



双歧杆菌对中国对虾原肌球蛋白致敏小鼠的免疫调控作用

彭吉祥, 王彦波, 傅玲琳*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品微生物技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘要: 【目的】比较研究婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis* 13.085)对中国对虾原肌球蛋白致敏 BALB/c 小鼠预防与治疗过敏反应的差异, 探究其对致敏小鼠 Treg/Th17 细胞平衡及相关细胞因子的影响。【方法】采用硫酸铵盐析及等电点沉淀法纯化中国对虾原肌球蛋白(TM), 将中国对虾 TM 和弗氏佐剂混合液腹腔注射诱发 BALB/c 小鼠致敏, 建立动物过敏模型。将实验小鼠随机分为正常对照组、治疗对照组、双歧杆菌治疗组、预防对照组和双歧杆菌预防组。观察分析小鼠过敏症状(腹泻、肺组织 HE 染色比较、称重法测定小鼠体重和脾脏脏器系数变化), 采用 ELISA 测定小鼠血清中特异性 IgE、IgG2a 和组胺的含量, 采用流式细胞术测定脾脏 T 淋巴细胞亚群(Treg、Th17)数量, 采用荧光定量 PCR 测定脾脏中 Treg 型和 Th17 型细胞因子和转录因子的表达量。【结果】纯化得到中国对虾原肌球蛋白纯度为 84.93%, 得率为 60.88%。体内试验表明, 双歧杆菌治疗组和预防组相比于对照组, 腹泻和过敏症状均有明显的缓解; 不同时期的双歧杆菌干预均对过敏小鼠肺组织症状有明显的改善作用, 且可降低过敏小鼠的脾脏脏器系数。第 56 天实验周期结束后发现, 相比预防对照组和治疗对照组, 双歧杆菌预防组和治疗组小鼠血清中特异性 IgE 和组胺含量显著降低($P<0.05$), 脾脏 Treg/Th17 比值显著升高($P<0.05$), Th17 型细胞因子 IL-17A mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$); 双歧杆菌治疗组相对于治疗对照组, Treg 型细胞因子 CD25 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。此外, 双歧杆菌治疗组血清特异性 IgE 及 IL-17A mRNA 转录水平显著低于双歧杆菌预防组($P<0.05$), 而 Treg/Th17 比值及 CD25 mRNA 转录水平显著高于预防组($P<0.05$)。【结论】双歧杆菌 13.085 能有效缓解小鼠过敏症状, 且治疗免疫调控效果优于预防效果, 其作用可能通过平衡 Treg/Th17 细胞亚群数量, 促进 Treg 型细胞因子表达而抑制 Th17 型细胞因子分泌, 从而阻断炎性抗体及组胺释放。

关键词: 中国对虾原肌球蛋白, 双歧杆菌, 过敏, 免疫调控

食物过敏已成为全球广泛关注的食品安全问题之一, 其发生率逐年上升。虾、蟹等甲壳类水产品由于其味道鲜美且营养丰富而深受消费者的喜爱, 虾类富含原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)、

基金项目: 国家自然科学基金(31571770); 浙江省自然科学基金(LY14C200001)

*通信作者。Tel: +86-571-28008963; E-mail: fulinglin@zjgsu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-03; 修回日期: 2016-11-04; 网络出版日期: 2016-11-29

精氨酸激酶(Arginine kinase, AK)和肌球蛋白轻链(Myosin light chain, MLC)等过敏原, 具有很强的致敏性^[1]。其中, 原肌球蛋白是一种过敏性糖蛋白, 分子量为 35–40 kDa, 主要通过诱导 IgE 抗体介导的 I 型超敏反应, 引起机体强烈的过敏反应^[2]。过去的研究多认为过敏反应主要是 Th2 主导的炎症性反应^[3]: 即 Th2 占优势的 Th1/Th2 失衡, 主要表现为 Th2 细胞作为介导体液免疫的重要细胞, 其数量增加、功能亢进的最终结果是诱导 B 细胞产生高水平的 IgE 应答和嗜酸性粒细胞活化, 并引起组胺、白三烯等多种炎性介质释放, 导致过敏反应发生; 而 Th1 细胞可分泌大量的 IL-2、IL-12 和 IFN- γ 等细胞因子, 抑制 Th2 型细胞的活性, 阻断 IgE 的合成, 从而缓解过敏症状。然而, 在最近的过敏及自身免疫性疾病研究中发现, T 淋巴细胞亚群中调节性 T 细胞(Treg)和 Th17 之间的平衡同样可以导致免疫紊乱^[4–5]。

近年来, 研究学者希望能借助益生菌来有效减缓过敏反应, 其免疫调节作用已逐渐被发现, 主要是因为益生菌可以调节机体产生较多数量的 Treg, 通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等细胞因子诱导针对自身以及外来抗原产生外周免疫耐受, 从而抑制过敏反应^[6]。前期体内外研究发现, 双歧杆菌 13.085 能够显著抑制肥大细胞内囊泡在过敏原 TM 刺激下的脱颗粒运动, 且显著缓解小鼠过敏反应。然而, 不同时期的双歧杆菌干预过敏小鼠是否会存在差异? 其缓解机制也有待进一步研究。本实验通过构建的动物模型, 探究双歧杆菌 13.085 对中国对虾原肌球蛋白致敏 BALB/c 小鼠预防与治疗过敏反应的差异, 及其体内免疫调控机制, 为食品过敏的预防与控制提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株: 婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis* 13.085)由浙江省食品微生物技术研究重点实验室分离保存。将菌种活化后接种于 MRS 肉汤培养基, 37 °C 厌氧环境培养 24 h, 菌悬液于 2000 \times g、4 °C 离心 10 min, 沉淀用磷酸缓冲液(PBS)重悬调整菌悬液浓度为 10⁹ CFU/mL, 4 °C 保存待用。

