

白培钿,裴婷,孔佳美,等. 复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 245-252.

Bai PT, Pei T, Kong JM, et al. Effect of compound microecological preparation on intestinal immune function in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 245-252.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.013

复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响

白培钿[#],裴婷[#],孔佳美,杨逢清,李涛,王海东,任玉红^{*}

(山西农业大学 动物医学学院,山西 晋中 030801)

【摘要】 目的 旨在研究复合微生态制剂对小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 **方法** 选取 28 日龄 BALB/C 小鼠 80 只,通过灌胃低、中、高不同剂量(2.5、5、10 g/kg 体重)的复合微生态制剂,第 14 天和第 28 天采取血液样本和空肠组织,并取材免疫器官进行免疫器官指数测定。用比浊法检测血液中溶菌酶含量,用 ELISA 法检测小鼠空肠黏膜免疫细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- γ)和 SIgA 含量;用荧光定量 PCR 检测小鼠空肠黏膜免疫细胞因子 mRNA 表达水平。**结果** (1)不同剂量复合微生态制剂均可提高小鼠肠道黏膜免疫细胞因子及 SIgA 的含量和免疫细胞因子 mRNA 的表达水平。第 14 天,中剂量组小鼠空肠黏膜免疫细胞因子 IL-4、IL-10、IFN- γ 及 SIgA 含量和 mRNA 表达水平极显著高于对照组($P < 0.01$)。第 28 天,低剂量组和中剂量组空肠黏膜 IL-4 含量极显著提高($P < 0.01$);中剂量组 IL-10、IFN- γ 及 SIgA 含量和 mRNA 表达水平极显著高于对照组($P < 0.01$);中、高剂量组 IL-4、IL-10 及 IFN- γ 的 mRNA 表达水平均不同程度高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);低剂量组 IL-4、IL-10 mRNA 表达水平与对照组差异不显著($P > 0.05$)。(2)第 14 天,中剂量组免疫器官指数显著高于对照组($P < 0.05$),第 28 天,各实验组免疫器官指数均显著高于对照组($P < 0.05$)。(3)各实验组小鼠溶菌酶含量显著高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 复合微生态制剂能促进小鼠的生长,增加小鼠免疫器官指数,提高小鼠血液中溶菌酶含量及肠道黏膜免疫功能,减少肠道感染性疾病发生。

【关键词】 微生态制剂;小鼠肠道;免疫细胞因子;SIgA;免疫器官指数

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0245-08

Effect of compound microecological preparation on intestinal immune function in mice

BAI Peitian[#], PEI Ting[#], KONG Jiamei, YANG Fengqing, LI Tao, WANG Haidong, REN Yuhong^{*}

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Corresponding author: REN Yuhong. E-mail:renyuhong1963@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of compound microecological preparation on the immune function of the intestinal mucosa of mice. **Methods** BALB/C mice at 28 days of age were selected for use in this study, and composite microecological preparations of high, medium, and low doses (2.5, 5 and 10 g/kg body weight) were given by gavage. Blood and jejunum tissue were sampled on the 14th and 28th days, and the immune organ index was measured. The blood lysozyme content was detected by turbidimetry, and the jejunum mucosa SIgA and immune cytokine (IL-4, IL-10 and IFN- γ) contents of mice were detected by ELISA. The expression of immunocytokine mRNA in the jejunum mucosa was detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** (1) The different compound microecological preparation doses increased the SIgA and immune cytokine contents and enhanced the expression of immune cytokine mRNA in the intestinal mucosa of

[基金项目] 山西省重点研发计划项目(201803D221009-4)。

Funded by Shanxi Province Key Research Project(201803D221009-4)。

[作者简介] 白培钿(1996—),男,硕士,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:359827412@qq.com;

裴婷(1995—),女,硕士,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:1135748413@qq.com。

[#]共同第一作者

[通信作者] 任玉红(1963—),女,教授,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:renyuhong1963@163.com

mice. On the 14th day, the contents of IL-4, IL-10 and IFN- γ ; the expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ mRNA; and the content of SIgA were significantly higher in the treated groups than the control group ($P < 0.01$). On the 28th day, the content of IL-4 in the jejunal mucosa of the low-dose and medium-dose groups was significantly increased ($P < 0.01$). In the middle-dose group, IL-10 and IFN- γ protein and mRNA levels and SIgA protein levels were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). In the middle-dose and high-dose groups, IL-4, IL-10, and IFN- γ mRNA expression was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of IL-4 and IL-10 mRNA between the low-dose and control groups ($P > 0.05$). (2) On the 14th day, the immune organ index of the medium dose group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). (3) On the 28th day, compared with the control group, each experimental group's immune organ index was significantly increased ($P < 0.05$). The lysozyme content of each experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound microecological preparation promoted the growth and increased the immune organ index, lysozyme content, and intestinal mucosal immune function of mice, consequently reducing the incidence of intestinal infectious diseases.

