

文章编号 :1009-038X(2000)04-0319-03

# 小鼠口服两歧双歧杆菌的免疫应答

张灏, 孙震, 承拥军

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:** 机体在大剂量、长时间摄取两歧双歧杆菌后才能在其血清中检出特异性抗体, 而非正常寄居菌——沙门氏菌经口摄取后, 机体在很短时间内就产生较高水平的特异性抗体, 并维持较长的时间。进一步的研究表明, 在体外诱导脾细胞产生免疫应答的细胞数量上, 双歧杆菌的数量是沙门氏菌的 20 倍。由此推论, 两歧双歧杆菌经口服后具有较弱的免疫原性。

**关键词:** 两歧双歧杆菌; 免疫应答; 口服

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

## Immunogenicity of *Bifidobacterium bifidum*

ZHANG Hao, SUN Zhen, CHENG Yong-jun

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** After the oral administration of a large amount of *Bifidobacterium bifidum* for a long time to the mice, significant amounts of anti-*B. bifidum* antibody were detected in the serum. However, the antibody in the mice administrated with *Salmonella sp.* were detected to much higher level in a short time. Furthermore, in vitro test, the optimal dose of *B. bifidum* to induce antibody production by spleen lymphocyte was 20 times than that of *Salmonella sp.*. It was demonstrated that *B. bifidum* was a weakly immunogenic antigen.

**Key words:** *Bifidobacterium bifidum*; immune response; oral administration

双歧杆菌是人类及某些动物肠道中对人体有益的正常菌, 它与机体的健康密切相关。我国从 20 世纪 80 年代开始了微生态调节剂的研制和开发, 现已初具规模。人们通过微生态调节剂大量地摄入双歧杆菌, 但如果日常摄入的抗原过多, 机体应对这些微生物有免疫反应, 双歧杆菌作为机体正常的寄居菌, 宿主会对其有什么样的免疫应答呢? 本研究通过对小鼠口服两歧双歧杆菌后, 双歧杆菌免疫原性强弱的研究, 探索两歧双歧杆菌与宿主之间的关系, 从而为双歧杆菌的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种

1) 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum* F-35): 从正常婴儿粪便中分离得到, 作者所在实验室鉴定、保存。

2) 沙门氏菌 (*Salmonella sp.*): 作者所在实验室分离、鉴定和保存。

### 1.2 实验动物

小鼠: 昆明鼠, 购自江苏原子医学研究所, 6~8

收稿日期: 1999-11-15; 修订日期: 2000-04-10。

基金项目: 江苏省应用基础研究项目资助课题 (BJ970008)。

作者简介: 张灏 (1962-), 男, 江苏苏州人, 工学硕士, 副教授。

周龄 雄性.

### 1.3 培养基

1) 双歧杆菌活化液体培养基,用于两歧双歧杆菌的活化和增殖.

2) MRS 培养基,用于两歧双歧杆菌的计数.

3) 肉汤蛋白胨培养液,用于沙门氏菌的增殖.

### 1.4 酶标抗体

HRP 标记兔抗鼠 IgG 购自上海细胞所.

### 1.5 细胞抗原的制备

两歧双歧杆菌接种于活化液体培养基中,于 39 °C 厌氧培养 20 h 后离心收获菌体.沙门氏菌接种于肉汤蛋白胨培养液中,37 °C 培养 22~24 h 后离心收获菌体.所获得的菌体分别用质量分数为 0.9% 的 NaCl 洗涤 3 次,悬浮于体积分数为 0.3% 的甲醛溶液中,37 °C 过夜,次日用质量分数为 0.9% 的 NaCl 洗涤 2 次.

### 1.6 抗原给药途径

将供试菌株的细胞浓度调整至  $2 \times 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ ,经灌胃给实验小鼠,每只剂量为 0.25 mL,每天 1 次,每组 5 只,对照组灌胃给等量生理盐水,于各实验阶段,摘眼球放血处死,收集血清.

### 1.7 抗体检测方法

血清中抗体的检测用间接 ELISA 法<sup>[1]</sup>.全细胞包被量为  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,每孔 100  $\mu\text{L}$ .

### 1.8 小鼠脾淋巴单核细胞的制备

小鼠取脾,制备单细胞悬液,经 200 目筛网过滤,用 Hanks 液洗涤 3 次,每次离心 10 min(1 000 r/min),加 ficoll 静置,去红细胞.将细胞悬浮于 2 mL RPMI1640 完全培养液中,用台盼蓝染色计活细胞数,应保证活细胞数在 95% 以上,调整细胞浓度为  $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ .

