 2.4. 实验动物

Balb/c 雄鼠 5 周大共 24 只,购自国家动物中心。动物饲养于中国医药大学动物中心小鼠专用房之独立 IVC (individual ventilated caging system)小鼠饲养系统,室温维持于 22°C  $\pm$  2°C,湿度 40%~60%,定时 12 小时光照与黑暗,饲料及无菌逆渗透水均任由小鼠自由取食。小鼠饲养 2 周适应环境后开始进行实验。

### 2.5. 实验设计

#### 2.5.1. 实验分组

将 5 周龄 Balb/c 雄鼠,共分为 4 组,各组之小鼠均随机分配为 6 只。组别包括喂食生理食盐水组、OVA 诱导组、GKK2-100 组及 GKK2-300 组。除了生理食盐水组之外,其余各组小鼠均进行卵白蛋白(OVA)致敏步骤。

#### 2.5.2. 管灌喂食产品之剂量及途径

小鼠灌食剂量之计算依据实验动物与人体表面积比的等效剂量换算系数,小鼠与人的换算系数为 9.01。小鼠每周秤量体重一次,每组计算出平均体重后,依成人(以体重 60 公斤计算)每日服用剂量  $1 \times 10^{10}$  cfu/day,加以换算每天应管灌小鼠之剂量,公式如下所示:

$$\text{小鼠每日喂食产品剂量(g)} = \{ \text{成人剂量/60公斤(成人体重)} \} \times \text{小鼠体重(公斤)} \\ \times 9.01(\text{小鼠与人的换算系数})$$

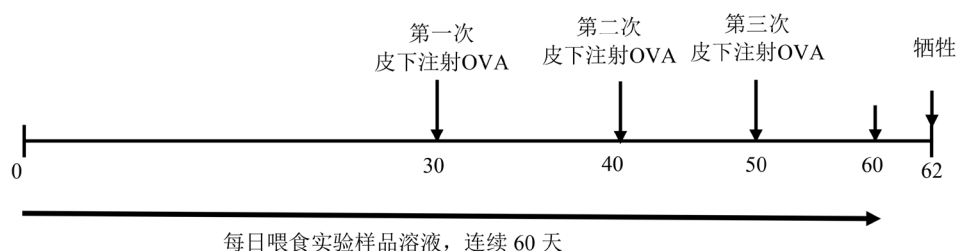
实验样品每日以 0.9%生理食盐水新鲜配制,各组小鼠分别管灌喂食 0.2 ml 体积之生理食盐水、安慰

剂溶液或是不同浓度之 GKK2 溶液。各组小鼠每天管灌喂食,计划执行期间共连续投予 60 天。喂食 GKK2 剂量如下:

- 1) GKK2-100 组: 0.123 mg/day/kg
- 2) GKK2-300 组: 0.41 mg/day/kg

### 2.5.3. 实验流程

本实验设计流程如图 1 所示:



**Figure 1.** Time line of the mouse OVA allergy experiment  
**图 1.** Balb/c 雄性小鼠之 OVA 致敏实验流程

### 2.5.4. 卵白蛋白抗原诱导小鼠过敏及气喘

将卵白蛋白抗原(OVA, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )与不完全佐剂(Incomplete Freund's adjuvant)以 1:1 等量均匀混合乳化后,以无菌过滤膜进行过滤后立即使用。各组小鼠于实验第 30、40 及 50 日,皆进行此过敏原之皮下注射,并且于第 45 天及第 55 天以喷雾 2% OVA 过敏原方式,进行 10 分钟呼吸道吸入(inhalation)以诱导小鼠产生过敏气喘。

### 2.5.5. 小鼠免疫细胞及血液之分离与制备

#### 1) 血液取得及血清之分离与保存

收集小鼠腹腔巨噬细胞后,剪开腹部皮肤,以 1 ml 注射器于肝门静脉收集血液样本。收集小鼠全血检体,置于含有抗凝血剂之试管中,待进行血液中白血球分类计数。另外,收集小鼠全血检体于无抗凝血剂的试管中,室温静置 1 小时后以 1000 rpm 离心 10 分钟,取得上清液检体即为血清。血清长期保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ ,待日后分析血清中免疫球蛋白及过敏原诱发的特异性抗体。

