

# 一株乳酸菌所产胞外多糖对荷瘤小鼠机体免疫功能影响的研究

顾笑梅 孔 健 王富生 马桂荣\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 对一株产胞外多糖(Exopolysaccharide, 简称 EPS)的乳酸菌 Z<sub>222</sub> 菌株的培养条件进行了优化, 其发酵液通过浓缩、除蛋白、脱色、乙醇沉淀、透析、CM-纤维素柱、DEAE-Sephadex 离子交换柱和 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 冷冻干燥后得到一种纤维状白色固体产品 EPS I。将该产品对荷肉瘤 S<sub>180</sub> 小鼠进行机体免疫功能影响的初步试验, 统计学处理结果表明, 它对迟发型超敏反应、免疫器官重量和脾细胞抗体形成均有较为明显的影响。EPS I 有希望作为一种新的免疫调节剂。

**关键词** 乳酸菌, 胞外多糖, 条件优化, 免疫功能

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)02-0251-06

乳酸菌(LAB)除被用于食品、饲料、工业乳酸等方面外, 在医药工业上也有相当重要的作用, 有的已被开发成保健品和药品加以利用, 在微生态学中具有重要的地位。LAB 的广泛应用促使人们对它进行更加深入的研究<sup>[1]</sup>。最近, 欧美及日本一些学者对 LAB 的大量研究表明, LAB 在抗变异原性、防癌抗癌和增强机体免疫力方面有着不可低估的作用<sup>[2,3]</sup>。乳酸菌胞外多糖(EPS)即是这类细菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的粘液多糖或荚膜多糖。仔细分析乳酸菌的生理功能均会发现与多糖有关。因为多糖类化合物广泛存在于动物、植物和微生物中, 作为生命物质的组成成分之一, 它们广泛参与了细胞的各种生命现象及生理过程的调节, 但由于其结构十分复杂, 并且其生物活性与其空间结构、分子量大小、分支度和溶解度有关, 所以迄今人们对其功能还未认识清楚。但是, 不断积累的证据表明, 多糖及其缀合物既是通讯的信息分子, 如抗原决定簇、受体分子上的接受者(激素受体、毒素受体)以及生物活性物质有关的信息携带者等; 又是细胞间的识别分子, 如性细胞粘着、病原体与寄主的作用、固氮菌的共生等<sup>[4]</sup>。同时, 大量药理及临床研究表明, 多糖类化合物是一种免疫调节剂, 能激活免疫受体, 提高机体的免疫功能, 在用于癌症的辅助治疗中, 具有毒副作用小、安全性高、抑瘤效果好等优点<sup>[5,6]</sup>。但有关乳酸菌产胞外多糖对机体免疫功能的影响研究国内尚未见报道。

本文对乳酸菌 Z<sub>222</sub> 产胞外多糖的发酵条件进行了优化, 从其发酵液中分离得到了多糖 EPS I, 并将 EPS I 用于治疗荷肉瘤 S<sub>180</sub> 小鼠, 可增强免疫功能下降的荷肉瘤小鼠的免

\* 通讯作者。E-mail: grma@beelink.com

作者简介: 顾笑梅(1970-)女, 安徽寿县人, 山东大学博士研究生, 主要从事微生物活性物质方面的研究。

E-mail: gxmyxc@163.com

收稿日期: 2002-06-13, 修回日期: 2002-10-24

疫功能等结果进行初步报道。

# 1 材料和方法

## 1.1 菌株和动物

$Z_{222}$  菌株为本实验室保藏,昆明系小鼠, Balb/c 小鼠,豚鼠。

## 1.2 培养基

MRS 培养基配方见参考文献 [7];条件试验在基本培养基中加入不同种类及不同浓度的糖。

## 1.3 试剂和仪器

CM-纤维素( Watman 进口,上海化学试剂站分装), DEAE-Sephadex A-25( Pharmacia 进口,上海化学试剂站分装), Sephadex G-100( Pharmacia ),  $S_{180}$  肿瘤( 山东省医科院提供 ), 环磷酸胺( 江苏恒瑞医药公司 );Alsever 液( 自制 ), Gey 氏液( 自制 ), Gey 氏溶血明胶液( 自制 ), 722 光栅分光光度计, 旋转蒸发仪, Spectra MAX190 微板光谱仪, 冷冻干燥机( LABCONCO )。

