

评估13种复合型益生菌在调节过敏中的有效性

林静雯¹, 蔡侑珊¹, 林诗伟¹, 吴文歆², 陈炎炼¹, 陈劲初^{3,4,5*}

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

²上海葡萄王企业有限公司, 上海

³台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

⁴实践大学食品营养与保健生技系, 台湾 台北

⁵中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

收稿日期: 2021年12月28日; 录用日期: 2022年3月18日; 发布日期: 2022年3月28日

摘要

本研究评估13种复合型益生菌在调节过敏方面的有效性。实验设计使用卵清蛋白(OVA)作为过敏原, 通过腹腔注射和呼吸喷雾使BALB/c小鼠(n = 6)致敏, 并评估三种不同剂量的复合益生菌对过敏的改善情况。结果表明, 复合益生菌补充剂以剂量依赖性方式显著降低了气道阻力。此外, 与OVA诱导组相比, 复合益生菌组的肺冲洗液中的炎症细胞因子IL-4、IL-5和PGE2也呈剂量依赖性降低。脾脏分析表明, 复合益生菌可以促进OVA特异性细胞因子和IL-2的分泌, 减少非特异性总免疫球蛋白E (IgE), 减少OVA特异性IgE的产生。综上所述, 13种复合益生菌表现出改善过敏反应的作用。

关键词

过敏反应, 白血球介素2, 免疫球蛋白 E, 卵白蛋白, 非特异性免疫, 特异性免疫

Evaluation of the Effectiveness of 13 Complex Probiotics in Regulating Allergies

Ching-Wen Lin¹, You-Shan Tsai¹, Shih-Wei Lin¹, Wen-Shin Wu², Yen-Lien Chen¹, Chin-Chu Chen^{3,4,5*}

¹Grape King Bio, Co., Ltd., Taoyuan Taiwan

²Shanghai Grape King Enterprise, Co., Ltd., Shanghai

³Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

*通讯作者。

文章引用: 林静雯, 蔡侑珊, 林诗伟, 吴文歆, 陈炎炼, 陈劲初. 评估 13 种复合型益生菌在调节过敏中的有效性[J]. 生物医学, 2022, 12(2): 85-96. DOI: 10.12677/hjbm.2022.122011

⁴Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan⁵Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan TaiwanReceived: Dec. 28th, 2021; accepted: Mar. 18th, 2022; published: Mar. 28th, 2022

Abstract

This study evaluated the effectiveness of 13 complex probiotics in regulating allergies. The experimental design uses ovalbumin (OVA) as the allergen to sensitize BALB/c mice (n = 6) by intraperitoneal injection and respiratory spray, and evaluate the improvement of allergies with three different doses of complex probiotics. The results showed that the airway resistance was significantly reduced by complex probiotics supplementation in a dose-dependent manner. In addition, the inflammatory cytokines IL-4, IL-5, and PGE2 from the lung flushing fluid were also dose-dependently decreased in the complex probiotics groups when compared to the OVA-induced group. Spleen analysis showed that the complex probiotics could promote the secretion of OVA-specific cytokines and IL-2, reduce non-specific total immunoglobulin E (IgE), and reduce OVA-specific IgE production. In summary, 13 kinds of complex probiotics showed the effect of improving allergic reactions.

Keywords

Hypersensitivity, Interleukin-2, Immunoglobulin E, Ovalbumin, Innate immunity, Adaptive Immunity

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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

Open Access

1. 引言

过敏(allergy)为人接触环境中的外来物质如: 尘螨、花粉、宠物毛屑、带壳海鲜或是坚果类等, 免疫系统辨认这些过敏原(allergen)后产生的过度的免疫反应, 例如皮肤反应出荨麻疹、呼吸道反应出气喘, 或消化系统反应出腹泻、胀气等现象[1]。过敏依据其反应时间与反应机制又可分为四型[2]。本篇讨论第一型过敏反应(Type I hypersensitivity)。

I 型过敏反应又称立即性过敏反应(immediate hypersensitivity reaction), 当过敏原第一次进入人体与抗原呈现细胞(antigen-presenting cell, APC)如: B 细胞(B cell)、巨噬细胞(macrophage)、树突细胞(dendritic cell)上的抗体结合后, 呈现给未成熟的初始 CD4⁺T 细胞(naive CD4⁺ T cell), 促使 naive CD4⁺ T cell 增殖并分化成辅助型 T 细胞 2 (Th2 cells) [3]。Th2 细胞则藉由分泌不同细胞激素(cytokines)去调控各种免疫反应, 像是介白素 4 (interleukin 4, IL-4)可刺激 B 细胞大量制造免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE), 分泌出的 IgE 与过敏原结合后, 会附着在肥大细胞(mast cell)表面的 Fcε 受体上。当相同的过敏原再度入侵人体, 过敏原和肥大细胞表面上的 IgE 结合, 会诱发肥大细胞释出发炎物质, 如组织胺(histamine)、白三烯素(leukotrienes)、与前列腺素(prostaglandins, PGE), 造成红肿、发痒等症状[4]。常见的过敏疾病有皮肤炎(dermatitis)、湿疹(eczema)、季节性鼻炎(allergic rhinitis)、药物过敏(drug allergy)、过敏性休克(anaphylaxis)、气喘(asthma)等[5]。

益生菌(probiotics)泛指对人体有益的菌, 常见为乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)或比菲德氏菌属