#### 2) 支气管肺泡冲洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

收集小鼠血液样本后,将小鼠下颚至胸腔的皮肤及骨骼剪开,把肌肉层拉开并使气管暴露,在气管靠近喉头处剪出个开口,插入 0.965 mm 的 polyethylene Tubing 末端接上 25G 的针头套管,用缝线将套管紧绑固定于气管上。将装有 1 ml 生理食盐水的注射针,慢慢将生理食盐水打进肺部至整个肺部完全膨胀,再回抽,如此反复三次后,将冲洗液以 750 rpm,离心 5 分钟,下层细胞以 1 ml 生理食盐水回溶后,取 100  $\mu\text{l}$  支气管肺泡冲洗液,以细胞离心机(cytospin)将细胞打至玻片做成细胞抹片,风干后,以刘氏染色法(Liu's stain)染色。利用油镜(400 $\times$ )观察 200 个白血球细胞种类,计算各占的百分比,乘上支气管肺泡冲洗液中细胞总数目,得出各白血球的绝对数目。

#### 3) 脾脏细胞之取得

在无菌操作条件下,摘取小鼠腹部左上侧的脾脏,将脾脏放入含有 3 ml PBS 缓冲液的培养皿中,以干净无菌的 10 ml 针筒推进器尾端,将脾脏压紧并磨碎,以离心机 1000 rpm 离心 10 分钟,倒掉上清液。再加入 cRPMI 细胞培养液清洗后重复离心的步骤,并倒掉上清液,如此重复两次清洗动作。进行细胞计数后将细胞以 cRPMI 细胞培养液定量并进行相关实验。

## 2.6. 检验分析项目及方法

### 2.6.1. 呼吸道阻力测试

小鼠于牺牲前一天,以 Buxco 公司出产的 Whole-body plethysmography (WBP),进行非侵入性之小鼠呼吸道阻力变化的测量,其阻力变化是依据小鼠呼吸过程中测得的数值经计算机分析后,得到一个 enhanced pause (Penh)值来表示,而数值越高代表呼吸道阻力越大。首先将小鼠放进动物舱中,测量小鼠的基础 Penh 值三分钟。接着将小鼠暴露在雾化的 0.9% NaCl 三分钟后,测量 Penh 值三分钟。接着将小鼠暴露在雾化的非特异性气管收缩刺激剂 methacholine (3.125 mg/ml)三分钟后,测量 Penh 值(PenhMch)三分钟,以逐渐增高浓度的 methacholine (6.25 mg/ml、12.5 mg/ml、25 mg/ml)重复上述步骤,本实验中是以 Penh Ratio 来表示结果,其资料分析是将各浓度 methacholine 所得到的 PenhMch 读值除以给予生理食盐水的 PenhNaCl 读值来计算之。

### 2.6.2. 气管肺泡冲洗液中白血球比例计算

取 100  $\mu$ l 离心后的冲洗液滴于载玻片上后风干,以刘氏染色法(Liu's stain)染色。利用油镜(100 $\times$ )观察 200 个白血球细胞种类,计算各细胞数量之百分比。

### 2.6.3. 血清中过敏原诱发的特异性抗体之含量分析

利用 sandwich-ELISA 免疫呈色反应法,定量血清中过敏原诱发的特异性 IgE 及 IgG2a 含量。首先以 coating buffer (pH 9.6)配制含适量之 anti-mice 单株抗体并添加 100  $\mu$ g/mL 卵白蛋白(OVA)抗原,覆盖于 96 孔微量分析盘(Nunc-Immuno plate)上,静置 1 小时后,以 wash buffer 冲洗未结合的单株抗体,再以 200  $\mu$ l/well 的 blocking buffer 填补未被单株抗体结合的部位。室温下反应 30 分钟后,再以 wash buffer 冲洗,然后加入 100  $\mu$ l 小鼠血清或已知浓度的各种免疫球蛋白标准品。小鼠血清或是各种免疫球蛋白标准品经过室温 1 小时反应后,以 wash buffer 冲洗,再加入适当浓度连结 HRP 的抗各种免疫球蛋白的二级抗体 100  $\mu$ l/well。于室温反应 30 分钟后,以 wash buffer 冲洗,接着以 100  $\mu$ l TMB 受质反应,经 15 分钟呈色后,加入 100  $\mu$ l 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止呈色反应,于 450 nm 波长测定其吸光值。根据各种免疫球蛋白标准品与吸光值所显示的标准曲线,经过回归运算后得到的公式,可用内插法来推算血清中过敏原诱发的特异性抗体的浓度。

