

乳酸杆菌通过定植和提供免疫信号调节宿主免疫反应

Lactobacillus Modulate Host Immune Response through Colonization and Provision of Immune Signals

孙 进/SUN Jin¹, 施用晖/SHI Yong-hui^{1,2}, 乐国伟/LE Guo-wei^{1,2}, 马西艺/MA Xi-yi¹, 苏广伟/SU Guang-wei¹

1. 江南大学食品学院食品营养与安全研究所, 江苏无锡 214036
2. 江南大学教育部食品科学和安全重点实验室, 江苏无锡 214036

1. Institute of Nutrition and Safety, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China
2. Key Laboratory of Food Science and Security, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China

[摘要] 提取了 *Lactobacillus* sp. 的肽聚糖, 用 Affymetrix MOE430A 基因芯片研究了肽聚糖对机体免疫细胞基因表达的影响。结果发现, 乳酸杆菌肽聚糖可以刺激免疫细胞 Th1 型免疫反应相关基因的表达, 可能激活 TLR-NF- κ B 相关信号通路, 同时, 不同剂量的肽聚糖可能通过调节 Tollip 的表达, 影响 TLR-NF- κ B 信号通路的激活, 从而调节细胞因子的表达。

[关键词] 益生菌, 定制, 免疫调节, 肽聚糖

[中图分类号] Q342

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)02-0043-04

Abstract: Peptidoglycan (PG) was prepared from *Lactobacillus* sp. Effects of *Lactobacillus* sp. PG on gene expression of mice immunocytes were studied by using Affymetrix MOE430A Genechip. PG was found inducing expression of molecules related to type 1 immune response. TLR-NF- κ B signal pathway would be activated. The expression of Tollip, a negative regulator of TLR-NF- κ B signal pathway was modulated by different doses of PG, which could lead to different expressions of different cytokines.

Key Words: probiotic, colonization, immune modulation, peptidoglycan

CLC Number: Q342

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)02-0043-04

1 引言

免疫功能在机体抵抗病原微生物感染、预防癌症和维持健康中发挥着至关重要的作用。但是, 许多体内外因素会影响免疫功能的正常发挥, 比如营养失调、年龄增长、体力压力、精神压力或不良的生活习惯。因此, 摄食具有免疫调节功能的食品是防止免疫失衡的有效方法。人的胃肠道存在大量的共生有益菌, 这些细菌是胃肠道或系统免疫稳态维持不可缺少的组成部分, 肠道正常菌群紊乱会导致口服免疫耐受丧失, 甚至会引起系统性的超敏反应。添加某些肠道共生菌的发酵食品有维持健康的作用。食品含有的有益细菌主要是某些革兰氏阳性乳酸菌(包括某些乳酸杆菌和双歧杆菌), 称作益生菌。大量研究表明益生菌具有免疫调节的作用, 但是其作用机制当前还不清楚。据推测, 益生菌进入体内后可以“模仿”肠道共生菌, 黏附到黏液或肠道上皮细胞, 从而在胃肠道短暂定植。定植的活益生菌、菌体死亡留下的菌体残片或细菌代谢产物可以为免疫监督系统提供免疫调节信号, 被胃肠道树突细胞或派伊尔斑内的巨噬细胞识别^[1]。益生菌提供的“信号”物

质可能主要是其独特的“共生相关分子模式”(CAMPs), 例如肽聚糖(PG)和脂磷壁酸(LTA)^[2]。CAMPs 可以和表达于抗原呈递细胞(如巨噬细胞)的“模式识别受体”(PRR)结合, 而诱导免疫信号的激活。但是, 当前还没有发现对益生菌 CAMPs-PRR 相互作用相关的系统研究。*Lactobacillus* sp. 是一种来源于肠道的乳酸杆菌, 本研究发现乳酸杆菌可以明显地黏附于鸡或大鼠肠道黏液, 具有潜在的益生作用。用基因芯片分析 *Lactobacillus* sp. 的肽聚糖与小鼠系统免疫细胞作用后基因表达的变化, 结果表明, 乳酸杆菌肽聚糖具有调节细胞因子表达的能力, 这种能力可能主要是通过诱导 TLR-NF- κ B 通路调节因子的表达而发挥的。

