

地衣芽孢杆菌对小鼠抗疲劳和免疫调节功能的研究

高翔,李妍妍,徐彩云,苏秀榕*

(宁波大学生命科学与生物工程学院,浙江宁波 315211)

摘要:目的:为了证明地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)能调节肠道微生态并能促使机体产生抗菌活性物质,具有抗疲劳和免疫调节功能,本研究利用小鼠研究了抗疲劳和免疫调节的作用。方法:将小鼠随机分成空白对照组、高、低两个实验组和阳性对照组,灌胃6周后,通过转棒时间、全血乳酸、血清尿素氮(BUN)、肝糖原及肌糖原测定观察小鼠的抗疲劳能力,通过免疫器官相对重量称重、Con A诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验及小鼠碳粒廓清实验研究小鼠的相关免疫学指标。结果:地衣芽孢杆菌能明显延长小鼠转棒时间、降低全血乳酸值和血清尿素氮值、增加肝糖原及肌糖原含量;增强小鼠Con A诱导的脾淋巴细胞转化及小鼠碳粒廓清指数。结论:地衣芽孢杆菌可增强小鼠抗疲劳能力和免疫调节作用。

关键词:地衣芽孢杆菌,抗疲劳,免疫调节

Study on anti-fatigue and immunomodulation effects of *Bacillus licheniformis* on mice

GAO Xiang, LI Yan-yan, XU Cai-yun, SU Xiu-rong*

(Faculty of Life Science and Biotechnology of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Objective: In order to prove the *Bacillus licheniformis* that can regulate the intestinal microecology through the effect of biology scrambling oxygen and induce body to produce the antibacterial material, have anti-fatigue and immune regulatory function, the effects of *Bacillus licheniformis* on anti-fatigue and immunomodulation effect in mice were studied in this article. Methods: Mice were randomly divided into normal group, group of low-dose, group of high-dose and positive group. After 6 weeks, claiming time, blood lactic acid, BUN, hepatic glycogen and muscle glycogen were tested for the anti-fatigue, and the index of spleen and thymus organs, the capacities of lymphocyte proliferation induced by Con A, the clearance rate of carbon particles were determined for the immunomodulation. Results: In comparison with the control group, the *Bacillus licheniformis* could improve the claiming time, reduce the contents of blood lactic acid and BUN and add the contents of hepatic glycogen and muscle glycogen. The capacities of lymphocyte proliferation induced by Con A and the indexes of the clearance rate of carbon particles were enhanced. Conclusion: *Bacillus licheniformis* has the ability of anti-fatigue and improving the immunomodulation effect in mice.

Key words: *Bacillus licheniformis*; anti-fatigue; immunomodulation

中图分类号: Q939.124

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)09-0328-03

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是芽孢杆菌中较具应用潜力的菌种之一。近年来,国内外对于地衣芽孢杆菌各方面应用的报道日益增多。在医药、饲料加工、农药等行业,取得了较好的研究成果^[1]。有研究表明,地衣芽孢杆菌对家兔的体液免疫功能有促进作用^[2],对地衣芽孢杆菌 TS-01 胞外多

糖进行研究,结果显示其具有清除自由基、增强免疫活性、抑制致病菌能力^[3],不同剂量芽孢杆菌制剂对黄鸡免疫功能的影响进行研究,结果显示,地衣芽孢杆菌对黄鸡免疫功能有一定的提高作用,它通过生物夺氧效应调节肠道微生态并能促使机体产生抗菌活性物质,具有一定的抗疲劳和免疫调节功能。因此本文用不同剂量地衣芽孢杆菌灌胃小鼠,观察其抗疲劳和免疫调节能力,为进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期:2009-08-12 *通讯联系人

