

· 基础研究 ·

乳酸杆菌对过敏性鼻炎模型大鼠免疫功能的影响*

胡晓艳¹, 姜 梁^{2△}

(1. 泸州医学院病原生物学教研室, 四川泸州 646000;

2. 泸州医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨乳酸杆菌对过敏性鼻炎(AR)大鼠血清中 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平等免疫指标的影响。方法 SD 大鼠 60 只随机分为正常对照组、模型组、乳酸杆菌组及阳性药对照组共 4 组, 每组 10 只。乳酸杆菌组每天用乳酸杆菌活菌制剂灌胃 3 周; 建立大鼠卵清蛋白致敏模型; 阳性药对照组灌胃氯雷他定; 另外 20 只大鼠用于被动皮肤过敏试验(PCA), 检验大鼠模型制备及治疗情况; 测定实验各组大鼠血清 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平, 检测鼻分泌物中嗜酸性粒细胞(EOS)水平。结果 模型组 IL-4、IL-5 水平显著高于正常对照组($P < 0.05$), IFN- γ 水平降低, 低于正常对照组($P < 0.05$)。乳酸杆菌组 IL-4、IL-5 水平均显著低于模型组($P < 0.05$), IFN- γ 水平增加, 高于模型组($P < 0.05$)。乳酸杆菌组各项指标与阳性药对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 乳酸杆菌可下调 AR 大鼠血清中 IL-4、IL-5 水平, 上调 IFN- γ 水平, 调节 Th1/Th2 淋巴细胞亚群平衡, 减轻鼻黏膜变应性炎症。

关键词: 乳酸杆菌; 过敏性鼻炎; 免疫功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)23-2752-02

Lactobacillus on allergic rhinitis rat models of the influence of the immune function*

Hu Xiaoyan¹, Jiang Liang^{2△}

(1. Department of Medical Microbiology and Parasitology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective Explore the effect lactobacillus on allergic rhinitis(AR) rat serum IL-4, IL-5, IFN- γ concentration and the influence of immune markers. **Methods** SD rat 60 were randomly divided into 4 groups, each group of 10 only. Lactic acid bacteria group every day with lactobacillus living bacterium preparations irrigation stomach 3 weeks, establish rats LuanBai protein sensitization model, positive drug control group irrigation stomach loratadine; Another 20 rats used for passive cutaneous anaphylaxis (PCA), inspection in the rat model preparation and treatment. Determination test group rats serum IL-4, IL-5, IFN- γ , the content of Eos in nasal secretion was detection. **Results** Model group IL-4, IL-5 content was significantly higher than normal control group ($P < 0.05$), IFN- γ levels were low, lower than the normal control group ($P < 0.05$). Lactic acid bacteria group IL-4, IL-5 content were significantly lower than the model group ($P < 0.05$), IFN- γ content increased, higher than the model group ($P < 0.05$). The index of lactobacillus group with positive drug compared difference was statistically significant. **Conclusion** Lactic acid bacteria can cut AR rats serum IL-4, IL-5 level, increase IFN- γ level, adjust Th1/Th2 lymphocyte subsets balance, reduce nasal mucosa allergic inflammation.

Key words: lactobacillus; allergic rhinitis; immunologic function

过敏性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是特异性个体接触致敏原后由 IgE 介导的递质释放、并有多免疫活性细胞和细胞因子参与的鼻黏膜慢性炎症反应性疾病^[1]。在普通人群的患病率为 10%~40%, AR 的主要临床表现有鼻塞、流鼻涕、鼻痒、打喷嚏以及嗅觉功能障碍等。此外, 它还可以导致或并发鼻窦炎、鼻息肉、咽炎、中耳炎、气管和支气管炎、哮喘和变应性眼结膜炎等, 并可影响患者的睡眠、学习、工作、发声功能、面部发育乃至生活质量。AR 是诱发支气管哮喘的危险因素之一, 两病常同时或先后发生^[2]。本研究通过检测乳酸杆菌对 AR 大鼠多种细胞因子的作用, 探索乳酸杆菌对 AR 大鼠免疫功能的调节机制。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 加氏乳酸杆菌(ATCC19992), 购于上海三踏生物科技有限公司。

