

## 运动员肠道乳杆菌分离株对小鼠免疫功能的增强作用

刘志刚, 冯海峰\*

山东农业大学体育与艺术学院, 山东 泰安 271018

**摘要:** 为研究运动员肠道乳杆菌分离株对小鼠免疫功能的影响, 本试验用 4 周龄小白鼠作为实验动物模型, 将清洁级昆明小鼠(雌性)300 只随机分为 5 组(I-V), I 组口服嗜酸乳杆菌, II 组口服卷曲乳杆菌, III 组口服鼠李糖乳杆菌, IV 组口服唾液乳杆菌, 浓度均为 ( $1 \times 10^{10}$  cfu/mL), V 组为对照组(不口服乳杆菌), 每组 10 mL/d, 连续灌喂 14 d, 分别于口服乳杆菌后第 3、7、14、21、28、35、42 d 进行相关指标的检测。试验结果表明, 嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和唾液乳杆菌均能提高小鼠血清抗体效价、小肠内 IgA 含量、淋巴细胞转化率以及血清中 IL-2 含量, 尤其以嗜酸乳杆菌效果最佳。结果证明了从运动员新鲜粪样中分离到的优势乳杆菌能显著提高机体的体液免疫水平和细胞免疫水平, 初步阐明了运动性胃肠综合征的发病机制及运动员服用微生态制剂提升运动素质的机理。

**关键词:** 运动员; 肠道; 乳杆菌; 免疫功能

**中图分类号:** R378.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)02-0177-04

## The Effect of *Lactobacillus* Isolated from the Athletes on the Immune Function of Mice

LIU Zhi-gang, FENG Hai-feng\*

College of Sports and Art/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

**Abstract:** In order to study the effect of *Lactobacillus* isolated from the athletes on the immune function of mice, female Kunming mice (4 weeks old) used in all experiments were divided into 5 groups (I~V). The group I was immunized via oral with strain of *Lactobacillus acidophilus*; the group II was immunized via oral with strain of *Lactobacillus crispatus*; the group III was immunized via oral with strain of *Lactobacillus rhamnosus*; the group IV was immunized via oral with strain of *Lactobacillus salivarius*. All groups with the concentration of  $1 \times 10^{10}$  cfu/mL. The group V was control group (*Lactobacillus* without oral administration) and the bacterial fluid was given by average (10 mL) for 14 days. The relevant indicators were detected after oral administration of *Lactobacillus* in 3,7,14, 21,28,35 and 42 d. Test results showed that *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus saliva* could improve the serum antibody titer of mice, IgA content in small intestine, lymphocyte transformation rate and serum IL-2 content, especially with the best effect of *Lactobacillus acidophilus*. The *Lactobacillus* isolated from the fresh fecal samples could significantly improve the humoral and cellular immunity. The study preliminary clarified the pathogenesis of sports gastrointestinal syndrome and the mechanism of the athletes taking the micro ecological agents.

**Keywords:** Athletes; intestinal; *Lactobacillus*; immune function

随着微生物生态学研究的深入, 证实定植在人和动物机体胃肠道内微生物菌群区系主要是由许多细菌组成, 它们附着在肠内粘膜上, 参与了机体的食物消化、药物代谢、合成维生素和防止外源致病菌入侵肠道, 对于维持机体健康和实现各种生理功能起着非常重要的作用, 人体肠道内这些微生物与人体胃肠的功能关系密切<sup>[1]</sup>。

运动性胃肠综合征是运动员常出现的一种训练综合征, 是在高强度、大运动量的运动训练和比赛中造成的机体胃肠功能紊乱的现象, 而且也不同程度地妨碍了运动员正常的运动训练和比赛<sup>[2,3]</sup>。前期对抽取的山东农大运动员肠道的正常菌群进行分离鉴定, 对定植在胃肠道内的正常微生物区系进行研究, 发现运动员肠道中的优势菌群为嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、卷曲乳杆菌 (*L. crispatus*)、鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) 和唾液乳杆菌 (*L. salivarius*)<sup>[4]</sup>。

乳酸杆菌是应用最早、应用历史最长的微生物添加剂, 也是机体肠道的优势菌群之一, 众多研究表明它具有改善机体代谢、促进肠道有益菌增殖、抑制有害菌生长和增强机体免疫等作用。采用优势菌群研制的微生态制剂口服液, 运动员服用 10 d 后胃肠功能、运动持久力、抗感冒的能力均明显增强, 能更好地适应运动带来的应急反应, 抗疲劳能力增强 0.7~1.1 h<sup>[4]</sup>, 为了验证其中的机理,