1.1.2 实验动物: 雌性无特定病原体级(SPF)BALB/c 小鼠, 4–6 周龄, 体重(20 \pm 1) g, 购自杭州师范大学实验动物中心。饲养环境温度(23 \pm 2) °C, 湿度 50%–75%, 标准小鼠饲料喂养(检测不含过敏原成分), 自由饮水。

1.1.3 主要试剂: 弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司; 兔抗鼠 IgE、IgG2a 酶标二抗购自美国 Southern Biotech 公司; FITC 标记的 CD4 抗体、Percp-cy5.5 标记的 IL-17 抗体、PE 标记的 CD25 抗体均购自美国 eBioscience 公司; Mouse-HIS ELISA 试剂盒(BM1406117)购自上海宝曼生物有限公司; 反转录试剂盒、SYBR Mix 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 中国对虾原肌球蛋白的提取

纯化中国对虾原肌球蛋白采用硫酸铵盐析及等电点沉淀法^[2], 具体改进步骤如下: 将去头、去尾、去虾线得到的虾肉置于缓冲液 A (50 mmol/L KCl、2 mmol/L NaHCO₃)溶液中充分匀浆, 4 °C 离心取沉淀, 重复操作 4 次; 预冷的丙酮洗涤沉淀, 搅拌过滤, 充分挥发虾肉中残留的丙酮; 将制好的虾肌肉丙酮粉置于缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L KCl、0.1 mmol/L 二

硫苏糖醇 DTT)中抽提过夜, 4 °C 离心取上清; 调节上清液的 pH 至 4.5, 并缓慢加入 40% (NH₄)₂SO₄ 溶液, 充分搅拌, 4 °C 离心取沉淀; 取上清液再次加入 40% (NH₄)₂SO₄ 溶液, 充分搅拌, 4 °C 离心取沉淀。缓冲液 B 分别溶解上述 2 次沉淀, 沸水浴加热 10 min, 冰上迅速冷却; 4 °C 离心取上清, 即为提取的中国对虾原肌球蛋白液。

1.3 蛋白含量测定及 SDS-PAGE

采用 Bradford 分光光度法测定蛋白含量。SDS-PAGE 分析蛋白提取过程中原肌球蛋白含量与纯度的变化, 采用 Alpha 化学发光凝胶成像系统(FluorChem HD2, Proteinsimple, USA)成像蛋白图谱, 采用 Proteinsimple 公司 AlphaView SA 3.4.0 电泳图像分析软件进行分析处理。

1.4 原肌球蛋白过敏动物模型的建立

将 BALB/c 小鼠随机分成 5 组(每组 8 只), 分别设为正常对照组(Negative)、治疗对照组(Positive1)、双歧杆菌治疗组(*B. infantis* therapy)、预防对照组(Positive2)和双歧杆菌预防组(*B. infantis* prevention), 如图 1 所示。治疗对照组和双歧杆菌治疗组小鼠分别在第 7、14、21、28 天腹腔注射 0.2 mL 浓度为 6 mg/mL 的过敏原(0.1 mL 弗氏佐剂+0.1 mL 12 mg/mL TM), 在第 28–56 天双歧杆菌治疗组每天灌胃 0.5 mL/只 1 次的双歧杆菌菌悬液(共 28 d), 最终在第 56 天致敏激发治疗对照组和双歧杆菌治疗组后取样(图 1-A)。双歧杆菌预防组在 0–28 d 每天灌胃 1 次, 然后预防对照组和双歧杆菌预防组分别在第 28、35、42、49 天腹腔注射免疫过敏原, 最终在第 56 天致敏激发后

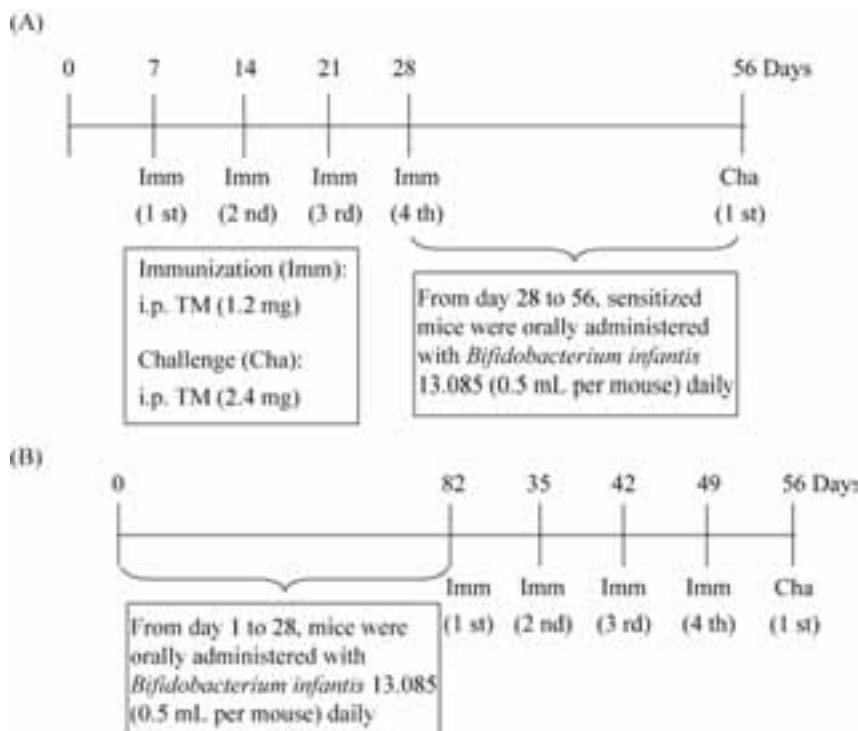


图 1. 原肌球蛋白过敏动物模型的建立及免疫程序

Figure 1. Experimental design of *in vivo* sensitization and probiotic treatment. A: therapy model; B: prevention model. i.p., intraperitoneal injection; i.g., intragastric administration.