(*Bifidobacterium* spp.), 其有部分曾被证实可改善过敏体质。*Lactobacillus rhamnosus* GG 可促使 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ) 分泌增加, 使 Th2 辅助细胞被抑制, 减少过敏相关的 IL-4、IL-5 分泌量[6]。*Lactobacillus casei*Shirota 亦使 IL-5、IL-6、IgE 分泌减少, 具有改善季节性鼻炎的潜力[7]。另外, 研究发现 *Bifidobacterium longum* BB536 可藉由平衡 Th 辅助细胞, 像是增加血液中嗜酸性球(eosinophil)比例、抑制 IFN- γ 的减少等, 于临床中减少因季节性鼻炎引起的眼睛过敏现象[8]。

考虑抗原性的免疫反应, 不同的益生菌菌株其表面结构可能具有差异化, 当作为调节免疫时的佐剂时, 不同的表面结构与 APC 相互作用, 能诱发更为完善的免疫调控, 加强抗炎、抑制过敏的效果[9]。有研究指出, 复合型双歧杆菌(*B longum* BB536, *B infantis* M-63, *B breve* M-16V)的使用可以有效缓解间歇性哮喘症状, 具有抗炎与免疫调节作用, 并减少救援药物西替利嗪糖浆(Cetirizine)和沙丁胺醇(Salbutamol)喷雾剂的使用[10]。因此, 本研究目的为探讨 13 种包含乳酸杆菌属与比菲德氏菌属的复合益生菌对致敏小鼠(ovalbumin-induced mice, OVA-induced mice)相关免疫反应的影响。

2. 材料方法

2.1. 菌株来源

本试验使用的 13 种复合型益生菌菌种分别为 *Lactococcus lactis*、*Bifidobacterium lactis*、*Lactobacillus acidophilus*、*B. bifidum*、*L. casei*、*B. breve*、*L. johnsonii*、*L. plantarum*、*L. rhamnosus*、*L. reuteri*、*B. longum*、*L. fermentum*, 以及 *L. paracasei*。试验物皆由葡萄王生技股份有限公司(Grape King Bio Ltd., Taiwan)制备提供。制备方法为将益生菌培养于 MRS 培养基中, 37℃ 培养 16 小时后, 发酵液离心取菌泥, 与脱脂奶粉混合, 经冷冻干燥后取得益生菌粉末[11]。复合型益生菌粉末则由混和各菌株冻干粉末而得。

2.2. 试验动物

30 只 8 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠购至乐斯科生物科技股份有限公司(BioLASCO Taiwan Co. Ltd., Taiwan)。动物饲养于温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 相对湿度 $5\% \pm 15\%$, 12 小时的光暗周期。每笼饲养 3 只实验老鼠, 饲料给予 MFG (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan), 并以水瓶方式提供逆渗透水, 实验老鼠自由摄食。本试验根据动物照护及使用委员会(Institutional Animal Care & Use Committee, IACUC)同意, 取得 IACUC 编号 106-13h。

2.3. 实验分组与设计

试验分组共设置正常对照组(normal)、负对照组(negative ctrl)、低剂量组(probiotics-L)、中剂量组(probiotics-M)以及高剂量组(probiotics-H), 共 5 组, 每组各使用 6 只小鼠进行试验。益生菌剂量设计为 60 公斤成人每日摄取 2.25 g、4.50 g、9.0 g 作为低、中、高剂量, 以小鼠相对人体代谢系数 12.3 进行换算, 小鼠每日摄取量分别为 0.461 g/kg BW、0.923 g/kg BW 及 1.845 g/kg BW。益生菌以逆透水配置成水溶液, 依重量分别管喂投予上述剂量。除正常对照组外, 其余组别皆以 OVA 诱导过敏反应, 详述如下:

以 OVA 作为致敏反应过敏原, 使用磷酸盐缓冲剂(PBS)配置成 100 $\mu\text{g/mL}$ 及 300 $\mu\text{g/mL}$, 再以无菌过滤膜过滤后保存于 -20°C 。实验开始(第 0 周)采集小鼠血液后, 分别投予各小鼠逆渗透水或益生菌, 每天 1 次。将 OVA 无菌溶液与佐剂(adjuvant)氢氧化铝(aluminium hydroxide)等量混合, 每只小鼠以腹腔注射(intraperitoneal injection, IP) 0.2 ml 混合溶液于实验第 1、3、5 周进行诱导致敏(图 1)。第一、二次诱导剂量为 10 μg OVA/mouse, 第三次诱导剂量为 30 μg OVA/mouse。另外, 在进行第 2 次诱导时同时进行 2% OVA 呼吸道致敏(inhalation, IH)。在动物牺牲前两天, 连续两天施以 IH, 隔天检测肺功能指针 Penh (Enhanced Pause)。动物牺牲后, 秤其脾脏重量, 计算脾脏相对重量(1)。

$$\text{脾脏相对重量} = (\text{脾脏绝对重量} \div \text{体重}) \times 100\% \quad (1)$$

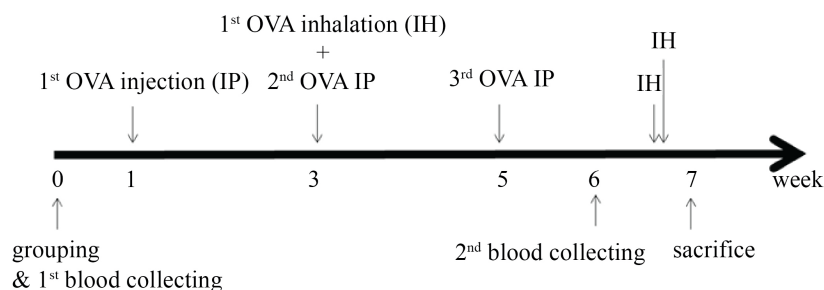


Figure 1. The experiment process of the allergy model in BALB/c female mice
图 1. BALB/c 雌性小鼠的致敏实验流程

