



$P = 0.03$ ). The difference of optical density of spleen lymphocyte proliferation in mice with different doses increased, and the difference was statistically significant ( $F = 48.786$ ,  $P = 0.000$ ). The number of hemolytic plaque increased with statistical significance ( $F = 22.095$ ,  $P = 0.000$ ). The half hemolysis value of middle and high dose groups increased, and the difference was statistically significant ( $F = 30.544$ ,  $P = 0.000$ ). The clearance index and phagocytosis index increased, and the difference was statistically significant and dose-dependent ( $F = 338.79$ ,  $P = 0.000$ ;  $F = 120.271$ ,  $P = 0.000$ ); NK cell activity also increased, and the difference was statistically significant and dose-dependent ( $F = 466.491$ ,  $P = 0.000$ ). **Conclusion** The compound probiotic powder can improve the immunity of mice, and the results meet the evaluation standard of "having the function of enhancing immunity" in the Technical Specification for Inspection and Evaluation of Health Food.

[**Key words**] *Lactobacillus rhamnosus* R9639; *Lactobacillus casei* zhang; *Lactobacillus plantarum* P9; Humoral immunity; Cytoimmunity

益生菌是一种在自然界或宿主自身筛选出的安全稳定的菌<sup>[1]</sup>。益生菌可以起到多种重要的保护作用,包括抵御自由基、减少胆固醇的摄入、阻止癌细胞的生成、增强身体的免疫功能等<sup>[2]</sup>,从而达到预防疾病的目的。最近有研究发现,摄入益生菌后,人体黏膜的微生态与酶平衡有所增强,且不同类型的免疫功能同样得到了提升,机体的抗病力和免疫力也因此有所提高<sup>[3]</sup>。植物乳杆菌基于提高NK细胞的代谢水平和介导巨噬细胞的极化,起到增强机体免疫、防癌、降低糖尿病和心血管疾病风险等效果<sup>[4]</sup>。然而在需制定对益生菌个性化应用的方案的背景下,益生元与免疫系统的全面作用机制和最佳匹配剂量仍需深入探索。因此,本文采用鼠李糖 R9639、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P9 3 种益生菌基于特定比例制得复合益生菌粉,基于分析复合益生菌粉的应用剂量和 ICR 小鼠免疫功能强度的关联性,为前者的保健效果评估与最佳利用效率提供数据支撑并奠定充分基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

复合益生菌粉:由鼠李糖乳杆菌 R9639、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P9 按 40%:20%:40% 比例混合而成,产品活菌数均为  $2.0 \times 10^{11}$  CFU  $\cdot$  g<sup>-1</sup>。均购自北京科拓恒通生物技术股份有限公司(批号分别为:20210716001、20210518008、20210805002)。

### 1.2 实验动物

SPF 级雌性 ICR 小鼠(18~20 g)160 只(北京斯贝福实验动物技术有限公司)许可证号:SCXK(京)2019-0010;实验单位使用许可证编号:SYXK(京)

2020-0033。先于北京中医药大学动物培养室内饲养 5 d,在此期间进水与摄食均不受限制,每天晚上 6:00 按时补充食物和饮用水,饲养温度 18 ℃~28 ℃,湿度 38%~40%,光照不进行干预。

### 1.3 主要仪器和试剂

主要仪器:分析天平、冷冻离心机、CO<sub>2</sub> 培养箱、酶标仪等。主要试剂:绵羊红细胞(SRBC)(鸿泉生物)、鸡红细胞(鸿泉生物)、Hanks 液(pH7.2)(华奥正生科技有限公司)、RPMI1640 培养基(华奥正生科技有限公司)、刀豆蛋白 A(ConA)(华奥正生科技有限公司)、FBS(血清)(武汉普诺赛生命科技有限公司)、YAC-1 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)、SA 缓冲液(Servicebio)、印度墨汁(Servicebio)、0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Servicebio)、Giemsa 染液(Servicebio)等。

### 1.4 实验动物分组及给药

将 160 只小鼠随机分为空白对照组、低剂量组(0.42 mg/kg)、中剂量组(0.84 mg/kg)、高剂量组(2.5 mg/kg),每组各 40 只实验前各组差异没有可比性( $P > 0.05$ )。按照上述剂量配置成 20 mL/kg 的浓度进行灌胃给药,空白组给予去离子水灌胃。持续给药 30 d。给药结束后,脱颈处死,进行手术取材并检测相应的免疫指标。