2 材料与方法

2.1 黏液的制备

按照 Ouwehand 等^[3]的方法提取黏液, 并进行了适当修改。取刚屠宰的鸡或大鼠的小肠, 用 PBS(含 0.05% Tween20, pH7.3)轻轻洗净内容物; 在冰上用载玻片轻轻刮取黏液, 投入冰冷的 PBS

收稿日期: 2005-09-13

基金项目: 教育部博士点基金资助项目(20040295005)

作者简介: 孙 进, 男, 江苏省无锡市惠河路 170 号江南大学食品学院, 博士生, 研究方向为分子营养学; E-mail: ericexist@163.com

乐国伟(通讯作者), 男, 江南大学 53 信箱, 教授, 研究方向为分子营养学; E-mail: lgw@sytu.edu.cn

(pH7.3); 匀浆; 加入两倍体积的无水乙醇在-20℃放置过夜, 使含粘蛋白的黏液沉淀; 冻干; 以 1 mg/ml 溶解于碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH9.6), 5 000 rpm 离心 15 min, 分装澄清的上清液, 于-20℃保存。

2.2 细菌培养及黏附实验

试验所用乳酸杆菌 (见表 1) 都为实验保存菌种。细菌悬浮于含有 15% 甘油的 MRS 培养基, 保存在-70℃。实验前活化, 转接于 MRS 培养基, 连续 2 次。

参考 Gross 等^[4]的方法研究乳酸杆菌向黏液的黏附行为, 并做了适当修改。把 150 μl 鸡或大鼠肠道黏液分别加到 96 孔微孔板 (BIOFIL) 的微孔, 过夜 (4℃), 用 PBS+1% Tween20 封闭 1 h (RT), 用 PBST 洗 2 次, 倒置风干; 把细菌在 MRS 培养基深层培养过夜 (16 h, 37℃), 收集细菌 1.4 ml (9 000 rpm 离心 5 min), 调节 A₆₀₀ 到 0.5±0.02, 分别按稀释比例悬浮于 PBST 或 MRS 液体培养基, 每孔加入 200 μl, 孵育 1 h (37℃), 用 PBST 洗 1 次; 在一部分实验中细菌黏附后在倒置显微镜下观察细菌黏附情况, 把其余的 96 孔板倒置风干, 用 0.1% 番红染色 30 s, 用 PBST 轻轻洗 2 次, 倒置风干, 测定 A₄₉₂。以 PBS 作为对照, 每组做 6 个重复, 连续进行 2 次实验。

2.3 乳酸杆菌肽聚糖的提取

按照修改的^[5]方法提取肽聚糖。把 *Lactobacillus* sp. 在 MRS 培养基培养 48 h (37℃), 迅速置于冰浴, 离心收获细菌 (2 000 rpm 10 min, 4℃), 用无菌水洗 4 次。置于沸水浴 20 min, 超声处理破碎细胞壁。离心 (1 000 rpm 15 min) 去除没破碎的菌体。离心上清液 (10 000 rpm 10 min), 去上清液, 取沉淀物与 2% SDS 孵育 30 min (60℃), 用无菌水洗 4 次, 再用无水乙醇洗 3 次。用 0.02% 胰蛋白酶 (0.1 mol/l 溶于 Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5) 消化 20 h (37℃)。用无菌水洗 4 次, 冻干。悬浮于 10% 三氯乙酸中摇动 20 min (60℃), 离心收集肽聚糖 (10 000 rpm 20 min), 用无菌水洗 15 次, 冻干。

2.4 乳酸杆菌肽聚糖对机体免疫细胞基因表达的基因芯片分析

把 9 只雄性健康 Balb/c 小白鼠随机分成 2 组, 另一组为对照组, 每组 3 只, 对照组小鼠每日腹腔注射无菌 PBS; 实验组小鼠每日腹腔注射由无菌 PBS 配制的乳杆菌肽聚糖 25 mg/kg, 1 组注射 1 次, 1 组连续 3 d, 注射后第 2 d 眼球放血处死后, 于 75% 乙醇中消毒 3~5 min, 在超净工作台中无菌取出每只鼠的腹腔细胞, 按组别合并。脾细胞按常规制细胞悬液, 也按组别合并。每组分别取腹腔细胞和脾细胞各 1×10⁷, 等量合并作为组待测样品, 2 000 rpm 离心 10 min, 弃上清后加入 2 ml Trizol 细胞裂解液, 在超净工作台中用 10 号口径吸管反复吹打均匀后在液氮中速冻, 于-70℃超低温冰箱中保存。

