

比较复合益生菌和低聚果糖联用对环磷酰胺诱导的免疫低下小鼠的免疫增强效果

马微微, 武亚楠, 赵伊阳, 孙杭, 黄莉莉*
(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150000)

摘要: 为探究复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠的免疫调节作用, 采用《保健食品功能检验与评价方法 (2023 年版)》中的方法, 通过注射环磷酰胺以降低小鼠的免疫能力, 成功建立小鼠免疫低下模型。分别测定低、中、高 (每只 6×10^6 、 6×10^7 、 6×10^8 CFU) 剂量复合益生菌和低聚果糖 (每只 1.5 mg) 联用对免疫低下小鼠的体质量、免疫器官指数、细胞免疫、体液免疫以及非特异性免疫的影响。实验结果表明对小鼠共同灌服复合益生菌和低聚果糖使免疫低下小鼠的体质量、胸腺指数和脾指数显著上升, 在高剂量组中两者较模型组分别上升了 104.15% 和 46.12%, 改善了胸腺和脾的病理学特征, 并且显著改善了免疫低下小鼠的细胞免疫功能、体液免疫功能以及非特异性免疫功能, 其中高剂量组的光密度差值、足跖厚度、溶血空斑数、半数溶血值、吞噬指数 α 、吞噬指数和 NK 细胞活性较模型组分别增加了 83.87%、94.12%、51.49%、31.83%、46.53%、54.29% 和 86.92%。血清细胞因子 IL-2、IL-6 和 TNF- α 也呈剂量依赖性增加。该研究为复合益生菌和低聚果糖联合增强免疫功能提供了理论依据。

关键词: 复合益生菌; 低聚果糖; 免疫功能; 环磷酰胺
文章编号: 1673-9078(2025)08-1-10 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0612

Comparison of the Immune-enhancing Effects of Combined Probiotic Complex and Oligofructose in Cyclophosphamide-induced Immunocompromised Mice

MA Weiwei, WU Ya'nan, ZHAO Yiyang, SUN Hang, HUANG Lili*
(School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China)

Abstract: To investigate the immunomodulatory effects of the combination of a probiotic complex and oligofructose on mice, an immunocompromised mouse model was successfully established by injecting cyclophosphamide according to the Methods for Testing and Evaluating the Functions of Health Foods (2023 Edition), thereby reducing the immune

引文格式:
马微微,武亚楠,赵伊阳,等.比较复合益生菌和低聚果糖联用对环磷酰胺诱导的免疫低下小鼠的免疫增强效果[J].现代食品科技,2025,41(8):1-10.

MA Weiwei, WU Ya'nan, ZHAO Yiyang, et al. Comparison of the immune-enhancing effects of combined probiotic complex and oligofructose in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 1-10.

收稿日期: 2024-05-06
基金项目: 黑龙江省博士后科研启动金项目 (LBH-Q13161); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2019H106); 黑龙江中医药中青年科技攻关项目 (ZQG-042)
作者简介: 马微微 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药用资源开发利用及益生菌功能食品开发, E-mail: 18504516911@163.com
通讯作者: 黄莉莉 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药及天然产物活性及机制研究, E-mail: 908668195@qq.com

function of mice. The effects of low, medium, and high (6×10^6 , 6×10^7 , and 6×10^8 CFU each) doses of combined probiotic complex and oligofructose (1.5 mg/pc) on body weights, immune organ indices, and cellular, humoral, and nonspecific in immunocompromised mice were determined. The experimental results showed that the co-infusion of probiotic complex and oligofructose resulted in a significant increase in the body weight, thymic index, and splenic index of immunocompromised mice, with the latter two in the high-dose group increasing by 104.15% and 46.12%, respectively, suggesting an improvement in the pathological characteristics of the thymus and spleen. Moreover, in the high-dose group, the optical density difference value, foot plantar thickness, hemolytic empty spot number, half hemolytic value, phagocytic index α , phagocytic index, and NK cell activity increased by 83.87%, 94.12%, 51.49%, 31.83%, 46.53%, 54.29%, and 86.92%, respectively, compared with values in the model group, indicating significantly improved cellular, humoral, and non-specific immunity in immunocompromised mice. Levels of the serum cytokines IL-2, IL-6, and TNF- α also increased in a dose-dependent manner. These findings indicate that the administration of a probiotic complex and oligofructose to mice can enhance their immune function.

Key words: probiotic complex; oligofructose; immune function; cyclophosphamide

当前,快节奏的生活方式、高压力的工作环境和不健康的饮食习惯等各种因素不断影响着人们的健康状况^[1]。因此,如何提升当前民众的免疫力逐渐成为各研究机构关注的重点。按照传统医学观点,抗生素被认为是治疗疾病较为有效且常见的方法^[2]。然而,由于有害菌对抗生素耐药性的增强和抗生素对机体和环境的副作用,目前急需找到可以替代抗生素用于预防和治疗疾病的有效物质,其中益生菌就是最受关注的方向之一^[3]。

免疫系统能够帮助机体抵御外部有害物质的入侵,是最重要的防御系统。肠道微生物群对机体免疫具有重要的调节作用,其可以产生具有免疫调节和抗炎功能的相应物质,并以此对机体的免疫系统产生影响。益生菌被定义为对宿主健康有益的微生物,并且可以通过维持宿主肠道微生物平衡调节宿主的免疫系统。大量研究表明益生菌对提高人体免疫力起着至关重要的作用^[4]。因此益生菌已被广泛用于增强人体的免疫能力^[5]。