## 1.4 产 EPS I 培养条件优化

将活化的  $Z_{222}$  菌株按 1% 接种量加入 MRS 液体培养基中, 培养 72h, 间隔一定时间取样, 离心除菌体后测定单糖和多糖含量变化; 在基本培养基中加入不同种类的糖及不同浓度的糖, 分别接种  $Z_{222}$  培养 27h 后, 6 000r/min 离心除去菌体测定发酵液中含糖量的变化。测定方法采用 DNS 法和苯酚-硫酸法<sup>[8,9]</sup>。

## 1.5 多糖的分离提取

将  $Z_{222}$  菌接入 2L MRS 液体培养基中, 培养 24h 后, 6 000r/min 离心去除菌体, 收集上清液。向菌体中加入无菌水并置 50℃ 水浴 2 h。浸提两次离心后弃去菌泥合并上清液, 减压浓缩至适当体积。用蒸馏水透析 48h, 检测透析液中无单糖存在。再次浓缩。然后三氯乙酸除蛋白、20%  $H_2O_2$  脱色、乙醇沉淀、透析、浓缩、真空干燥。<sup>[4,10,11]</sup>

粗品 EPS 溶于适量蒸馏水中, 先后经 CM-纤维素柱、DEAE-Sephadex 离子交换柱和 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 苯酚-浓硫酸法检测收集含多糖组份, 最后真空浓缩、透析、冷冻干燥。<sup>[5,12]</sup>

## 1.6 EPS I 对荷瘤小鼠免疫功能调节

**1.6.1 对绵羊红细胞 (SRBC) 诱导的小鼠足垫迟发型超敏反应和对荷瘤小鼠免疫器官的重量的影响:** 昆明系小鼠 60 只, 雌雄兼用, 在右前肢接种肿瘤  $S_{180}$  后随机分成 6 组, 并称重做标记。然后连续 7d 给药, 第 3 天在小鼠的左足垫注射 0.5% 的 SRBC 悬液, 当天给药改为皮下途径。第 7 天测量小鼠的左足垫厚度, 并注射 0.5% 的 SRBC 悬液攻击左足。第 8 天, 小鼠称重, 测定小鼠被攻击后左足垫的厚度, 作记录后, 眼球放血致死, 解剖取脾脏称重<sup>[13]</sup>。

**1.6.2 对小鼠脾细胞抗体形成的影响试验:** Balb/c 小鼠 60 只, 雌雄兼用, 在右前肢接种肿瘤  $S_{180}$  后随机分成六组, 连续 8d 腹腔注射( ip )给药。第 9 天小鼠眼球放血致死, 用预冷的 Gey 氏液制成  $5 \times 10^6$  /mL 脾细胞悬液, 每管一次加脾细胞悬液 0.5mL, 0.2% 的 SRBC 0.5mL 及 1:30 补体 0.5mL, 摇匀后, 37℃ 孵育 1h (孵育期间轻轻摇动两次), 2 500r/min 离心 5min。

取上清在 413nm 处测 OD 值。同时需要做两种对照 ,一种用正常小鼠的脾细胞代替免疫小鼠脾细胞 ;一种用 Gey 氏液代替脾细胞悬液<sup>[ 13 ~ 15 ]</sup>。

2 结 果

2.1 产胞外多糖条件优化

2.1.1 时间对 EPS 产生的影响 :以葡萄糖为碳源在 32℃ 下培养 ,间隔一定时间测定葡萄糖的消耗 ,生物量和 EPS 的量。结果如图 1 所示 ,Z<sub>222</sub> 菌株在培养 6h 后进入稳定生长期 ,同时发酵液中葡萄糖的含量不断减少而 EPS 产量不断递增 ,在 27h 左右出现最大值。此时细菌的生长进入衰亡期 ,30h 左右单糖的量有所增加 ,EPS 在逐渐减少 ,说明 Z<sub>222</sub> 能分解 EPS 成单糖补充碳源使 Z<sub>222</sub> 又继续生长。50h 后发酵液中的 EPS 含量达到稳定值。所以 ,将发酵时间定为 27h。