**收稿日期:** 2015-02-11

**修回日期:** 2015-05-01

**基金项目:** 山东星火计划项目

**作者简介:** 刘志刚(1958-),男,副教授.研究方向为足球运动及阳光体育运动. E-mail: zhigang5807@sina.com

**\*同等贡献作者:** 冯海峰(1962-),女,副教授.研究方向为小球类运动.

本试验以小白鼠为动物模型,将不同种类的乳杆菌给小白鼠口服来研究其免疫功能增强作用,为进一步阐明运动性胃肠综合症的发病机制及提升运动员素质的机理提供科学的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和实验动物

嗜酸乳杆菌 SL-1 株,为从山东农业大学高水平运动员粪样中分离到的菌株<sup>[4]</sup>;小白鼠为清洁级昆明小鼠,购自山东泰邦公司实验动物中心。

### 1.2 试剂

胎牛血清,郑州佰安生物工程有限公司产品,批号 201511003;羊抗鼠酶标二抗,购自晶美生物工程有限公司;鼠淋巴细胞分离液,购自上海浩本生物科技有限公司;伴刀豆素球蛋白(ConA),Amresco 公司产品,用无血清 RPMI 1640 培养液配制成  $0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,过滤除菌,分装,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存;120370 胃蛋白酶 1:3 000 Amresco 分装,活力单位 3 000~3 500 U/mg;RPMI1640 培养液, Gibco 公司产品;PI 染料, Amresco 公司产品;ELISA 试剂盒, IL-2 检测试剂盒, SIgA 检测试剂盒,均购自上海浩本生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

分光光度计, UV-1100 型,上海美普达仪器有限公司产品;全自动血细胞分析仪, PE-6800VET 型,深圳普康电子有限公司产品;流式细胞仪, Guava Technologies 公司产品,型号 GuagaEasyCyte Mini; Gene5 酶标仪, ELX800 型,美国 Bio-Tek 宝特公司生产。

### 1.4 小鼠动物试验设计和检测指标

选取 2 周龄清洁级昆明小鼠(雌性)300 只,放于室内适应环境 1 周,然后随机分为 4 组(I~V),每组 60 只。试验分组: I 组口服嗜酸乳杆菌, II 组口服卷曲乳杆菌, III 组口服鼠李糖乳杆菌, IV 组口服唾液乳杆菌,浓度均为  $(1 \times 10^{10} \text{ cfu/mL})$ ; V 组为对照组(不口服乳杆菌)。每组 10 mL/d,连续灌喂 14 d,在第 3 d 每组均注射 NDV 疫苗。分别于免疫后第 3、7、14、21、28、35、42 d 对小鼠进行心脏采血,颈椎脱臼处死后取小肠,然后进行相关指标的检测。

1.4.1 抗体水平的检测 将每组血液样本离心(2000 r/min, 10 min),分离出血清。采用 ELISA 试剂盒检测血清中 NDV-IgG 含量。

1.4.2 小肠内 SIgA 的检测 对各组小鼠截取 20 cm 十二指肠至空肠段的小肠,加 2 mL PBS 充分研磨,离心取上清,用作一抗。按照 SIgA ELISA 试剂盒说明书步骤操作,测定 OD 450 nm 值。

1.4.3 淋巴细胞转化率的检测 无菌采取小鼠心脏抗凝血 2 mL,沿试管壁缓缓加入含有 2 mL 鼠淋巴细胞分离液的试管中,1500 r/min 离心 20 min;吸取淋巴细胞层移入无菌离心管中,用 RPMI 1640 离心洗涤淋巴细胞 3 次(2000 r/min, 15 min);用台盼蓝拒染法检测细胞活率  $>95\%$ ,同时进行细胞计数。用 RPMI 1640(含 10% 犊牛血清)调细胞浓度至  $1.0 \times 10^8$  个/mL。将细胞悬液分加到 96 孔细胞培养板中,100  $\mu\text{L}$ /孔,随后加入 ConA(终浓度 25  $\mu\text{g/mL}$ ),同时设不加 ConA 的对照孔,置细胞培养箱培养 48 h。然后每孔加入 5 mg/mL MTT 10  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h。细胞培养结束后,每孔再加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,于小型微量振荡器上轻轻振荡混匀约 15 min,溶解各孔中沉淀物;于酶标仪上检测 490 nm 波长下各孔的 OD 值,按下式计算:淋巴细胞转化率(%)=(试验孔平均 OD 值-对照孔平均 OD 值)/试验孔平均 OD 值  $\times 100\%$ 。