动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11, XLTG11) 分离自健康婴儿肠道,具有较强的耐酸和耐胆盐能力、较高的细胞粘附性以及体外抗炎能力,因此具有很好的益生特性^[6]。植物乳杆菌 CCFM8661 (*Lactobacillus plantarum* CCFM8661, CCFM8661) 是一株具有排铅功能的益生菌菌株,且对机体的氧化应激产生保护^[7]。副干酪乳酪杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 广泛存在于人体的肠道中,具有优良的耐酸性和良好的益生菌特性^[8,9]。然而对于副干酪乳酪杆菌 LP16 (*Lactobacillus paracasei* LP16, Glory LP16) 菌株目前还鲜有相关研究,特别是对它免疫功能的影响目

前还有没有相关研究。低聚果糖 (Fructo-oligosaccharide, FOS) 是一种常见的膳食纤维,对肠道中部分益生菌的生长具有一定的促进作用,还能抑制肠道中病原菌的生长从而起到调节肠道菌群的作用^[10,11]。

复合益生菌是指将几种不同种属的益生菌按不同的比例进行混合,以使其比单一益生菌产生更佳的益生效果^[12]。目前已有研究报道了复合益生菌对肠道菌群平衡和增强免疫功能的作用^[13-15]。但是目前并没有对本研究所用的三种益生菌 (XLTG11、CCFM8661、Glory LP16) 增强免疫功能的研究,特别是没有上述三种益生菌和低聚果糖联用以增强免疫功能的研究。

环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX) 是烷化剂的一种,广泛应用于癌症的治疗,但他对免疫细胞等快速分裂的细胞也具有毒性,因此常被用于建立免疫抑制模型^[16]。本研究以 CTX 构建小鼠免疫低下模型,灌服复合益生菌和低聚果糖,研究其对小鼠体重指数、免疫器官指数、细胞免疫功能、体液免疫功能、非特异性免疫功能的影响,评价复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验动物饲养于屏障环境动物室,控制实验室温度为 22 ℃,湿度在 10%~60% 之间,并进行不间断的 12 h 明暗交替照明,使用实验要求的小鼠标准饲料对实验小鼠进行喂养,实验动物生产许可证号: SCXK (黑) 2024-002。实验所需的动物实验均经黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准,所有操作均按照黑龙江中医药大学《实验动物管理条例》进行,动物伦理审查号: 2023113007。

实验所需的材料与仪器如下：CCFM8661，微康益生菌（苏州）股份有限公司；Glory LP16 菌粉、XLTG11，金华银河生物科技有限公司；绵羊红细胞（Sheep Blood Cells, SRBC），玉环市南方试剂有限公司；细胞培养液，美国 GIBCO 公司；胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS），美国 Gibco 公司；刀豆蛋白 A（Concanavalin A, ConA），美国 Sigma 公司；白细胞介素-2（IL-2）检测试剂盒、白细胞介素-6（IL-6）检测试剂盒、TNF- α 检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α 检测试剂盒、苏木素伊红（HE）染色试剂盒均购自北京诚林生物科技有限公司。

游标卡尺（精密度 0.02 mm），哈尔滨量具刃具集团有限责任公司；MLS-3751L-PC 高压蒸汽灭菌器、MDF-382E 型 -80 $^{\circ}$ C 冰箱，日本 Panasonic 公司；SORVALL ST8/8R 型低温离心机，美国 TOMOS 公司；SMATBCD 型全自动酶标仪，美国 BIOTEK 公司。

1.2 动物实验

如表 1 所示建立小鼠免疫低下模型。

将 60 只 BALB/c 小鼠饲养于动物房中，在实验正式开始前先对实验小鼠进行 1 周的适应性喂养，使其适应实验环境，随后将小鼠随机分为 5 组，分别为：对照组（NC）、模型组（MC）、低聚果糖和复合益生菌低剂量组（每只 6×10^6 CFU+1.5 mg 低聚果糖）、复合益生菌和低聚果糖中剂量组（每只 6×10^7 CFU+1.5 mg 低聚果糖）、复合益生菌和低

聚果糖高剂量组（每只 6×10^8 CFU+1.5 mg 低聚果糖），每组 12 只。实验周期 30 d，在第 1~3 天，除对照组小鼠腹腔注射生理盐水外，其余各组小鼠分别注射 100 μ L CTX（40 mg/kg）以建立小鼠免疫低下模型。随后按照组别灌胃对应剂量的复合益生菌和低聚果糖直至实验结束。对小鼠进行最后一次灌服的 12 h 后分别记录各个小鼠体质量并脱颈处死，在无菌超净台中取出小鼠的胸腺和脾脏并记录质量。复合益生菌按 4:3:3 的比例将 XLTG11、CCFM8661 和 Glory LP16 混合。每种益生菌灌胃量见表 2。

1.3 免疫功能指标测定

1.3.1 免疫器官分析

取小鼠眼球血，脱颈处死在超净台中取出脾脏和胸腺，使用滤纸吸取周围血液，并分别置于无菌平皿中测量质量，分别计算小鼠的脾指数与胸腺指数。胸腺和脾脏随后进行苏木精 - 伊红染色（Hematoxylin-Eosin Staining, HE）处理，观察脾脏与胸腺的病理学变化。

1.3.2 细胞免疫功能测定

1.3.2.1 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

具体实验方法参考《保健食品功能检验与评价方法（2023 年版）》，采取 MTT 法对小鼠进行 ConA 诱导的脾淋巴细胞转化实验。

表 1 实验分组及干预

Table 1 Experimental groupings and interventions					
序号	分组	动物数量/只	喂养方式	腹腔注射剂量（1~3 d）	灌胃剂量（4~30 d）
1	对照组（NC）	12	自由采食	同体积生理盐水	同体积生理盐水
2	模型组（MC）	12	自由采食	CTX（40 mg/kg）	同体积生理盐水
3	低剂量复合菌+低聚果糖（LP）	12	自由采食	CTX（40 mg/kg）	复合菌（ 6×10^6 CFU/只）+ 低聚果糖（1.5 mg/只）
4	中剂量复合菌+低聚果糖（MP）	12	自由采食	CTX（40 mg/kg）	复合菌（ 6×10^7 CFU/只）+ 低聚果糖（1.5 mg/只）
5	高剂量复合菌+低聚果糖（HP）	12	自由采食	CTX（40 mg/kg）	复合菌（ 6×10^8 CFU/只）+ 低聚果糖（1.5 mg/只）

