

鼠李糖乳杆菌GKLC1减少香烟烟雾引起的过敏性炎症

石仰慈¹, 蔡侑珊¹, 林诗伟¹, 林静敏², 陈炎炼¹, 林文鑫³, 陈劲初^{4,5,6*}

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中国医药大学药系, 台湾 台中

⁴台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

⁵实践大学食品营养与保健生技系, 台湾 台北

⁶中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

收稿日期: 2024年7月4日; 录用日期: 2024年10月22日; 发布日期: 2024年10月30日

摘要

香烟烟雾(cigarette smoke, CS)中含有多种有害物刺激物, 容易经呼吸道吸入引起过敏性炎症反应, 特别是对已具过敏体质者。本研究评估鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)菌株GKLC1对降低香烟烟雾引起之过敏性炎症反应的效果。实验采用7周龄之Balb/c雄性小鼠随机分成过敏对照组(OVA + CS)与菌株GKLC1组(GKLC1), 每组6只。所有试验小鼠于试验第0、12天进行腹腔注射卵白蛋白抗原(Ovalbumin, OVA, 500 ug/ml), 并于试验第17日至23日以2% OVA进行喷雾致敏, 诱发过敏体质。试验第24日至54日, 小鼠每日暴露10分钟之香烟烟雾加剧过敏性炎症反应。比较过敏性小鼠于CS刺激期间每日补充菌株GKLC1 (4.5 mg/day)与否, 对于体内发炎相关指标之影响。结果发现, 菌株GKLC1组之小鼠血清中内毒素显著低于过敏对照组($p < 0.001$), 且肝脏中的细胞激素IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5分泌量皆显著减少, 显示菌株GKLC1补充有助于降低香烟烟雾引起之过敏性发炎反应。

关键词

益生菌, 过敏, 香烟烟雾, 内毒素, 细胞因子, 发炎

Lactobacillus rhamnosus GKLC1 Reduced Allergic Inflammation Induced by Cigarette Smoke

Yangtzu Shih¹, Youshan Tsai¹, Shihwen Lin¹, Jingmin Lin², Yenlien Chen¹, Wenhsin Lin³, Chinchu Chen^{4,5,6*}

*通讯作者。

文章引用: 石仰慈, 蔡侑珊, 林诗伟, 林静敏, 陈炎炼, 林文鑫, 陈劲初. 鼠李糖乳杆菌 GKLC1 减少香烟烟雾引起的过敏性炎症[J]. 生物医学, 2024, 14(4): 666-672. DOI: 10.12677/hjbm.2024.144073

¹Grape King Bio Co., Ltd., Taoyuan Taiwan²Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai³Department of Medicine, China Medical University, Taichung Taiwan⁴Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan⁵Department of Food Science, Nutrition and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan⁶Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan TaiwanReceived: Jul. 4th, 2024; accepted: Oct. 22nd, 2024; published: Oct. 30th, 2024

Abstract

Cigarette smoke (CS) contains various harmful irritants, which can easily be inhaled through the respiratory tract, causing allergic inflammatory reactions, especially in individuals with pre-existing allergic conditions. This study assessed the effectiveness of the *Lactobacillus rhamnosus* strain GKLC1 in reducing allergic inflammatory reactions caused by CS. Male Balb/c mice at 7 weeks of age were randomly divided into an allergic control group (OVA + CS) and a GKLC1 strain group (GKLC1), with 6 mice in each group. All experimental mice were intraperitoneally injected with ovalbumin antigen (OVA, 500 ug/ml) on days 0 and 12, and sensitized with 2% OVA inhalation from days 17 to 23 to induce allergic predisposition. From day 24 to day 54 of the experiment, mice were exposed to CS for 10 minutes daily to exacerbate allergic inflammatory reactions. The impact of daily supplementation of the strain GKLC1 (4.5 mg/day) on inflammatory markers in allergic mice during CS stimulation was compared. The results showed that the serum endotoxin levels in the GKLC1 group were significantly lower than those in the allergic control group ($p < 0.001$). Additionally, the secretion of cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-5 in the liver was significantly reduced in the GKLC1 group, indicating that supplementation with the strain GKLC1 contributed to reducing allergic inflammatory reactions caused by cigarette smoke.