2.4. 自然杀伤细胞毒杀活性分析

收集脾脏细胞(反应细胞, effector cell), 过 35 μm 筛网, 用 LIVE/DEAD[®]Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (Invitrogen)的荧光物质来侦测细胞毒杀反应。取 YAC-1 (目标细胞, target cell)加入荧光物质 DiOC18 于 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 40 分钟后, 以 HBSS (Creative Life Science Co., Ltd., Taiwan)洗去未标记的荧光物质, 并加入适量细胞培养基(含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养基)调整 YAC-1 细胞数量为 3×10^4 cells。将脾脏细胞与处理完的 YAC-1 细胞以 E:T ratio 100:1 和 200:1 的比例混合, 于 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行反应 4 小时后, 加入 PI 荧光染料染色 5 分钟, 以流式细胞仪分析。被 DiOC18 绿色荧光染上的 YAC-1 细胞中同时也表现了红色荧光, 代表被 NK 细胞进行毒杀的 YAC-1 细胞所占的百分比, 作为自然杀伤细胞的细胞毒杀活性依据。

2.5. 血液中颗粒球吞噬活性

血液样本以 Phagotest kit (Glycotape, Taiwan) 搭配流式细胞仪计算颗粒性白血球的荧光强度百分比做为颗粒球吞噬百分比(2)。

$$\text{吞噬活性}(\%) = 37^{\circ}\text{C 吞噬百分比(最大吞噬活性)} - 4^{\circ}\text{C 吞噬百分比(吞噬能力的背景值)} \quad (2)$$

2.6. 脾脏细胞的细胞激素测定

收集脾脏细胞, 过 35 μm 筛网(BD Falcon, America)后以 RBC lysis buffer (Creative Life Science Co., Ltd., Taiwan)处理, 于 24-well 中调整细胞数量为 3×10^6 cells/well。以 10%胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养基培养, 并分别加入最终浓度 3 $\mu\text{g/mL}$ Con A (非特异性免疫诱导)、100 $\mu\text{g/mL}$ OVA (特异性免疫诱导), 于 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 小时。细胞培养液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 1500 rpm 离心 5 分钟, 收取上清, 存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。以市售套组测定上清液中的 IL-2、IL-4、IL-5、或 IFN- γ 的含量, 操作参考原厂手册(DuoSet[®]ELISA Kits, R&D Systems, USA), 并于波长 450 nm 下以 ELISA reader 测定其吸光值。

2.7. 血清中抗体测定

于 96-well 中加入 2 μg OVA/well, 静置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱隔夜。利用 blocking buffer (含 1% bovine serum albumin, BSA)填满无 OVA 附着部分后, 加入 100 μL /well 待测稀释血清(sample)或空白对照组(blank) PBS 静置反应。再加入 100 μL /well 自 Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)购入的稀释 HRP conjugate goat anti-mouse IgG2a、IgG1、或 IgE 后, 静置反应。随后加入 100 μL /well TMB substrate (KPL), 室温下

缓缓摇动呈色，在波长 450 nm 条件下以 ELISA reader 测定吸光值，并以 ELISA unit (EU)表示(3)。并以前次试验中成功诱发免疫反应的较高 OVA 特异性 IgE 抗体效价的小鼠血清做为 positive serum。

ELISA unit (EU) = (OD sample – OD blank)/(OD positive serum – OD blank) (3)

2.8. 肺部呼吸道阻力测试

小鼠牺牲日前一天，以 Buxco 公司(Taiwan)的 Whole body plethysmography 测试系统，测量小鼠呼吸道阻力的变化。将老鼠放入测量压克力隔离区中适应 5 分钟，给予小鼠吸入 2 分钟气雾化的 PBS 或逐渐增高浓度的 Methacholine (6.25、12.5、25 及 50 mg/mL; Sigma, Taiwan)，再分别记录每次吸入完成后 3 分钟内平均呼吸道阻力值，其阻力变化由 Penh 值表示，数值越高代表呼吸阻力越大。

2.9. 肺部冲洗液中发炎激素测定

以 1 mL 含 2% FBS (Gibco, America)的 HBSS (Creative Life Science Co., Ltd., Taiwan)溶液冲洗小鼠气管，共冲洗 3 次。将 3 次的肺部冲洗液以 1,500 rpm，离心 5 分钟，并收集上清液保存于-20℃备用。上清液中 IL-4、IL-5 和 PGE₂ 的含量以 DuoSet® ELISA (R&D, America)套组并参考原厂手册测定。以 ELISA reader (Epoc, BioTek, Winooski, VT, America)与标准品浓度曲线计算样品中发炎激素的含量。

2.10. 统计分析

所有数据均以平均值±标准偏差(Mean ± SD)表示。各项检测结果利用统计软件 SPSS (SPSS 20)进行单因子变异数分析(One-way ANOVA)后以 Duncan's multiple range test 分析，当*p < 0.05 时表示组间具有显著性差异。

3. 结果

3.1. 动物体重、摄食量变化与脾脏重量

所有试验组的 BALB/c 小鼠在试验前后，其生长状况正常且无临床症状等异常状况，表示益生菌对于小鼠并无毒性或伤害。正常对照组、负对照组与 3 组剂量组的试验起始体重、结束体重、摄食量皆无显著差异(p > 0.05) (表 1)。脾脏相对重量显示，负对照组及 3 组剂量组的脾脏相对重量皆显著高于正常对照组(p < 0.001)。