### 2.6.4. 脾脏细胞之特异性细胞激素分泌量分析

将前述所收集并置于-80 $^{\circ}$ C 保存之脾脏细胞液进行各种细胞激素分析。以 ELISA 方法分析 IFN- $\gamma$  含量。分析步骤为于 96 孔微量分析盘(Nunc-Immuno plate)上注入,以 coating buffer 配制含适量之 anti-mice cytokine 单株抗体 100  $\mu$ l,静置 4 $^{\circ}$ C 隔夜后,以 wash buffer 冲洗未结合的单株抗体,再以 200  $\mu$ l/well 的 blocking buffer 充填未被单株抗体结合的部位。室温下反应 2 小时后,再以 wash buffer 冲洗,然后加入 100  $\mu$ l 淋巴细胞培养上清液或已知浓度的 recombinant cytokine 标准品。细胞培养上清液或是细胞激素标准品经过室温 2 小时反应后,以 wash buffer 冲洗,再加入适当浓度连结生物素(biotin)的抗细胞激素二级抗体 100  $\mu$ l/well。于室温反应 1 小时后,以 wash buffer 冲洗,接着加入适当浓度的 HRP 100  $\mu$ l/well,室温反应 1 小时后,以 wash buffer 冲洗,接着以 100  $\mu$ l TMB 受质进行反应,经 15 分钟呈色后,加入 50  $\mu$ l 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止呈色反应,于 450 nm 波长测定其吸光值。根据细胞激素标准品与吸光值所显示的标准曲线,经过回归运算后得到的公式,用内插法来推算细胞培养上清液中细胞激素的浓度。

## 2.7. 统计分析

本份测试报告的实验结果以 mean  $\pm$  SD 表示,并以 SPSS 12.0 软件包于计算机中进行统计分析,以 T-test 测定各组间之差异,显著性差异之判断标准为  $p < 0.05$ 。



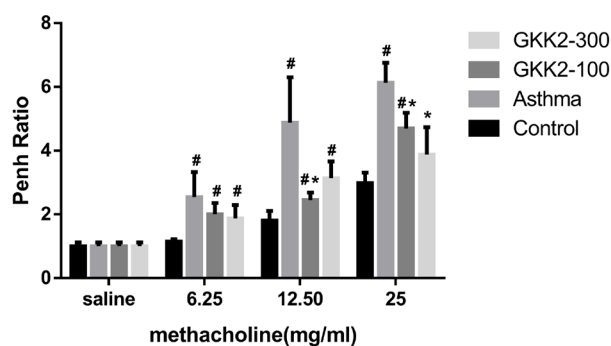
### 3. 结果

#### 3.1. 乳双歧杆菌 GKK2 菌数测定

经菌数测定, 结果为: GKK2 总菌数为  $3.9 \times 10^{11}$  cells/g、活菌菌数为  $3.0 \times 10^{11}$  cells/g、死菌菌数为  $9 \times 10^{10}$  cells/g。而培养法测得菌数约为  $3.5 \times 10^{11}$  cfu/g。使用时依平板计数结果, 以 0.9%生理食盐水调整到  $1 \times 10^{10}$  cfu/g 及  $3 \times 10^{10}$  cfu/g 备用。

#### 3.2. 呼吸道阻力测试的生理反应

为了评估受试样品对于气喘小鼠之呼吸道敏感性的影响, 我们利用 Whole body plethysmography 以测量小鼠呼吸道的阻力变化。致敏后只喂食生理食盐水的小鼠组别, 在此实验中定义为气喘对照组 (Asthma), 在渐增 methacholine 浓度的呼吸道刺激后, 致敏各组小鼠的呼吸道阻力皆逐渐增加。实验结果如图 2 所示, 而喂食不同 GKK2 剂量的两组小鼠在 25mg 的 methacholine 刺激下, 小鼠之呼吸道阻力皆显著低于过敏诱导气喘组 (Asthma) ( $p < 0.05$ )。



\*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to asthma group,  
#Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control group.

**Figure 2.** Effect of *B. lactis* GKK2 on respiratory resistance in OVA-induced asthmatic Balb/c male mice stimulated by different doses of methacholine

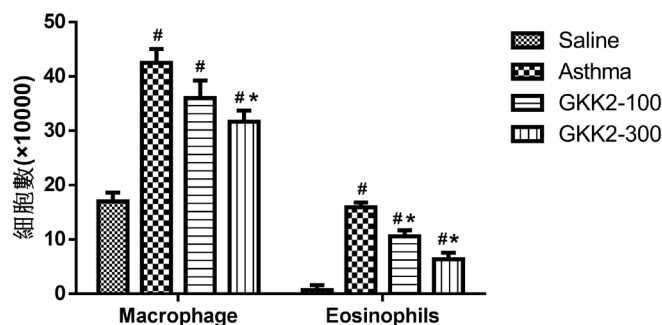
**图 2.** 乳双歧杆菌 GKK2 对不同剂量 methacholine 刺激 OVA 致敏之 Balb/c 雄性小鼠呼吸道阻力的影响