按照 Affymetrix 实验规程 (<http://www.Affymetrix.com>) 提取 RNA 并用 Affymetrix MOE430A 基因芯片分析基因表达变化。

2.5 统计分析

用 SPSS ver10.0 中的 one way ANOVA 进行方差分析, 并用 LSD 法进行多重比较。

用 Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) 和 Data Mining Tool Version 2.0 (Affymetrix) 处理和分析基因数据。在 <http://www.geneontology.org> 上在线分析基因表达变化的功能分布。

3 结果

3.1 *Lactobacillus* sp. 的黏附性

在本研究中, 被固定于 96 孔酶标板微孔的鸡或大鼠小肠黏液用来作为黏附基质, 共分析了 5 种乳酸杆菌在体外向黏液的黏附的能力。结果发现, *Lactobacillus* sp. 黏附于鸡和大鼠的小肠黏液的能力最强 (表 1)。无论把乳酸杆菌悬浮于 PBST 还是 MRS 黏附, 结果均相似 (图 1)。

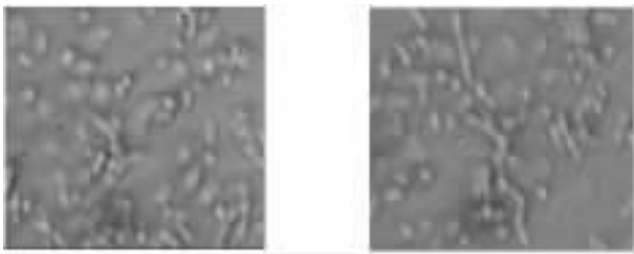


图 1 黏附于鸡 (左) 和大鼠 (右) 小肠黏液的 *Lactobacillus* sp.
Fig. 1 Adhesion of *Lactobacillus* sp. to chicken and rat mucus immobilised into microtitre wells

表 1 5 种乳酸杆菌在小肠黏液的黏附能力
Tbl. 1 Adhesion of *Lactobacillus* sp. immobilized mucus

细菌	黏附 (A492)	
	大鼠小肠黏液	鸡小肠黏液
<i>Lactobacillus</i> sp.	0.100±0.0498 ^a	0.353±0.162 ^a
<i>Lactobacillus casei</i>	0.023±0.011 ^b	0.298±0.021 ^b
<i>Lactobacillus platum</i> 01	0.045±0.021 ^b	0.267±0.087 ^b
<i>Lactobacillus platum</i> 02	0.034±0.019 ^b	0.195±0.067 ^b
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	0.055±0.018 ^b	0.425±0.068 ^b

注: 上标为不同标号表示差异显著 (P<0.05)

3.2 基因表达变化的总体分析

用乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.) 肽聚糖刺激 Balb/c 小鼠后, 提取 mRNA, 杂交到寡核苷酸芯片 (MOE430A genechip, 含有 22,690 寡核苷酸探针), 进行基因表达分析, 基因表达的变化用信号对数比率表示 (SLR)。基因表达的总体情况见图 1, 用肽聚糖刺激小鼠 1 次和 3 次, 分别引起 1 580 和 519 条基因表达显著上调 (SLR>1), 其中有 125 条基因是两个刺激条件共反应的基因。刺激 1 次和 3 次后分别有 1 752 和 338 条基因表达显著下调 (SLR>1), 其中有 191 条是共反应基因 (见图 2)。根据 Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>), 这些共反应基因可以归入 10 个功能分类, 各功能类别所占的比例见表 2。可以看出有 59% 的基因与应激反应、信号传导和代谢有关。上调基因中有关免疫反应和信号传导的基因共占到 44%, 而下调基因只有 14%。



图 2 基因表达改变的总体情况
Fig. 2 General information of genes expression change
(注: I 刺激 1 次, II 刺激 3 次)