【Keywords】 microecological preparation; intestinal tract of mice; immunocytokines; sIgA; index of immune organ

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着我国养殖业的迅速发展,抗生素作为饲料添加剂被大量用于畜禽疾病防治及促进畜禽生长。然而,抗生素的滥用导致耐药细菌大量产生,大大降低了药物疗效,同时药物在畜禽产品中大量残留,直接危害动物源性食品安全和人类健康。2017年6月,我国农业农村部发布《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017~2020年)》的通知,要求我国从2020年起在动物养殖生产中全面禁止使用人兽共用或容易产生耐药性的抗菌药物作为动物促生长剂^[1]。微生态制剂能够改善动物肠道健康,提高生长性能,增强机体免疫力,但是微生态制剂存在活菌数低,不易保存等问题。酶制剂能够补充动物体内酶类的不足,消除抗营养因子,增强机体免疫力,但是酶制剂也存在稳定性差,不易保存等一系列的问题。近年来,研究者开始对益生菌和酶制剂的共同作用效果进行研究,提高益生菌剂和酶制剂的质量和作用效果。本课题组成功研制一种酶与微生态制剂复合组剂(申请公布号:CN113439798A)^[2],以期应用于畜禽生产中,为养殖业“减抗禁促”提供新的饲料添加剂。本研究通过对小鼠灌胃不同剂量复合微生态制剂,研究其对小鼠肠道黏膜免疫功能、免疫器官指数及血液溶菌酶含量的影响,旨在为复合微生态制剂在养殖业的应用提供理论依据,同时为养殖业研制能替代抗生素的安全、高效及绿色的饲料添加剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80只28日龄清洁级BALB/C小鼠,体重为(16±

2)g,雌雄各半购自山西医科大学实验动物中心【SCXK(晋)2019-0005】。饲养于山西农业大学动物实验室【SYK(晋)2020-0003】,维持饲料购自山西医科大学动物实验中心。实验期间同室分笼喂养,饲养温度为(22±2)℃,湿度为40%~60%,自由采光和饮水。本实验方案符合山西农业大学动物护理与使用委员会的要求(SXAU-EAW-2020SD0201)。

1.1.2 主要试剂与仪器

复合微生态制剂:由枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、啤酒酵母菌、中性蛋白酶及纤维素酶所组成(总活菌数 1.0×10^{11} CFU/g),由微生态制剂研发课题组研制(专利申请号:20211059339 2.7)。IL-4、IL-10、IFN- γ 、SIgA检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;溶菌酶(LZM)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;实时荧光定量试剂盒诺购自唯赞生物科技有限公司;TRIzol(美国life);反转录试剂盒为TaKaRa产品等。

SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices,美国);StepOnePlus 实时荧光定量PCR仪(ABI,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

小鼠正常饲喂饲养7d后,按照随机分组原则分为4组,每组雌雄各10只,实验组持续灌胃复合微生态制剂28d,对照组灌胃生理盐水。实验动物分组及处理见表1。

1.2.2 样品采集

在第14天和第28天,从各组随机选取10只小鼠(雌雄各半),麻醉后采血,置于非抗凝采血管内,

表 1 实验动物分组

Table 1 Groups of experimental animals

分组 Groups	处理 Treatment
对照组 Control group	日粮+无菌蒸馏水灌胃 0.2 mL Daily diet+aseptic distilled water was intragastrically administered for 0.2 mL
低剂量组 Low dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 2.5 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 2.5 g/kg body weight
中剂量组 Medium dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 5.0 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 5.0 g/kg body weight
高剂量组 High dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 10 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 10 g/kg body weight

分离血清,用于溶菌酶含量的测定。采血后处死小鼠,取胸腺、脾和肠系膜淋巴结并称重,用于免疫器官指数测定。小鼠空肠样品的采集处理方法参考文献^[3],用于总 RNA 的提取和免疫细胞因子含量的测定,小鼠空肠黏膜免疫细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- γ)检测方法参考文献^[4-5]。

1.2.3 生长性能的测定

在实验期间 0、7、14、21 和 28 d 时,对每组小鼠进行空腹称重,计算平均体重。

1.2.4 免疫器官指数的测定

免疫器官指数=免疫器官重量(mg)/体重(g)

1.2.5 溶菌酶的测定

按试剂盒说明测定各组小鼠血清溶菌酶浓度。计算数据以每毫升血清中所含微克溶菌酶表示,即 $\mu\text{g/mL}$ 。严格按照试剂盒操作要求检测溶菌酶的活力,按公式计算溶菌酶含量。