#### 3.3. 肺泡冲洗液及血液中免疫细胞次群分析

于小鼠气管肺泡冲洗液中各种白血球含量分析, 过敏造成巨噬细胞 (macrophage) 增加对抗过敏原, 进而引起严重的免疫反应; 嗜酸性球 (eosinophils) 主要探讨于全身性与肺部的发炎反应及浸润现象。结果如图 3 所示, 于肺部冲洗液中, 未喂食受试样品的气喘对照组 (Asthma), 其嗜酸性球及巨噬细胞显著高于生理食盐水组 ( $p < 0.05$ ), 而喂食 GKK2-300 的受试样品相对于气喘组小鼠, 其肺部冲洗液中巨噬细胞的含量明显较低 ( $p < 0.05$ ); 在嗜酸性球结果上, 低高剂量 GKK2 组别小鼠其嗜酸性球含量皆明显下降 ( $p < 0.05$ )。

#### 3.4. 血清中 OVA 特异性抗体之含量分析

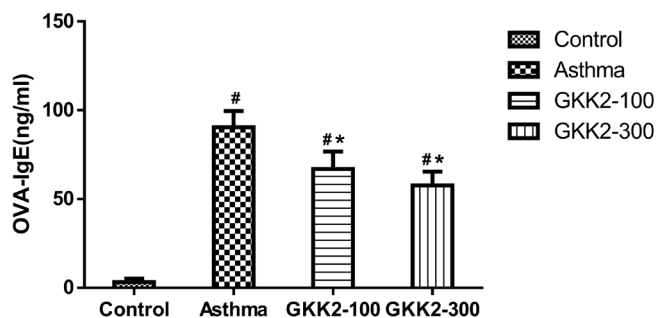
分析小鼠血清中的 OVA 特异性抗体, 结果发现喂食 GKK2-100 及 GKK2-300 的小鼠组别, 其 OVA 特异性 IgE 皆显著低于气喘组小鼠 ( $p < 0.05$ ), 其中又以 GKK2-300 之降低效果较为显著, 结果如图 4 所示。另外, 分析血液 OVA 特异性 IgG2a 抗体, 喂食 GKK2 的小鼠与气喘组进行比较时, 发现 GKK2-100 及 GKK2-300 在统计上皆具有显著性较高的情形 ( $p < 0.05$ ), 结果如图 5 所示。



\*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to asthma group, #Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control group.

**Figure 3.** Number of Macrophage and Eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid of Balb/c male mice

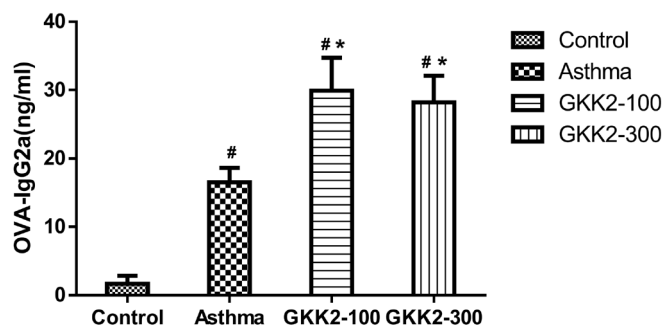
**图 3.** Balb/c 雄性小鼠气管肺泡冲洗液中 Macrophage 及 Eosinophils 数量



\*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to asthma group, #Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control group.

**Figure 4.** Concentration of OVA specific IgE in Balb/c male mice serum

**图 4.** Balb/c 雄性小鼠血清中 OVA specific IgE 抗体浓度



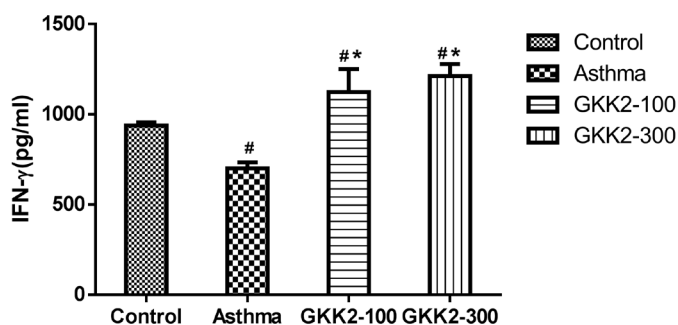
\*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to asthma group, #Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control group.

**Figure 5.** Concentration of OVA specific IgG2a in Balb/c male mice serum

**图 5.** Balb/c 雄性小鼠血清中 OVA specific IgG2a 抗体浓度

### 3.5. 脾脏细胞之细胞激素分泌量分析

小鼠脾脏细胞以 OVA 抗原进行特异性的刺激后, 分析其不同细胞激素的表现情形。结果发现所有喂食受试样品的小鼠, IFN- $\gamma$  的产生量相较于气喘组皆有明显提高的趋势( $p < 0.05$ ), 结果如图 6 所示。



\*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to asthma group. #Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control group.