表 2 每组益生菌和低聚果糖含量情况

Table 2 Probiotics and oligofructose content per group						
序号	分组	总菌灌胃量/(CFU/只)	XLTG11/(CFU/只)	CCFM8661/(CFU/只)	GloryLP16/(CFU/只)	低聚果糖/(mg/只)
1	低剂量复合菌+低聚果糖（LP）	6×10^6	2.4×10^6	1.8×10^6	1.8×10^6	1.5
2	中剂量复合菌+低聚果糖（MP）	6×10^7	2.4×10^7	1.8×10^7	1.8×10^7	1.5
3	高剂量复合菌+低聚果糖（HP）	6×10^8	2.4×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	1.5

1.3.2.2 迟发型变态反应实验

对实验小鼠进行腹腔注射，注射物为 SRBC，使其进行 4 d 的实验培养后测量小鼠的足跖厚度。在测量完小鼠足跖厚度后，在相同部位部位注射 20 μL 20% (V/V) 的 SRBC，并在第二天再次测量足跖厚度。

1.3.3 体液免疫功能测定

1.3.3.1 抗体生成细胞检测

采用 Jerne 改良玻片法。对每只鼠腹腔注射用生理盐水配成的 0.2 mL 2% (V/V) 的 SRBC，4 d 后脱颈处死，取出脾脏制成 Hank's 液，在 RPMI1640 培养液中进行细胞计数。

取一定量的表层培养基加热溶解，随后取与表层培养基等量的 Hank's，调节其 pH 值达到 7.2，将二者均匀混合，将混合液分装转移到小试管中，并向其中加入 50 μL 的体积分数为 10% 的 SRBC，同时再加入 20 μL 的脾细胞悬液。取经高压灭菌的玻片，于表层刷上琼脂糖，将混合液倾倒入玻片上，孵育 1.5 h 后加入 SA 缓冲液，1.5 h 后计数溶血空斑数。

1.3.3.2 血清溶血素的测定

对受试小鼠进行血清溶血素的测定。对小鼠进行动物免疫 4 d 后取眼球血并进行离心处理以分离血清，并对分离出来的血清稀释 300 倍后分别加入样品孔和对照孔。对样品孔每孔加入 50 μL 的经稀释后的血清；对对照孔每孔加入 50 μL SA 缓冲液和补体以及 25 μL 10% (V/V) SRBC，孵育 30 min 后对混合液进行离心，分别取 50 μL 上清液加入另一培养板内，并加入 150 μL 都氏试剂。加 12.5 μL SRBC 于半数溶血孔内，再加都氏试剂至 200 μL 。测量其 540 nm 处光密度值 (OD)。用半数溶血值 (HC₅₀) 表示溶血素的量，按以下公式计算。

$$B = \frac{OD_0}{OD_1} \times D \quad (1)$$

式中：

B——半数溶血值 (HC₅₀)；

OD₀——样品光密度值；

OD₁——SRBC 半数溶血时的光密度值；

D——稀释倍数。

1.3.4 非特异性免疫功能的测定

1.3.4.1 碳廓清实验

将用生理盐水稀释好的墨汁 (10 mL/kg) 从小鼠尾静脉注入，注射后第 2 分钟和第 10 分钟尾部静脉取血 20 μL ，加到 2 mL 的 0.1% Na₂CO₃ 中。测

量其在 600 nm 波长处的光密度值。以吞噬指数 α 表示小鼠碳廓清的能力，按以下公式计算。

$$Pia = \frac{W_0}{W_a + W_b} \times \sqrt[3]{K} \quad (2)$$

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

式中：

Pia——吞噬指数 α ；

W₀——小鼠质量；

W_a——小鼠的肝脏质量；

W_b——小鼠的脾脏质量；

OD₁——注射墨汁 2 min 时小鼠静脉血的光密度值；

OD₂——注射墨汁 10 min 时小鼠静脉血的光密度值；

t₁——首次采血时间，2 min；

t₂——首次采血时间，10 min。

1.3.4.2 腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

具体实验方法参考《保健食品功能检验与评价方法 (2023 年版)》，采取滴片法对小鼠进行腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验。晾干后在显微镜下计数巨噬细胞，按以下公式计算吞噬指数。

$$Pi = \frac{Pi_0}{Pi_1} \quad (4)$$

式中：

Pi——吞噬指数；

Pi₀——被吞噬的鸡红细胞总数；

Pi₁——计数的巨噬细胞数。

1.3.4.3 NK 细胞活性检测

具体实验方法参考《保健食品功能检验与评价方法 (2023 年版)》，采取 LDH 法对小鼠进行 NK 细胞活性检测实验。按以下公式计算 NK 细胞活性。

$$E = \frac{OD_3 - OD_4}{OD_5 - OD_4} \times 100\% \quad (5)$$

式中：

E——NK 细胞活性 (CA_{NK})，%；

OD₃——反应孔光密度值；

OD₄——自然释放孔光密度值；

OD₅——最大释放孔光密度值。

1.4 血清细胞因子水平测定

严格按照说明书要求进行酶联免疫吸附试验 (ELISA)，检测血清中 IL-2、IL-6 和 TNF- α 的含量。

1.5 数据统计及分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示，使

用 SPSS 22.0 与 Statistix 8.1 统计软件, LSD 法进行两两比较, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。并使用 Origin 2021 作图软件对数据结果绘制柱状图。