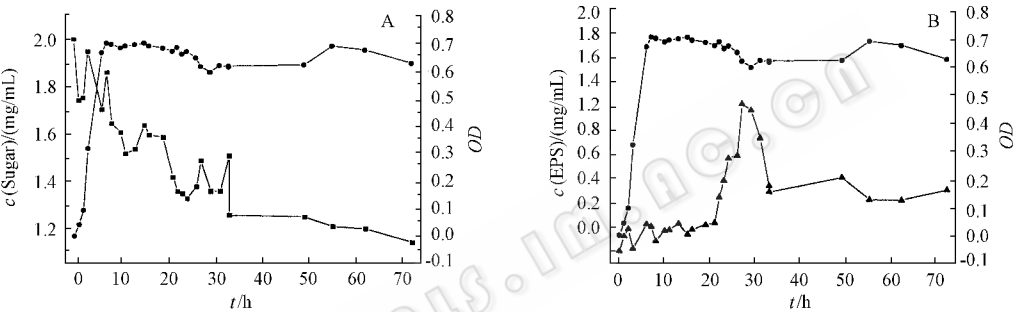


图 1 在 MRS 液体培养基中葡萄糖和生物量及 EPS 随时间的变化曲线

Fig.1 Curve of glucose and biomass and EPS in MRS broth  
A. Curve of glucose and biomass ;B. Curve of EPS and biomass  
- ◆ - Glucose ; - ● - Biomass ; - ▲ - EPS.

2.1.2 培养基中不同种类的糖对 EPS 产量的影响试验 :如图 2 所示 ,不同的糖对 Z<sub>222</sub> 菌产多糖的量有显著的影响 ,其中以葡萄糖作为碳源所得到的多糖的产量最高。

2.1.3 培养基中葡萄糖起始含量不同对产 EPS I 的影响试验 :如图 3 所示 Z<sub>222</sub> 菌在含 6% 葡萄糖的培养基中产生的 EPS I 量最高 ,但是与在含 4% 葡萄糖的培养基中 EPS I 的产量比较差别不明显 ,所以选择含葡萄糖 4% 的培养基较为经济。

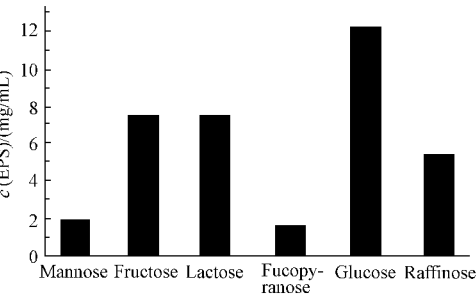


图 2 不同种类的糖对 EPS 产量的影响

Fig.2 Effect of different saccharides on productivity of EPS

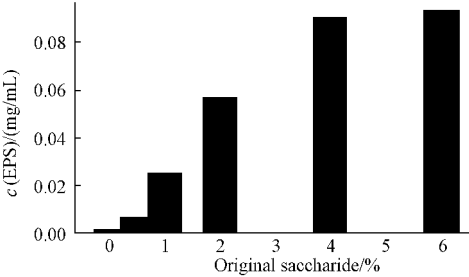


图 3 培养基中起始葡萄糖含量对 EPS 产量的影响

Fig.3 Effect of original glucose concentration  
in culture medium on yield of EPS

2.2 EPS I 的形态特征和理化性质

Z<sub>222</sub>菌发酵液经分离纯化后得到一种纤维状白色疏松固体物质。它在室温下极易吸水液化,易溶于水,不溶于丙酮、甲醇。最终 EPS I 的产量为 100mg/L。EPS I 经薄层层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳、紫外、红外、<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 分析证明其为纯多糖。

2.3 EPS I 对荷瘤小鼠免疫功能的初步影响

2.3.1 迟发型超敏反应( DTH ):结果表明 腹腔注射( ip )EPS I 的高( H ) 中( M ) 低( L )剂量组和 EPS I + 环磷酰胺( Cy )组都与生理盐水( normal saline ,简称 NS )对照组存在显著差异( p < 0.05 ),说明 EPS I 能提高荷瘤小鼠机体的细胞免疫功能。并且 EPS I + Cy 组与 Cy 也存在显著差异( p < 0.05 ),说明 EPS I 能在一定程度上对抗 Cy 引起的小鼠机体免疫功能的下降。

表 1 荷瘤小鼠 DTH 实验结果

Table 1 Results of DTH test in the mice planted with S<sub>180</sub>

Group	Dose	DTH
NS	2mL	0.14 ± 0.02
Cy	25mg/kg	0.08 ± 0.01
EPS I ( H )	100mg/kg	0.32 ± 0.02 *
EPS I ( M )	50mg/kg	0.31 ± 0.02 *
EPS I ( L )	25mg/kg	0.29 ± 0.01 *
EPS I + Cy	100mg/kg × 6 + 50mg/kg × 1	0.30 ± 0.02 *

n = 10 X ± SD ; \* p < 0.05 , compared with NS group .