### 1.5 实验方法

**1.5.1 小鼠胸腺、脾脏脏器指数测定实验** 记录小鼠末次给药后体重,取脾脏和胸腺,对其重量进行检测,按下式进行计算脏器指数<sup>[5]</sup>:

$$\text{小鼠胸腺指数} = \frac{\text{胸腺重量(mg)}}{\text{小鼠体重(g)}}$$

$$\text{小鼠脾脏指数} = \frac{\text{脾脏重量(mg)}}{\text{小鼠体重(g)}}$$

**1.5.2 足趾增厚法(DTH)测定迟发型变态反应** 新鲜羊血去纤维,生理盐水稀释 3 次(2000 r/min, 10 min),得到 20% 和 2%(v/v)的溶液,在灌胃 26 d 时,腹腔注射 2% 的 SRBC 0.2 mL,注射后第 4 天,

卡尺检测小鼠左后足跖部厚度, 重复 3 次。继续向左后足跖部皮下注射 20% 的 SRBC 20  $\mu\text{L}$ , 隔天测左后足跖部厚度, 处理前后足跖厚度的差值即为 DTH 结果。

**1.5.3 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验** 无菌环境下取脾, Hank's 液洗 3 次, 漂洗后 1000 r/min 离心 10 min, 检测细胞浓度, 并将终浓度稀释为  $1 \times 10^6$  个/mL, 每孔加 0.1 mL 细胞悬液, 继续补充培养基到总体积为 1 mL, 其中 1 孔中加 25  $\mu\text{L}$  ConA 液 (7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 另 1 孔作空白对照, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度孵箱中继续培养 72 h 并设 3 个平行孔。提前 4 h 把原来的培养液倒掉, 再次向孔内补充新鲜的 RPM1640 培养基与 MTT (5 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ , 培养至反应结束。完成后将培养液吸除, 向所有孔内补加 1 mL 异丙醇, 震荡溶解, 酶标仪 (570 nm) 测吸光度。

**1.5.4 血清溶血素溶血值的检测** 小鼠灌胃第 24 d, 取绵羊红细胞, 按照 1.5.2 方法稀释得到 2% (v/v) 的溶液, 腹腔注射 2% (v/v) 的 SRBC 0.2 mL, 第 28 天, 摘眼球取血, 2000 r/min 离心 10 min, 上清液中加入 300 倍体积的生理盐水, 取 1 mL 到试管内, 分别加入 10% SRBC 0.5 mL 以及 1 mL 补体, 水浴锅内 37  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min, 随后转移至冰内。1500 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL 补充 3 倍体积的文齐氏试剂, 取 10% (v/v) SRBC 0.25 mL, 补充 16 倍体积的文齐氏试剂。反应 10 min, 分别用酶标仪 (540 nm) 测 OD 值。按式 (1) 得半数溶血值 ( $\text{HC}_{50}$ ) 即为所求。

$$\text{样品 HC}_{50} = (\text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{SRBC 半数溶血}}) \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

**1.5.5 Jerne 改良玻片法检测抗体生成细胞** 灌胃第 25 d, 腹腔注射 0.2 mL 2% (v/v) SRBC 悬液, 免疫后的第 5 d, 取材, 脾制成单细胞悬液, 浓度调至  $2 \times 10^7$  个/mL。取 1 mL 压积 SRBC 补充至 5 mL 血清内, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min, 反复振荡, 离心取上清。琼脂糖 1 g, 双蒸水补足至 100 mL 制成表层培养基, 加热溶解, 45  $^{\circ}\text{C}$  保温, 与两倍体积 Hank's 液混合并摇匀, 各取 0.5 mL 置于试管内, 补充 50  $\mu\text{L}$  10% SRBC 及 20  $\mu\text{L}$  脾单细胞悬液, 试管中混匀, 铺在琼脂糖薄层的玻片表面, 琼脂凝固后, 玻片架上水平扣放, 二氧化碳培养箱内进行温育 1.5 h, 向玻片架凹槽中补充 8 倍体积的补体, 继续温育 1.5 h, 统计溶血空斑总量。