Keywords

Probiotics, Allergy, Cigarette Smoke, Endotoxin, Cytokines, Inflammation

Copyright © 2024 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

香烟烟雾(cigarette smoke, CS)中的有害物刺激物已成为当代公共卫生的一个重要议题, 其对呼吸道产生的危害引起了广泛的关注[1]。这种烟雾中包含的多种有害物质, 如尼古丁(nicotine)、一氧化碳(carbon monoxide)、焦油(tar)等, 易于通过呼吸道进入人体, 并导致不同程度的健康问题, 尤其对那些已经具有过敏体质的人更为严重[2] [3]。长期刺激下可加剧过敏反应并伴随肺部发炎, 包括气喘(asthma)、慢性支气管炎(chronic bronchitis), 甚至是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease) [4] [5]。

过敏性炎症(allergic inflammation)是一种免疫系统的异常反应, 当接受外来刺激物如前述香烟烟雾等时, 因第一型辅助型 T 细胞(Th1)与第二型辅助型 T 细胞(Th2)分泌的细胞因子(cytokines)失衡, 影响身体免疫细胞对于讯息产生过度反应[6]。这些过量的细胞因子, 也是炎症因子, 会造成身体慢性的发炎反应, 长久负面影响身体多处器官、循环系统等[7]。有关如何有效降低香烟烟雾诱发的过敏性炎症反应的研究

仍相对有限。因此本试验以香烟烟雾为影响因子，加剧过敏体质者之过敏性炎症症状，并了解免疫系统对烟雾中有害物质的反应，以及介入性方法(如本研究使用的鼠李糖乳杆菌 GKLC1)对于缓解炎症反应的影响，有助于深入了解过敏性炎症的机制和发展相应的治疗策略。

2. 材料与方法

2.1. 菌株来源与制备

鼠李糖乳杆菌 GKLC1 (*Lactobacillus rhamnosus* GKLC1)自台湾妇女所捐赠的母乳检体中分离而得，经 16S rRNA 鉴定，并寄存于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)，寄存编号 CGMCC 15202。实验菌株 GKLC1 培养于 1 L 之 MRS (BD Difco, USA) 培养基中，经 37℃，16 小时培养后，以 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R, Germany)，室温离心 10 分钟取得菌泥，混入 20%脱脂奶粉后冷冻干燥获得活菌菌粉，保存于-20℃备用。

2.2. 试验动物与分组

5 周龄雄性 Balb/c 小鼠购自台湾地区实验动物中心(Laboratory Animal Center, NLAC)。动物饲养于中国医药大学动物中心之独立通气饲育盒(individual ventilated cage)中，室温 22℃ ± 2℃，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，进行随机分组，分为过敏对照组(OVA + CS)与益生菌 GKLC1 组(GKLC1)，每组 6 只。

2.3. 试验设计

试验小鼠皆于试验第 0 天及第 12 天以腹腔注射(intraperitoneal injection)卵白蛋白抗原(ovalbumin, OVA)进行全身性致敏，并于试验第 17 天至第 23 天以喷雾吸入(inhalation) 2% OVA 过敏原的方式进行局部性致敏。试验第 24 天起，每日使小鼠暴露于香烟烟雾(cigarette smoke, CS)下 10 分钟，连续 30 天，加重小鼠过敏性炎症反应(图 1)。制备注射用之 OVA 为先将 500 µg/mL OVA 与不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant)以 1:1 混合均匀后，经无菌过滤膜除菌后立即使用。

试验第 24 天至第 54 天，益生菌 GKLC1 组之小鼠每日管喂 4.5 mg 活菌 GKLC1 菌粉，相当 60 kg 成人每日摄取约 1 g；对照组之小鼠则以管喂等量之生理食盐水作为对照。试验结束后，所有小鼠皆进行牺牲采血，并收集肝脏小叶。