Table 1. Weight change and average food intake
表 1. 体重变化与平均摄食量

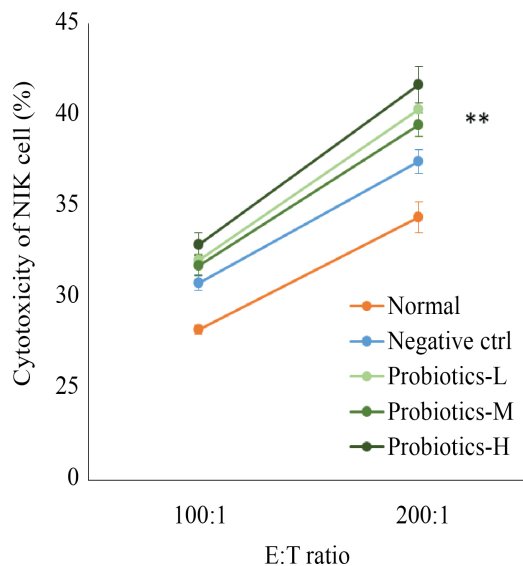
Group	Body weight (g)		Relative spleen weight (%)	Food intake (g/week)
	Initial	Final		
Normal	17.35 ± 0.20	19.75 ± 0.23	0.42 ± 0.01	2.93 ± 0.15
Negative control	17.20 ± 0.15	19.60 ± 0.25	0.55 ± 0.01***	2.78 ± 0.17
Probiotics-L	17.50 ± 0.15	19.46 ± 0.37	0.55 ± 0.02***	2.68 ± 0.11
Probiotics-M	17.17 ± 0.20	19.70 ± 0.21	0.53 ± 0.01***	2.70 ± 0.02
Probiotics-H	17.23 ± 0.19	19.48 ± 0.17	0.56 ± 0.02***	2.82 ± 0.06

与正常对照组相比，具有显著差异者以***p < 0.001 表示。

3.2. 自然杀手细胞活性与颗粒球吞噬活性比

随着 E:T ratio 的提高，脾脏自然杀手细胞毒杀活性差距越明显(图 2)。于负对照组相比，高剂量复合

型益生菌组的自然杀手细胞毒杀活性在 E:T ratio 200:1 下显著提高($p < 0.01$)。中剂量($p = 0.05$)与低剂量($p = 0.09$)组虽无统计上的差异,但与负对照组相比,其自然杀手细胞毒杀活性亦具有提高的趋势。说明本试验的 13 株复合益生菌的摄入,以中剂量以上具有提高脾脏自然杀手细胞的毒杀活性。

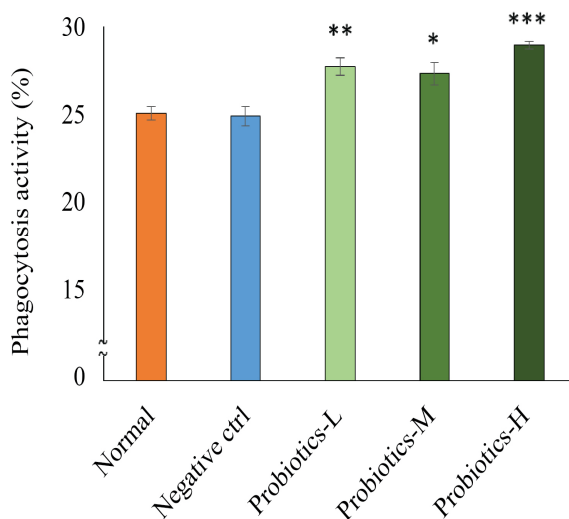


与负对照组相比,具有显著差异者以** $p < 0.01$ 表示。

Figure 2. Cytotoxicity of NK cell from spleen

图 2. 脾脏中自然杀手细胞毒杀活性

在血液中颗粒球吞噬活性方面,低、中、高剂量组于负对照组相比,其颗粒球吞噬活性皆显著提高(图 3)。说明本试验的 13 株复合益生菌的摄入,具有提高血液中颗粒球的吞噬活性。



与负对照组相比,具有显著差异者以* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 表示。

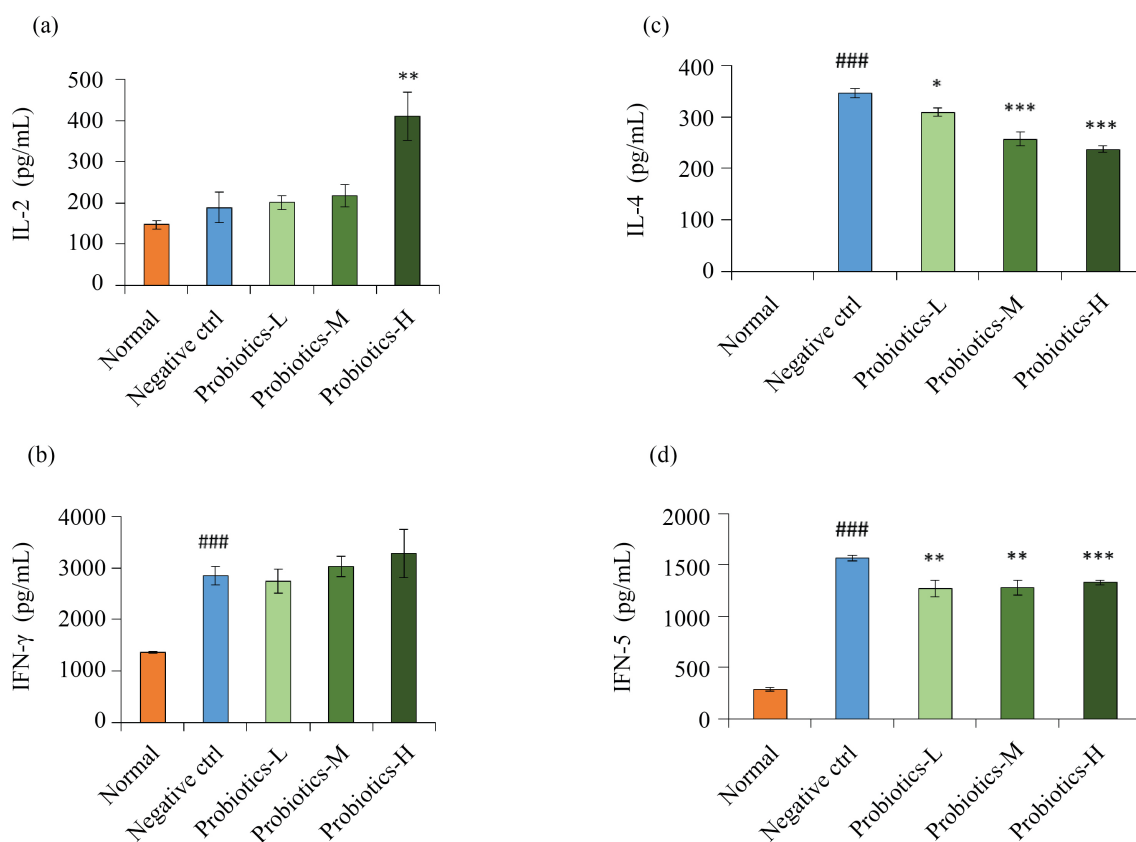
Figure 3. The phagocytosis activity of granulocyte in blood