作者简介:高翔(1985-),男,硕士在读,研究方向:食品科学。

基金项目:浙江省重大科技攻关项目(2006C13089);宁波市科技局资助项目(2008C50027)。

表1 地衣芽孢杆菌对小鼠体能和应急的作用

组别	初始体重 (g)	终期体重 (g)	转棒时间 (min)	Y字迷宫时间 (s)	Y字迷宫次数 (次)
空白	25.11 ± 1.31	28.91 ± 3.27	81.63 ± 26.28	14.43 ± 9.44	7.88 ± 3.09
低剂量组	24.68 ± 1.87	28.00 ± 3.49	131.09 ± 55.83 ^a	11.26 ± 6.45 ^b	11.88 ± 2.70 ^a
高剂量组	25.24 ± 2.10	28.13 ± 2.94	139.36 ± 49.06 ^b	12.12 ± 7.00 ^a	10.90 ± 2.02 ^a
阳性对照组	24.65 ± 2.14	26.70 ± 2.66	152.45 ± 38.20 ^b	12.23 ± 7.41 ^a	11.00 ± 1.41 ^a

注:与空白对照组比较,a:P<0.05,b:P<0.01。表2、表4同。

地衣芽孢杆菌 本实验室分离保存;印度墨汁 西安罗森佰科技有限公司;MTT、刀豆蛋白A 均购于美国 sigma 公司;RPMI1640 购自美国 GIBCO 公司;小牛血清 上海蓝季生物科技有限公司;全血乳酸、血尿素氮、肝糖原及肌糖原试剂盒 均购于南京建成生物工程研究所;其他试剂 均为国药分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及饲养 ICR 健康小鼠 88 只,雌性各半,体重 20 ± 2g,由浙江动物实验中心提供。

抗疲劳实验用鼠 40 只,将实验动物适应性喂养 2d 后随机分为 4 组,空白对照组(生理盐水,0.1mL/10g · bw),阳性对照组(螺旋藻,0.1mL/10g · bw),低剂量组(1 × 10⁶ 个/mL 菌悬液,0.1mL/10g · bw),高剂量组(1 × 10⁸ 个/mL 菌悬液,0.1mL/10g · bw)。

免疫实验用鼠 44 只,将实验动物适应性喂养 2d 后随机分为 4 组,空白对照组(生理盐水,0.1mL/10g · bw),阳性对照组(青春宝永真片,0.1mL/10g · bw),低剂量组(1 × 10⁶ 个/mL 菌悬液,0.1mL/10g · bw),高剂量组(1 × 10⁸ 个/mL 菌悬液,0.1mL/10g · bw)。每日定时灌胃给药,自由进食、饮水。灌胃 6 周后进行实验。

1.2.2 抗疲劳 灌胃 6 周后进行转棒抗疲劳实验,连续训练 2d,剔除最高和最低的鼠。实验时转速调到 40r/min,记录小鼠在转棒上的运动时间。

1.2.3 应激反应 在灌胃 6 周后进行 Y 电迷宫训练,电压 36V,每个训练日对每只小鼠训练 15 次。训练 2d 后进行测试,以小鼠被电击后逃至安全区(无电)为正确反应。记录每只小鼠连续 15 次测试中的正确反应次数及每次正确反应所用时间。

1.2.4 血乳酸和血尿素氮含量的测定 末次灌胃 30min 后,将小鼠置温度为 25℃ 的水中不负重游泳 30min,游泳后立即眼球取血,用试剂盒测定^[4]。

1.2.5 肝糖原、肌糖原 末次灌胃 30min 后,处死小鼠,立即取后肢肌肉和肝脏,放入预冷的生理盐水中清除其血液,并用滤纸吸干,称重待用,用试剂盒测定^[5]。

1.2.6 免疫调节实验^[6]

1.2.6.1 免疫器官测重 末次灌胃 30min 后,处死小鼠,摘取胸腺和脾脏,称重,计算胸腺指数和脾脏指数。

1.2.6.2 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化 灌胃 6 周后,颈椎脱臼处死动物,无菌取脾,磨碎,过滤(200 目),洗涤,悬浮,制备成细胞浓度为 5 × 10⁶ 脾细胞悬液。将上述脾细胞悬液加入 96 孔培养板中,每孔 100μL,实验孔加 20μL Con A,对照孔不加 Con A。

置 5% CO₂, 37℃ CO₂ 培养箱中培养 72h。培养结束前 4h,每孔轻轻吸取上清 100μL,加入 100μL 不含胎牛血清的 RPMI1640 培养液,同时加入 MTT 20μL,继续培养 4h。培养结束后,每孔加入 100μL 二甲基亚砷,吹打均匀,使紫色结晶完全溶解,于 570nm 波长处测定 A 值。