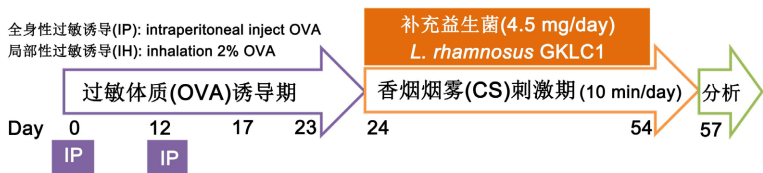


Figure 1. Animal model of allergic inflammation induced by ovalbumin antigen (OVA) and cigarette smoke (CS) in mice
图 1. 卵白蛋白抗原(OVA)及香烟烟雾(CS)诱导小鼠过敏性炎症之动物模型

2.4. 血液内毒素分析

以市售内毒素检测试剂(GeneScript, Piscataway, New Jersey, USA)，利用 LAL (Limulus Amebocyte Lysate)呈色检验法，分析血液中内毒素含量。取 0.1 mL 血清加入 0.1 mL 鲎试剂(LAL)，于 37℃下反应 45 分钟后，以分光光度计检测波长 545 nm 下之吸亮度。内毒素浓度以大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的内

毒素为标准品对照。

2.5. 肝脏组织之细胞激素及肝脏酵素活性分析

取小鼠肝脏 0.3 g 以 HEPES buffer 均质后，以 3000 ×g、4℃下离心 10 分钟，取上清液以市售生化分析套组及 ELISA 方法，依据厂商操作说明，分析干扰素-γ (interferon-γ, IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白介素-5 (interleukin-5, IL-5)含量，以及天门冬胺酸胺基转移酶(aspartate transaminase, AST)、麸丙转胺酶(alanine aminotransferase, ALT)活性。上述细胞激素 ELISA Kit 购自 eBioscience (San Diego, CA, USA)。

2.6. 生物统计分析

实验结果以平均值 ± 标准偏差(mean ± SD)表示，以 Student's *t* test 进行统计分析，比较对照组与益生菌 GKLC1 组之组间差异，显著性差异之判断标准为 $p < 0.05$ 。

3. 结果

3.1. 小鼠体重变化

试验期间，各组小鼠之体重变化如表 1 所示。两组体重并无显著差异，亦无观察到个体的不良反应，说明益生菌 GKLC1 对于受试动物无负面影响。

Table 1. Change of body weight (g)
表 1. 体重变化(公克)

试验天数	第 0 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天	第 56 天
过敏对照组(OVA + CS)	26.4 ± 1.7	28.2 ± 2.2	28.2 ± 1.5	29.2 ± 1.7	30.2 ± 1.4
GKLC1 组	27.1 ± 0.7	29.3 ± 0.6	29.8 ± 0.8	30.2 ± 0.7	30.7 ± 1.1
<i>p</i> value	0.4283	0.3307	0.0646	0.2538	0.5663

3.2. 血液内毒素含量

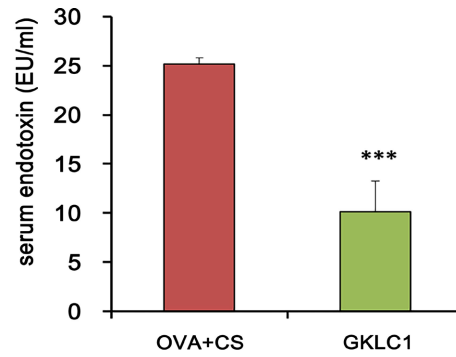
益生菌 GKLC1 组的小鼠血清中内毒素含量显著低于过敏对照组($p < 0.001$)，说明在相同的过敏刺激物环境下，益生菌 GKLC1 的补充有助于增进身体之抵抗的能力，减少内毒素通过血管、扩散至全身引起相关炎症的机率(图 2)。

3.3. 肝脏组织之细胞激素

分析小鼠肝脏中与 Th1 细胞分泌相关的细胞激素，益生菌 GKLC1 组之 IFN-γ (图 3(a))及 TNF-α (图 3(b))含量皆显著低于过敏对照组($p < 0.01$)，说明益生菌 GKLC1 的摄入可降低肝脏中 Th1 细胞的活性。另外，与 Th2 细胞分泌相关的细胞激素 IL-4 (图 4(a))、IL-5 (图 4(b))，亦以益生菌 GKLC1 组显著低于过敏对照组($p < 0.001$, $p < 0.01$)，意即显示菌株 GKLC1 具抑制过敏环境下引起之 Th2 细胞的潜力。