1.4.4 细胞因子 IL-2 的检测 按照小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒说明书要求检测血清中 IL-2 的含量。

1.4.5 数据处理 数据以  $X \pm \text{SD}$  表示,用 SPSS 11.0 软件进行 Duncan 多重比较分析。

## 2 结果

### 2.1 小鼠血清抗体效价的变化

由表 1 可知,免疫后 3 d,小鼠的抗体效价开始发生变化,嗜酸乳杆菌 I 组和鼠李糖乳杆菌 III

组在第 21 d 达到抗体高峰, 而卷曲乳杆菌 II 组、唾液乳杆菌 IV 组和对照组 V 组在第 28 d 达到抗体高峰; 从免疫后第 7 d, 口服各种乳杆菌试验组 I~IV 组抗体滴度显著高于对照组 V 组 ( $P<0.05$ ), 嗜酸乳杆菌 I 组、卷曲乳杆菌 II 组和鼠李糖乳杆菌 III 组显著高于唾液乳杆菌 IV 组 ( $P<0.05$ ); 免疫后 7 d 至第 42 d, 鼠李糖乳杆菌 III 组抗体水平高于卷曲乳杆菌 II 组, 但差异不显著。

表 1 小鼠血清抗体效价  
Table 1 The serum antibody titer in NDV immune enhanced mice

组别 Group	免疫后时间 Time after immunization (d)						
	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
I 组	2.62±0.124 <sup>e</sup>	4.56±0.172d	5.57±0.282ab	7.26±0.157a	6.82±0.137a	6.63±0.128ab	6.05±0.71cb
II 组	2.61±0.094 <sup>e</sup>	4.16±0.036d	5.34±0.153d	6.01±0.083mn	6.11±0.162n	5.68±0.100dm	5.10±0.130a
III 组	2.58±0.117 <sup>e</sup>	4.48±0.165d	5.71±0.293ab	6.95±0.162a	6.19±0.155a	6.08±0.154ab	5.73±0.89cb
IV 组	2.51±0.090 <sup>e</sup>	3.64±0.112d	4.74±0.154bf	4.81±0.107a	5.28±0.082a	4.64±0.151b	4.06±0.146c
V 组	1.43±0.128 <sup>e</sup>	2.2±0.092f	3.34±0.101c	4.02±0.120b	4.32±0.058c	3.40±0.086n	2.78±0.122f

注: 每列每组不同小写字母上标表示显著差异 ( $P<0.05$ )。数据表示为 mean±SD, n=3。(下同)

Note: lowercase letters in each column of group with different superscript showed the significant difference ( $P<0.05$ ). Data represented as mean±SD, n=3. (the same as follows)

## 2.2 小鼠小肠内 IgA 含量的变化

表 2 小鼠小肠内 IgA 含量的变化  
Table 2 The change of SIgA in the intestine of mice

组别 Group	免疫后时间 Time after immunization (d)						
	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
I 组	0.558±0.318mf	0.602±0.013e	0.685±0.115h	0.731±0.097h	0.673±0.105h	0.642±0.031em	0.565±0.020mf
II 组	0.531±0.427ad	0.566±0.058f	0.631±0.715e	0.648±0.089me	0.622±0.076e	0.573±0.105df	0.537±0.049a
III 组	0.522±0.093 <sup>a</sup>	0.543±0.011d	0.605±0.127m	0.637±0.874m	0.608±0.008m	0.585±0.027ad	0.530±0.027a
IV 组	0.514±0.416ad	0.542±0.067f	0.613±0.797e	0.624±0.013me	0.605±0.006e	0.573±0.015df	0.526±0.016a
V 组	0.459±0.017c	0.487±0.147bc	0.497±0.073a	0.531±0.775a	0.501±0.075b	0.483±0.301bc	0.424±0.106n

由表 2 可见, 从免疫后第 3 d, 小白鼠小肠内 IgA 含量开始变化, 各个组均在 21 d 到达峰值; 嗜酸乳杆菌 I 组、卷曲乳杆菌 II 组、鼠李糖乳杆菌 III 组和唾液乳杆菌 IV 组均显著高于对照组 (V 组) ( $P<0.05$ ); I 组 IgA 含量总体水平显著高于 II~IV 组 ( $P<0.05$ ), 并且 I~IV 组 IgA 含量均高于下一组。