溶菌酶含量=(测定透光度-空白透光度)/(标准透光度-空白透光度) $\times$ 标准品浓度 $\times$ 样本测试前稀释倍数

1.2.6 空肠黏膜细胞因子及 SIgA 含量测定

空肠黏膜细胞因子 IL-4、IL-6、IFN- γ 以及 SIgA 含量测定参照 ELISA 试剂盒说明书进行所有标准品和样本均设复孔。酶标仪检测各孔 OD 值,计算肠道黏膜内细胞各细胞因子的浓度。

1.2.7 荧光定量测定肠道黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ mRNA 相对表达量

根据 NCBI 上基因数据库查找目的基因 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 以及内参 GAPDH 相对应的基因序列,运用 Primer 5.0 软件设计各基因的上下游引物(如表 2 所示)。PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,65℃ 延伸 30 s,40 个循环。目的基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

1.3 统计学分析

用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理,各组数据均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),实验结果用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,用 GraphPad Prism 5 绘制柱状图。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 复合微生态制剂对小鼠体重的影响

小鼠灌胃微生态复合制剂后,各阶段体重变化如表 3 所示。从表 3 可知小鼠在灌胃不同剂量的复合微生态制剂第 7 天和第 14 天,各组小鼠体重均有所增加,但无显著差异性($P > 0.05$);在第 21 天和第 28 天,中剂量组和高剂量组的小鼠体重增加明显,差异具有显著性($P < 0.05$),低剂量组的小鼠体重无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物名称 Genes	引物序列(5'-3') Sequence of primer(5'-3')	产物大小(bp) Product size(bp)
GAPDH	F:GGCTCGGAAGTCCAGAAAGAAG R:CTCGGCAGTACAGCGCAAAG	139
IL-10	F:TTTCAAACAAAGGACCAG R:ACTGGATCATTTCCGATAAGGCTTG	100
IL-4	F:TCCTGCTCTTCTTTCTCG R:GCGTCCCTTCTCCTGTGACCTCGTT	101
IFN- γ	F:GCCTCATACTCATAACCTCA R:CATGCAGACAGGGATAGCTTGAGC	142

表 3 各组小鼠体重变化情况(g)

Table 3 Changes of mice body weight in different groups(g)

组别 Groups	D0	D7	D14	D21	D28
对照组 Control group	17.23 ± 0.45	25.65 ± 0.51	31.00 ± 0.53	35.25 ± 0.23	37.95 ± 0.55
低剂量组 Low dose group	16.00 ± 1.54	26.50 ± 0.95	31.33 ± 0.84	36.45 ± 0.37	38.20 ± 0.57
中剂量组 Middle dose group	16.50 ± 1.60	28.13 ± 0.97	34.16 ± 0.78	38.12 ± 0.56 [#]	39.80 ± 0.72 [#]
高剂量组 High dose group	16.50 ± 1.56	25.31 ± 0.78	31.00 ± 0.56	36.05 ± 0.45 [#]	38.85 ± 0.50 [#]

注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.2 复合微生态制剂对小鼠免疫器官指数的影响

由表 4 可以看出,灌胃复合微生态制剂第 14 天,不同剂量的复合微生态制剂均能不同程度提高小鼠的免疫器官指数,且中剂量组差异具有显著性

($P < 0.05$)。第 28 天,低剂量组和高剂量组小鼠的脾指数和胸腺明显高于对照组,且差异具有显著性($P < 0.05$);中剂量组免疫器官指数极显著高于对照组($P < 0.01$)。