取样(图 1-B)。正常对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水, 并以等量生理盐水灌胃。末次腹腔注射激发 2 h 后, 统一处死小鼠取样(眼眶静脉取血、肺、脾脏), 同时观察小鼠腹泻和过敏症状并评分, 评分标准见表 1^[7-8]。

1.5 肺组织学分析

将小鼠肺组织用 4% 多聚甲醛固定, 进行常规石蜡切片制作, 采用 HE 染色并在显微镜下观察 (10×40 倍)。

1.6 小鼠体重和脾脏脏器系数变化分析

在 BALB/c 小鼠饲养实验周期内, 每周称重 1 次, 共 9 次。脏器系数计算公式按照公式(1)进行。

$$\text{脾脏脏器系数} = \frac{\text{脾脏重量}}{\text{小鼠体重}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

1.7 血清特异性抗体和组胺含量的测定

特异性 IgE、IgG2a 测定采用间接 ELISA 法, 一抗为稀释 20 倍的小鼠血清, 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠 IgE 和 IgG2a 二抗 37 °C 孵育

1 h 后 TMB 显色, 最终测定 IgE 在波长 490 nm 处的吸光度值以及 IgG2a 在波长 450 nm 处的吸光度值。组胺含量测定按照 Mouse-HIS ELISA 检测试剂盒操作说明进行。

1.8 流式细胞术测定 T 细胞亚群数量

无菌取小鼠脾脏组织研碎制成细胞悬液, 裂解红细胞后将细胞浓度调至 10⁷ 个/mL, 分别与 FITC 标记的 Anti-Mouse CD4、PE 标记的 Anti-Mouse CD25 和 Percp-cyanine 5.5 标记的 Anti-Mouse IL-17 反应(4 °C、30 min)。PBS 缓冲液清洗后, 细胞悬浮于 PBS 缓冲液中, 通过流式细胞仪(Beckman Coulter, USA)检测。同时设定空白对照组和阴性对照组。

1.9 荧光定量 PCR 测定细胞因子和转录因子表达量

脾脏 RNA 用 Trizol 法提取, RNA 纯度用 NanoDrop2000 测定, 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计并合成(表 2)。反应体系为 20 μL: SYBR Mix 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, cDNA

表 1. 小鼠过敏症状与行为评分表

Table 1. Evaluation of allergic symptoms scores in mice

Symptoms	Scores			
	0	1	2	3
Diarrhea	Normal stools	A few wet and unformed stools	A number of wet and unformed stools with moderate perianal staining of the coat	Severe, watery stool with severe perianal staining of the coat
Anaphylactic symptoms	No symptoms	Reduced activity, trembling of limbs	Loss of consciousness	Convulsions, death

表 2. 荧光定量 PCR 分析的基因引物序列

Table 2. List of primers used for real-time PCR analyses

Genes	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
Foxp3	TTTCCAAGAACGGGCATTA	TGTGGCTGACTGAGGGTGT
CD25	ACACCTGTAAGCCCAGCTCT	TGGAAAGGTTGAGGGGTAAG
IL-17A	AGGGAGAGCTTCATCTGTGG	AGATTCATGGACCCCAACAG
IL-23	TGCTGGATTGCAGAGCAGTAA	GCATGCAGAGATTCCGAGAGA
β-actin	CGCAAAGACCTGTATGCCAAT	GGGCTGTGATCTCCTTCTGC

2 μL , ddH₂O 7.2 μL 。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 40 次。基因相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法计算。

1.10 数据处理

实验数据采用 Origin8.5 和 SPSS19.0 进行统计分析, 各组数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 比较均值采用 Duncan's 检验, 以 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著差异。

2 结果和分析

2.1 中国对虾原肌球蛋白的提取及 SDS-PAGE 分析

通过考马斯亮蓝法计算出纯化过程中每个步骤获得的样品蛋白总量, 再经 AlphaView SA 3.4.0 软件分析每个步骤获得的样品 SDS-PAGE 条带(图 2), 得出每个步骤样品中中国对虾原肌球蛋白(分子量约为 35.8 kDa)的百分含量, 进而得出纯化过程中中国对虾原肌球蛋白的得率及纯化倍数。表 3 结果显示, 最终纯化的中国对虾原肌球蛋白百分含量为 84.93%, 得率为 60.88%。

2.2 双歧杆菌缓解小鼠致敏反应的效果评价

2.2.1 小鼠过敏症状行为打分: 末次腹腔注射激发 0–2 h 后观察腹泻和过敏症状, 由图 3 可看出, 相

对于正常对照组而言, 治疗和预防对照组小鼠都出现不同程度的腹泻(图 3-A)及过敏症状(图 3-B), 主要表现为粪便不成形, 成液状, 量较多, 肛门周围有明显染色现象, 活动交流能力减弱 ($P < 0.05$)。而双歧杆菌治疗组和预防组的腹泻和过敏症状有明显缓解 ($P < 0.05$), 而双歧杆菌治疗组和预防组之间没有明显变化 ($P > 0.05$)。