**Figure 6.** Concentration of IFN- $\gamma$  in Balb/c male mice spleen cells  
**图 6.** Balb/c 雄性小鼠脾脏细胞中 IFN- $\gamma$  之表现浓度

#### 4. 讨论

已有许多文献指出, 食用乳酸菌对人体健康有正面的影响。如预防脂肪堆积、降低体重、免疫调节、改善肠道微生物群及减少肠道炎症等[14] [15]。本研究以国内婴儿肠道自行筛选出之乳双歧杆菌 GKK2, 评估其对 OVA 所诱导过敏性气喘之小鼠是否具有改善过敏功效。

本次动物实验中, 小鼠每日喂样品, 共 60 天, 并分别于第 30、40 及 50 日, 进行 OVA 皮下注射, 并且于第 45 及 55 日以喷雾 2% OVA 过敏原方式, 进行 10 分钟呼吸道吸入(inhalation)以诱导小鼠产生过敏性气喘。牺牲前一天, 以 Whole-body plethysmography (WBP)进行小鼠呼吸道阻力变化的测量, 实验以气管收缩刺激剂 methacholine 刺激小鼠呼吸道, 诱使小鼠呼吸道收缩剧烈, 造成呼吸道阻力增加。结果显示, 未经 methacholine 刺激则呼吸道阻力皆不会提高, 不论有无 OVA 致敏。在 methacholine 刺激下, 所有组别小鼠呼吸道阻力皆随 methacholine 浓度上升而增加, 呈剂量效益, 其中 OVA 致敏小鼠组别在各 methacholine 浓度上之呼吸道阻力皆显著高于生理食盐水组( $p < 0.05$ )。低高剂量 GKK2 两组小鼠组别其呼吸道阻力亦会随 methacholine 浓度上升而增加, 但在 3 个 methacholine 剂量下, 低高剂量 GKK2 组皆可较无 GKK2 组显著降低呼吸道阻力( $p < 0.05$ )。在 Hougee 等人[16]的研究中, 以 OVA 诱导过敏性气喘小鼠评估 6 株乳酸菌之抗过敏功效, 发现仅有 3 株乳酸菌能有效降低 methacholine 刺激所造成呼吸道阻力之增加, 显示非所有乳酸菌株具有改善呼吸道发炎、孔道狭窄之能力。过敏会造成巨噬细胞(macrophage)增加对抗过敏原, 进而引起严重的免疫反应。而文献指出, 嗜酸性球(eosinophils)为造成气喘问题的一个重要因素, 当呼吸道受过敏原刺激后, 呼吸道中嗜酸性球将增加黏液分泌与造成呼吸道水肿, 而引起支气管收缩, 最终容易导致气喘发作[17]。此外, 有文献认为, 嗜酸性球具有启动 Th2 细胞分泌相关免疫调节因子的作用, 造成过敏反应增加[18]。实验结果显示, 小鼠经 OVA 致敏后, 巨噬细胞及嗜酸性球皆明显增多( $p < 0.05$ ), OVA 导致小鼠呼吸道中巨噬细胞大量增加以对抗过敏原侵入; 嗜酸性球聚集使得呼吸道发炎且黏液增加, 最终诱发过敏性气喘。先前研究结果发现, 小鼠经 OVA 致敏诱发过敏性气喘后, 发现小鼠肺泡冲洗液中巨噬细胞及嗜酸性球数量明显增加, 显示此两者数量增加与 OVA 诱导过敏性气喘有关[16], 本实验结果与先前研究相符。若同时给予乳双歧杆菌 GKK2, 在高剂量 GKK2 组别上, 小鼠之巨噬细胞数量显著降低( $p < 0.05$ ); 在主要造成呼吸道发炎反应的嗜酸性球数量上, 在低高剂量 GKK2 组别皆有显著性降低( $p < 0.05$ )。此结果与小鼠之呼吸道阻力试验之结果相符, 因此可初步左证喂食乳双歧杆菌 GKK2 亦可改善呼吸道受阻力现象。

一般常见过敏性疾病如气喘、过敏性鼻炎、湿疹等, 皆属于第一型过敏反应, 第一型过敏反应主要以过敏抗体 IgE 分泌为主, IgE 会诱使肥大细胞(mast cell)活化进而释放致敏物质如组织胺、血小板活化