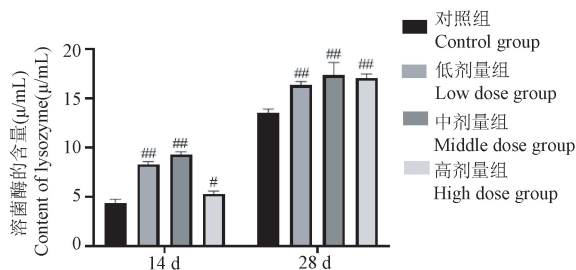
表 4 复合微生态制剂对免疫器官指数的影响

Table 4 Effect of the compound probiotics on immune organ index

组别 Groups	D14			D28		
	脾指数 Spleen index	淋巴结指数 Lymph node index	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	淋巴结指数 Lymph node index	胸腺指数 Thymus index
对照组 Control group	3.05 ± 0.02	3.14 ± 0.05	1.78 ± 0.10	3.15 ± 0.04	3.21 ± 0.07	1.83 ± 0.04
低剂量组 Low dose group	3.08 ± 0.03	3.15 ± 0.06	1.83 ± 0.08	3.93 ± 0.06 ^{##}	3.22 ± 0.07	1.98 ± 0.07 [#]
中剂量组 Middle dose group	3.20 ± 0.02 [*]	3.19 ± 0.07 [*]	1.92 ± 0.06 [#]	4.14 ± 0.05 ^{##}	3.35 ± 0.07 ^{##}	2.14 ± 0.06 ^{##}
高剂量组 High dose group	3.09 ± 0.02	3.16 ± 0.05	1.82 ± 0.04	3.68 ± 0.04 ^{##}	3.23 ± 0.07	2.08 ± 0.04 [#]

2.3 复合微生态制剂对血清溶菌酶含量的影响

由图 1 可知,在灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,不同剂量的复合微生态制剂均能不同程度的提高小鼠血清中溶菌酶的含量。第 14 天,低剂量组和中剂量组小鼠的溶菌酶含量均明显高于对照组,且差异极具显著性($P < 0.01$);高剂量组小鼠的溶菌酶含量增加,差异具有显著性($P < 0.05$)。第 28 天,各实验组溶菌酶含量均明显高于对照组,差异极具显著性($P < 0.01$)。



注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

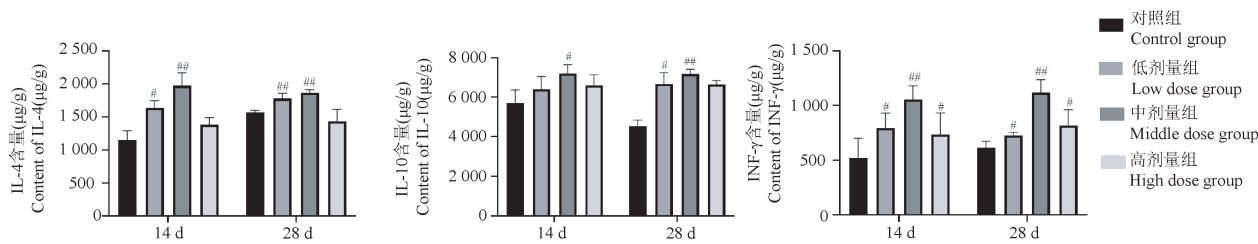
图 1 复合微生态制剂对小鼠血清溶菌酶含量的影响

Note. Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of the compound probiotics on lysozyme in serum

2.4 复合微生态制剂对空肠黏膜免疫细胞因子含量的影响

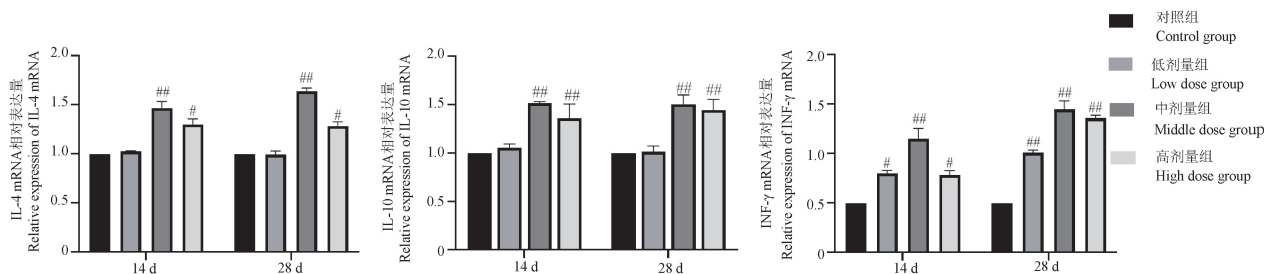
由图 2 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,低剂量组空肠黏膜的 IL-4 含量均呈不同程度高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中剂量组空肠黏膜 IL-4 含量显著高于对照组($P < 0.01$);高剂量组空肠黏膜 IL-4 含量均无显著性差异($P > 0.05$)。第 14 天,中剂量组空肠黏膜 IL-10 含量高于对照组,差异具有显著性($P < 0.05$)。低剂量组和高剂量组空肠黏膜 IL-10 含量与对照组无显著性差异($P > 0.05$);第 28 天,各实验组小鼠空肠黏膜 IL-10 含量呈不同程度高于对照组,其中,低剂量组和高剂量组显著高于对照组($P < 0.05$),中剂量组空肠黏膜 IL-10 含量极显著增加($P < 0.01$)。小鼠在灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,各实验组小鼠肠道黏膜 IFN- γ 含量呈不同程度高于对照组。与对照组相比,中剂量组空肠黏膜 IFN- γ 含量明显增加,差异极显著($P < 0.01$);低剂量组和高剂量组空肠黏膜 IFN- γ 含量明显增加,差异显著($P > 0.05$)。