### 1.9 体外免疫应答

将上述制备好的脾淋巴单核细胞滴加于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ;每孔滴加不同细胞浓度的两歧双歧杆菌或沙门氏菌 20  $\mu\text{L}$ ,置于 37 °C、体积分数 5% 的二氧化碳培养箱中,于 3 d 后补充 RPMI1640 完全培养基 100  $\mu\text{L}$ ,5 d 或 7 d 后收集上清液,用酶联免疫法测定抗体的含量,每一浓度重复 3 次.

## 2 结果与讨论

### 2.1 血清抗体的产生

小鼠经灌供试菌后,对其血清中抗两歧双歧杆菌、抗沙门氏菌的 IgG 水平进行 ELISA 法检测,结果见图 1<sup>2</sup>.

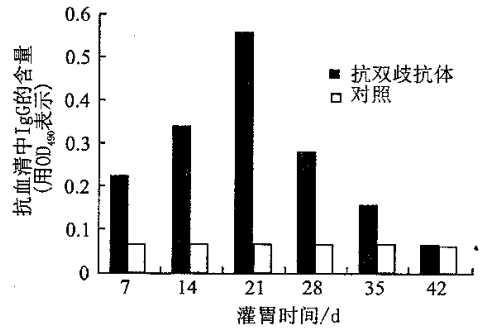


图1 血清中抗两歧双歧杆菌 IgG 的生成

Fig.1 Specific antibodies in the serums of mice fed *B. bifidum*

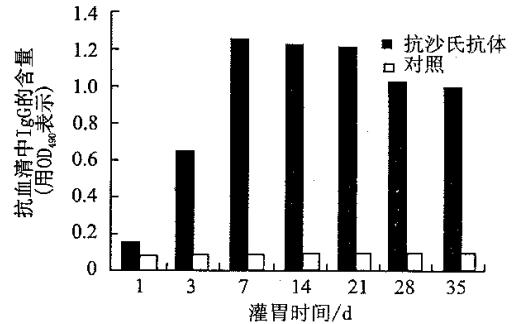


图2 血清中抗沙门氏菌 IgG 的生成

Fig.2 Specific antibodies in the serums of mice fed *Salmonella sp.*

从图 1 中可看出,小鼠灌胃两歧双歧杆菌后,第 14 天开始有抗体生成,第 21 天抗体水平达到最高,之后开始下降,并于第 42 天下降至对照水平.从图 2 中可看出,小鼠经灌胃沙门氏菌后,第 3 天开始有抗体生成,第 7 天抗体水平明显升高,并达到最高值,之后在试验期内一直维持在较高的水平.根据文献[2]可知,宿主两次口服 *Streptococcus mutans*  $5 \times 10^6 \text{ cfu}$  后,特异性抗体便被检出,口服霍乱毒素 5 ng/次 4 次之后也能检出产生的抗霍乱毒素的特异性抗体<sup>[3]</sup>,而两歧双歧杆菌需要大剂量、长时间的口服才能检出宿主产生的抗两歧双歧杆菌的特异性抗体.因此,可以认为双歧杆菌一般不易引起宿主产生抗体.即使产生抗体也是低水平,或在短时间内有一定的反应,之后很快便消失.这可能与双歧杆菌是一种正常的寄居菌有关,其抗原性和其宿主的组织抗原性有相似性或相同性.而沙门氏菌则是人或动物体的一种致病菌,经口进入肠道后,很快便引起宿主对它的免疫应答,并且长时间地产生高水平的抗体.由此可以说明,两歧双歧杆菌在诱导机体产生特异性抗体方面的能力较弱.

### 2.2 体外免疫应答

脾细胞对两歧双歧杆菌与沙门氏菌在体外的

免疫应答见图 3 A.脾细胞培养 7 d 后,两歧双歧杆菌的细胞浓度为  $10^9 \text{ mL}^{-1}$  时,脾细胞对其应答产生的抗体水平达到最高.而沙门氏菌的细胞浓度在  $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  时,脾细胞对其应答产生的抗体数量达到最高.抗原致使脾细胞产生其特异性抗体时,两歧双歧杆菌的浓度是沙门氏菌浓度的 20 倍,且脾细胞在接触沙门氏菌后第 5 天已经产生了很高水平的抗体.据文献 4 报道,短双歧杆菌引起肠系膜淋巴结产生免疫应答的数量为  $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,这说明了两歧双歧杆菌在诱导机体免疫器官脾细胞产生其特异性应答的能力方面较沙门氏菌弱.