图 3. 血液中颗粒球吞噬百分比

3.3. 非特异性免疫反应表现

IL-2 和 IFN- γ 为 Th1 细胞主要分泌的相关细胞激素。图 4(a) 的 Con A 诱导非特异性 IL-2 分泌, 除了高剂量复合菌组外, 其余组别与正常对照组相比皆不具有显著差异($p > 0.05$)。说明负对照组、低、中剂量复合菌组对于 Th1 细胞分泌 IL-2 的调控并无显著影响。图 4(b) 的 Con A 诱导非特异性 IFN- γ 分泌, 负对照组显著地高于正常组($p < 0.001$), 而不论低、中、高剂量组的复合益生菌皆与负对照组呈现不影响非特异性免疫调控的 Th1 细胞分泌 IFN- γ ($p > 0.05$)。

IL-4 和 IL-5 为 Th2 细胞主要分泌的相关细胞激素。负对照组在 Con A 诱导非特异性 IL-4 (图 4(c)) 与 IL-5 (图 4(d)) 分泌下, 皆显著高于正常对照组。说明本试验的致敏动物模式成功影响 Th2 细胞分泌过多而导致过敏现象。在复合菌益生菌介入下, 非特异性免疫反应引起的 IL-4 与 IL-5 分泌量与负对照组相比, 皆有显著性减少, 且呈现剂量效应(dose-dependent)。说明本试验的复合型益生菌于非特异性免疫调控上, 可透过减缓 Th2 细胞分泌量而达到舒缓过敏的现象。



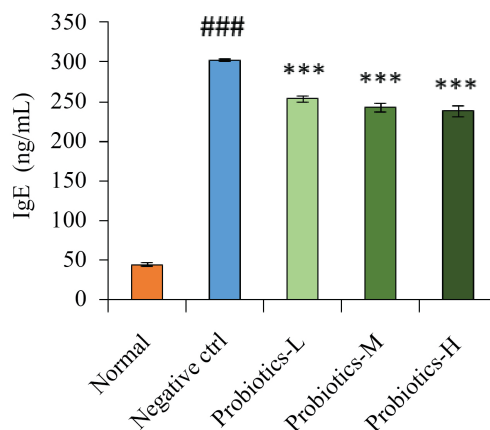
与负对照组相比, 具有显著差异者以* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比, 具显著差异者以### $p < 0.001$ 表示。

Figure 4. Non-specific immune-related cytokines expression: (a) IL-2; (b) IFN- γ ; (c) IL-4; (d) IL-5

图 4. 非特异性免疫相关细胞激素表现: (a) IL-2; (b) IFN- γ ; (c) IL-4; (d) IL-5

图 5 为血清中 IgE 抗体含量检测结果。负对照组的 IgE 含量显著高于正常对照组($p < 0.001$), 而复合型益生菌的组别, 其 IgE 含量与负对照组相比, 具有显著下降。说明在摄入复合型益生菌后, Th 辅助细胞的细胞激素分泌受调控, 亦使 B 细胞分泌较少的抗体 IgE, 进而减少 IgE 与过敏原的结合机会, 降低

过敏反应。

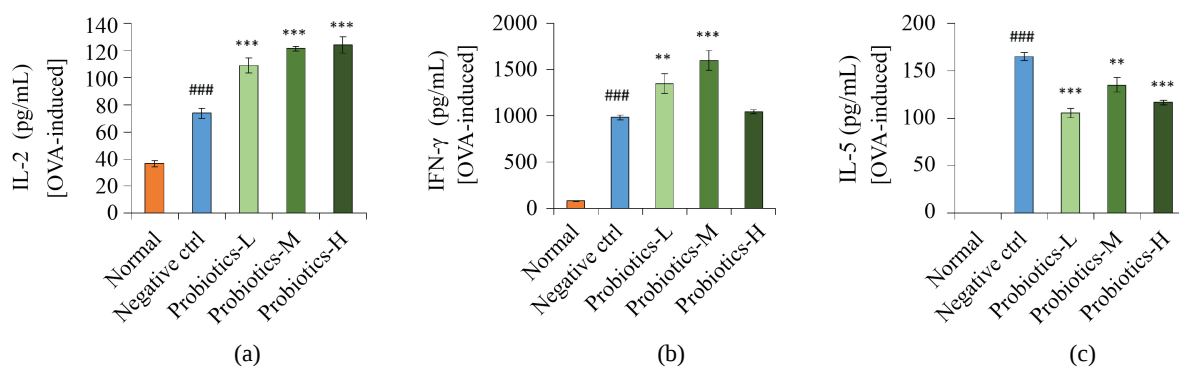


与负对照组相比,具有显著差异者以 $***p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比,具有显著差异者以 $###p < 0.001$ 表示。