**1.5.6 乳酸脱氢酶 LDH 法测定 NK 细胞活性** 参照《中药药理实验方法学》的实验操作, 将 YAC-1 靶细胞进行标记处理, 小鼠酒精灭菌, 取脾

脏, 制成细胞悬液, 细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个/mL。50 : 1 的比例取总体积为 100  $\mu\text{L}$  的效应和靶细胞, 转移至 96 孔板内; 自然释放孔加 100  $\mu\text{L}$  靶细胞及培养液; 最大释放孔加同体积的 1% NP40 及靶细胞, 设置 3 个平行, 培养箱内孵育 4 h, 随即 1500 r/min 处理 5 min, 在新的培养板中, 每孔加上清液 100  $\mu\text{L}$ , 并将同体积的 LDH 基质液加入培养板, 避光反应 10 min, 继续补充 30  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的稀盐酸, 酶标仪 (490 nm) 测 OD 值, 统计 NK 细胞活性, 公式如下:

$$\text{NK 细胞活性} = (\text{OD}_{\text{反应孔}} - \text{OD}_{\text{自然释放孔}}) / (\text{OD}_{\text{最大释放孔}} - \text{OD}_{\text{自然释放孔}})$$

**1.5.7 小鼠碳廓清试验** 最后 1 次给药 1 h 后, 尾静脉注射印度墨汁, 浓度为 0.1 mL/10 g, 注射后立即计时, 2 min ( $t_1$ ) 和 10 min ( $t_2$ ) 进行小鼠眼眶后取血 20  $\mu\text{L}$ , 溶于 2 mL 0.1% (即 1 g/L) 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中, 洗净吸管壁附着的血, 摇匀。置分光光度计 (600 nm) 下比色, 测定光密度 (OD)。随即采取脱颈的方式将小鼠处死, 取出肝、脾脏和胸腺, 称重。随后计算各组小鼠胸腺指数、脾指数以及廓清指数、吞噬指数, 计算公式如下:

$$\text{胸腺 (脾) 指数} = \text{胸腺 (脾) 重 (mg)} / \text{体重}$$

$$\text{廓清指数 K} = \frac{\log \text{OD}_1 - \log \text{OD}_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数 } \alpha = \sqrt{3K} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

**1.5.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞** 取材前 30 min, 腹腔注射 1 mL 20% (V/V) 鸡红细胞悬液, 脱颈后继续给予 2 mL 生理盐水, 振荡小鼠 1 min, 随即在腹壁前剪开小口, 用移液枪吸出大约 1 mL 的生理盐水洗液, 将其以各 500  $\mu\text{L}$  的体积分别加入到载玻片中, 搪瓷盒提前垫上湿纱布, 将在载玻片放入搪瓷盒中, 随即放到孵箱中孵育 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 处理完用生理盐水洗去游离的细胞, 等待水分蒸发, 加入等体积丙酮-甲醇溶液固定, 4% 的 Giemsa-磷酸缓冲液浸泡 3 min, 置于无菌水中洗脱残留溶液, 油镜中观察细胞数量。计数 100 个/片, 统计吞噬指数与吞噬率。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的吞噬细胞数}}$$

## 1.6 统计学处理

应用 SPSS 25.0 软件对以上符合正态分布的计量数据资料进行单因素方差分析和组间 LSD 检

验,若数据资料不符合正态分布,则采用非参数检验统计学处理。结果用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 复合益生菌粉对小鼠体重的影响

在全部研究阶段,小鼠体征稳定,发育过程平缓,体重稳定增长,无死亡。小鼠经灌胃 30 d 后,经过统计学分析,与空白对照组比较,各组小鼠体重未见显著性差异( $F=0.885$ ,  $P=0.458$ ;  $P>0.05$ )表明小鼠体重增长正常,该益生菌长期口服安全性良好,见表 1。