1.2.6.3 碳粒廓清 灌胃 6 周后,尾静脉注射生理盐水稀释 4 倍的印度墨汁(0.1mL/10g · bw),注射后 2、10min 分别从小鼠内眦静脉丛取血 30μL,并立即加到 3mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,于 600nm 波长处以 Na₂CO₃ 溶液为空白测定 A 值。第 2 次取血后处死动物,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污后分别称重。以碳粒廓清指数 α 表示小鼠碳粒廓清能力,计算公式如下:

碳粒廓清指数 α = $\frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K}$, $K = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_2 - t_1}$

1.3 数据处理

所有数据经统计学处理后用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS13.0 统计软件进行统计比较。

2 结果与分析

2.1 体能及应急

转棒疲劳实验结果显示,各实验组和阳性对照组能明显延长小鼠转棒时间。Y 电迷宫结果显示,各实验组和阳性对照组能明显减少小鼠正确反应时间,明显增加小鼠正确反应次数(见表 1)。

2.2 生理生化指标

研究结果显示,地衣芽孢杆菌能明显降低全血乳酸和血清尿素氮含量;肝糖原含量无明显差异;明显增加肌糖原含量(见表 2)。

2.3 免疫活性

各实验组和阳性对照组对小鼠体重和免疫器官的重量无影响,与空白对照组比较无明显差异(见表 3)。

Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验结果显示,各实验组和空白对照组比较,淋巴细胞增殖能力有显著性提高,阳性对照组与空白对照组比较无明显差异。碳粒廓清结果表明,各实验组和阳性对照组与空白对照组比较小鼠碳粒廓清指数有显著性提高(见表 4)。

表4 地衣芽孢杆菌对小鼠免疫功能的作用

组别	碳粒廓清指数	Con A 诱导的淋巴细胞增殖能力(A)
空白组	2.90 ± 0.22	0.62 ± 0.40
低剂量组	3.49 ± 0.29 ^b	1.09 ± 0.38 ^a
高剂量组	3.25 ± 0.28 ^a	1.30 ± 0.49 ^a
阳性对照组	3.65 ± 0.61 ^b	0.91 ± 0.19

表2 地衣芽孢杆菌对小鼠生理生化指标的作用

组别	全血乳酸 (mmol/L)	血尿素氮 (mmol/L)	肝糖原 (mg/g)	肌糖原 (mg/g)
空白	6.63 ± 2.12	10.31 ± 1.41	4.19 ± 3.5	0.90 ± 0.19
低剂量组	4.46 ± 0.90 ^b	8.90 ± 1.40 ^a	5.91 ± 5.26	1.94 ± 0.81 ^b
高剂量组	4.49 ± 1.10 ^b	8.81 ± 1.13 ^a	6.54 ± 3.43	1.71 ± 0.82 ^a
阳性对照组	4.55 ± 1.90 ^b	8.80 ± 1.39 ^a	5.12 ± 2.81	1.68 ± 0.68 ^b

表3 地衣芽孢杆菌对小鼠免疫器官的作用

组别	初始体重 (g)	终期体重 (g)	脾脏指数 (mg/g)	胸腺指数 (mg/g)
空白组	22.69 ± 1.11	30.96 ± 3.08	3.63 ± 0.84	1.49 ± 0.33
低剂量组	24.55 ± 2.45	32.82 ± 4.41	4.15 ± 1.86	1.34 ± 0.14
高剂量组	23.84 ± 1.43	31.47 ± 2.45	3.55 ± 0.77	1.53 ± 0.49
阳性对照组	22.17 ± 1.72	27.26 ± 2.35	3.84 ± 0.83	1.66 ± 0.25

3 讨论

3.1 地衣芽孢杆菌作用机理

地衣芽孢杆菌在肠道内迅速生长繁殖,造成肠道低氧环境。对肠道内的双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌、消化链球菌等有益健康的厌氧菌的生长繁殖有促进作用,对葡萄球菌、白色念球菌、酵母样菌等致病菌则有拮抗作用,通过这种双重作用可以调整肠道菌群失调,维持人体肠道微生态平衡。

动物的免疫状态、体内免疫因子水平对动物的生长有很大影响。而机体的免疫状态又受多种营养因素影响,动物消化吸收的蛋白质、能量、矿物质元素、维生素等都对免疫功能有很大影响,而地衣芽孢杆菌能影响以上各种营养成分的消化和吸收,最终影响机体免疫状况。