Figure 5. Non-specific immune-related IgE expression
图 5. 非特异性免疫相关免疫球蛋白 IgE 表现

3.4. 特异性免疫反应表现

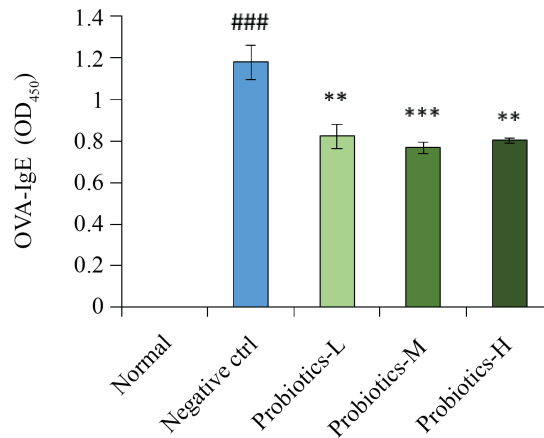
图 6 为特异性免疫反应的细胞激素含量。负对照组在特异性免疫反应上,与正常组相比,皆显著性刺激 Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ , 以及 Th1 细胞分泌 IL-5 ($p < 0.001$)。复合型益生菌组的介入后,不论是低、中、高剂量,与负对照组相比,皆可显著提升 IL-2 和 IFN- γ , 以及降低 IL-5 的分泌量。说明本试验的复合型益生菌在 OVA 引起的特异性免疫反应上,可藉由增加 Th1 细胞分泌以及减少 Th2 细胞分泌来平衡过敏机制的 Th2 细胞分泌过量的问题。



与负对照组相比,具有显著差异者以 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比,具有显著差异者以 $###p < 0.001$ 表示。

Figure 6. Specific immune-related cytokines expression: (a) IL-2; (b) IFN- γ ; (c) IL-5
图 6. 特异性免疫相关细胞激素表现: (a) IL-2; (b) IFN- γ ; (c) IL-5

特异性免疫反应的免疫球蛋白 OVA-IgE 含量表示于图 7。低、中、高剂量组的特异性免疫球蛋白 IgE, 皆较负对照组明显降低。说明复合型益生菌在特异性免疫反应上亦能降低 IgE 的产生, 减少过敏反应的发生。



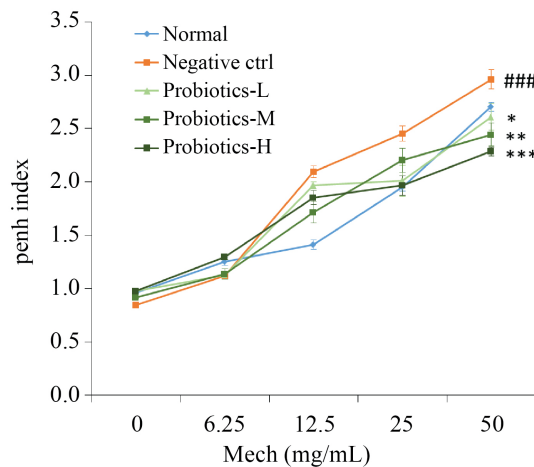
与负对照组相比,具有显著差异者以** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比,具有显著差异者以### $p < 0.001$ 表示。

Figure 7. Specific immune-related IgE expression

图 7. 特异性免疫相关免疫球蛋白 IgE 表现

3.5. 肺部呼吸道阻力

分别以 6.25、12.5、25、50 mg/mL 浓度的 Methacholine (Mech)刺激老鼠呼吸道,随着 Mech 刺激浓度的提高,老鼠的呼吸阻力越明显,结果显示于图 8。在 Mech 50 mg/mL 下,负对照组肺部呼吸道阻力(Penh ratio)显著高于正常对照组($p < 0.001$),而复合益生菌组的 Penh ratio 与负对照组相比,随着剂量的增加呈现显著减少的现象。说明本试验的复合型益生菌具有减缓过敏反应的呼吸阻力效果。



与负对照组相比,具有显著差异者以* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比,具有显著差异者以### $p < 0.001$ 表示。

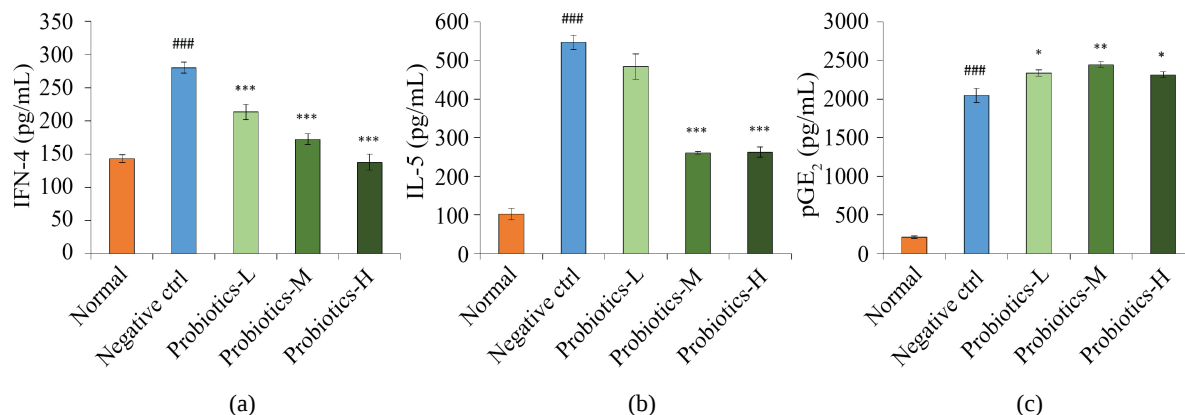
Figure 8. Airway resistance test

图 8. 呼吸道阻力测试

3.6. 肺部冲洗液中发炎激素

在肺部冲洗液的发炎因子分析中,负对照组的 IL-4、IL-5、PGE₂ 皆显著高于正常对照组($p < 0.001$),

表示肺部有明显的发炎现象(图 9)。低、中、高剂量的复合益生菌组与负对照组相比,发炎因子皆有下降的趋势。说明补充复合益生菌可减缓过敏引起的肺部发炎现象。其中以中剂量以上的剂量,其抑制发炎现象较为显著。