因子等,造成过敏症状产生[19]。Th2 细胞会分泌 B 细胞生长因子 IL-4,促进 B 细胞分泌过敏抗体 IgE, IgE 会同时抑制 IgG2a 分泌,使过敏反应加剧[20] [21]。实验结果发现,经 OVA 致敏后,小鼠体内 OVA-IgE 含量显著增加,然给予乳双歧杆菌 GKK2 小鼠组别,体内 OVA-IgE 产生量明显下降( $p < 0.05$ )。Ishida 等人[22]指出,经 OVA 致敏小鼠喂食乳酸菌发酵乳后,能降低小鼠体内 OVA-IgE 含量; Kim 等人[23]实验指出,给予乳酸菌 *Bifidobacterium lactis* AD011 及 *Lactobacillus acidophilus* AD031 皆能有效降低 OVA 致敏小鼠体内 OVA-IgE,本实验与以上文献有相同的结果。

当过敏原入侵时,免疫反应受到刺激使抗体含量皆有所提高,从结果可知致敏小鼠体内 IgE 及 IgG2a 相较于正常小鼠皆显著提升( $p < 0.05$ ),此为一正常生理反应,而 IgE 含量增加会促进 Th2 反应进行; IgG2a 增加则会驱使免疫反应偏向 Th1。在此实验中,致敏小鼠体内 IgE 含量较 IgG2a 含量高,使小鼠免疫反应趋向 Th2 过敏反应。经给予低高剂量 GKK2 之小鼠,皆显著提升 IgG2a 含量( $p < 0.05$ ),使反应趋向 Th1,以维持体内免疫平衡。而文献亦指出, IgG2a 能够抑制 IgE 结合至肥大细胞上,防止过敏原入侵时与附着在肥大细胞上的 IgE 结合而造成一系列过敏反应[24],因此 IgG2a 显著上升可有效缓解过敏问题。

研究指出, IFN- $\gamma$  能够活化巨噬细胞,以抵抗病原菌或病毒感染细胞[25],也具有抑制 Th2 细胞反应的作用[2],并刺激抗过敏抗体 IgG2a 分泌[26]。本次数据表明,小鼠经 OVA 诱导过敏性气喘后,其体内 IFN- $\gamma$  含量显著下降( $p < 0.05$ ),此因 OVA 致敏气喘后使体内免疫反应趋向 Th2 反应, Th2 细胞分泌之激素会抑制 Th1 生长分化,进而抑制 Th1 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,造成 IFN- $\gamma$  含量降低。当经 OVA 致敏小鼠同时给予乳双歧杆菌 GKK2,发现能显著提升小鼠体内 IFN- $\gamma$  含量( $p < 0.05$ ),显示此菌能高度刺激 IFN- $\gamma$  分泌,进而抑制 Th2 反应,使过敏指数 IgE 分泌降低。此外, Yoshida 等人[27]研究发现,给予 IFN- $\gamma$  能够改善以 OVA 诱导过敏性气喘之小鼠的呼吸道阻力增加问题,本实验低高剂量 GKK2 组别小鼠体内 IFN- $\gamma$  含量皆较 OVA 致敏组显著提升外( $p < 0.05$ ),在呼吸道阻力测试结果上,亦同时得到改善呼吸道阻力增加的结果。另结果发现低高剂量 GKK2 组之 IFN- $\gamma$  含量皆显著高于生理食盐水组( $p < 0.05$ ),推测因致敏小鼠体内的 IFN- $\gamma$  含量相较正常小鼠大幅下降,而原本正常小鼠中的 IFN- $\gamma$  含量不足以改善体内 Th2 过度反应, GKK2 在致敏小鼠上藉由刺激 IFN- $\gamma$  大量产生,以改善体内 Th1 及 Th2 失衡状态。

许多文献显示给予乳酸菌死菌,亦有调节免疫、改善过敏的功效。Ou 等[28]研究发现部分乳酸菌死菌能够增加 IFN- $\gamma$  含量,使体内免疫反应从 Th2 反应趋向 Th1 反应,进而舒缓过敏; Sashihara 等[29]研究则指出,给予 *L. gasseri* OLL2809 死菌后,小鼠体内 IgE 浓度降低,显示死菌能够调节过敏反应。本实验乳双歧杆菌 GKK2 菌数测定结果中约含有 25%之死菌( $9 \times 10^{10}$  cells/g),推测可能亦参与调节小鼠体内过敏反应。