1.1.2 实验动物 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只由泸州医

学院实验动物中心提供, SPF 级, 雌性, 3 周龄, 体质量 40~60 g。

1.1.3 药物及培养基 卵清蛋白(ovalbumin, OVA), 购于美国 Sigma 公司(V 级); 氢氧化铝[Al(OH)₃], 上海桃浦化学试剂公司; IL-4、IL-5 和 IFN- γ ELISA 试剂盒由美国 R&D 公司进口分装。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 SD 大鼠 60 只随机分为正常对照组、模型组、乳酸杆菌组及阳性药对照组 4 组, 每组 10 只。另 20 只用于被动皮肤过敏试验(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)。

1.2.2 灌胃大鼠 乳酸杆菌组每天用乳酸杆菌活菌制剂 1.5 mg/g, 以无菌稀释液溶解后灌胃 3 周; 正常对照组、模型组及阳性药对照组均予无菌稀释液灌胃 3 周。

1.2.3 建立 OVA 致敏模型 3 周后模型组、乳酸杆菌组及阳性药对照组开始建立 OVA 致敏模型: 第 1 天用含 10 μ g OVA

* 基金项目: 四川省卫生计生厅科研基金资助项目(100241)。 作者简介: 胡晓艳(1979~), 讲师, 硕士, 研究方向为益生菌的免疫调节功能。

△ 通讯作者, Tel: 13882725713; E-mail: tiger56821015@163.com。

及 1 mg Al(OH)₃ 的无菌生理盐水 0.5 mL 腹腔注射进行基础致敏,第 15 天用含 10 μg OVA 的无菌生理盐水 0.5 mL 腹腔注射强化致敏,强化致敏后第 1 天开始每天 1 次用 50 μL 的 2 mg/mL OVA 滴鼻,连续应用 15 d,对大鼠进行激发,观察大鼠喷嚏流涕等 30 min,记录大鼠行为学得分。正常对照组则在上述时间用无菌生理盐水进行假致敏和假激发。

1.2.4 给药 阳性药对照组灌胃给予氯雷他定 5 mg/kg,用无菌生理盐水稀释,灌胃给药 1 mL/kg;乳酸杆菌组和正常对照组灌胃给予同等剂量的无菌生理盐水。各组于滴鼻前 1 h 给药,每天 1 次,共 10 次。

1.2.5 PCA 反应 参照文献[3]的方法。

1.2.6 血清的制备 各组大鼠最后 1 次激发 24 h 后,将大鼠用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,剪开腹部皮肤,暴露腹主动脉,用一次性注射器(预先用 1:25 肝素湿润)抽取腹主动脉血 8 mL,立即注入抗凝管中,静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,-70 °C 保存备用。

1.2.7 鼻分泌物涂片检查 微型小棉棒伸入大鼠鼻腔轻擦鼻甲表面 3 次,制作涂片,HE 染色,光镜下观察并行分泌物嗜酸性粒细胞(EOS)计数。

1.2.8 细胞免疫因子的检测 采用 ELISA 法检测试验各组大鼠血清 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平。

1.2.9 评分标准 见表 1。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件对数据进行分析处理,采用方差分析进行组间比较,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠 AR 模型行为学观察 模型组、乳酸杆菌组及阳性药对照组 30 只大鼠总分超过 5 分,即有 30 只造模成功。

表 1 大鼠 AR 模型鼻部症状的评分标准

症状	轻度	中度	重度
鼻痒	亲碰数次	两者之间	四处摩擦
鼻涕	可见鼻涕少量	涕过中线	涕流满面
喷嚏	1~3 次	3~9 次	9 次以上
评分	1 分	2 分	3 分