图2 微生态复合制剂对 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 含量的影响Figure 2 Effect of the compound probiotics on IL-4, IL-10 and IFN- γ content

2.5 复合微生态制剂对空肠黏膜免疫细胞因子 mRNA 表达水平的影响

由图 3 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,低剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 mRNA 表达量与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), IFN- γ

mRNA 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。中剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ mRNA 表达量增加,差异极具显著性 ($P < 0.01$)。高剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ mRNA 表达量不同程度高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

图3 复合微生态制剂对 IL-4、IL-10 及 IFN- γ mRNA 表达水平的影响Figure 3 Effect of the compound probiotics on the relative expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ mRNA

2.6 复合微生态制剂对空肠黏膜 SIgA 含量的影响

由图 4 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天,低剂量组 SIgA 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组 SIgA 含量明显高于对照组,且差异极具显著性 ($P < 0.01$);高剂量组的含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。第 28 天,各实验组小鼠空肠黏膜 SIgA 含量均明显高于对照组,其中,中剂量组的 SIgA 含量显著高于对照组,差异极具显著性 ($P < 0.01$);低剂量组和高剂量组 SIgA 含量增加,差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。

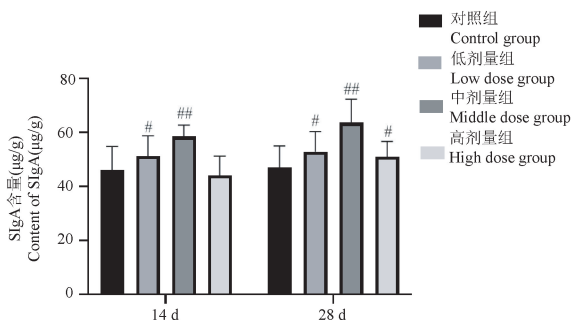


图4 复合微生态制剂对空肠黏膜 SIgA 含量的影响

Figure 4 Effect of the compound probiotics on SIgA content in jejunal mucosa

3 讨论

免疫器官指数是评价机体免疫力的一项重要指标^[6],能反映身体免疫反应的水平,免疫器官指数升高代表机体免疫力提高,免疫器官指数降低则为机体免疫能力降低^[7-8]。脾、胸腺和淋巴结是机体的免疫器官,具有免疫功能,其中脾是免疫细胞储存的场所,能清除血液中异物、抗原及衰老死亡的红细胞^[9];胸腺是 T 细胞成熟的场所,参与机体细胞免疫^[10]。淋巴结具有滤过淋巴、产生淋巴细胞的作用,还能进行免疫应答。张雷等^[11]研究发现微生态制剂能够使雏鸡的免疫器官指数的增加,提高免疫力。本实验结果表明,不同剂量复合微生态制剂均可不同程度提高小鼠胸腺、淋巴结和脾的免疫器官指数,且中剂量组免疫器官指数高于其它两组,此结果与胡影等^[12]的研究结果一致。这说明复合微生态制剂在一定程度上促进小鼠免疫器官的生长、发育,可增强小鼠机体的免疫力。

溶菌酶作为一种体内碱性小分子量的蛋白水解酶,是单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞的产物,对革兰氏阳性菌有显著的抑菌效果^[13]。在动物体

正常的防御、非特异性免疫和免疫反应中起着重要的作用,是构成机体非特异性免疫系统的重要因子之一。通过测定溶菌酶的活力,可估测机体的非特异性免疫的能力^[14]。本研究,灌胃不同剂量复合微生态制剂均可以增加小鼠血清中溶菌酶的含量,此结果与刘宇等^[15]的研究一致。由此可见,复合微生态制剂作用于小鼠后,可促进小鼠产生并释放出溶菌酶,从而增加机体杀菌、抗感染的能力。