2.2.2 肺组织学分析: 如图 4 所示, 通过对不同处理组小鼠肺组织 HE 染色发现, 相对于正常对照组, 经过中国对虾原肌球蛋白致敏的小鼠肺出现明显炎症性改变, 肺间质和肺泡内可见炎性细



图 2. 不同纯化阶段中国对虾原肌球蛋白 SDS-PAGE 图谱

Figure 2. SDS-PAGE pattern of purified *Fenneropenaeus chinensis* tropomyosin. Lane M: molecular marker; lane 1–4: supernatants obtained from four successively extractions by buffer A; lane 5: 20% ammonium sulphate fraction; lane 6: 20%–30% ammonium sulphate fraction; lane 7 & 8: the heat-treated supernatant of resuspended 20% (lane 7) or 20%–30% (lane 8) ammonium sulphate fraction.

表 3. 中国对虾原肌球蛋白纯化过程中含量的变化

Table 3. Content changes of *Fenneropenaeus chinensis* tropomyosin (TM) during purification

Purification process	Total protein/mg	Tropomyosin percentage/%	Tropomyosin yield/%	Tropomyosin purification factor
Supernatant of extraction by buffer B	14.37	50.09	100	1.00
Mixture of ammonium sulphate fraction	8.15	65.48	74.14	1.31
Heat-treated supernatant of resuspended mixture of ammonium sulphate fraction	5.16	84.93	60.88	1.70

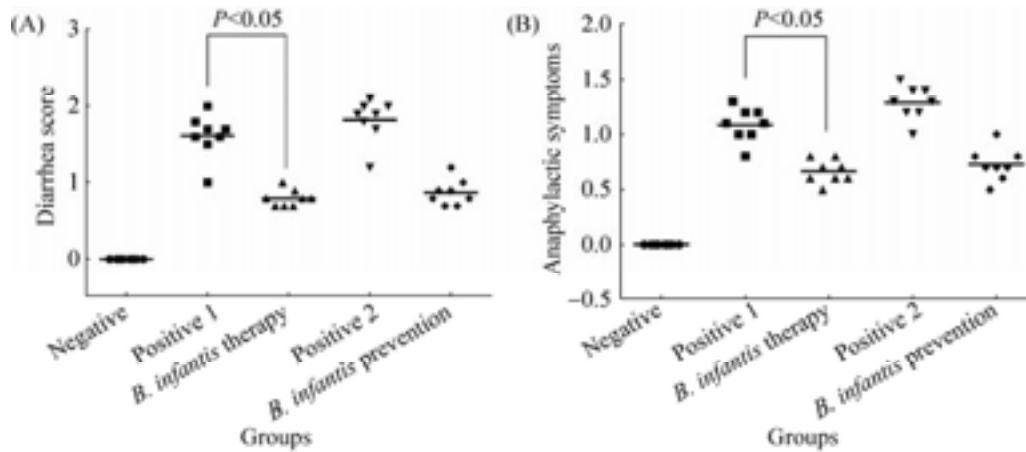


图 3. 双歧杆菌对小鼠过敏症状行为的影响
Figure 3. Effect of *B. infantis* on allergic symptoms in mice.

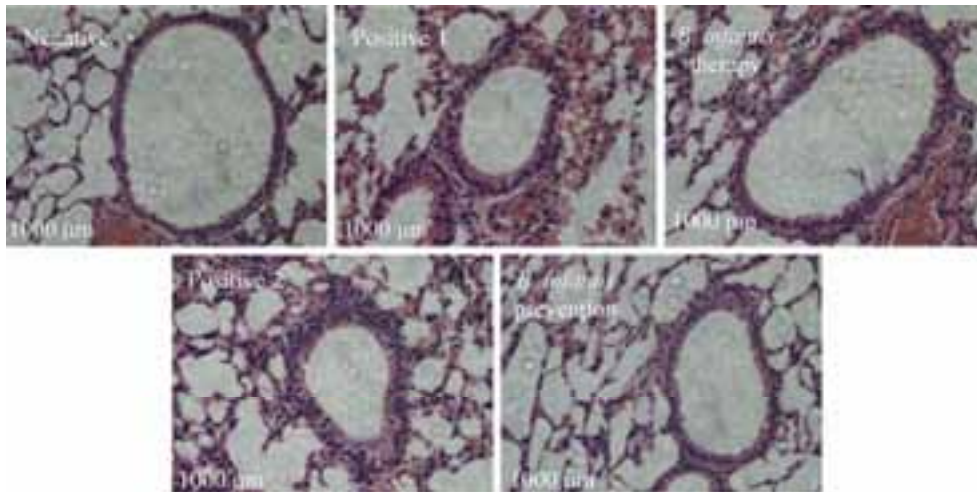


图 4. 双歧杆菌不同处理组小鼠肺组织变化
Figure 4. Histological analyses of lung tissues in different *B. infantis* treated groups.