2.3.2 对荷瘤小鼠免疫器官重量的影响

试验 结果表明 腹腔注射( ip ) EPS I 的各个剂量组均能使荷瘤小鼠的脾脏重量增加 ,与对照组相比脾指数有显著差异( p < 0.05 和 p < 0.01 )。 EPS I + 环磷酰胺( Cy )组与 Cy 也存在显著差异( p < 0.05 ),说明 EPS I 能明显改善环磷酰胺引起的小鼠脾脏重量的降低。

表 2 荷瘤小鼠脾重变化结果

Table 2 Test results of EPS I effect on the spleen weight of the mice planted with S<sub>180</sub>

Group	Dose	Spleen weight	Spleen index
NS	2mL	0.128 ± 0.031	0.005 ± 0.001
Cy	25mg/kg	0.066 ± 0.020	0.003 ± 0.002
EPS I ( H )	100mg/kg	0.19 ± 0.060 <sup>(1)</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>(1)</sup>
EPS I ( M )	50mg/kg	0.21 ± 0.035 <sup>(2)</sup>	0.009 ± 0.002 <sup>(2)</sup>
EPS I ( L )	25mg/kg	0.18 ± 0.049 <sup>(1)</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>(1)</sup>
EPS I + Cy	100mg/kg × 6 + 50mg/kg × 1	0.11 ± 0.047 <sup>(3)</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>(3)</sup>

n = 10 X ± SD ( 1 ) p < 0.05 , compared with NS group ( 2 ) p < 0.01 , compared with NS group ( 3 ) p < 0.05 , compared with Cy group .

2.3.3 对荷瘤小鼠脾细胞抗体形成的影响试验 结果表明 腹腔注射( ip ) EPS I 的高( H ) 中( M ) 低( L )剂量组都与生理盐水( NS )对照组和阳性对照组( Cy )存在显著差异( p < 0.05 ),说明 EPS I 能提高荷瘤小鼠脾细胞形成特异性抗体的能力 ,与环磷酰胺合使用能在一定程度上减轻由 Cy 引起的荷瘤小鼠特异性免疫力的降低。

表 3 脾细胞产生特异抗体能力的检测结果

Table 3 Test results of EPS I effect on the abilities of the antibody formation of spleen cell

Group	Dose	OD <sub>413</sub>
NS	2mL	0.269 ± 0.034
Cy	25mg/kg	0.202 ± 0.027
EPS I ( H )	100mg/kg	0.455 ± 0.063 *
EPS I ( M )	50mg/kg	0.362 ± 0.017 *
EPS I ( L )	25mg/kg	0.385 ± 0.029 *
EPS I + Cy	100mg/kg × 7 + 50mg/kg × 1	0.333 ± 0.055 *

n = 10 X ± SD ; \* p < 0.05 , compared with NS group and Cy group .

### 3 讨 论

影响乳酸菌 EPS 产量的因素诸多,如菌株、发酵条件、培养基组成等。其中碳源的种类对某些菌株合成 EPS 量影响尤为明显,同时也可能影响 EPS 的组成。已报道的产 EPS 的乳酸菌如德氏乳杆菌保加利亚种(*Lactobacterium delbrueckii* subsp. *bulgaricus*),干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*),乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)等,在合成胞外多糖的过程中,培养基中糖的种类对多糖的合成量都有一定的影响。本实验比较了 Z<sub>222</sub> 利用五种不同种类的糖为碳源合成 EPS 的量,结果表明以葡萄糖作为碳源所得到的 EPS 的量最高。这与国外有关这方面的报导是一致的<sup>[14]</sup>。Petronella 等人对乳酸乳球菌发酵生产 EPS 研究发现,用葡萄糖作为碳源比用果糖作为碳源 EPS 生成量高的原因是由于催化果糖-1,6-二磷酸转化为果糖-6-磷酸的果糖二磷酸酶(FBPase)活性低,乳酸菌从果糖生物合成糖类核苷酸的必需阶段受到限制。通过 *fbp* 基因过量表达使得 EPS 生成量大幅提高,进一步证明了 FBPase 限制了以果糖作为碳源的乳酸菌合成 EPS 的量<sup>[15~18]</sup>。

对荷瘤小鼠机体的免疫调节作用试验结果显示出 EPS I 有较高的促进淋巴细胞产生特异抗体的能力,能对抗由环磷酰胺引起的荷瘤小鼠脾脏重量的降低和提高荷瘤小鼠的迟发型超敏反应应答能力。因此可以看出, EPS I 提高荷瘤小鼠的免疫力是通过 T 细胞诱导的,详细机制可能与该多糖的特殊结构有关。什么样的结构才具有增强和恢复机体免疫力的作用,这是今后多糖研究的重点。目前已探索到一些规律<sup>[19]</sup>,如  $\beta(1 \rightarrow 2)$  为主链的葡聚糖、甘露糖和半乳糖,大都有一定的抑瘤活性,均一的  $(1 \rightarrow 6)$ - $\beta$ -D-葡聚糖是水不溶的,没有抗肿瘤活性,但经成部分或完全溶于水,就显示出很强的抗肿瘤活性,含乙酰化的  $(1 \rightarrow 6)$ - $\beta$ -D-葡聚糖,有抑瘤活性,如果除去乙酰基,就丧失了抗肿瘤活性。由于多糖结构复杂,其结构与功能关系中的机理还不完全清楚,对此我们将做深入的研究来揭示 EPS I 增强免疫力的机理。