表 2 乳酸杆菌肽聚糖响应基因的功能分布 (%)
Tbl. 2 Functional profiles of expression differently changed by *Lactobacillus* sp. PG (%)

功能分类	上调基因	下调基因	功能分类	上调基因	下调基因
转录调控	13	8	细胞周期	16	10
细胞凋亡	2	3	细胞分化	3	4
代谢	9	42	信号传导	16	10
细胞黏附	7	5	应激反应	28	12
生物合成	6	6	物质转运	8	8

3.3 乳酸杆菌肽聚糖对 TLR-NF- κ B 信号通路基因表达的影响

MyD88 依赖型的 TLR-NF- κ B 信号通路是肽聚糖与免疫呈递细胞作用后主要激活的一条信号通路,此信号通路被激活产生的细胞因子等产物,具有调节免疫的作用。乳酸杆菌肽聚糖刺激后有 17 条与 TLR-NF κ B 信号通路相关的基因表达在两种刺激后发生了不同的表达变化,根据 KEGG 数据库(<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)提供的 TLR-NF- κ B 信号通路图进行分析,可以发现,乳酸杆菌肽聚糖刺激主要对 MyD88 依赖的 NF- κ B 信号通路产生影响(见图 3),刺激 3 次后,TLR2 的表达显著上调,用肽聚糖刺激 1 次后 MyD88 的表达受到了抑制,而白细胞介素 1 受体关联激酶 1(Trak1)的表达被激活。肽聚糖刺激 3 次后肿瘤坏死因子受体关联因子(Traf6)、NF- κ B1 和 NF- κ B2 的表达上调;两种刺激之后,NF- κ B 信号通路的产物中,IL-1、IL-6、CD80、CD86 等的表达均上调。Th1 型细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 分别在刺激 1 次和 3 次之后上调。不同剂量 PG 对 Tollip 表达的诱导作用也不同,刺激 1 次后其表达没有变化,而刺激 3 次后,其表达发生了上调。

4 讨论

乳酸杆菌的黏附对其免疫调节作用有重要的意义。Ouwehand 等^[6]研究表明,双歧杆菌对胃肠道黏膜的黏附能力与人的年龄有负相关关系,随着年龄的增长人或动物的黏膜反应有削弱的趋势,这可能是肠道黏附和定植的乳酸菌减少的结果。有一些研究已经表明,乳酸杆菌的黏附性能与其免疫调节作用之间有一定的关系,有强黏附性的乳酸杆菌(如 *Lactobacillus GG*, *L. rerteri* 等)比弱黏附性的乳酸杆菌(如 *L. delbrueckii* spp.*bulgarica*)能更好地增加抗轮状病毒 IgA 的分泌,并能更强地提高 IgA 特异性抗原呈递细胞的水平^[7-10]。食用含有强黏附性乳酸杆菌(如 *L. johnsonii* Lj1)能更好地增加吞噬细胞在体外吞噬大肠杆菌的能力^[11]。

在肠道,抗原呈递主要发生在派伊尔斑(pp)的滤泡相关上皮(FAE)。FAE 由单层柱状上皮细胞和散在分布的 M 细胞组成^[12]。

FAE 中 M 细胞的含量很少,但是它们可能在吸收益生菌菌体继而诱导免疫反应的过程中发挥重要作用。和其它肠道上皮细胞细胞不同,M 细胞膜通常没有厚得糖萼^[13],但存在独特的配糖体。这些糖配体可能是与细菌凝集素发生配体/受体黏附作用的靶标。Lelouard 等^[14]发现,M 细胞外膜顶端至少表达有 3 种糖配体与黏液素(Muc2)的糖抗原决定簇相同。所以细菌可能以与黏液素黏附相似的机制黏附到 M 细胞,从而进入 PP,引发免疫反应。Link-Amster 等^[15]发现,小鼠摄入 *Lactobacillus murinus* 后,菌体或细胞残片可以通过 PP 进入肠道上皮下层,而内源乳酸杆菌也可以通过“生理性移位”进入脾脏或其它组织^[16]。乳酸杆菌生理移位后其 CAMPs 将会与抗原呈递细胞接触,这可能是引发免疫调节作用的主要途径之一。