2 结果与讨论

2.1 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠体质量的影响

如表 3 所示, 与对照组 (NC) 相比, 模型组 (MC) 和低剂量组 (LP)、中剂量 (MP) 组小鼠的终末体质量均显著降低 ($P<0.05$), 而高剂量组 (HP) 与 NC 组无显著性差异。而与 NC 组相比 LP、MP、HP 组小鼠的终末体质量均显著上升 ($P<0.05$), 且表现出剂量依赖性趋势。表明采用高剂量复合菌 + 低聚果糖对小鼠进行灌胃, 对其免疫能力的恢复和体质量的增长具最佳的效果。

表 3 复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠体质量的影响
Table 3 Effect of combination of probiotic complex and oligofructose on body weight in mice

组别	初始体质量/g	终末体质量/g
对照组	20.33 ± 1.15	25.92 ± 0.63 ^a
模型组	19.50 ± 1.14	19.82 ± 0.57 ^d
低剂量组	20.28 ± 1.10	21.37 ± 0.86 ^c
中剂量组	20.04 ± 1.44	24.00 ± 0.58 ^b
高剂量组	19.55 ± 0.84	25.75 ± 0.60 ^a

注: 小写字母不同表示差异显著, 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠免疫器官的影响

由图 1 可知, 与 NC 组相比, MC 组的胸腺指数和脾指数显著降低 ($P<0.05$), 表示建模成功, 而 HP 组无显著性差异, 表示高剂量组的免疫力恢复情况良好。与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的免疫器官指数均显著升高 ($P<0.05$), 并呈现出剂量依赖性趋势。结果表明, 对免疫低下的小鼠使用复合益生菌和低聚果糖灌胃可以促进其免疫器官的恢复, 提高其免疫力, 并改善机体的免疫功能。图 2 为实验小鼠免疫器官经 HE 染色后制作成的病理学切片。NC 组小鼠胸腺的结缔组织小叶较好的将胸腺分割为小叶状, 皮质和髓质的界限清晰, 细胞排列整齐。MC 组小鼠的皮质与髓质分布无规律, 界限不清晰。联用复合益生菌和低聚果糖低、中、高剂量组小鼠的胸腺结构逐渐恢复正常,

皮质与髓质的界限逐渐清晰, 病理特征得到改善。NC 组小鼠脾脏的白髓与红髓分界清楚, 边缘清晰, 红髓均匀地分布在白髓中, 无病变情况。MC 组小鼠的白髓与红髓界限模糊, 无明显分隔区, 出现淋巴细胞浸润的现象。联用复合益生菌和低聚果糖低、中、高剂量组小鼠的脾脏结构逐渐恢复正常, 其中高剂量组最为明显, 红髓与白髓的界限重新变得清晰可见, 而且淋巴细胞浸润的现象减轻。

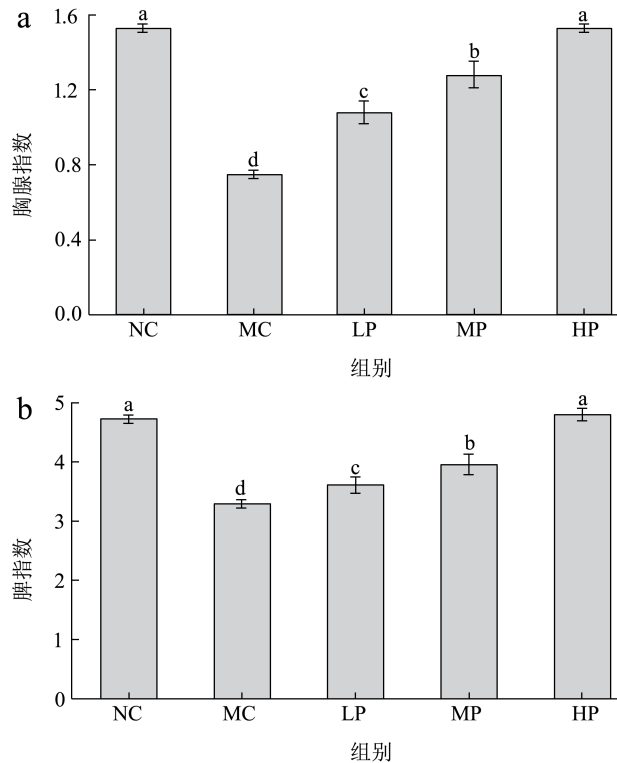


图 1 复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠免疫器官指数的影响

Fig.1 Effect of combination of probiotic complex and oligofructose on immune organ index in mice

注: 图中不同小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。图 3~6 同。

免疫器官指数和病理学特征是反应免疫反应程度的重要指标^[17]。此外, 刘春红等^[18]使用植物乳杆菌 C88 和人参多糖联用对小鼠进行灌胃, 其低剂量组 (每只 1×10^8 CFU C88 和 2 mg 人参多糖) 小鼠的脾指数较模型组上升了 29.32%, 而本实验的高剂量组 (每只 6×10^8 CFU 复合益生菌和 1.5 mg 低聚果糖) 小鼠的脾指数较模型组上升了 46.50%。胸腺和脾脏的病理学分析表明, 本研究的复合益生菌和低聚果糖干预能够呈剂量依赖的方式改善 CTX 诱导的病理学特征恶化。这些数据表明, 在相同剂量益生菌干预下, 本实验所用的复合益生菌和低聚果糖的组合改善免疫的能力更强。