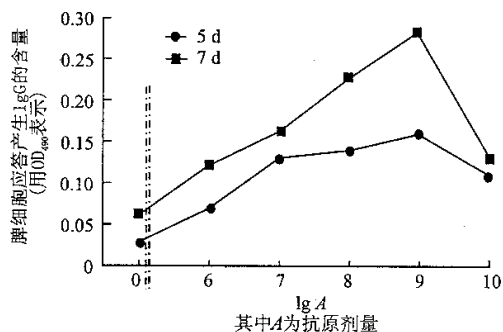


图 3 两歧双歧杆菌体外免疫应答

Fig. 3 Vitro immune response to various doses of *B. bifidum* in spleen cell culture

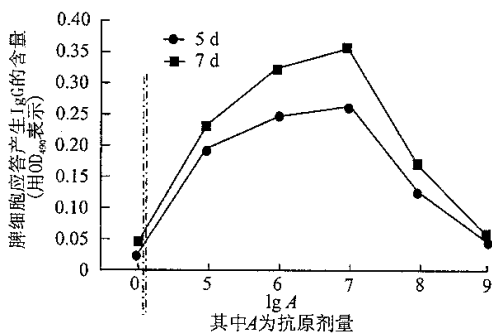


图 4 沙门氏菌体外免疫应答

Fig. 4 Vitro immune response to various doses of *Salmonella sp.* in spleen cell culture

### 2.3 灌供试菌后小鼠脾细胞对双歧杆菌的免疫应答

分别制备灌供试菌后 14 21 d 的小鼠的脾细胞悬液,并滴加浓度为  $10^9 \text{ mL}^{-1}$  的两歧双歧杆菌,7 d 后检测其上清液中的抗体数量,结果如图 5 所示.结合血清中抗体生成变化的试验可看出,小鼠在灌胃 14 d 后,脾细胞对双歧杆菌表现出较高的应答,而此时血清中的抗体的数量正处于上升趋势;灌胃 21 d 后脾脏细胞的应答降到很低的水平,此时血清中的抗体数量达到最高值.这可能是因为脾脏是机体的一个免疫器官,小鼠口服双歧杆菌后第 14 天时,脾脏已产生了特异性抗体.然后这些抗体再缓慢释放至血液中,到第 21 天时脾脏所产生的特异性抗体基本上释放完毕,此时血液中的抗体数量达到最高值.而且双歧杆菌与宿主频繁接触后,形成了一个统一体,不再会有强烈的免疫反应<sup>[5]</sup>.

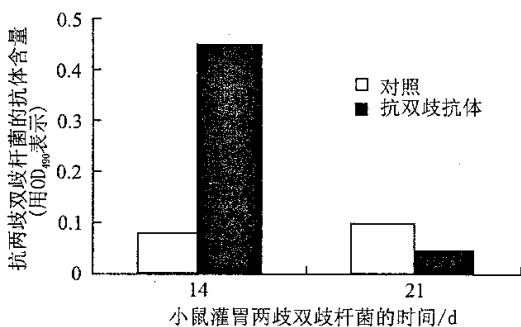


图 5 灌供试菌后小鼠脾细胞对双歧杆菌的免疫应答

Fig. 5 Vitro immune response to *B. bifidum* of spleen cells from mice feeding *B. bifidum*

## 3 结 语

综上所述,双歧杆菌长期灌胃给小鼠一般不易引起宿主产生抗体,即使诱生了抗体,其浓度也远远低于外籍菌诱生的抗体水平,且小鼠脾细胞对双歧杆菌刺激同样表现出低的反应性.

## 参考文献

[1] 孙震,张灏,谢晴. 双歧杆菌免疫学检测方法的研究[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(1): 28~32.

[2] MORISAKI I, MICHALEK G, MARMAN G. Effective immunity to dental caries: enhancement of salivary anti-*Streptococcus mutans* antibody with oral adjuvants[J]. *Infect Immun*, 1983, 40: 577~581.

[3] SVENNERHOLM A, LANGE S, HOLMGREN J. Intestinal immune response to cholera toxin: dependence on route and dosage of antigen for priming and boosting[J]. *Infect Immun*, 1980, 30: 337~342.

[4] H YASUI, A MIKE, M OHWAKI. Immunogenicity of *Bifidobacterium breve* and change in antibody production in Peyer's patches after oral administration[J]. *J of Dairy Sci*, 1988, 71(1): 30~35.

[5] 杨景云主编. 医用微生物学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.