肠道黏膜免疫系统是肠道屏障的重要组成部分,与肠道上皮细胞相互作用、相互影响,保护肠道免受细菌、病毒等微生物的粘附和入侵及防止异物的吸收,起到机体第一道防线的作用。复合微生态制剂是由酶制剂和益生菌复合制成的复合制剂,其中的益生菌能够在肠道内定殖并改善菌群平衡,对宿主健康有益。益生菌进入机体后可参与活化肠道相关淋巴组织,诱导 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞分泌细胞因子,也可作用于肠道黏膜上皮细胞使黏膜局部 T 细胞增殖和活化产生白介素-4(IL-4)、白介素-10(IL-10)和干扰素- γ (IFN- γ)等细胞因子以及使 B 细胞产生 Ig,直接或者间接调控肠道黏膜免疫^[16-18]。其中 IL-4 能够促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,促进 B 淋巴细胞增殖分化,诱导 IgE 和 IgG 产生,也可促进 NK 细胞的增殖、分化使产生 IFN- γ 的能力增强,调节免疫反应应答^[19-20]。IL-10 属于 Th2 型细胞因子,主要由 Treg 细胞分泌,有抑制 Th1 细胞分泌 IL-2、IL-3、集落刺激因子和肿瘤坏死因子- α 的作用而发挥抗感染作用。同时,也可刺激 B 细胞分化增生,促进抗体生成^[21]。IFN- γ 主要由活化的 Th1 细胞和 NK 细胞产生,可刺激巨噬细胞活化的作用,促进抗原呈递细胞表达 MHC II 类分子,提高抗原递呈能力,增强 NK 细胞和 CTL 细胞的杀伤活性,促进 B 淋巴细胞分化、增殖;抗病毒感染和抗肿瘤作用^[22]。本研究发现复合微生态制剂可增加空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的含量及 mRNA 表达水平,其结果与崔畅婉等^[23]的研究结果一致。低剂量组和中剂量组可促进小鼠肠道黏膜分泌 IL-4 和 IL-10,这可能是由于益生菌在黏膜表面和黏膜下层被肠黏膜淋巴样组织中的巨噬细胞吞噬并提取特征抗原传递给 T、B 淋巴细胞和其他免疫细胞。适量的益生菌可刺激调节性 T 淋巴细胞分化,使 Th0 细胞分化为 Th2 细胞,增加 IL-4、IL-10 的含量^[24-25]。复合微生态制剂可能通过不同途径来改善小鼠免疫功能。Rizzello 等^[26]认为,乳酸菌的免疫调节功

能主要体现在刺激 NK 细胞增殖并增强其细胞功能,从而增强动物机体的抵抗力。Fink 等^[27]报道嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌显著提高 NK 细胞的活力和杀菌能力。本研究中,灌服复合微生态制剂可以提高小鼠空肠黏膜 IFN- γ mRNA 表达水平及含量,这可能是由于嗜酸乳杆菌可通过 Toll 样受体 9 传导信号,增加小鼠派尔集合淋巴结中 IFN- γ 阳性细胞的数量^[28-29],且添加适量复合微生态制剂可以促进树突状(DC)细胞分泌白介素-12,白介素-12 可以激活 NK 细胞并促使其合成、分泌 IFN- γ ^[27,30]从而抑制病毒的复制,起到免疫调节作用和增强抗病毒能力。

肠道黏膜免疫系统由多种免疫成分组成,分泌性免疫球蛋白 A(SIgA)是肠道黏膜免疫的主要保护效应,是防御病原菌在肠道粘附和定植的第一道防线。SIgA 通过结合聚合免疫球蛋白受体(pIgR)^[31],从基底外侧表面传输到黏膜表面,用于保护肠黏膜上皮细胞,提升消化道黏膜防御功能^[32]。有研究表明微生物种群的变化会影响固有免疫的激活,以维持黏膜稳态。Nagayama 等^[33]给小鼠灌胃酵母补充物后,小鼠的空肠的 SIgA 含量增加。本研究发现复合微生态制剂能够增加肠道黏膜 SIgA 的分泌,这可能是益生菌在肠道定植后,自身及代谢产物作为抗原物质被 M 细胞吞噬或内化形成内体,M 细胞内的抗原快速释放并被树状突细胞摄取,后者随之迁移至派尔集合淋巴结的 T 淋巴细胞区或系膜淋巴结,将抗原提呈给初始 T 淋巴细胞,激活 Th2 细胞,产生大量白介素-5,活化派尔集合淋巴结生发中心的 B 淋巴细胞,使其转化为浆细胞分泌 IgA,提高 SIgA 的含量水平^[34]。表明复合微生态制剂可促进小鼠空肠黏膜 IgA 浆细胞分泌 SIgA,提高 SIgA 在空肠黏膜的含量,增强小鼠空肠黏膜的免疫功能,减少肠道病原微生物的感染。

4 结论

复合微生态制剂能促进小鼠的生长,提高小鼠免疫器官指数及血液中溶菌酶的含量,增强小鼠抗感染的能力;复合微生态制剂能提高肠道黏膜免疫细胞因子的表达水平,促进肠道黏膜分泌免疫球蛋白,进而增强肠道黏膜免疫功能,减少肠道感染性疾病的发生。

参 考 文 献(References)