## 5. 结论

小鼠经 OVA 诱发过敏性气喘后,同时给予乳双歧杆菌 GKK2,观察其是否能改善小鼠过敏性气喘。当实验以 methacholine 来刺激小鼠呼吸道时,评估小鼠呼吸道阻力的生理变化,从结果可知,给予乳双歧杆菌 GKK2,呼吸道阻力相较于气喘组有显著性降低( $p < 0.05$ ),此结果显示乳双歧杆菌 GKK2 对于呼吸道敏感反应有抑制作用,可减缓因 OVA 过敏原所引发的呼吸道压力,意即可改善气喘之压迫程度。在小鼠气管肺泡冲洗液分析上,给予乳双歧杆菌 GKK2,其肺部冲洗液中巨噬细胞(macrophage)数量在高剂量 GKK2 组显著降低( $p < 0.05$ ),改善过度免疫反应;嗜酸性球(eosinophils)的数量则在低高剂量 GKK2 组皆明显降低( $p < 0.05$ ),显示肺部的发炎反应及浸润现象有所改善。分析小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 及 IgG2a 抗体含量,发现给予乳双歧杆菌 GKK2,可有效降低 OVA-IgE 抗体( $p < 0.05$ )及提升抗过敏抗体 IgG2a 浓度( $p < 0.05$ ),减缓过敏发作及不适。在小鼠脾脏细胞分析中,结果发现喂食乳双歧杆菌 GKK2 的小鼠, IFN- $\gamma$  的表现量相较于气喘组明显增加( $p < 0.05$ ),舒缓过敏反应。

综合以上结果证实,乳双歧杆菌 GKK2 能够改善过敏性气喘所造成呼吸阻力,巨噬细胞(macrophage)及嗜酸性球(eosinophils)数量增加,同时降低特异性 IgE 浓度,提升特异性 IgG2a 及 IFN- $\gamma$  浓度,改善过敏性气喘所造成的呼吸道发炎情形及不适。