2.2 PCA 模型组 PCA 试验阳性率为 97%,其余 3 组全部表现为阴性。

2.3 各组大鼠鼻腔分泌物 EOS、血清 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平比较 模型组大鼠的鼻腔分泌物 EOS 计数明显增多,高于正常对照组($P < 0.05$)。乳酸杆菌组和阳性药对照组大鼠的鼻腔分泌物 EOS 计数比模型组明显减少($P < 0.05$)。乳酸杆菌组与阳性药对照组大鼠的鼻腔分泌物 EOS 计数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组大鼠血清 IL-4、IL-5 水平增加,高于正常对照组($P < 0.05$);IFN-γ 水平降低,低于正常对照组($P < 0.05$)。乳酸杆菌组和阳性药对照组 IL-4、IL-5 水平降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);IFN-γ 水平增加,高于模型组($P < 0.05$)。乳酸杆菌组与阳性药对照组 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠鼻腔分泌物 EOS、血清 IL-4、IL-5、INF-γ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EOS 计数(%)	IL-4(pg/mL)	IL-5(pg/mL)	IFN-γ(ng/mL)
正常对照组	10	0*	9.16 ± 1.58*	14.13 ± 2.05*	26.75 ± 2.64*
模型组	10	9.05 ± 1.06	52.87 ± 4.26	55.85 ± 3.89	19.57 ± 1.89
乳酸杆菌组	10	5.32 ± 1.36*	16.32 ± 2.37*	21.71 ± 3.14*	26.71 ± 3.04*
阳性药对照组	10	3.91 ± 1.53*	12.21 ± 3.59*	17.84 ± 6.31*	28.91 ± 3.27*

*: $P < 0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

从免疫学角度来看,AR 是体外环境因素作用于机体导致的异常免疫反应,造成 Th1 和 Th2 免疫反应失衡而引发的、以鼻腔黏膜 Th2 免疫反应为主的变应性炎症反应,其主要的免疫病理学特征是组织中大量表达 Th2 细胞因子的细胞浸润[4]。Th1 细胞的功能主要依赖 IFN-γ 实现。而 Th2 细胞功能主要依赖 IL-4、IL-5 等[5]。有研究证据表明,通过诱导 Th1 型细胞的反应来调节 Th2 型细胞的细胞因子分泌谱可以改善与 Th2 相关的疾病[6-7]。据报道,IFN-γ 等 Th1 型淋巴细胞及其细胞因子可以抵抗并抑制 Th2 型反应导致的过敏性疾病[8]。事实上,IFN-γ 分泌的下调会增加过敏性疾病发病的可能,患严重哮喘的患者接触过敏原后常呈现出明显的 IFN-γ 下调[9]。甚至有人发现过敏反应的消退似乎与 IFN-γ 分泌的正常化有关[10]。因此,Th1/Th2 淋巴细胞亚群平衡及自身调节对过敏性疾病的发生、发展有着极其重要的作用。

益生菌是一群生活在机体内有益于宿主健康的微生物,它维护人体健康和调节免疫功能的作用已被广泛认可。乳酸杆菌是一类革兰阳性厌氧或微需氧,发酵糖类以产生乳酸为主的杆菌,广泛存在于人体的口腔、泌尿生殖道、胃肠道内,是一种重要的益生菌。大量研究证明,乳酸杆菌是通过激活宿主多种免疫细胞和诱导多种细胞因子而发挥免疫调节的作用[11]。乳酸

杆菌可诱导人外周单核细胞产生 Th1 型细胞因子 IL-2、IL-18 和 IFN-γ[12];乳酸杆菌细胞壁成分具有诱导产生多种细胞因子(IFN-γ、IL-12 等)的功能[13]。口服乳酸杆菌可在小鼠体内产生菌株依赖的细胞因子,这些细胞因子决定了免疫应答的方向和效果[14]。本研究建立 AR 动物模型,其鼻分泌物中 EOS 水平显著增加,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),证实利用 OVA 致敏和激发可成功复制 AR 大鼠模型。实验结果显示,乳酸杆菌组能显著降低鼻分泌物中 EOS 水平($P < 0.05$),与阳性药对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),印证了 AR 大鼠模型中存在着以 Th2 为主的细胞免疫。同时,乳酸杆菌组能显著下调 IL-4、IL-5 水平,上调 IFN-γ 水平,与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);乳酸杆菌组与阳性药对照组 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

综上所述,乳酸杆菌可调节 Th1/Th2 淋巴细胞亚群平衡,诱导 Th 向 Th1 分化,抑制 Th2 的表达,促进 IFN-γ 的产生,抑制 IL-4、IL-5 的形成,从而减轻 EOS 的活化和浸润,以调节 AR 大鼠的免疫功能,减轻 AR 的炎症反应,达到治疗目的。

(下转第 2757 页)