胞浸润，以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞为主，终末细支气管上皮细胞部分断裂及脱落，管壁增厚，支气管周围有大量黏液分泌，杯状细胞增生，同时在中国对虾原肌球蛋白致敏的小鼠中观察到呼吸节奏加快的症状，类似于支气管哮喘病症。而经过双歧杆菌干预后，双歧杆菌治疗组和预防组小鼠肺间质和肺泡内炎性细胞浸润明显减少，终末细支气管组织形态结构较完整。

2.2.3 小鼠体重和脾脏脏系数变化分析: 由图 5

所示，由于小鼠过敏后出现腹腔积水现象，治疗对照组和双歧杆菌治疗组相对于正常对照组而言，小鼠体重增长较快。而预防对照组和双歧杆菌预防组相对于正常对照组，初期由于灌胃了双歧杆菌体重增长较慢，后期注射过敏蛋白后体重增长速度加快。至第 56 天，处理组的小鼠体重均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)。随着致敏时间的延长，治疗和预防对照组相对于正常组，小鼠由于出现脾脏浮肿和脂肪堆积等现象，脾脏重量增加，脾脏脏

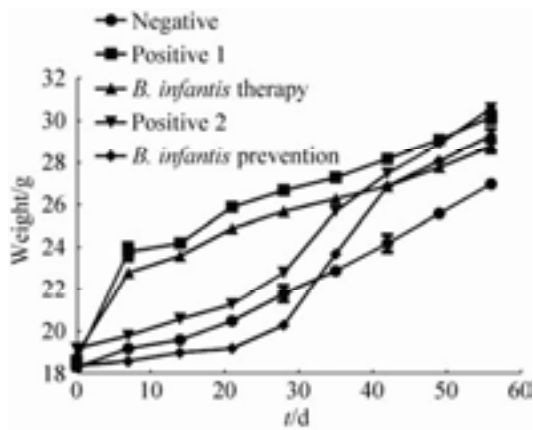


图 5. 双歧杆菌不同处理组小鼠体重变化趋势

Figure 5. Body weight changes of different *B. infantis* treated groups. The data represent mean \pm SD of triplicate samples. Experiments were repeated for three times.

器系数增加明显($P<0.05$); 而经双歧杆菌干预后, 双歧杆菌治疗组和预防组分别相对于治疗和预防对照组脾脏脏系数显著降低($P<0.05$) (表 4)。

2.2.4 小鼠血清特异性抗体和组胺含量测定: 末次腹腔注射激发后眼眶静脉取血, 间接 ELISA 测小鼠血清中特异性 IgE 和 IgG2a 含量, 从图 6 可以看出, 治疗对照组和预防对照组相对于正常对照组而言, 随着致敏次数的增加小鼠血清中特异性抗体水平和组胺含量逐渐升高; 双歧杆菌治疗组和双歧杆菌预防组相对于治疗和预防对照组, 特异性 IgE 水平和组胺含量明显降低($P<0.05$), 而特异性 IgG2a 水平升高($P>0.05$); 其中双歧杆菌治

疗组相对于双歧杆菌预防组, 特异性 IgE 水平更低($P<0.05$)。说明双歧杆菌可有效缓解对虾原肌球蛋白引起的过敏效应。

2.3 双歧杆菌对致敏小鼠脾脏 Treg 和 Th17 细胞分化的调控

为研究双歧杆菌对过敏小鼠脾脏中 Treg 和 Th17 细胞数量及分化的影响, 采用流式细胞仪分别检测正常对照组、治疗对照组、双歧杆菌治疗组、预防对照组和双歧杆菌预防组中 CD4⁺CD25⁺Treg 和 Th17 细胞数量。如表 5 所示, 治疗对照组和预防对照组 Treg/Th17 比例显著低于正常对照组 ($P<0.01$), 而双歧杆菌治疗组和预防组 Treg/Th17 比例均显著高于治疗和预防对照组, 其中双歧杆菌治疗组 Treg/Th17 比例显著高于双歧杆菌预防组 ($P<0.01$)。

2.4 双歧杆菌对 Treg 和 Th17 型细胞因子和转录因子表达量的影响

由图 7 可知, 双歧杆菌预防对照组和治疗对照组相对于正常对照组, 小鼠脾脏中 Th17 型细胞因子 IL-17A、IL-23 mRNA 表达水平升高 ($P<0.01$), Treg 型转录因子 CD25 mRNA 表达水平增加 ($P<0.05$), Foxp3 表达量有所增加 ($P>0.05$)。相比于预防对照组和治疗对照组, 双歧杆菌预防组和治疗组 Th17 型细胞因子 IL-17A mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 双歧杆菌治疗组相对于治疗对

表 4. 第 56 天不同处理组小鼠脾脏脏系数的比较 ($\bar{x} \pm SD$)

Table 4. Comparison of splenic organ coefficient in different groups on day 56 ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	Weight/g	Spleen weight/mg	Organ coefficient/%
Negative	27.02 \pm 0.28 ^a	16.71 \pm 0.45 ^a	0.062 \pm 0.008 ^a
Positive 1	30.21 \pm 0.31 ^b	27.85 \pm 1.23 ^b	0.092 \pm 0.012 ^b
<i>B. infantis</i> therapy	28.82 \pm 0.43 ^c	20.43 \pm 1.29 ^c	0.071 \pm 0.006 ^{ac}
Positive 2	30.63 \pm 0.32 ^b	30.82 \pm 1.96 ^{bd}	0.101 \pm 0.015 ^{bd}
<i>B. infantis</i> prevention	29.32 \pm 0.47 ^c	21.77 \pm 0.69 ^c	0.074 \pm 0.005 ^{ac}

The different lowercase letters in same columns mean significant difference ($P<0.05$).