表 1 复合益生菌粉对小鼠体重的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab.1 Effect of compound probiotic powder on body weight of mice( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	初体重(g)	终重(g)	体重差值(g)
空白对照组	23.40 $\pm$ 1.01	31.06 $\pm$ 1.45	7.67 $\pm$ 1.71
低剂量组	19.74 $\pm$ 0.36	27.49 $\pm$ 1.74	7.75 $\pm$ 1.92
中剂量组	20.11 $\pm$ 0.53	26.49 $\pm$ 3.54	6.38 $\pm$ 3.41
高剂量组	20.23 $\pm$ 0.53	26.54 $\pm$ 2.59	6.31 $\pm$ 2.41

$F=0.885$ ,  $P>0.05$ 。 $P$ 为与阴性对照组比较。

### 2.2 复合益生菌粉对小鼠脏器/体重比值的影响

相较于对照组,各剂量组脏器/体重比无显著差异( $F=0.844$ ,  $P=0.479$ ;  $F=0.732$ ,  $P=0.540$ ;  $P>0.05$ )。显示各剂量水平的复方益生菌粉对小鼠脏器作用程度有限,见表 2。

### 2.3 复合益生菌粉对小鼠细胞免疫机能的影响

**2.3.1 复合益生菌粉对小鼠迟发型变态反应的影响** 与空白对照组相比,低、中、高剂量组小鼠的足趾肿胀水平差异显著提升( $F=3.252$ ,  $P=0.033$ ;  $P<0.05$ ),并呈现剂量依赖性,见表 3。

表 2 复合益生菌粉对小鼠脏器/体重比值的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab.2 Effect of Compound Probiotic Powder on Organ/Body Weight Ratio in Mice( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	脾脏/体重(mg/g)	胸腺/体重(mg/g)
空白对照组	4.00 $\pm$ 0.29	2.65 $\pm$ 0.47
低剂量组	4.05 $\pm$ 0.22	2.40 $\pm$ 0.39
中剂量组	4.07 $\pm$ 0.51	2.43 $\pm$ 0.38
高剂量组	4.25 $\pm$ 0.26	2.48 $\pm$ 0.67

$F=0.844$ ,  $P>0.05$ ;  $F=0.732$ ,  $P>0.05$ 。

表 3 复方益生菌粉对小鼠迟发型变态反应的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab.3 Effect of Compound Probiotic Powder on Delayed Allergy in Mice( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	足肿胀程度差值(mm)
空白对照组	0.105 $\pm$ 0.086
低剂量组	0.117 $\pm$ 0.071*
中剂量组	0.170 $\pm$ 0.095*
高剂量组	0.215 $\pm$ 0.097*

$F=3.252$ ,  $*P<0.05$ 。

**2.3.2 复合益生菌粉对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化过程的作用** 与空白对照组相比,不同剂量组的小鼠脾淋巴细胞增殖能力均有显著增强,结果有统计学意义( $F=48.786$ ,  $P=0.000$ ;  $P<0.05$ ),说明该复合菌粉能够有效提高小鼠脾淋巴细胞的增殖能力,见表 4。

表 4 复合益生菌粉对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab.4 Effect of Compound Probiotic Powder on Lymphocyte Proliferation in Mice( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	淋巴细胞增殖能力
空白对照组	0.069 $\pm$ 0.018
低剂量组	0.095 $\pm$ 0.018*
中剂量组	0.112 $\pm$ 0.023*
高剂量组	0.174 $\pm$ 0.021*

$F=48.786$ ,  $*P<0.05$ 。

### 2.4 复合益生菌粉对体液免疫的影响

**2.4.1 复合益生菌粉对小鼠半数溶血值(HC<sub>50</sub>)的作用** 相较于对照组,中剂量组与高剂量组的半数溶血值显著升高( $F=30.544$ ,  $P=0.000$ ;  $P<0.05$ ),见表 5。

**2.4.2 复合益生菌粉对小鼠抗体细胞生成数的作用** 与空白对照组相比,复合益生菌粉各剂量组溶血空斑数显著增加( $F=22.095$ ,  $P=0.000$ ;  $P<0.01$ ),表明该复合益生菌粉对抗体细胞生成有增强作用,见表 6。

表 5 复合益生菌粉对小鼠半数溶血值的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab.5 Effect of Compound Probiotic Powder on Half Hemolytic Value of Mice( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	半数溶血值(HC <sub>50</sub> )
空白对照组	68.86 $\pm$ 1.97
低剂量组	66.09 $\pm$ 2.46
中剂量组	72.74 $\pm$ 2.76*
高剂量组	77.24 $\pm$ 2.06*