## 参考文献

- [1] Holgate, S.T. (1999) The Epidemic of Allergy and Asthma. *Nature*, **402**, B2-B4. <https://doi.org/10.1038/35037000>
- [2] Romagnani, S. (1999) Th1/Th2 Cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, **5**, 285-294. <https://doi.org/10.1097/00054725-199911000-00009>
- [3] Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. and Salminen, S. (2000) Probiotics in the Management of Atopic Eczema. *Clinical and Experimental Allergy*, **30**, 1604-1610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00943.x>
- [4] Myllyluoma, E., Ahlroos, T., Veijola, L., Rautelin, H., Tynkkynen, S. and Korpela, R. (2007) Effects of Anti-Helicobacter Pylori Treatment and Probiotic Supplementation on Intestinal Microbiota. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29**, 66-72.
- [5] Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., Rantala, I., Virtanen, E. and Arvilommi, H. (1993) *Lactobacillus casei* Strain GG Reverses Increased Intestinal Permeability Induced by Cow Milk in Suckling Rats. *Gastroenterology*, **105**, 1643-1650. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)91059-Q](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)91059-Q)
- [6] Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. (1998) Effect of a Probiotic Formula on Intestinal Immunoglobulin A Production in Healthy Children. *International Journal of Food Microbiology*, **42**, 39-44. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00056-7)
- [7] Lin, W.-H., Yu, B., Lin, C.-K., Hwang, W.-Z. and Tsen, H.-Y. (2007) Immune Effect of Heat-Killed Multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* Invasion to Mice. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 22-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03073.x>
- [8] Hisbergues, M., Magi, M., Rigaux, P., Steuve, J., Garcia, L., Goudercourt, D., Pot, B., Pestel, J. and Jacquet, A. (2007) *In Vivo* and *in Vitro* Immunomodulation of Der p 1 Allergen-Specific Response by *Lactobacillus plantarum* Bacteria. *Clinical & Experimental Allergy*, **37**, 1286-1295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02792.x>
- [9] Abbas, Z.G. and Swai, A.B. (1997) Evaluation of the Efficacy of Thiamine and Pyridoxine in the Treatment of Symptomatic Diabetic Peripheral Neuropathy. *East African Medical Journal*, **74**, 803-808.
- [10] Blümer, N., Sel, S., Virna, S., Patrascan, C.C., Zimmermann, S., Herz, U., Renz, H. and Garn, H. (2007) Perinatal Maternal Application of *Lactobacillus rhamnosus* GG Suppresses Allergic Airway Inflammation in Mouse Offspring. *Clinical & Experimental Allergy*, **37**, 348-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02671.x>
- [11] Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R.D., Steinhilber, S., Avagyan, A., Jaudszus, A., Ahrens, B., Groneberg, D.A., Wahn, U. and Hamelmann, E. (2007) Probiotic-Induced Suppression of Allergic Sensitization and Airway Inflammation Is Associated with an Increase of T Regulatory-Dependent Mechanisms in a Murine Model of Asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, **37**, 498-505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02629.x>
- [12] Pessi, T., Sütas, Y., Hurme, M. and Isolauri, E. (2000) Interleukin-10 Generation in Atopic Children Following Oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical & Experimental Allergy*, **30**, 1804-1808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00948.x>
- [13] Boyle, R.J. and Tang, M.L.K. (2006) The Role of Probiotics in the Management of Allergic Disease. *Clinical & Experimental Allergy*, **36**, 568-576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02472.x>
- [14] O'Hara, A.M. and Shanahan, F. (2007) Mechanisms of Action of Probiotics in Intestinal Diseases. *The Scientific World Journal*, **7**, 31-46. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.26>
- [15] Iacono, A., Raso, G.M., Canani, R.B., Calignano, A. and Meli, R. (2011) Probiotics as an Emerging Therapeutic Strategy to Treat NAFLD: Focus on Molecular and Biochemical Mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **22**, 699-711. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.002>
- [16] Hougee, S., Vriesema, A.J.M., Wijering, S.C., Knippels, L.M.J., Folkerts, G., Nijkamp, F.P., Knol, J. and Garssen, J. (2010) Oral Treatment with Probiotics Reduces Allergic Symptoms in Ovalbumin-Sensitized Mice: A Bacterial Strain Comparative Study. *International Archives of Allergy and Immunology*, **151**, 107-117. <https://doi.org/10.1159/000236000>
- [17] Wardlaw, A.J., Brightling, C., Green, R., Woltmann, G. and Pavord, I. (2000) Eosinophils in Asthma and Other Allergic Diseases. *British Medical Bulletin*, **56**, 985-1003. <https://doi.org/10.1258/0007142001903490>
- [18] MacKenzie, J.R., Mattes, J., Dent, L.A. and Foster, P.S. (2001) Eosinophils Promote Allergic Disease of the Lung by Regulating CD4<sup>+</sup> Th2 Lymphocyte Function. *The Journal of Immunology*, **167**, 3146-3155.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3146>
- [19] Gould, H.J. and Sutton, B.J. (2008) IgE in Allergy and Asthma Today. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 205-217. <https://doi.org/10.1038/nri2273>
- [20] Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A. and Paul, W.E. (1986) B Cell Stimulatory Factor-1 Enhances the IgE Response of Lipopolysaccharide-Activated B Cells. *The Journal of Immunology*, **136**, 4538-4541.
- [21] 戴志展. 抗敏合方对过敏性鼻炎临床疗效之研究[J]. 中医药年报, 2008, 26(1): 233-252.
- [22] Ishida, Y., Bandou, I., Kanzato, H. and Yamamoto, N. (2003) Decrease in Ovalbumin Specific IgE of Mice Serum after Oral Uptake of Lactic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 951-957. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.951>
- [23] Kim, J.Y., Choi, Y.O. and Ji, G.E. (2008) Effect of Oral Probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) Administration on Ovalbumin-Induced Food Allergy Mouse Model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 1393-1400.
- [24] Wai, C.Y.Y., Leung, N.Y.H., Leung, P.S.C. and Chu, K.H. (2016) T Cell Epitope Immunotherapy Ameliorates Allergic Responses in a Murine Model of Shrimp Allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, **46**, 491-503. <https://doi.org/10.1111/cea.12684>
- [25] Meydani, S.N. and Ha, W.K. (2000) Immunologic Effects of Yogurt. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 861-872. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.4.861>
- [26] Bossie, A. and Vitetta, E.S. (1991) IFN-Gamma Enhances Secretion of IgG2a from IgG2a-Committed LPS-Stimulated Murine B Cells: Implications for the Role of IFN-Gamma in Class Switching. *Cellular Immunology*, **135**, 95-104. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90257-C](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90257-C)
- [27] Yoshida, M., Leigh, R., Matsumoto, K., Wattie, J., Ellis, R., O'Byrne, P.M. and Inman, M.D. (2002) Effect of Interferon-Gamma on Allergic Airway Responses in Interferon-Gamma-Deficient Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **166**, 451-456. <https://doi.org/10.1164/rccm.200202-095OC>
- [28] Ou, C.C., Lin, S.L., Tsai, J.J. and Lin, M.Y. (2011) Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Enhance Immunomodulatory Potential by Skewing the Immune Response toward Th1 Polarization. *Journal of Food Science*, **76**, M260-M267. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02161.x>
- [29] Sashihara, T., Sueki, N. and Ikegami, S. (2006) An Analysis of the Effectiveness of Heat-Killed Lactic Acid Bacteria in Alleviating Allergic Diseases. *Journal of Dairy Science*, **89**, 2846-2855. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72557-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72557-7)

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjbm@hanspub.org](mailto:hjbm@hanspub.org)