## 2.3 小鼠淋巴细胞转化率的变化

表 3 小鼠淋巴细胞转化率的变化  
Table 3 The transformation ratio of lymphocyte in mice

组别 Group	免疫后时间 Time after immunization (d)						
	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
I 组	30.83±2.35 <sup>e</sup>	36.79±1.17 <sup>b</sup>	45.58±1.93 <sup>nc</sup>	53.69±1.20 <sup>c</sup>	59.23±1.94 <sup>c</sup>	54.56±1.22 <sup>n</sup>	47.12±0.99 <sup>ab</sup>
II 组	28.38±3.11 <sup>e</sup>	31.54±2.00 <sup>cd</sup>	43.10±1.02 <sup>b</sup>	45.71±2.04 <sup>a</sup>	54.57±1.20 <sup>ab</sup>	47.17±1.47 <sup>cd</sup>	46.68±1.61 <sup>d</sup>
III 组	28.17±2.35 <sup>e</sup>	30.38±1.17 <sup>b</sup>	42.22±1.93 <sup>nc</sup>	44.57±1.20 <sup>c</sup>	53.15±1.94 <sup>c</sup>	52.39±1.22 <sup>n</sup>	45.78±0.99 <sup>ab</sup>
IV 组	27.27±2.57 <sup>e</sup>	29.45±1.66 <sup>cd</sup>	40.48±1.83 <sup>b</sup>	43.73±1.92 <sup>a</sup>	52.77±1.77 <sup>ab</sup>	50.39±0.96 <sup>cd</sup>	43.17±1.01 <sup>d</sup>
V 组	27.34±2.53 <sup>e</sup>	29.32±1.39 <sup>mf</sup>	32.58±0.95 <sup>f</sup>	39.05±1.63 <sup>d</sup>	42.64±0.72 <sup>mf</sup>	39.54±0.84 <sup>be</sup>	35.54±0.89 <sup>e</sup>

由表 3 可见, 从免疫后第 7 d, 小白鼠淋巴细胞转化率嗜酸乳杆菌 I 组、卷曲乳杆菌 II 组、鼠李糖乳杆菌 III 组和唾液乳杆菌 IV 组均显著高于对照组 (V 组) ( $P<0.05$ ), 各个组均在 28 d 到达峰值; I 组淋巴细胞转化率显著高于 II~IV 组 ( $P<0.05$ ); II~IV 组淋巴细胞转化率差异不显著。

## 2.4 小鼠血清 IL-2 含量的变化

表 4 小鼠血清 IL-2 含量的变化  
Table 4 The change of IL-2 in mice (ng/L)

组别 Group	免疫后时间 Time after immunization (d)						
	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
I 组	0.396±0.007a	0.436±0.134f	0.479±0.093d	0.534±0.905h	0.506±0.076d	0.469±0.077f	0.423±0.034b
II 组	0.371±0.007a	0.421±0.121d	0.452±0.124m	0.461±0.143n	0.416±0.007m	0.393±0.341	0.361±0.006a
III 组	0.345±0.007a	0.416±0.134f	0.448±0.093d	0.459±0.905h	0.429±0.076d	0.411±0.077f	0.387±0.034b
IV 组	0.333±0.021a	0.398±0.338d	0.435±0.107mn	0.453±0.006nf	0.419±0.247me	0.398±0.403e	0.378±0.107a
V 组	0.317±0.203a	0.331±0.087b	0.369±0.205e	0.372±0.406b	0.363±0.013b	0.342±0.332f	0.292±0.307d

由表 4 可见, 免疫后 3 d 小鼠血清 IL-2 含量开始发生变化, 从免疫后第 7 d, 小鼠血清 IL-2 含量嗜酸乳杆菌 I 组、卷曲乳杆菌 II 组、鼠李糖乳杆菌 III 组和唾液乳杆菌 IV 组均显著高于对照组 (V 组) ( $P<0.05$ ), 各个组均在 21 d 到达峰值; I 组小鼠血清 IL-2 含量显著高于 II~IV 组 ( $P<0.05$ ); II~IV