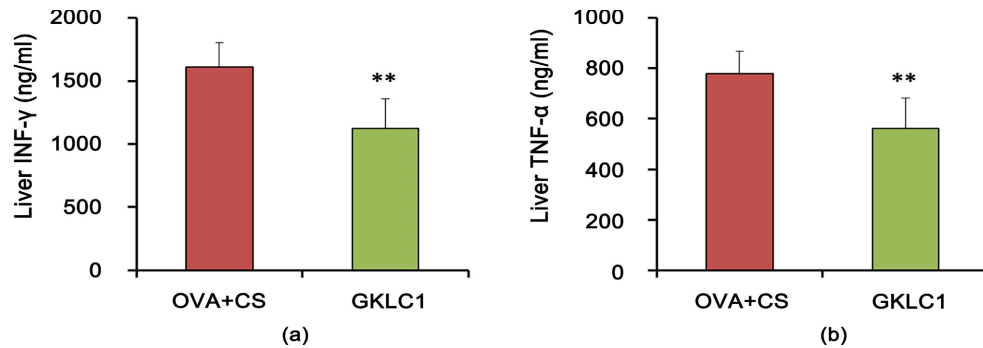
3.4. 肝脏酵素活性差异

肝指针 AST 及 ALT 表示肝功能外，亦显示肝发炎的程度。益生菌 GKLC1 组之小鼠肝指标皆显著低于过敏对照组(图 5)，说明菌株 GKLC1 补充有助于降低过敏引起之发炎反应。



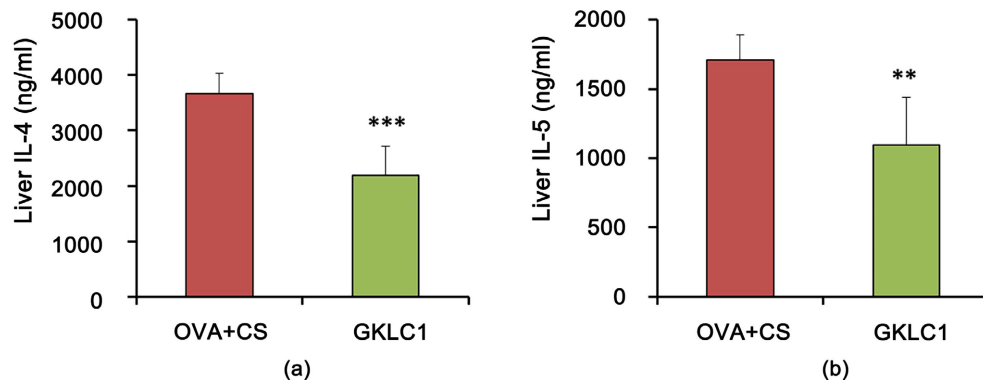
数值均以 mean $\pm$ SD (n = 6)表示, 星号表示统计上显著差异(** $p < 0.001$)。

Figure 2. Level of serum endotoxin
图 2. 血清中内毒素含量



数值均以 mean $\pm$ SD (n = 6)表示, 星号表示统计上显著差异(** $p < 0.01$)。

Figure 3. The level of IFN- γ (a) and TNF- α (b) in liver
图 3. 肝脏中 IFN- γ (a)及 TNF- α (b)之浓度