### 参 考 文 献

- [1] 杨洁彬,郭兴华,张 簾,等.乳酸菌—生物学基础及应用.北京:中国轻工业出版社,1996.179~180,246~249.
- [2] 胡东良.乳酸菌的抗肿瘤、抗突变原及免疫增强作用.中国乳品工业,1997,25(6):12~14.
- [3] Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 76: 383~389.
- [4] 田庚元,冯宇澄.多糖类免疫调节剂的研究与应用.化学进展,1994,4(2):114~124.
- [5] 王 鑫,马桂荣,孔 建,等.几株乳酸菌的分离鉴定.生物技术,1994,4(1):387~391.
- [6] 张惟杰.糖复合物生化研究技术.第二版.杭州:浙江大学出版社,1999.10~12.
- [7] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1982.9~11.
- [8] Elvin M, Marshall V M, Gu Y. Environmental factors influencing exopolysaccharides from thermophilic strains of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 1999, 34, 137~143.
- [9] Richard V K, Joey D. Marugg I I. Can Swam: Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 1997, 242: 387~397.
- [10] David R. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. *Analytical Biochemistry* 1979, 99: 474~476.
- [11] 张均田.现代药理实验方法(上册).北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998.708,738,855.
- [12] 徐淑云,陈 修,卞如濂.药理学实验方法学.北京:人民卫生出版社,1993.33~35.

[ 13 ] Simpson M A , Gozzo J J , Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis in vitro. *J Immunol Methods* ,1978 **21** :159.

[ 14 ] Macedo M G ,Lacroix C ,Gardner N J ,*et al* .Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal* ,2002 , **12** :419 ~ 426.

[ 15 ] Kleerebezem M , Boels I C , Groot M N , *et al* .Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* :the impact of genomics and metabolic modelling. *Journal of Biotechnology* ,2002 **98** ( 2 - 3 ) :199 ~ 213.

[ 16 ] Petronella J L ,Lionel T ,Ericde V ,*et al* .Physiological function of exopoly-saccharides produced by *Lactococcus lactis* . *International Journal of Food Microbiology* ,2001 **64** :71 ~ 80.

[ 17 ] Kleerebezem M. Exopolysaccharides produced by *lactococcus lactis* :from genetic engineering to improved rheological properties ? *Antonie van Leeuwenhoek* , 1999 , **76** :357 ~ 365.

[ 18 ] Laws A ,Gu Y ,Marshall V. Biosynthesis ,characterisation ,and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances* ,2001 **19** :597 ~ 625.

[ 19 ] Luc D V ,Bart D. Hetetopolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* ,1999 **23** :153 ~ 177.

**Exopolysaccharide I ( EPS I ) Purified from a Strain of Lactic Acid Bacterium Z<sub>222</sub> and Studying on the Effect of EPS I on the Immunofunction of Mice Planted with S<sub>180</sub>**

Gu Xiaomei Kong Jian Wang Fusheng Ma Guirong\*

( State Key Laboratory of Microbial Tecnology , Shandong University , Jinan 250100 , China )

**Abstract :** Lactic bacteria strain Z<sub>222</sub> isolated from intestine of a cock by our lab before yielded exopolysaccharide( EPS ). The conditions of fermentation have been optimized through altering culturing time ,changing the concentration of glucose of medium and so on. Subsequently ,the rough crystal of exopolysaccharide was purified by CM-cellulose column chromatography ,DEAE-Sephadex A-25 ionexchange and Sephadex G-100 gel chromatography.

The preliminary immunological efficacy of exopolysaccharide I ( EPS I ) against S<sub>180</sub> planted in mice was carried out. The test results showed that EPS I can significantly inhibit DTH( delayed-type hypersensitivity ) induced by SRBC( sheep red blood cell ) , increase the weight of spleen and enhance the abilities of the antibody formation of spleen cell.

**Key words :** Lactic bacterium ,Exopolysaccharide I ,Optimization , Immunofunction

\* Corresponding author. E-mail :grma@beelink.com