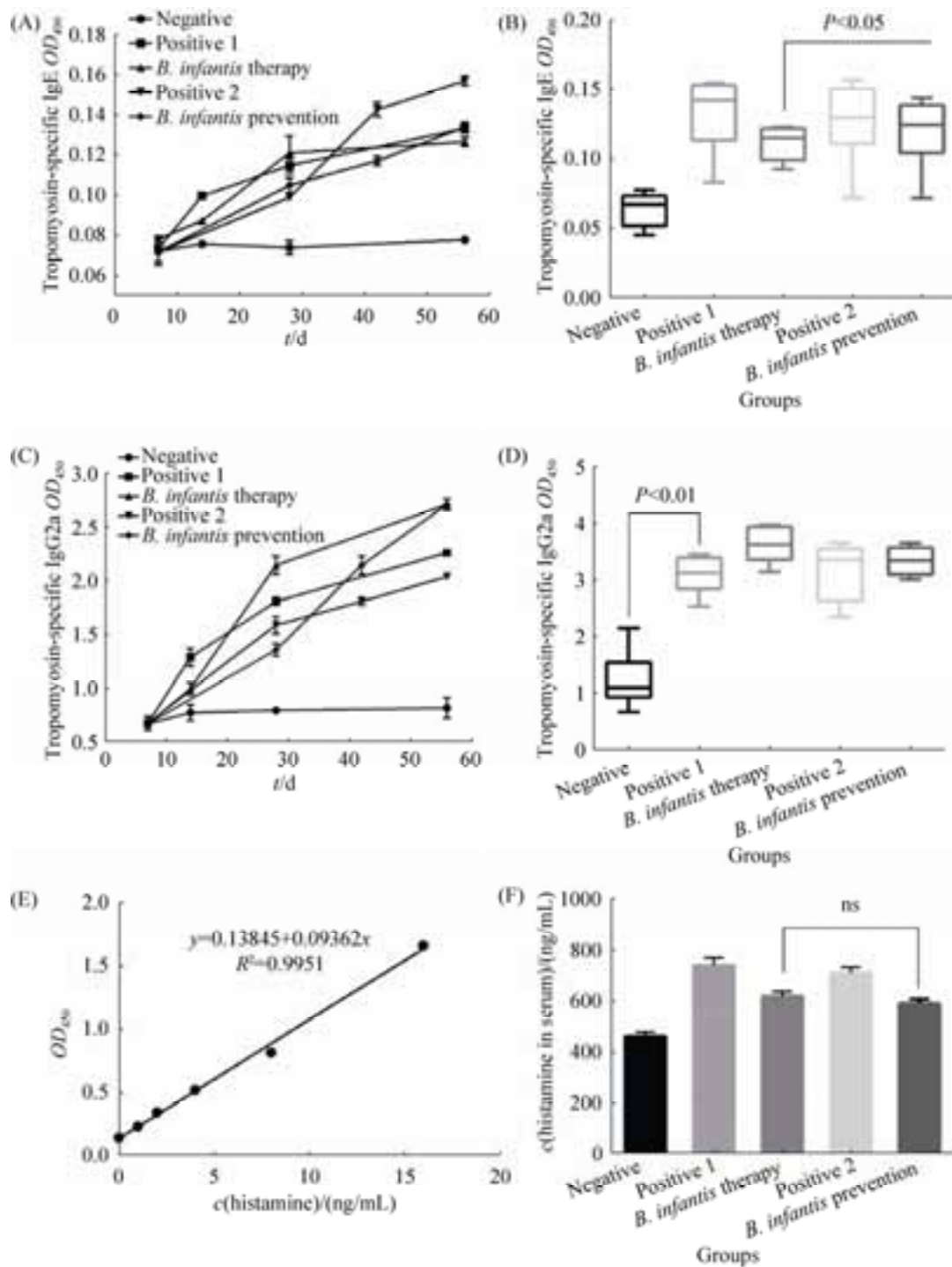


图 6. 双歧杆菌对不同处理组小鼠血清中特异性 IgE、IgG2a 和组胺含量的影响

Figure 6. Effect of *B. infantis* on the tropomyosin-specific IgE, IgG2a and histamine levels in the sera of different groups. Time-course levels of TM-specific IgE (A) and IgG2a (C) antibodies in sera were determined by ELISA. TM-specific IgE, IgG2a and histamine levels on day 56 (B, D and F) were also analyzed. (E) Standard curve of determination of histamine level. The data represent the mean \pm SD of six samples. Experiments were repeated for three times.

表 5. 不同处理组小鼠脾脏 Treg 和 Th17 型细胞数量及比例

Table 5. The percentage and ratios of Treg and Th17 of splenocyte in sensitization mice

Percentage of cells	Groups				
	Negative	Positive 1	<i>B. infantis</i> therapy	Positive 2	<i>B. infantis</i> prevention
Treg/%	5.84±0.55 ^a	2.74±0.44 ^b	5.51±0.52 ^a	2.71±0.19 ^b	4.34±0.47 ^c
Th17/%	0.31±0.01 ^a	0.59±0.03 ^b	0.44±0.05 ^c	0.88±0.06 ^d	0.63±0.06 ^b
Treg/Th17	18.93±1.44 ^a	4.64±0.43 ^b	12.52±1.03 ^c	3.08±0.33 ^d	6.89±0.73 ^e

The different lowercase letters of same line mean significant difference ($P < 0.05$).