实验周期短,节约资金和人力成本。是一种经济有效的建立脑转移癌动物模型的方法。

3.3 颈内动脉注射手术技巧。术中钝性分离胸锁乳突肌及肩胛舌骨肌以暴露颈动脉鞘,暴露困难时可剪断肩胛舌骨肌。解剖游离出颈动脉时注意不要过度牵拉或损伤迷走神经以及颈动脉鞘下方的颈交感干。上微血管夹时避开颈动脉分叉处、迷走神经以及颈交感干。手术中小鼠死亡 1 只,手术死亡率为 6.25%。考虑系牵拉迷走神经导致心跳呼吸骤停,注射成功后 10-0 强生公司 prolene 缝线缝合血管穿刺口,轻压颈动脉穿刺点 1~3 min 均即可以可靠止血。

参考文献:

- [1] Schackert G, Fidler IJ. Development of in vivo models for studies of brain metastasis[J]. *Int J Cancer*, 1988, 41(5): 589-594.
- [2] Kaal EC, Niël CG, Vecht CJ, et al. Therapeutic management of brain metastasis[J]. *Lancet Neurol*, 2005, 4(2): 289-298.
- [3] Santarelli JG, Sarkissian V, Hou LC, et al. Molecular events of brain metastasis[J]. *Neurosurg Focus*, 2007, 22(3): 352-354.
- [4] Hoshikawa H, Kishino T, Mori T, et al. The value of 18F-FLT PET for detecting second primary cancers and distant metastases in head and neck cancer patients[J]. *Clin Nucl Med*, 2013, 28(1): 68-71.
- [5] Yi CA, Lee KS, Lee HY, et al. Coregistered whole body magnetic resonance imaging-positron emission tomography (MRI-PET) versus PET-computed tomography plus brain MRI in staging resectable lung cancer: Comparisons of clinical effectiveness in a randomized trial[J].

Cancer, 2013, 10(2): 235-237.

- [6] Schackert G. Surgery of brain metastases-pro and contra [J]. *Onkologie*, 2002, 25(5): 480-481.
- [7] Wilhelm I, Molnár J, Fazakas C, et al. Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 138-141.
- [8] Escalona Zapata J. Astrocytes in brain tumours, Differentiation or trapping? [J]. *Histol Histopathol*, 1994, 9(2): 325-328.
- [9] Zhang M, Olsson Y. Reactions of astrocytes and microglial cells around hematogenous metastases of the human brain. Expression of endothelin-like immunoreactivity in reactive astrocytes and activation of microglial cells[J]. *J Neurol Sci*, 1995, 134(1): 26-32.
- [10] Escartin C, Bonvento G. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy[J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 38(3): 231-241.
- [11] Ridet JL, Malhotra SK, Privat A. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function[J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(5): 570-577.
- [12] Kim SJ, Kim JS, Park ES, et al. Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(3): 286-298.
- [13] Lin Q, Balasubramanian K, Fan D, et al. Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(9): 748-754.

(收稿日期: 2013-02-12 修回日期: 2013-05-18)

(上接第 2753 页)

参考文献:

- [1] 田勇泉. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 63-69.
- [2] 孔维佳, 许庚, 董震, 等. 变应性鼻炎的流行病学与治疗[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 23(8): 376-378.
- [3] 张枢, 王宇, 张宇. 艾叶挥发油治疗大鼠变应性鼻炎的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(9): 787-789.
- [4] Kay AB. Allergy and allergic diseases; first of two parts [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(3): 330-337.
- [5] Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy[J]. *Immunotechnology*, 1998, 20(3): 233-244.
- [6] Singh VK, Mehrotra S, Agarw AS. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines; its relevance to autoimmunity and allergy[J]. *Immunol Res*, 1999, 20(1): 147-161.
- [7] Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttill RW, et al. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation; paradigm lost? [J]. *Crit Rev Immunol*, 1999, 19(2): 155-172.
- [8] Cohn L, Homer RJ, Niu N, et al. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production[J]. *J Exp Med*, 1999, 190(9): 1309-1318.

- [9] Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, et al. Reduced interferon gamma production in infants with bronchiolitis and asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159(5Pt 1): 1417-1422.
- [10] Smart JM, Horak E, Kemp AS, et al. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma; resolution of asthma is associated with normalization of IFN gamma responses[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(3): 450-456.
- [11] Cross ML, Gill HS. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 125(2): 112-119.
- [12] Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, et al. *Lactobacilli* and *streptococci* induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(12): 6058-6062.
- [13] Chen T, Isomaki P, Rimpilainen M, et al. Human cytokine responses induced by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 118(2): 261-267.

(收稿日期: 2013-01-23 修回日期: 2013-05-12)