- [1] 农业部关于印发《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017-

- 2020 年)》的通知 [J]. 中华人民共和国农业部公报, 2017, 7: 45-46.
- Notice of the Ministry of agriculture on printing and distributing the "national action plan to curb drug resistance of bacteria from animals (2017-2020)" [J]. Zhonghua Renmin Gongheguo Nongyebu Gongbao, 2017, 7: 45-46.
- [2] 任玉红, 裴婷, 王海东, 等. 一种酶与微生态制剂复合组剂及其制备方法: CN113439798A [P]. 2021-09-28.
- Ren YH, Pei T, Wang HD, et al. A kind of enzyme and microecological compound and preparation method there of CN113439798A [P]. 2021-09-28.
- [3] 程玉鑫. 干酪乳杆菌发酵蓝莓果渣对高脂膳食小鼠肠道屏障功能的调节作用及机制 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2020.
- Chen YX. Lactobacillus casei fermentend blueberry pomace regulates the intestinal barrier function of high fat diet mice and the underlying mechanisms [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2020.
- [4] 杨田田, 于龙魅, 刘二强, 等. 天蚕素 A-马盖宁杂合肽对小鼠小肠黏膜结构、小肠黏膜免疫功能和肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(11): 3387-3395.
- Yang TT, Yu LM, Liu EQ, et al. Effects of cecropin A-Magainin hybrid peptide on small intestinal mucosal structure, mucosal immune function and intestinal microflora in mice [J]. Chin J Anim Nutr, 2014, 26(11): 3387-3395.
- [5] 刘丹, 杨波, 蓝程, 等. 感染后肠易激综合征小鼠肠黏膜和血中细胞因子的表达变化 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2015, 36(6): 841-845.
- Liu D, Yang B, Lan C, et al. Altered expression of intestinal mucosa and blood cytokines in post-infectious irritable bowel syndrome mouse [J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2015, 36(6): 841-845.
- [6] 饶泽斌, 曾艳, 刘宇波, 等. 饲料添加干酪乳杆菌代田株对断奶仔猪生长性能、抗氧化功能和结肠生物胺的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(6): 3165-3175.
- Rao ZB, Zeng Y, Liu YB, et al. Effects of Lactobacillus casei Strain Shirota on growth performance, antioxidant function and bioamines in colon of weaned piglets [J]. Chin J Anim Nutr, 2021, 33(6): 3165-3175.
- [7] Xu B, Wu S, Han Q. Modulation of the growth performance and innate immunity of loaches (Paramisgurnus dabryanus) upon dietary mannan oligosaccharides [J]. 3 Biotech, 2021, 11(3): 133.
- [8] 巩萍, 孙铜, 戴晓莉, 等. 松花粉对环磷酰胺增效减毒作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 60-63.
- Gong P, Sun T, Dai XL, et al. Synergism and attenuation effects of Pini Pollen on cyclophosphamide [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 60-63.
- [9] 阳帆, 康丹菊, 陈志宝, 等. 飞机草总黄酮对小鼠免疫调节功能的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 56-60.
- Yang F, Kang DJ, Chen ZB, et al. Effects of total flavonoids from Pteris odorata on immune regulation in mice [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2020, 39(5): 56-60.
- [10] 艾西木江·热甫卡提, 尤力都孜·买买提, 阿不都热衣木·肉孜, 等. 土大黄根提取物对实验性银屑病小鼠组织器官形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 41-47.
- Haximjan R, Yultuz M, Abdiryim R, et al. Effects of *Rumex L.* root extract on the morphology of skin and some organs in mouse model of experimental psoriasis [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(9): 41-47.
- [11] 张雷, 王欢欢, 葛莹, 等. 饮用微生态制剂对雏鸡生产性能、免疫器官指数和肠道益生菌的影响 [J]. 浙江农业科学, 2020, 61(1): 196-198.
- Zhang L, Wang HH, Ge Y, et al. Effects of dietary microecological agents on growth performance, immune organ indexes and intestinal profitable microflora in chicks [J]. J Zhejiang Agr Sci, 2020, 61(1): 196-198.
- [12] 胡影, 曹云芳, 樊琼, 等. 酵母培养物对鹌鹑生长性能、免疫器官指数及肠道菌群的影响 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(24): 144-149.
- Hu Y, Cao YF, Fan Q, et al. Effects of yeast culture on growth performance, immune organ index and intestinal flora of quail [J]. Chin Agr Sci Bull, 2019, 35(24): 144-149.
- [13] 张新帅, 阮瑶, 刘武康, 等. 致病菌抵抗溶菌酶机制的研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(17): 298-306.
- Zhang XS, Ruan Y, Liu WK, et al. Mechanism of pathogen resistance to lysozyme: a review [J]. Food Sci, 2020, 41(17): 298-306.
- [14] 黄俊祥. 氟中毒对肉仔鸡血细胞数、血清溶菌酶和补体 C3、C4 含量的影响 [J]. 现代牧业, 2020, 4(2): 30-33.
- Huang JX. Dietary high fluoride decreased the blood cells number, serum lysozyme and complement content in chickens [J]. Modern Anim Husbandry, 2020, 4(2): 30-33.
- [15] 刘宇, 朱战波, 孙秀军, 等. 复合活菌制剂对断奶仔猪生长性能及血清溶菌酶含量的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(9): 784-787.
- Liu Y, Zhu ZB, Sun XJ, et al. Effect of live microbe preparation on the growth performance and and serum sozyme content in weaned piglets [J]. Chin J Microecol, 2010, 22(9): 784-787.
- [16] Shan M, Gentile M, Yeiser JR, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals [J]. Science, 2013, 342(6517): 447-453.
- [17] Ding S, Yan W, Ma Y, et al. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals [J]. Anim Nutr, 2021, 7(1): 24-30.
- [18] Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells [J]. J Immunol, 2002, 168(1): 171-178.
- [19] Szkodinski J, Hudzik B, Osuch M, et al. Serum concentrations of interleukin-4 and interferon-gamma in relation to severe left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention [J]. Heart Vessels, 2011, 26(4): 399-407.
- [20] Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, et al. Biological function of