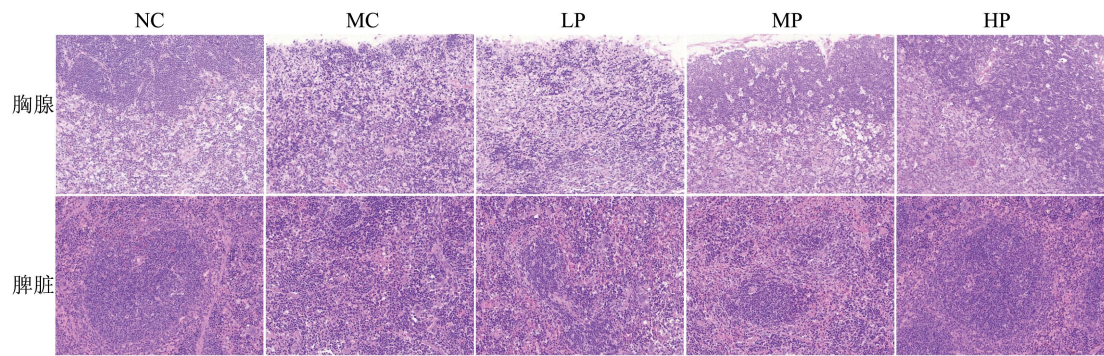


图 2 实验小鼠胸腺和脾脏 HE 染色的病理学切片 (200 ×)

Fig.2 Pathologic sections of HE-stained thymus and spleen of experimental mice

2.3 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠细胞免疫功能的影响

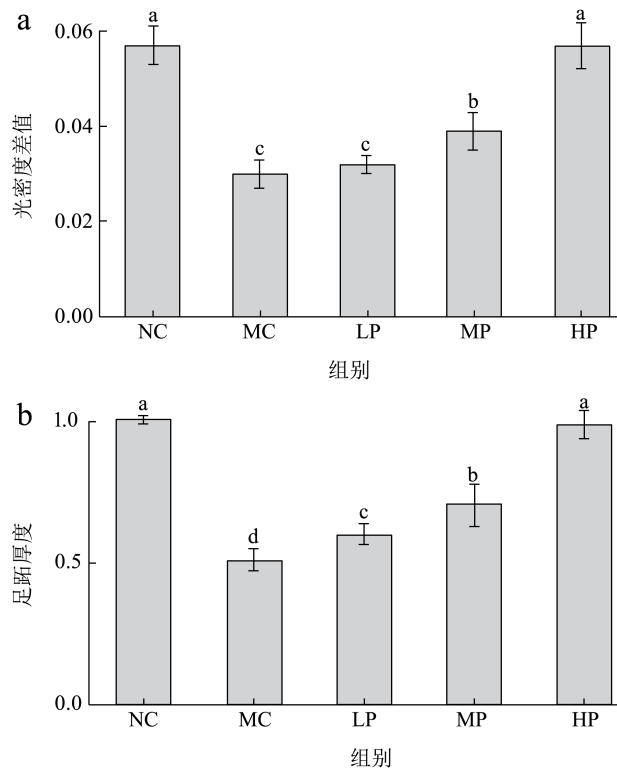


图 3 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠细胞免疫功能的影响

Fig.3 Effects of combined probiotic complex and oligofructose on cellular immune function in immunocompromised mice

由图 3a 可知，在 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验中，与 NC 组相比，MC 组的光密度差值产生显著性降低 ($P<0.05$)，而 HP 组无显著性差异。与 MC 组相比，LP 组的光密度差值有所上升但无显著性差异，而 MP 组与 HP 组小鼠的光密度差值均出现显著性上升 ($P<0.05$)，且表现为剂量

依赖性。实验结果表明对免疫低下小鼠灌胃复合益生菌和低聚果糖可以使其淋巴细胞产生一定程度的增值，其中 HP 组的增值效果最好。由图 3b 可知，与 NC 组相比，MC 组的足跖厚度产生显著性降低 ($P<0.05$)，而 HP 组无显著性差异。与 MC 组相比，LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的足跖厚度均明显增加，并表现出显著性差异 ($P<0.05$)，且表现为剂量依赖性趋势。实验结果表明对免疫低下小鼠灌胃复合益生菌和低聚果糖可以增强其迟发型变态反应，其中 HP 组的效果最好。

脾淋巴细胞主要由 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞组成，脾淋巴细胞的增殖直接反映了小鼠的特异性免疫。通过 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验发现复合益生菌与低聚果糖可以使其淋巴细胞产生一定程度的增值，特别是高剂量组小鼠的光密度差值较模型组增加了 83.87%。迟发性变态反应是反映细胞免疫的一个重要参数^[19]，本研究发现灌服复合益生菌和低聚果糖的小鼠的足跖厚度与模型组小鼠相比产生一定程度的增加，特别是高剂量组小鼠的足跖厚度较模型组增加了 94.12%，表明复合益生菌和低聚果糖联用可以增强小鼠的 DTH 反应，进而起到调节细胞免疫的作用。刘柘君等^[20]使用鼠李糖乳杆菌 R9639、干酪乳杆菌 Zhang 和植物乳杆菌 P9 (4:2:4) 三株益生菌组成的复方益生菌粉探究其对小鼠免疫的增强作用，其中剂量组（每只 8.4×10^6 CFU）的复合菌粉使实验小鼠的足跖厚度较对照组增加了 11.69%，而本实验低剂量组小鼠的足跖厚度较对照组增加了 17.65%，表明本实验的复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠的免疫功能增强效果更明显。

2.4 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠体液免疫功能的影响

由图 4a 可知, 与 NC 组相比, MC 组的溶血空斑数产生显著性降低 ($P<0.05$), 而 HP 组无显著性差异。与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的溶血空斑数明显上升, 且有显著性差异 ($P<0.05$), 并表现为剂量依赖性趋势。实验结果表明对免疫低下小鼠灌胃复合益生菌和低聚果糖可以增加其溶血空斑个数, 其中 HP 组的效果较好。由图 4b 可知, 与 NC 组相比, MC 组的 HC_{50} 值产生显著性降低 ($P<0.05$)。而与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的 HC_{50} 值明显上升, 表现出显著性差异 ($P<0.05$), 且表现为剂量依赖性趋势。实验结果表明对免疫低下小鼠灌胃复合益生菌和低聚果糖可以提高其 HC_{50} 的值, 其中 HP 组的效果最好。