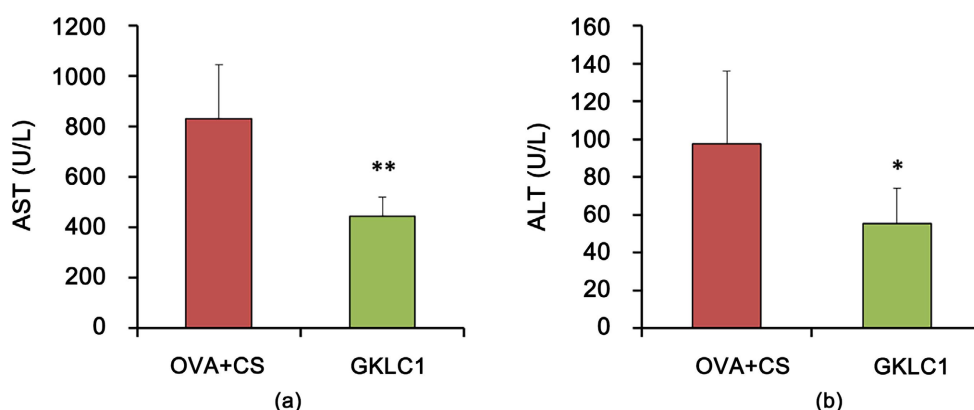


数值均以 mean $\pm$ SD (n = 6)表示, 星号表示统计上显著差异(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

Figure 4. The level of IL-4 (a) and IL-5 (b) in liver
图 4. 肝脏中 IL-4 (a)及 IL-5 (b)之浓度

4. 讨论

Srutkova 等人的研究指出, 鼠李糖乳杆菌分泌的胞外多糖可帮助调节 Th2 细胞激素反应并改善 OVA 致敏小鼠的过敏性发炎症状[8]。这一结果显示, 益生菌可以通过调节免疫系统来减轻过敏反应。同样,



数值均以 mean $\pm$ SD (n = 6)表示, 星号表示统计上显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

Figure 5. The active concentration of AST (a) and ALT (b) in liver

图 5. 肝脏酵素 AST (a)及 ALT (b)活性浓度

Hou 等人亦通过细胞实验及 OVA 致敏小鼠动物实验模式证实, 鼠李糖乳杆菌可通过下调 STAT6/SPDEF 通路来改善黏液分泌并缓解呼吸道发炎症状[9], 显示益生菌的补充可作为过敏性发炎反应的有效治疗方法。本研究实证, 利用 OVA 及香烟烟雾可诱导小鼠产生严重的过敏性炎症, 影响呼吸道屏障, 导致循环系统中的内毒素增高(图 2)、并引起相关脏器中的发炎反应(图 3、图 4)。且鼠李糖乳杆菌 GKLC1 的介入可有效降低上述炎症反应, 达到减敏、抗发炎的调节效果。这与 Srutkova 和 Hou 的研究一致, 进一步支持了益生菌在减轻过敏性炎症中的重要作用。

在肝脏酵素活性的分析指标中, 以 AST 为大量存在于肝脏细胞中的酵素, 当细胞发炎或坏死时, AST 会自细胞中被释放至血液, 临床上因此可应用于肝脏功能的诊断[10]。本次试验中, 补充菌株 GKLC1 皆可有效降低肝脏中因过敏炎症引起的高浓度 AST 或 ALT 的现象(图 5)。参考过去菌株 GKLC1 的功效性研究, 该菌株在酒精性脂肪肝的动物模式下, 有肝脏保护的功効, 与本次试验结果中的护肝指标结果符合[11], 显示出菌株 GKLC1 在多种炎症情况下的脏器保护作用。更进一步地推论, 在过敏体质下, 菌株 GKLC1 可透过降低过敏引起的炎症因子达到减缓过敏症状、减少内毒素进入循环系统, 降低对于肝脏等器官的伤害[12] [13]。

本研究以鼠李糖乳杆菌 GKLC1 介入应用于减缓烟雾所加剧的过敏性炎症反应。结果显示, 益生菌的补充, 特别是鼠李糖乳杆菌 GKLC1, 具有潜在的临床应用价值, 尤其在治疗过敏性炎症反应和保护肝脏功能方面。这为未来的临床研究提供了有力的理论支持和研究基础。