$F=30.544$ ,  $*P<0.05$ 。

表 6 复合益生菌粉对小鼠抗体细胞生成数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 6 Effect of compound probiotic powder on the number of antibody cells in mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	溶血空斑数(个/全脾细胞)
空白对照组	104.50 ± 18.54
低剂量组	131.38 ± 27.58**
中剂量组	165.29 ± 30.78**
高剂量组	241.67 ± 57.66**

$F = 22.095, P < 0.05$ 。

## 2.5 复合益生菌粉对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的作用

**2.5.1 复合益生菌粉对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的作用** 低、中、高剂量组的廓清指数和吞噬指数均显著高于空白对照组( $F = 338.79, P = 0.000; P < 0.05$ ), 且随着菌粉用量的增加, 小鼠细胞的碳廓清能力也有所增加。说明该复合益生菌粉能有效提高小鼠的碳廓清能力, 见表 7。

表 7 复合益生菌粉对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的作用( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 7 Effect of compound probiotic powder on carbon clearance of monocyte-macrophage in mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	廓清指数	吞噬指数
空白对照组	0.0049 ± 0.0015	4.3025 ± 0.2626
低剂量组	0.0105 ± 0.0015*	5.0439 ± 0.1829*
中剂量组	0.0208 ± 0.0027*	6.1996 ± 0.1770*
高剂量组	0.0445 ± 0.0049*	7.0339 ± 0.2683*

$F = 338.79, *P < 0.05$ 。

**2.5.2 复合益生菌粉对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的作用** 与空白对照组相比, 各剂量组小鼠的巨噬细胞吞噬率显著升高( $F = 113.625, P = 0.000; F = 120.271, P = 0.000; P < 0.05$ ), 说明该复合益生菌粉能够有效提高小鼠巨噬细胞对外源细胞的吞噬作用, 增强其细胞活性, 见表 8。

## 2.6 复合益生菌粉对小鼠 NK 细胞活性的影响

相对于对照组, 中、高剂量组的 NK 细胞活性显著提高, ( $F = 466.491, P = 0.000; P < 0.05$ ), 且 NK 细胞活性能力随着剂量的增加而增强, 这说明利用复合益生菌粉能够改善小鼠 NK 细胞活性, 增强 NK 细胞功能, 见表 9。

## 3 结论

益生菌的研究是目前医学科学中一个有价值

表 8 复合益生菌粉对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 8 Effect of compound probiotic powder on phagocytosis of chicken red blood cells by mouse macrophages( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	吞噬率(%)	吞噬指数
空白对照组	0.812 ± 0.136	0.0080 ± 0.0012
低剂量组	1.187 ± 0.270*	0.0118 ± 0.0028*
中剂量组	1.998 ± 0.179*	0.0200 ± 0.0018*
高剂量组	2.892 ± 0.402*	0.0289 ± 0.0039*

$F = 113.625, P = 0.000 < 0.05; F = 120.271, P = 0.000 < 0.05$ 。

表 9 复合益生菌粉对小鼠 NK 细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 9 Effect of compound probiotic powder on NK cell activity in mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	NK 细胞活性(%)
空白对照组	28.36 ± 7.62
低剂量组	34.94 ± 4.28
中剂量组	75.92 ± 4.57*
高剂量组	114.06 ± 6.23*

$F = 466.491, *P < 0.05$ 。

的研究领域, 益生菌是活的微生物, 是有益于宿主健康的微生物菌株, 在使用特定的剂量喂养宿主后, 其会为宿主带来诸多健康优势, 比如能够调节肠道微生物群和免疫机能。鼠李糖乳杆菌 R9639 可改善小鼠肠道菌群并增强小鼠免疫功能<sup>[6-8]</sup>。干酪乳杆菌 Zhang 在稳定肠道生态、抗氧化、预防治疗肿瘤、增强免疫等方面具有显著功能<sup>[9]</sup>。植物乳杆菌 P9 在促进农药降解、抗氧化、调节肠道菌群等方面具有强大活性<sup>[10]</sup>。有研究表明 3 种菌株均具有胃肠消化液良好的耐受性, 能够以活的状态进入人体肠道, 有良好的生物活性。