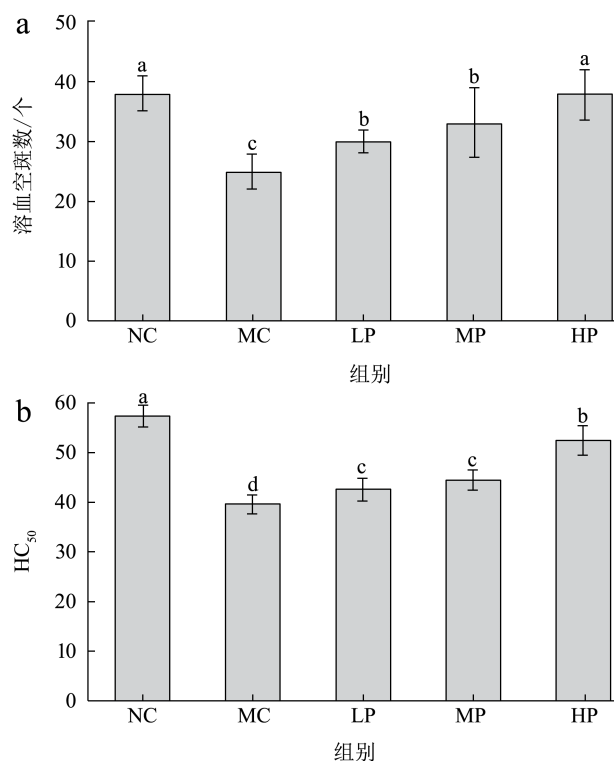


图 4 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠体液免疫功能的影响

Fig.4 Effects of combined probiotic complex and oligofructose on humoral immune function in immunocompromised mice

溶血空斑数可反映抗体生成细胞数, 后者是反映体液免疫能力的重要指标^[21]。血清溶血素能够体现机体释放特异性抗体的能力, 也被认为是评价免疫功能的重要指标^[22]。在本实验中, 灌服复合益生菌和低聚果糖小鼠的溶血空斑数和半数溶血值 (HC_{50}) 与模型组小鼠相比显著增加, 特别是高剂

量组小鼠的溶血空斑数和半数溶血值较模型组分别增加了 51.49% 和 31.83%, 表明复合益生菌和低聚果糖联用显著增强了小鼠的体液免疫功能。付玉洁等^[23]使用复合益生菌 (每只肠膜芽孢杆菌 1.75×10^7 、凝结芽孢杆菌 1.4×10^7 、酿酒酵母 1.05×10^8 、植物乳杆菌 3.5×10^7 、丁酸梭菌 1.61×10^8 CFU) 探究对小鼠免疫功能的影响, 其 HC_{50} 值较对照度上升了 25.71%, 而本实验的 HC_{50} 值较对照度上升了 31.83%, 表明本实验的复合益生菌和低聚果糖联用对小鼠的免疫功能增强效果更明显。

2.5 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠非特异性免疫的影响

由图 5a 可知, 与 NC 组相比, MC 组的吞噬指数 α 值产生显著性降低 ($P<0.05$), 而 HP 组的吞噬指数 α 值无显著性变化。与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的吞噬指数 α 值产生显著性上升 ($P<0.05$), 且表现为剂量依赖性趋势, 其中 HP 组的效果最显著。对小鼠进行腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验, 由图 5b 可知, 与 NC 组相比, MC 组的吞噬指数产生显著性降低 ($P<0.05$), 而 HP 组的吞噬指数无显著性变化。与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的吞噬指数明显上升, 且有显著性差异 ($P<0.05$), 并表现出剂量依赖性趋势, 其中 HP 组的效果最显著。由图 5c 可知, 与 NC 组相比, MC 组的 NK 细胞活性产生显著性降低 ($P<0.05$), 而 HP 组的吞噬指数无显著性变化。与 MC 组相比, LP 组、MP 组与 HP 组小鼠的 NK 细胞活性上升, 并表现出显著性差异 ($P<0.05$), 且呈现出剂量依赖性趋势, 其中 HP 组的效果最显著 ($P<0.05$)。

巨噬细胞具有传递抗原、调节 T 细胞和 B 细胞免疫等作用, 常常作为评价活性成分免疫调节能力的重要载体^[24,25]。而 NK 细胞是机体内能够产生自然免疫防御的重要的效应细胞, 普遍被认为是机体自然免疫的重要细胞, 具有非特异性免疫功能的作用, 能够非识别性地清除侵入体内的各种异物, 并且可以直接杀伤寄生在细胞内的病原体^[26]。Azizi 等^[3]使用含有粪链球菌 T-110 株 (1×10^9 CFU/g)、丁酸梭菌 TO-A 株 (1×10^8 CFU/g) 和肠系膜芽孢杆菌 TO-A 株 (1×10^8 CFU/g) 的复合益生菌增强仔猪的免疫能力, 实验表明从肝脏和肺泡中分离的粒细胞的吞噬指数较对照组分别上升了 14.35% 和 44.94%, 而本实验的高剂量组吞噬指数较对照组上升了 54.29%。证明本实验的复合益生菌与低聚果糖联用更好地增强了小鼠的功能。