与负对照组相比,具有显著差异者以 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 表示。与正常对照组相比,具有显著差异者以 $###p < 0.001$ 表示。

Figure 9. Inflammatory cytokines in lung flushing fluid: (a) IL-4; (b) IL-5; (c) PGE₂

图 9. 肺部冲洗液中发炎激素: (a) IL-4; (b) IL-5; (c) PGE₂

4. 讨论

过敏是体内 Th1/Th2 失衡导致,有研究发现益生菌可以减缓过敏产生的发炎反应,增加 Th1 相关细胞因子 IFN- γ 、IL-2 浓度,并降低 Th2 相关细胞因子 IL-4、IL-5 浓度[12]。Kim 等人研究发现长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)有效降低 OVA 特异性 IgE 抗体浓度,改善 Th1 与 Th2 失衡状况,缓解小鼠过敏性鼻炎[13]。在本次数据表明,经 ConA 处理后,低、中与高剂量组的 Th1 细胞相关细胞激素 IL-2 与 IFN- γ 显著高于负对照组(图 4(a), 图 4(b)),且 Th2 细胞相关细胞激素 IL-4 与 IL-5 显著低于负对照组(图 4(c), 图 4(d))。三组剂量组的血清中总 IgE 抗体含量显著低于负对照组,代表给予益生菌,可以改善过敏反应 Th1 和 Th2 细胞失衡及血清中总 IgE 抗体异常增加的情形(图 5)。在特异性 OVA 处理后的免疫反应也呈类似的趋势(图 6, 图 7)。IFN- γ 能够活化巨噬细胞,以抵抗病原菌或病毒感染细胞[14],也具有抑制 Th2 细胞反应的作用[15],并刺激抗过敏抗体 IgG2a 分泌[16]。因此可推测本次试验的复合型益生菌组合,其可能机制为诱发的高度 Th1 细胞激素 IFN- γ 、IL-2 活性,进而抑制 Th2 相关抗体表现,驱使细胞从 Th1/Th2 失衡状态中导向平衡,达到减轻过敏反应的目的。

呼吸道高度反应(airway hyperresponsiveness, AHR)为气喘发生的重要因素,呼吸道受刺激后产生的收缩反应将影响呼吸道阻力变化[17]。文献指出,唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*) PM-A0006 能提高 IFN- γ 浓度,改善过敏原引起的 AHR [18]。本实验以 OVA 诱导过敏性哮喘,导致小鼠的呼吸道阻力增加,经由渐进浓度的非专一性支气管收缩剂 Methacholine 刺激下,在浓度为 50 Mech (mg/mL)时,呼吸道阻力反应相较于正常对照组呈现明显上升。而 3 组剂量组肺部呼吸道阻力皆显著低于负对照组,且随着试验物质剂量的增加,呼吸道阻力有因剂量增加而下降越多(图 8)。此外,在 Lin 等人的研究中发现喂食哮喘炎症模型小鼠副干酪乳酸菌(*Lactobacillus paracasei*),可以减缓肺部阻力,以及抑制发炎激素 IL-4、IL-5 等,有效降低诱发哮喘[19]。本次试验结果,益生菌组除了使肺部呼吸阻力降低外,同时也观察到肺部冲洗液中的发炎因子 IL-4、IL-5 降低(图 9),说明此结果与文献相符,13 种复合菌株可以舒缓过敏现象。

5. 结论

本试验藉由 OVA 诱发 BALB/c 小鼠过敏反应的动物模式评估喂食 13 种复合型益生菌对免疫调节的反应。结果显示, 复合型益生菌的摄入不仅能提升致敏小鼠的 NK 细胞毒杀活性, 以及颗粒球的吞噬能力, 在非特异性的免疫反应上, 复合型益生菌的摄入可抑制 Th2 细胞的相关细胞激素 IL-4 与 IL-5 分泌, 进一步地抑制过敏原诱发的总 IgE 抗体。另外, 在 OVA 特异性的免疫反应上, 复合型益生菌的摄入可促进 Th1 细胞的相关细胞激素 IL-2 与 IFN- γ 分泌, 同时也抑制 Th2 细胞的细胞激素 IL-4 与 IL-5 分泌, 进而也减少 OVA 专一性 IgE 抗体的生成。过敏反应过程中由 Th2 导向的过敏反应趋向平衡, 减缓过敏反应的症状。且经复合型益生菌介入的致敏老鼠, 其肺部呼吸阻力降低, 肺部相关的发炎因子 IL-4、IL-5、PEG2 也有显著下降。本试验证实 13 种复合型益生菌有助于调解过敏体质。