免疫包括先天免疫及特异性免疫, 是指机体通过识别“自我”和“非我”后产生免疫识别、免疫应答等一系列免疫反应的过程。其中先天免疫又叫非特异性免疫被认为是抵御病原体的第一线防御系统, 而这种一线防御系统在绝大部分情况下受到吞噬细胞与免疫活性分子的总量, 通过传递给抗原呈递细胞信号来激活脊椎动物的特异性免疫<sup>[11]</sup>。适应性免疫又叫特异性免疫, 该反应的关键参与者是 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 其中, T 淋巴细胞主要参与细胞免疫, B 淋巴细胞主要参与体液免疫<sup>[12]</sup>。T 淋巴细胞转化、增殖至致敏淋巴细胞的过程可通过 SRBC 刺激实现<sup>[13]</sup>。当 B

淋巴细胞接触到红细胞时,会产生一种特异性的抗体,即血清溶血素,当这种抗体与特异性抗原 SRBC 结合时,其水平可以反映出机体对这种抗体的抵抗能力<sup>[14]</sup>。

通过将 3 种益生菌鼠李糖乳杆菌 R9639、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P9 按照特定的比例混合应用,笔者发现该复合益生菌粉能够显著地改善小鼠的免疫系统,从而为深入探索这 3 种益生菌之间的协同机制,和益生菌粉未来在不同场景的利用提供参考。在本篇文章中,通过实验来评估小鼠的免疫系统,包括对胸腺、脾脏、溶血素、淋巴细胞、吞噬细胞、碳廓清以及 NK 细胞的监控。这些实验旨在更好的理解小鼠的细胞免疫、体液体液、吞噬细胞的功能,以及对抗病毒的非特异性免疫反应<sup>[15-17]</sup>。

在本研究中,全部纳入实验的小鼠体重增加情况良好,脾脏和胸腺指数相较于对照差异不显著,说明该复合益生菌粉的口服安全性良好且对小鼠免疫器官的影响较小。小鼠足趾用 SRBC 来刺激,造成免疫反应致小鼠足趾肿胀,通过观察其肿胀度,能够评价小鼠细胞免疫功能<sup>[18]</sup>。实验结果显示不同剂量组小鼠的足趾肿胀水平存在显著差异,说明该复合益生菌粉能提高机体对外来抗原的识别及清除能力。在 ConA 诱导小鼠淋巴细胞转化研究中,复合益生菌各组均能使小鼠脾淋巴细胞增殖水平光密度差异扩大,这两个实验说明复合益生菌粉不仅能有效改善小鼠足趾肿胀症状,还有助于增加其辨认和消灭外界病毒的能力,从而增强小鼠的细胞免疫功能。在对复合益生菌粉对体液免疫的实验中发现,复合益生菌粉的中、高剂量组的半数溶血值升高,抗体细胞生成数增加,这提示复合益生菌粉通过参与体液免疫影响小鼠的免疫功能。碳廓清实验和吞噬鸡红细胞的实验结果表明复合益生菌粉可以增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能,从而提高小鼠的免疫力。此外,NK 细胞也被证实为一种常见的重要的免疫淋巴细胞,具有非特异性抗肿瘤、抗病毒作用<sup>[19-21]</sup>。本实验结果表明,该复合益生菌粉的中高剂量组可以通过增强小鼠 NK 细胞的活性而增强免疫。

综上所述,由鼠李糖乳杆菌 R9639、干酪乳杆菌 Zhang、植物乳杆菌 P9 按照 40%:20%:40% 比例复配而成的复合益生菌粉可通过增强体液免疫、细胞免疫、单核-巨噬细胞功能和 NK 细胞代谢水平以提升小鼠的免疫功能。该实验为复