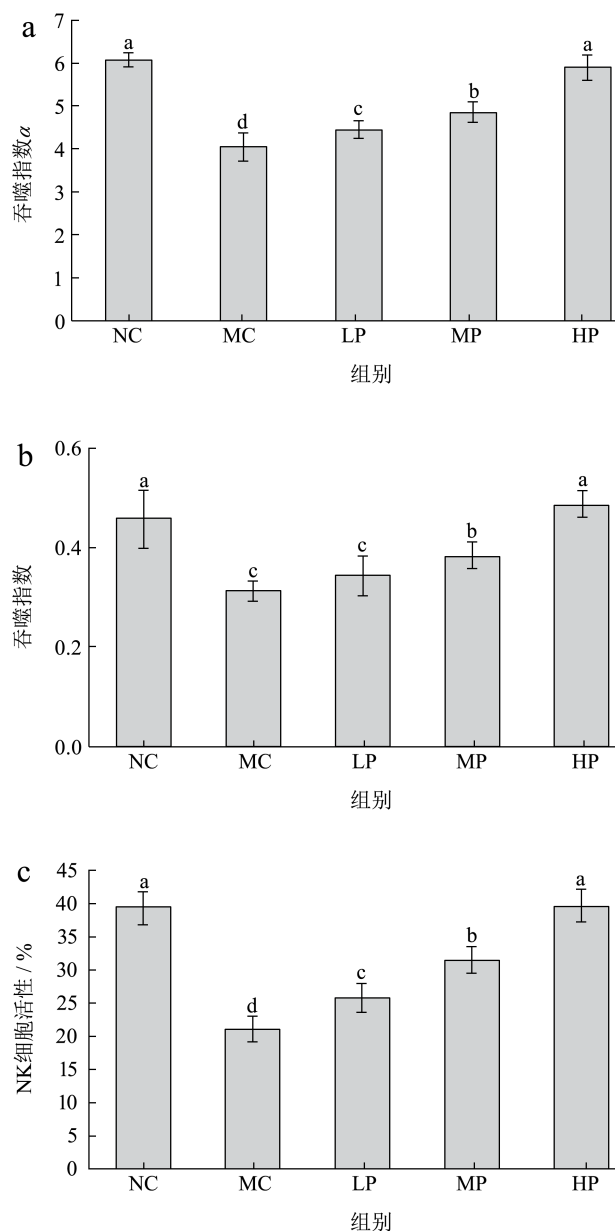


图5 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠非特异性免疫的影响

Fig.5 Effect of combined probiotic complex and oligofructose on nonspecific immunity in immunocompromised mice

2.6 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠血清细胞因子含量的影响

由图6可知,与NC组相比,MC组的IL-2、IL-6和TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$),表明CTX摄入降低了小鼠血液中细胞因子的含量,免疫能力较NC组显著降低,表明建模有效。在补充不同剂量的复合益生菌和低聚果糖后,IL-2、IL-6和TNF- α 水平呈剂量依赖方式的增加,且HP组的效果最显著 ($P < 0.05$)。

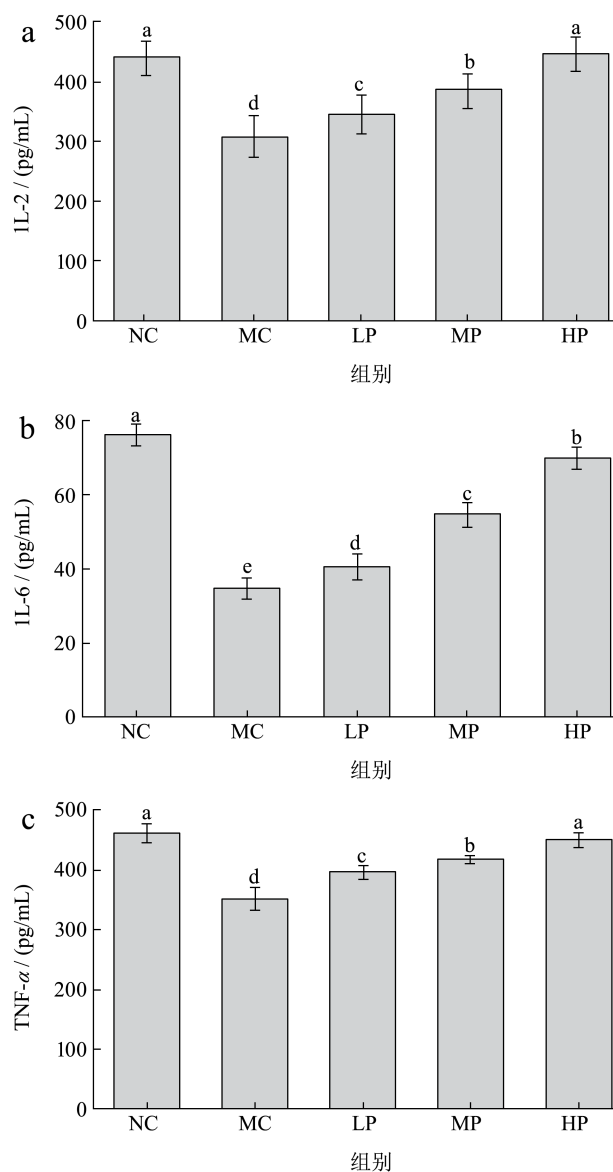


图6 复合益生菌和低聚果糖联用对免疫低下小鼠血清细胞因子含量的影响

Fig.6 Effect of combination of complex probiotics and oligofructose on serum cytokine levels in immunocompromised mice

IL-2是T细胞的生长因子,促进T细胞的增殖和活化^[27]。IL-6能够促进炎症介质的释放和白细胞的活化,在免疫细胞的增殖和分化过程中发挥调控作用^[28]。TNF- α 参与急性和慢性炎症反应的调节,能够促进炎症细胞的迁移和活化,并促进其他炎症介质的释放^[29]。李玫玫等^[30]研究表明,复合益生菌能够上调免疫低下小鼠血清细胞因子的含量,缓解环磷酰胺引起的免疫低下。Ma等^[31]研究发现,动物双歧杆菌乳酸亚种XLTG11、干酪乳杆菌Zhang和植物乳杆菌P8复合益生菌同样增加了环磷酰胺引起的免疫低下小鼠血清细胞因子水平。这些研究