- CD40 on human endothelial cells; costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes [J]. *Immunology*, 2000, 100(4): 441–448.
- [21] 周建光, 杨梅, 华川. IL-10 与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 4(17): 2743–2745.
- Zhou JG, Yang M, Hua C. Research progress on the relationship between IL-10 and autoimmune diseases [J]. *Med Recapitulate*, 2012, 4(17): 2743–2745.
- [22] 吴艳梅, 张颖, 周琳, 等. 四君子汤对脾虚小鼠感染念珠菌后血清中 IFN- γ 含量及腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(8): 182–185, 225.
- Wu YM, Zhang Y, Zhou L, et al. Effect of Sijunzi decoction on serum INF- γ content and peritoneal macrophage in spleen deficiency mice infected with candida [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2020, 47(8): 182–185, 225.
- [23] 崔畅婉, 于森, 吴思, 等. 骆驼奶对小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(2): 106–110.
- Cui CW, Yu M, Wu S, et al. Effects of camel milk on intestinal mucosal immune function in mice [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2018, 38(2): 106–110.
- [24] Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic lactobacillus rhamnosus Lcr35 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): 56–63.
- [25] 鄢素会, 潘颖, 高丽洁. 益生菌对肠道黏膜免疫的调节作用 [J]. *临床合理用药杂志*, 2016, 9(14): 179–181.
- Xi SH, Pan Y, Gao LJ. Regulation of probiotics on intestinal mucosal immunity [J]. *Chin J Clin Rat Drug Use*, 2016, 9(14): 179–181.
- [26] Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, et al. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 473097.
- [27] Fink LN, Zeuthen LH, Christensen HR, et al. Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(12): 1319–1327.
- [28] 林如琴, 吴婉波, 张益多, 等. 嗜酸乳杆菌抑制大肠杆菌 O157:H7 肠道定植体内外实验 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(16): 2603–2607.
- Lin RQ, Wu XB, Zhang YD, et al. Inhibiting effect of Lactobacillus acidophilus on intestinal colonization of enterohaemorrhagic *E.coli* O157:H7 *in vitro* and *vivo* [J]. *J Pract Med*, 2016, 32(16): 2603–2607.
- [29] Dogi CA, Weill F, Perdígón G. Immune response of non-pathogenic gram(+) and gram(–) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(1): 60–69.
- [30] Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function; parallels with CD8 T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(10): 645–657.
- [31] Sun H, Bi J, Lei Q, et al. Partial enteral nutrition increases intestinal sIgA levels in mice undergoing parenteral nutrition in a dose-dependent manner [J]. *Int J Surg*, 2018, 49: 74–79.
- [32] Kengang TS, Kapila S, Shanmugam VP, et al. Fermented milk with probiotic Lactobacillus rhamnosus S1K3 (MTCC5957) protects mice from salmonella by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 30: 62–73.
- [33] Nagayama T, Sugimoto M, Ikeda S, et al. Effects of astaxanthin-enriched yeast on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of weanling mice [J]. *Anim Sci J*, 2014, 85(4): 449–453.
- [34] 张鑫, 郭军. 益生菌与肠道黏膜免疫研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(11): 58–64.
- Zhang X, Guo J. Research progress on association of probiotics with intestinal mucosal immunity [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2017, 38(11): 58–64.

[收稿日期] 2021-07-16