参考文献

- [1] Kay, A.B. (2001) Allergy and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*, **344**, 30-37. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440106>
- [2] Hopp, R.J. (2020) Hypersensitivity Reactions: An Everyday Occurrence in Pediatric Allergy Clinics. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*, **33**, 12-18. <https://doi.org/10.1089/ped.2019.1109>
- [3] Wang, B., Fujisawa, H., Zhuang, L., Freed, I., Howell, B.G., Shahid, S., Shivji, G.M., Mak, T.W. and Sauder, D.N. (2000) CD4⁺ Th1 and CD8⁺ Type 1 Cytotoxic T Cells Both Play a Crucial Role in the Full Development of Contact Hypersensitivity. *The Journal of Immunology*, **165**, 6783-6790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.6783>
- [4] Yamaguchi, M., Sayama, K., Yano, K., Lantz, C.S., Noben-Trauth, N., Ra, C., Costa, J.J. and Galli, S.J. (1999) IgE Enhances Fc Epsilon Receptor I Expression and IgE-Dependent Release of Histamine and Lipid Mediators from Human Umbilical Cord Blood-Derived Mast Cells: Synergistic Effect of IL-4 and IgE on Human Mast Cell Fc Epsilon Receptor I Expression and Mediator Release. *The Journal of Immunology*, **162**, 5455-5465.
- [5] Sampson, H.A., Muñoz-Furlong, A., Campbell, R.L., Adkinson, N.F., Bock, S.A., Branum, A., Brown, S.G., Camargo, C.A., Cydulka, R., Galli, S.J., Gidudu, J., Gruchalla, R.S., Harlor, A.D., Hepner, D.L., Lewis, L.M., Lieberman, P.L., Metcalfe, D.D., O'Connor, R., Muraro, A., Rudman, A., Schmitt, C., Scherrer, D., Simons, F.E., Thomas, S., Wood, J.P. and Decker, W.W. (2006) Second Symposium on the Definition and Management of Anaphylaxis: Summary Report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **117**, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1303>
- [6] Spacova, I., Petrova, M.I., Fremau, A., Pollaris, L., Vanoirbeek, J., Ceuppens, J.L., Seys, S. and Lebeer, S. (2019) Intranasal Administration of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Prevents Birch Pollen-Induced Allergic Asthma in a Murine Model. *Allergy*, **74**, 100-110. <https://doi.org/10.1111/all.13502>
- [7] Ivory, K., Chambers, S.J., Pin, C., Prieto, E., Arqués, J.L. and Nicoletti, C. (2008) Oral Delivery of *Lactobacillus casei* Shirota Modifies Allergen-Induced Immune Responses in Allergic Rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*, **38**, 1282-1289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03025.x>
- [8] Xiao, J.Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Miyaji, K., Enomoto, K., Sakoda, T., Iwatsuki, K. and Enomoto, T. (2007) Clinical Efficacy of Probiotic *Bifidobacterium longum* for the Treatment of Symptoms of Japanese Cedar Pollen Allergy in Subjects Evaluated in an Environmental Exposure Unit. *Allergology International*, **56**, 67-75. <https://doi.org/10.2332/allergolint.O-06-455>
- [9] Morandi, B., Agazzi, A., D'Agostino, A., Antonini, F., Costa, G., Sabatini, F., Ferlazzo, G. and Melioli, G. (2011) A Mixture of Bacterial Mechanical Lysates Is More Efficient than Single Strain Lysate and of Bacterial-Derived Soluble Products for the Induction of an Activating Phenotype in Human Dendritic Cells. *Immunology Letters*, **138**, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.03.006>
- [10] Del Giudice, M.M., Indolfi, C., Capasso, M., Maiello, N., Decimo, F. and Ciprandi, G. (2017) *Bifidobacterium* Mixture (*B longum* BB536, *B infantis* M-63, *B breve* M-16V) Treatment in Children with Seasonal Allergic Rhinitis and Intermittent Asthma. *Italian Journal of Pediatrics*, **43**, Article No. 25. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0340-5>
- [11] Lin, S.W., Shu, J.R., Chang, W.T., Wang, C.S., Zhao, C., Chen, Y.L., Hsu, C.L. and Chen, C.C. (2017) Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 on Obesity in High-Fat Diet-Induced Rats. *Hans Journal of Food and Nutrition Science*, **6**, 85-95.
- [12] Wang, W., Luo, X., Zhang, Q., He, X., Zhang, Z. and Wang, X. (2020) *Bifidobacterium infantis* Relieves Allergic Asthma in Mice by Regulating Th1/Th2. *Medical Science Monitor*, **6**, e920583. <https://doi.org/10.12659/MSM.920583>
- [13] Kim, W.G., Kang, G.D., Kim, H.I., Han, M.J. and Kim, D.H. (2019) *Bifidobacterium longum* IM55 and *Lactobacillus*

- plantarum* IM76 Alleviate Allergic Rhinitis in Mice by Restoring Th2/Treg Imbalance and Gut Microbiota Disturbance. *Beneficial Microbes*, **10**, 55-67. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0146>
- [14] 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>
- [15] Romagnani, S. (1999) Th1/Th2 Cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, **5**, 285-294. <https://doi.org/10.1097/00054725-199911000-00009>
- [16] Bossie, A. and Vitetta, E.S. (1991) IFN- γ 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)
- [17] Lauzon A.M. and Martin J.G. (2016) Airway Hyperresponsiveness; Smooth Muscle as the Principal Actor. *F1000Research*, **5**, 9 p. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7422.1>
- [18] Li, C.Y., Lin, H.C., Hsueh, K.C., Wu, S.F. and Fang, S.H. (2010) Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* Inhibits the Allergic Airway Response in Mice. *Canadian Journal of Microbiology*, **56**, 373-379. <https://doi.org/10.1139/w10-024>
- [19] Lin, C.H., Tseng, C.Y. and Chao, M.W. (2020) Administration of *Lactobacillus paracasei* HB89 Mitigates PM_{2.5}-Induced Enhancement of Inflammation and Allergic Airway Response in Murine Asthma Model. *PLoS ONE*, **15**, e0243062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243062>