体外实验的结果表明,*Lactobacillus* sp.可以明显地黏附于鸡或大鼠的黏液,表明这种乳酸杆菌在体内具有潜在的定植能力。因为黏液中的主要黏附受体是黏液素^[8],所以乳酸杆菌也可以通过相似的机制黏附到 M 细胞,具有通过“生理性移位”与免疫细胞发生作用的潜能。分析其肽聚糖与机体免疫细胞作用后基因表达变化的结果表明,用乳酸杆菌肽聚糖刺激小鼠时,可以诱发免疫调节性细胞因子等的表达。这些蛋白质的表达,有利于提高机体的免疫监督作用。

最近的研究表明,许多优良的益生菌主要通过诱导 Th1 型免疫反应调节宿主免疫功能。这一作用可能主要是通过 Th1 型免疫反应相关细胞因子表达实现的^[17]。本研究中,乳酸杆菌肽聚糖刺激 1 次和 3 次分别诱导了 Th1 型细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的表达,暗示免疫反应将向 Th1 型极化。IL-10 对 Th1 免疫反应具有负调节作用,IL-10 在刺激 3 次后也显著上调,表明肽聚糖诱导的 Th1 免疫反应是受机体调节的。这可能是乳酸杆菌可以增强机体免疫功能,但不会由于免疫反应过度激活引起组织损伤的原因。

本研究也发现,乳酸杆菌对细胞因子表达的诱导作用有剂量依赖性。细胞因子是 TLR-NF- κ B 信号通路激活的产物。本研究中,肽聚糖刺激频率对 TLR-NF- κ B 信号通路相关分子表达有影响。其中肽聚糖对 Tollip 表达的调节可能对整个通路的激活状态有重要影响。Tollip 是 TLR-NF- κ B 信号通路的负调节因子^[18]。本研究发现 Tollip 的表达有 PG 剂量依赖性,这可能是不同剂量 PG 影响 NF- κ B 信号通路的激活状态和细胞因子的表达变化的原因。不同种和同种不同剂量乳酸杆菌免疫调节作用的差异可能与其进入体内后实际与抗原呈递细胞发生作用的 PG 的量有关。

5 结论

Lactobacillus sp. 可以黏附到肠道液上,具有潜在的定植能力。不同剂量乳酸杆菌肽聚糖可以对免疫信号接受系统调节因子表达和信号传导系统激活状态进行调节,从而控制细胞因子表达,调节机体免疫功能。乳酸杆菌 CAMPs(如肽聚糖)可能是介导乳酸杆菌免疫调节作用的主要物质。

参考文献(References)

- [1] OUWEHAND A C, ISOLAURI E, KIRJAVAINEN P V, et al. Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 172: 61-64.
- [2] CARIO E, BROWN D, MCKEE M, et al. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium[J]. Am J Pathol, 2002,160(1):165-73.
- [3] OUWEHAND A C, KIRJAVAINEN P V, SHOR C, et al. Probiotics: mechanisms and established effects [J]. Int Dairy J, 1999,9: 43-52.

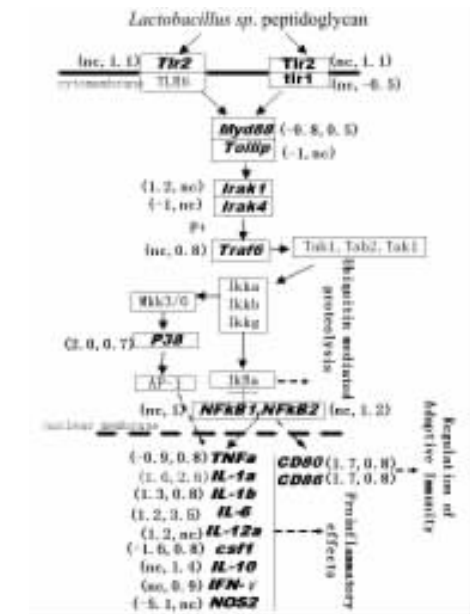


图 3 乳酸杆菌 PG 对 TLR-NF- κ B 信号通路相关基因表达的影响

Fig. 3 Functional mapping of effect of *Lactobacillus* sp. PG on genes related to TLR-NF- κ B pathways
注: 括号左面的数字表示刺激 1 次后表达的变化, 右边为刺激 3 次后表达的变化