组淋巴细胞转化率差异不显著。

### 3 讨论

(1)人体的胃肠道是控制和调节适应和再生能力系统的一部分,平衡的胃肠免疫系统以及积极的免疫活性可以使运动员抵御有害病原体的侵害。在运动过程中,机体所发生的一系列的变化将会导致胃肠系统的功能及其结构的变化,降低胃肠道对体液及营养物质的吸收,导致脱水和能量贮存不足,从而影响运动员的运动能力<sup>[5,6]</sup>。近年来,随着高校高水平运动员的增多,锻炼项目及锻炼强度的增加,运动员常常出现运动后身体不适,尤其是胃肠功能的问题<sup>[1]</sup>。胃肠微生物区系对维持运动员健康起着重要作用,而且与胃肠综合症的发病有着一定的联系<sup>[2,3]</sup>。本研究利用从山东农业大学高水平运动员新鲜粪样中分离到的嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和唾液乳杆菌对小白鼠的免疫功能的影响研究,进一步揭示了高水平运动员胃肠道微生物区系与人体素质(免疫功能)的关系,为提高运动员的抵抗力、增强体质提供了动物实验理论依据。

(2)本试验选用4周龄小白鼠作为动物模型,小白鼠体型小,性情温顺,易于饲养管理、操作和观察,对外来刺激和病原体均很敏感,此外,由于遗传均一,个体差异小,试验结果精确可靠,均有利于试验研究。抗体效价的水平能直接反映机体体液免疫的状态;SIgA 是黏膜免疫应答过程中的主要体液因子,肠道中SIgA含量的变化直接反映机体黏膜的局部免疫状态<sup>[7]</sup>;细胞免疫不仅参与胞内的免疫应答而且对体液免疫也有一定的调节作用,是抗感染免疫的主要力量;白细胞介素2(IL-2)主要由活化的T淋巴细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子,是所有T细胞亚群的生长因子,并可促进活化B细胞增殖,诱导产生干扰素,增强单核细胞以及自然杀伤细胞(NK)的杀伤活性,在机体的免疫反应中具有重要的调节作用<sup>[8,9]</sup>;T淋巴细胞是机体细胞免疫功能的承担者,它分泌各种介质并作用于其他淋巴细胞或巨噬细胞,行使信息传递、识别、效应等功能,是机体免疫反应的重要调节细胞<sup>[10-12]</sup>。试验结果表明,嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和唾液乳杆菌均能提高小鼠血清抗体效价、小肠内IgA含量、淋巴细胞转化率以及血清中IL-2含量。结果充分证明了从运动员新鲜粪样中分离到的优势乳杆菌能显著提高机体的体液免疫水平和细胞免疫水平。

(3)前期研究发现农业大学运动员口服微生态制剂后明显增强了运动员的抗应急、抗疲劳、抗感冒的能力,坚持服用微生态制剂可以明显提高运动员的运动能力。本次研究以小白鼠为动物模型,将不同种类的乳杆菌给小白鼠口服来研究其免疫功能增强作用,进一步阐明了运动性胃肠综合症的发病机制及运动员服用微生态制剂提升运动素质的机理。

### 参考文献

- [1] 杨景云.肠道菌群与健康-肠道微生物学[M].哈尔滨:黑龙江科技出版社,1991:135
- [2] 乔德才,高峰,李海鹏.运动性胃肠综合症的流行病学特征[J].中国临床康复,2005,9(4):166-167
- [3] 郭本恒.人肠道菌群的生理功能[J].中国乳品工业,2001,29(4):20-22
- [4] 刘志刚,冯海峰,庄俊涛,等.农业院校高水平运动员肠道菌群区系与身体素质的关系探讨[J].山东农业大学学报:自然科学版,2015,46(6):874-879
- [5] Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. Distribution of repetitiveDNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1991,19(24):6823-6831
- [6] Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998,62(4):1157-1170
- [7] Yang SF, Wei K, Zhao X, et al. Characterization and biological activity of Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharide in vitro[J]. PLOS ONE, 2015(10):e0115638
- [8] Lowry SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation[J]. Arch Surg, 1993,128(11):1235-1241
- [9] Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells[J]. Advances in Immunology, 1989(46):111-147
- [10] Torti C, Prosperi M, Motta DS, et al. Factors influencing the normalization of CD4+ T-cell count, percentage and CD4+/CD8+T-cell ratio in HIV-infected patients on long-term suppressive antiretroviral therapy[J]. Clin Microbiol Infect, 2012(18):449-458
- [11] Huang Y, Jiang CM, Hu YL, et al. Immunoenhancement effect of rehmannia glutinosa polysaccharide on lymphocyte proliferation and dendritic cell[J]. Carbohydr Polym, 2013(96):516-521
- [12] Olivares-Zavaleta N, Carmody A, Messer R, et al. Chlamydia pneumoniae inhibits activated human T lymphocyte proliferation by the induction of apoptotic and pyroptotic pathways[J]. J Immunol, 2011(186):7120-7126