同本研究的结果一致,这表明,增加血清细胞因子水平可能是提高免疫能力的潜在机制,然而还需要更详细的研究去探讨验证。

3 结论

本研究表明,由动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11、植物乳杆菌 CCFM8661 和副干酪乳酪杆菌 Glory LP16 (4:3:3) 组成的复合益生菌与低聚果糖联用能够呈剂量依赖性的提高免疫低下模型小鼠的体重、胸腺指数和脾指数,改善病理学特征,能够对小鼠的细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫产生显著影响,具有增强免疫功能的作用,这可能与提高机体的细胞因子水平有关。本研究为该复合益生菌和低聚果糖联用进一步开发和利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] JAYAWARDENA R, SOORIYAARACHCHI P, CHOURDAKIS M, et al. Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review [J]. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2020, 14(4): 367-382.
- [2] KIM S, COVINGTON A, PAMER E G. The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens [J]. Immunological Reviews, 2017, 279(1): 90-105.
- [3] AZIZI A F N, UEMURA R, OMORI M, et al. Effects of probiotics on growth and immunity of piglets [J]. Animals, 2022, 12(14): 1786.
- [4] KAWASHIMA T, HAYASHI K, KOSAKA A, et al. *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses [J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(12): 2017-2024.
- [5] RUPA P, MINE Y. Recent advances in the role of probiotics in human inflammation and gut health [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(34): 8249-8256.
- [6] WANG N, WANG S, XU B, et al. Alleviation effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Microorganisms, 2021, 9(10): 2093.
- [7] 陈峰,马微微,于雷雷,等.植物乳杆菌CCFM8661增强小鼠免疫力的功能评价[J].食品与生物技术学报,2024, 43(5):37-43.
- [8] KIM H, CHAE H, JEONG S, et al. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures [J]. Asian-australasian Journal of Animal Sciences, 2005, 18(2): 255-258.
- [9] MIETTINEN M, VUOPIO-VARKILA J, VARKILA K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria [J]. Infection and Immunity, 1996, 64(12): 5403-5405.
- [10] 张金,王美华,杨永龙.低聚果糖和低聚半乳糖的研究进展及在乳制品中的应用[J].中国食品添加剂,2020,31(10): 129-134.
- [11] 张慧,贺延苓,李琼,等.低聚果糖的生物药学效用及应用研究进展[J].药物生物技术,2019,26(5):446G8.
- [12] 刘辉,季海峰,单达聪,等.益生菌对动物免疫机能影响的研究进展[J].饲料与畜牧:新饲料,2010,11:49-51.
- [13] RUAN D, FAN Q, FOUAD A M, et al. Effects of dietary oregano essential oil supplementation on growth performance, intestinal antioxidative capacity, immunity, and intestinal microbiota in yellow-feathered chickens [J]. Journal of Animal Science, 2021, 99(2): skab033.
- [14] XU L, SUN X, WAN X, et al. Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* improves growth performance of broilers by regulating intestinal microbiota and mucosal epithelial cells [J]. Animal Nutrition, 2021, 7(4): 1105-1114.
- [15] ZHAO T S, XIE L W, CAI S, et al. Dysbiosis of gut microbiota is associated with the progression of radiation-induced intestinal injury and is alleviated by oral compound probiotics in mouse model [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 717636.
- [16] 查苏娜,苏日娜,齐和日玛,等.刺玫根多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J].天然产物研究与开发,2024,36(2):196-205, 292.
- [17] EL-NASEERY N I, MOUSA H S, NORELDIN A E, et al. Aging-associated immunosenescence via alterations in splenic immune cell populations in rat [J]. Life Sciences, 2020, 241: 117168.
- [18] 刘春红,王晓慧,高磊,等.植物乳杆菌C88联合人参多糖的免疫调节作用[J].食品科学,2016,37(11):202-207.
- [19] WERNERSSON S, PEJLER G. Mast cell secretory granules: armed for battle [J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(7): 478-494.
- [20] 刘柘君,刘振权,孙文燕.复方益生菌粉提高小鼠免疫力的实验研究[J].食品与药品,2023,25(5):456-461.
- [21] 赵宏宇,崔林虎,张伟云.蛹虫草对小鼠体液免疫功能和NK细胞活性的影响[J].园艺与种苗,2020,40:3-5,49.
- [22] MANTOVANI A, LOCATI M. Macrophage metabolism shapes angiogenesis in tumors [J]. Cell Metabolism, 2016, 24(5): 653-654.
- [23] 付玉洁,郑从森,陈晓良,等.三种复合益生菌对菌群失调模型小鼠补偿生长和免疫功能的影响[J].中国预防兽医

- 学报,2018,40(11):1055-1060.
- [24] RONG Y, YANG R, YANG Y, et al. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 213: 247-256.
- [25] SHI Z, AN L, ZHANG S, et al. A heteropolysaccharide purified from leaves of *Ilex latifolia* displaying immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 245: 116469.
- [26] 陈亮,王雨晴,冀峰,等.玉米低聚肽中焦谷氨酰亮氨酸(pEL)二肽的研究[J].食品与发酵工业,2021,47:49-52.
- [27] TONG B, LEONG S G, JIAN T, et al. Site-specific pegylated IL2 mutein with biased IL2 receptor binding for cancer immunotherapy [J]. International Immunopharmacology, 2024, 136: 112359.
- [28] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2020, 28(5): 115327.
- [29] VAN DER HOUWEN T, VAN LAAR J. Behçet's disease, and the role of TNF- α and TNF- α blockers [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3072.
- [30] 李玟玟,马微微,马青,等.复合益生菌对免疫低下模型小鼠的保护作用[J].中国食品学报,2023,23(8):124-131.
- [31] MA W, LI W, YU S, et al. Immunomodulatory effects of complex probiotics on the immuno-suppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1055197.