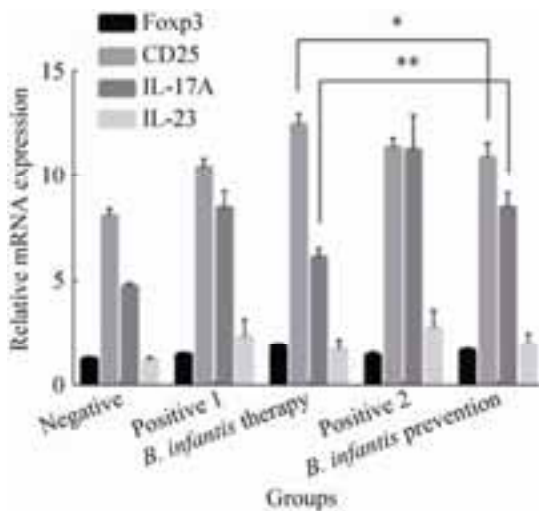


图 7. 不同处理组小鼠脾脏中 Treg 和 Th17 型细胞因子和转录因子的表达量比较

Figure 7. The quantitative PCR detection of Treg- and Th17-related cytokines and transcription factors expression of splenocyte in different groups ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

对照组, Treg 型细胞因子 CD25 和 Fcpx3 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。此外, 双歧杆菌治疗组 IL-17A mRNA 表达水平显著低于预防组($P < 0.01$), CD25 mRNA 表达水平显著高于预防组($P < 0.05$)。

3 讨论

目前, 关于益生菌缓解食物过敏机制的研究主要集中在菌株特异性和 Th2/Treg/Th17 细胞失衡及其分子调控机制等方面。其中 Th17 细胞占优势的 Treg/Th17 细胞失衡可以引起免疫紊乱, 即当

机体发生炎症反应时, IL-6 大量产生, 促进初始 T 细胞分化为 Th17 细胞, 同时抑制 Treg 细胞的形成^[9]。此外, 益生菌可以通过调节 Fcpx3⁺Treg 和树突状细胞的产生, 使免疫系统处于健康稳定状态^[10]; 然而, 不同益生菌菌株效果不一, 有关益生菌缓解或抑制过敏反应的免疫调节机理尚不明确。本课题组前期通过体内外筛选得到 1 株具有显著缓解中国对虾原肌球蛋白致敏性的婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis* 13.085), 其灌胃小鼠后可以显著缓解过敏反应症状, 但是不同时期的双歧杆菌干预可能存在差异, 本文主要研究双歧杆菌干预致敏小鼠预防与治疗过敏反应的差异, 并探究其对致敏小鼠 Treg/Th17 细胞平衡及相关细胞因子的影响。

以往研究表明, 食物过敏可导致儿童下丘脑部位脑肥大细胞 mTORC1 处于过度激活状态, 进而产生炎性病灶, 诱发脑过敏, 损害大脑语言及运动中枢, 诱发过敏症状^[8]。本研究与 Yamaki^[7,11]等研究结果一致, 即致敏小鼠出现交流减少和行为重复等异常性症状。此外, Hua^[12]等研究过敏对小鼠肺组织气道炎症的影响, 发现过敏后小鼠气道局部以及外周骨髓嗜酸性粒细胞数目明显增加, 并伴有 Th2/Treg/Th17 等淋巴细胞失衡现象。本研究中不同时期双歧杆菌灌胃小鼠后, 腹泻和过敏症状有明显的缓解, 小鼠肺间质和肺泡内炎性细胞浸润明显减少, 终末细支气管组织形态结

构较完整。此外, 不同时期的双歧杆菌干预, 过敏小鼠脾脏脏系数显著降低, 由此推测双歧杆菌缓解了过敏小鼠代谢异常引起的脾脏浮肿和脂肪堆积等现象。

在甲壳类水产品中, 原肌球蛋白可与超过50%的过敏症患者血清 IgE 发生特异性反应^[13], 而 IgE、IgG2a 和组胺均参与该反应的发生。致敏激活期特异性 IgE 抗体遍布于机体各处, 在外周特异性 IgE 抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面高亲和力受体 FcεRI 结合, 使机体处于致敏状态; 效应期肥大细胞和嗜碱性粒细胞发生脱颗粒现象, 释放大量活性物质(组胺、白三烯、肝素、前列腺素和 PAF 等), 这些活性物质可以引起平滑肌扩张、毛细血管破裂和局部红肿等过敏症状, 从而引发肠道过敏现象并造成严重的靶器官损伤^[14-15]。本研究通过 ELISA 手段测定小鼠血清中特异性 IgE、IgG2a 抗体水平和组胺含量, 发现随着致敏次数的增加, 各组小鼠血清中特异性 IgE、IgG2a 抗体水平和组胺含量明显上升, 这与 Wu^[16] 等研究结果一致。此外, 不同时期双歧杆菌干预均能降低小鼠血清中特异性 IgE、IgG2a 抗体水平和组胺含量。一个值得注意的结果是, 双歧杆菌治疗组相对于预防组, 特异性 IgE 水平更低 ($P < 0.05$), 说明不同时期双歧杆菌干预过敏小鼠存在差异。

正常情况下, 机体 Treg/Th17 细胞比例处于稳定状态, 当机体发生炎症反应时, Th17 功能持续增强, 导致 Treg/Th17 细胞比例失衡。Foxp3 是 Treg 细胞特定的表面标志, 对于 Treg 细胞的形成及功能发挥起重要的作用^[17]。而 IL-23 主要作用于 Th17 细胞, 对 Th17 细胞的增殖及维持其稳定性方面起到重要作用, 并促使 Th17 细胞产生 IL-17A、IL-21 等特征性细胞因子^[18]。流式细胞术