合益生菌粉的应用提供实验支撑,以促进复合益生菌粉更好的开发应用。

### [参考文献]

- [1] 余建新,韩春茂. 益生菌的作用机制及临床应用前景 [J]. 中国微生态学杂志, 2002, 14(6): 61-62.
- [2] 黄蕊蕊,刘文正,李亚楠. 复合益生菌粉对小鼠免疫机能的影响研究 [J]. 中国食物与营养, 2021, 27(7): 61-66.
- [3] 李晓萌,钟伟,徐森,等. 复合益生菌制剂对 Balb/c 小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 食品与发酵科技, 2017, 53(1): 50-52.
- [4] 李俊洁,陈庆森. 双歧杆菌调理和改善肠道相关疾病作用的研究进展 [J]. 食品科学, 2011, 32(23): 326-332.
- [5] 刘泽坤,马俊丽,李艳,等. 环磷酰胺诱导的小鼠免疫低下模型的方法学考察及金樱子提取物联合益生菌调节免疫功能的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(8): 1701-1708.
- [6] Wang W, Lin L, Du Y, et al. Assessing the viability of transplanted gut microbiota by sequential tagging with D-amino acid-based metabolic probes [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1317.
- [7] 任吴疆,张静,霍清,等. 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠肠道菌群及抗氧化能力的影响 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(13): 1-8.
- [8] 聂颖兰,焦玥,吴晓霞,鼠. 李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响及机制研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9461-9466.
- [9] 包秋华,王丽娜,张雨虹,等. 益生菌干酪乳杆菌 Zhang VBNC 态和正常态的代谢组学研究 [J]. 中国乳品工业, 2022, 50(6): 10-15.
- [10] 于淑俊,张连中,刘振权. 复合益生菌粉对功能性便秘小鼠润肠通便的作用 [J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(2): 142-151.
- [11] Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions [J]. J Leukoc Biol, 2011, 89(5): 685-695.
- [12] Sanchez-Trincado J L, Gomez-Perosanz M, Reche P A. Fundamentals and methods for T- and B-Cell epitope prediction [J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 2680160.
- [13] 史顶聪,赵宏宇,佟晓乐,等. 红景天当归不同配伍对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 食品研究与开发,

- 2020, 41(5): 28-33.
- [14] Mcgettigan S E, Debes G F. Immunoregulation by antibody secreting cells in inflammation, infection, and cancer[J]. *Immunol Rev*, 2021, 303(1): 103-118.
- [15] 冯萍, 陈芳, 陈少秀, 等. 氯强油搽剂对小鼠迟发型变态反应的影响 [J]. *儿科药学杂志*, 2020, 26(8): 3-6.
- [16] 牛雅萱, 杨华, 王礼群, 等.  $\beta$ -葡聚糖生物强化大米对小鼠免疫功能的影响 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46(21): 3977-3980.
- [17] 安洁, 王蕾, 吴涛, 等. 小鼠 NK 细胞体内扩增、分离纯化的方法研究 [J]. *军事医学*, 2017, 41(10): 850-855.
- [18] 徐瑞波, 高广琦, 白晓晔, 等. 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 的特异性荧光原位杂交探针设计及应用 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11): 230-235.
- [19] 许沛. NK 细胞数及 Th1/Th2 与再生障碍性贫血的相关性研究 [J]. *罕少疾病杂志*, 2024, 31(8): 126-128.
- [20] 李然, 孙丽艳, 陈婷婷, 等. 白细胞滤器中的 NK 及 T 细胞回收数量及其相关因素研究 [J]. *临床输血与检验*, 2024, 26(4): 451-456.
- [21] 丁萌, 吴斯琦, 朱慧敏, 等. 黄芪含药血清对 NK 细胞活性、NKG2A、NKG2D 及细胞因子 IFN- $\gamma$  表达的影响 [J]. *新疆医科大学学报*, 2024, 47(8): 1061-1065, 1072.

## 征稿启事

为积极支持和推动昆明医科大学学科建设和发展, 进一步提升《昆明医科大学学报》的办刊质量, 不断扩大本刊的学术影响力, 特对高质量稿源进行广泛征集。(1)国家自然科学基金资助课题的综述类论文可以在学报正刊发表;(2)对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医科大学“十三五”省级、校级重点学科立项建设的研究论文, 给予优先刊登。另外, 投稿时需同时附: 投稿单位证明、论文诚信承诺书以及基金项目证明。欢迎广大临床科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿。

网上投稿 <http://kmykdx.cnjournals.cn>, 电话: 0871-65936489, 65393133, 65922951, 65922874。

昆明医科大学学报编辑部

2024 年 1 月 1 日