参考文献

- [1] Wills, T.A., Soneji, S.S., Choi, K., Jaspers, I. and Tam, E.K. (2020) E-Cigarette Use and Respiratory Disorders: An Integrative Review of Converging Evidence from Epidemiological and Laboratory Studies. *European Respiratory Journal*, **57**, Article 1901815. <https://doi.org/10.1183/13993003.01815-2019>
- [2] Soleimani, F., Dobaradaran, S., De-la-Torre, G.E., Schmidt, T.C. and Saeedi, R. (2022) Content of Toxic Components of Cigarette Smoke vs Cigarette Butts: A Comprehensive Systematic Review. *Science of the Total Environment*, **813**, Article 152667. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152667>
- [3] Ueha, R., Ueha, S., Kondo, K., Nishijima, H. and Yamasoba, T. (2020) Effects of Cigarette Smoke on the Nasal Respiratory and Olfactory Mucosa in Allergic Rhinitis Mice. *Frontiers in Neuroscience*, **14**, Article 126. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00126>
- [4] Bircan, E., Bezirhan, U., Porter, A., Fagan, P. and Orloff, M. (2021) Electronic Cigarette Use and Its Association with Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma-COPD Overlap Syndrome among Never Cigarette Smokers. *Tobacco Induced Diseases*, **19**, 1-10. <https://doi.org/10.18332/tid/142579>

-
- [5] Crotty Alexander, L.E., Drummond, C.A., Hepokoski, M., Mathew, D., Moshensky, A., Willeford, A., *et al.* (2018) Chronic Inhalation of E-Cigarette Vapor Containing Nicotine Disrupts Airway Barrier Function and Induces Systemic Inflammation and Multiorgan Fibrosis in Mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **314**, R834-R847. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00270.2017>
- [6] Hirose, K., Iwata, A., Tamachi, T. and Nakajima, H. (2017) Allergic Airway Inflammation: Key Players Beyond the Th2 Cell Pathway. *Immunological Reviews*, **278**, 145-161. <https://doi.org/10.1111/imr.12540>
- [7] Al-Harbi, N.O., Nadeem, A., Al-Harbi, M.M., Ansari, M.A., AlSharari, S.D., Bahashwan, S.A., *et al.* (2016) Airway Oxidative Stress Causes Vascular and Hepatic Inflammation via Upregulation of IL-17A in a Murine Model of Allergic Asthma. *International Immunopharmacology*, **34**, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.003>
- [8] Srutkova, D., Kozakova, H., Novotna, T., Gorska, S., Hermanova, P.P., Hudcovic, T., *et al.* (2023) Exopolysaccharide from *Lactocaseibacillus rhamnosus* Induces IgA Production in Airways and Alleviates Allergic Airway Inflammation in Mouse Model. *European Journal of Immunology*, **53**, Article 2250135. <https://doi.org/10.1002/eji.202250135>
- [9] Hou, Y., Zheng, S., Zou, F., Wang, D., Da, H., Zhou, Y., *et al.* (2023) *Lactobacillus rhamnosus* 76 Alleviates Airway Inflammation in Ovalbumin-Allergic Mice and Improves Mucus Secretion by Down-Regulating STAT6/SPDEF Pathway. *Immunobiology*, **228**, Article 152712. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152712>
- [10] Wannamethee, S.G. and Shaper, A.G. (2010) Cigarette Smoking and Serum Liver Enzymes: The Role of Alcohol and Inflammation. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, **47**, 321-326. <https://doi.org/10.1258/acb.2010.009303>
- [11] Tsai, Y., Lin, S., Chen, Y. and Chen, C. (2020) Effect of Probiotics *Lactobacillus paracasei* GKS6, *L. plantarum* GKM3, and *L. rhamnosus* GKLC1 on Alleviating Alcohol-Induced Alcoholic Liver Disease in a Mouse Model. *Nutrition Research and Practice*, **14**, 299-308. <https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.4.299>
- [12] Garth, J., Barnes, J.W. and Krick, S. (2018) Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article 3402. <https://doi.org/10.3390/ijms19113402>
- [13] Paternoster, G. (2023) Strategies to Reduce Endotoxin Activity. In: De Rosa, S. and Villa, G., Eds., *Endotoxin Induced-Shock: A Multidisciplinary Approach in Critical Care*, Springer International Publishing, 117-125. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18591-5_13