基于遗传算法获取正则参数的一种新方法

A New Method of Choice Regularization Parameters Based on Genetic Algorithm

邹学文/ZOU Xue-wen,王宝娥/WANG Bao'e,寇 婷/KOU Ting,闵 涛/MIN Tao

西安理工大学,西安 710048

Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China

[摘要] 研究了正则化方法中正则参数的选择问题,提出了利用遗传算法获取正则参数的一种新方法。大量的数值模拟结果表明:该方法在处理大规模不适定问题时具有一定的优越性,是一种实用有效的方法。

[关键词] 反问题,正则化,正则参数,遗传算法 **[中图分类号]** O24

[文献标识码] A **[文章编号]** 1000-7857(2006)02-0046-04

Abstract: This paper deals with the parameter choice problems in the regularization method, give out a new method (genetic algorithms) for solving this question. Numerical result represents that this method is feasible and efficient.

Key Words: inverse problem, regularization, regularization parameter, genetic algorithms

CLC Number: O24

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)02-0046-04

1 引言

反问题是数学物理研究的一个热点问题,但是数学物理反问

题的求解面临的一个本质性困难是不适定性^[1]。多年来,人们对不适定问题的求解已发展了许多方法,诸如脉冲谱技术(PST)、广

收稿日期:2005-10-09

基金项目:国家 863 计划项目(2005AA113150),国家自然科学基金项目(50279041)

作者简介:邹学文,男,西安市金花南路5号西安理工大学,讲师,研究方向为数学物理反问题;E-mail: zouxw@xuat.edu.cn

- [4] GROSS M, CRAMTON S E, GOTZ F, et al. Key role of Teichoic acid net charge in staphylococcus aureus colonization of artificial Surface[J]. Infect Immun, 2001, 65: 3 423-3 426.
- [5] SARKA B, DOMINIC M D, MICHAEL J P. Structure of biologically active muramyl peptides from peptidoglycan of Streptococcus Sanguis[J]. J Mass Spectrom, 1998, 33: 1 182-1 191.
- [6] OUWEHAND A C, NIENI P, SALMINEN S J. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 177: 35-38.
- [7] KIRJAVAINEN P V, TUOMOLA E M, CRITTENDEN R G, et al. *In vitro* adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli[J]. Infect Immun, 1999, 67: 2 653-2 655.
- [8] MAJAMAA H, ISOLAURI E, SAXELIN M, et al. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995, 20: 333-338.
- [9] SHORNIKOVA A V, CASAS I A, ISOLAURI E, et al. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhoea in young children[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1997, 24: 399-404.
- [10] TUOMOLA E M, OUWEHAND A C, SALMINEN S J. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics [J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 28: 159-163.
- [11] SCHIFFRIN E J, ROCHAT F, LINK-AMSTER H, et al. Im-

- munomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria[J]. J Dairy Sci, 1994, 78: 491-497.
- [12] LAISSUE J A, CHAPPUIS B B, MUKLLER C, et al. The intestinal immune system and its relation to disease [J]. Dig Dis, 1993, 11: 298-312.
- [13] GIANNASCA P J, GIANNASCA K T, LEICHTNER AM, et al. Human intestinal M cells display the sialyl lewis a antigen [J]. Infect Immun, 1999, 67(2): 946-953.
- [14] LELOUARD H, REGGIO H, ROY C, et al. Glycocalyx on rabbit Intestinal M cells displays carbohydrate epitopes from muc2[J]. Infect Immun, 2001, 2001, 69(2): 1 061 - 1 071.
- [15] LINK-AMSTER H, ROCHAT F, SAUDAN K Y, et al. Modulation of a specific humoral immuneresponse and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1994, 10: 55-63.
- [16] BERG R D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract [J]. Trends Microbiol, 1995, 3: 149-154.
- [17] MARTIN L C. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health [J]. Clinical and Applied Immunology Reviews, 2002, 3: 115-125.
- [18] ZHANG G, GHOSH S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by tollip[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 7 059-7 065.

(责任编辑 王 芷)