3.2 抗疲劳

转棒时间是评价抗运动性疲劳的重要指标,高剂量地衣芽孢杆菌可极显著延长小鼠转棒时间,低剂量组能显著延长小鼠转棒时间^[7-9]。

糖是机体活动时的重要能源,糖代谢供能在机体运动时的能量供应中占重要地位,大强度运动时机体的衰竭总是和糖原的耗竭同时发生,糖原的含量能说明疲劳发生的快慢和程度。由表2可以看出,各剂量组和阳性对照组能增加肌体肝糖原含量,但与对照组比较无显著差异。低剂量组和阳性对照组与空白对照组比较能极显著提高肌糖原含量。

机体血清尿素氮含量随运动负荷的增加而增加,是机体运动过程中的一种代谢产物,需要及时运输,在体内积累后,将表现为机体对负荷的适应能力差,机体显示疲劳的现象;血乳酸作为肌肉活动的主要代谢产物,是评价机体疲劳的重要标志。由表2可以看出,各实验组和阳性对照组与空白组比较能极显著降低全血乳酸含量,显著降低血清尿素氮含量。

3.3 提高机体免疫力

机体免疫系统中淋巴细胞增殖是机体对非己抗原刺激发生免疫应答过程中的重要事件,淋巴细胞增殖的结果表现为效应淋巴细胞的产生,该细胞通过发挥清除非己抗原的作用达到维护机体内环境稳定的作用。淋巴细胞增殖效果决定了效应淋巴细胞

的数量,决定了机体免疫应答反应的强度,因此,对小鼠进行淋巴细胞增殖反应的测定,能够准确反映出机体免疫水平。低剂量组和高剂量组都能显著提高淋巴细胞的增殖能力。

碳粒廓清实验^[10]是免疫学实验技术中非特异性免疫功能测定的常用方法之一。颗粒状异物(如碳粒)静脉注射进入血液循环后,迅速被单核巨噬细胞吞噬,其中主要被定居在肝脏和脾脏的巨噬细胞所吞噬。若将异物量恒定,测其血液中的消除速率,可反映单核巨噬细胞的吞噬功能,而单核巨噬细胞的吞噬率则反映机体的非特异性免疫功能。低剂量组能极显著提高碳粒廓清指数,高剂量组能提高碳粒廓清指数。

参考文献

- [1] 唐娟,张毅,李雷雷,等.地衣芽孢杆菌应用研究进展[J].湖北农业科学,2008,47(3):351-354.
- [2] 潘康成,何明清,等.地衣芽孢杆菌对家兔体液免疫功能的影响研究[J].中国微生态学杂志,1998,10(4):204-206.
- [3] 彭爱铭,佟建明,崔建云,等.地衣芽孢杆菌 TS-01 胞外多糖功能的研究[J].食品科学,2004(S1):158-162.
- [4] Li Wang, Hua-Li Zhang, Rong Lu. The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice [J]. Science Direct, 2008, 29:1176-1182.
- [5] Bo Yu, Zhao-Xin Lu, Xiao-Mei Bie. Scavenging and anti-fatigue activity of fermented defatted soybean peptides [J]. Eur Food Res Technol, 2008; 226:415-421.
- [6] 李永进,杨睿悦,扈学伟,等.火麻仁蛋白对小鼠抗疲劳和免疫调节功能的初步研究[J].卫生研究,2008,37(2):175-178.
- [7] 赵文莉,张馨,王伟,等.人参茎叶总皂甙抗疲劳作用的体内实验研究[J].卫生研究,2009,38(2):184-187.
- [8] 汪建红,陈晓琴,张蔚俊,等.黑果枸杞果实多糖抗疲劳生物功效及其机制研究[J].食品科技,2009,34(2):203-207.
- [9] 丁红秀,高荫榆,晁红娟,等.毛竹叶多糖抗疲劳作用研究[J].食品科学,2008,29(4):389-391.
- [10] 杨莲,段小花,李松梅,等.普洱茶对免疫低下小鼠单核一巨噬细胞系统碳粒廓清功能的影响[J].云南中医中药杂志,2008,29(10):43-44.