及 RT-PCR 结果显示, 不同时期的双歧杆菌干预后脾脏 Treg/Th17 细胞比例显著升高, Th17 型细胞因子 IL-17A mRNA 表达水平显著降低。此外, 双歧杆菌治疗组相对于预防组, CD25 mRNA 表达水平及 Treg/Th17 细胞比例更高, 与 Th17 相关细胞因子 IL-17A mRNA 转录水平更低。该结果可能是双歧杆菌通过调控调节性 T 细胞的增殖和分化, 从而实现 Treg/Th17 免疫动态平衡, 抑制过敏反应的发生^[19]。但其具体的作用机制尚不明确, 有待进一步研究。

综上所述, 不同时期的双歧杆菌 13.085 干预均能有效地缓解小鼠过敏症状, 其中治疗效果要优于预防效果, 其作用可能通过平衡 Treg/Th17 细胞亚群数量, 促进 Treg 型细胞因子表达而抑制 Th17 型细胞因子分泌, 以维持正常的免疫应答, 从而达到抗过敏的功效。

参 考 文 献

- [1] Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sánchez-García S, Lin J, Towle D, Ibañez MD, Sastre J, Sampson HA, Ayuso R. Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2015, 3(4): 521–529.e10.
- [2] Gámez C, Zafra MP, Sanz V, Mazzeo C, Ibañez MD, Sastre J, del Pozo V. Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin. *Food Chemistry*, 2015, 173: 475–481.
- [3] Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. Th2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 2013, 14(6): 536–542.
- [4] Klatka M, Grywalska E, Partyka M, Charytanowicz M, Kiszczak-Bochynska E, Rolinski J. Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity*, 2014, 47(3): 201–211.
- [5] Ochs HD, Oukka M, Torgerson TR. Th17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Journal of*

- Allergy and Clinical Immunology*, 2009, 123(5): 977–983.
- [6] Dwivedi M, Kumar P, Laddha NC, Helen Kemp E. Induction of regulatory T cells: a role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 2016, 15(4): 379–392.
- [7] Yamaki K, Yoshino S. Preventive and therapeutic effects of rapamycin, a mammalian target of rapamycin inhibitor, on food allergy in mice. *Allergy*, 2012, 67(10): 1259–1270.
- [8] Theoharides TC. Is a subtype of autism an allergy of the brain? *Clinical Therapeutics*, 2013, 35(5): 584–591.
- [9] Ma YH, Yuan XL, Deng L, Xu WP, Zheng YX, Yue CY, Zhang GH, Xie F, Yang YH, Gantier MP, Liu JP, Xu DK, Shen LS. Imbalanced frequencies of Th17 and Treg cells in acute coronary syndromes are mediated by IL-6-STAT3 signaling. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72804.
- [10] Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2159–2164.
- [11] de Theije CG, Wu JB, Koelink PJ, Korte-Bouws GAH, Borre Y, Kas MJH, da Silva SL, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. *Behavioural Brain Research*, 2014, 261: 265–274.
- [12] Hua W, Liu H, Xia LX, Tian BP, Huang HQ, Chen ZY, Ju ZY, Li W, Chen ZH, Shen HH. Rapamycin inhibition of eosinophil differentiation attenuates allergic airway inflammation in mice. *Respirology*, 2015, 20(7): 1055–1065.
- [13] Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MCR, Chapman MD, Galvão CES, Kalil J, Morato-Castro FF. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(4): 872–878.
- [14] Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi PD. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immunopharmacology*, 2012, 13(4): 432–439.
- [15] Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 693–704.
- [16] Wu JB, de Theije CG, da Silva SL, van der Horst H, Reinders MTM, Broersen LM, Willemsen LE, Kas MJH, Garssen J, Kraneveld AD. mTOR plays an important role in cow's milk allergy-associated behavioral and immunological deficits. *Neuropharmacology*, 2015, 97: 220–232.
- [17] Palomares O, Rückert B, Jartti T, Küçüksezer UC, Puhakka T, Gomez E, Fahrner HB, Speiser A, Jung A, Kwok WW, Kalogjera L, Akdis M, Akdis CA. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3⁺ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 129(2): 510–520.e9.
- [18] Robinson KM, Manni ML, Biswas PS, Alcorn JF. Clinical consequences of targeting IL-17 and Th17 in autoimmune and allergic disorders. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2013, 13(6): 587–595.
- [19] Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, Russell WM, Forsythe P, Bienenstock J, Kiely B, Shanahan F, O'Mahony L. Bacterial strain-specific induction of Foxp3⁺ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clinical & Experimental Allergy*, 2010, 40(5): 811–819.

Immunological regulation of *Fenneropenaeus chinensis* tropomyosin-stimulated sensitization by *Bifidobacterium infantis* in mice

Jixiang Peng, Yanbo Wang, Linglin Fu*

Key Laboratory for Food Microbial Technology of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] This work aims to compare the preventive and therapeutic effects of *Bifidobacterium infantis* 13.085 on suppression of shrimp tropomyosin (TM) sensitization in BALB/c mice. The balance of Treg/Th17 ratio and expression of Treg- and Th17-associated cytokines were also studied. [Methods] Shrimp tropomyosin was purified by ammonium sulfate and isoelectric precipitation. Four groups (Positive1, *B. infantis* therapy, Positive2 and *B. infantis* prevention) of BALB/c mice were immunized by intraperitoneal (IP) injection of purified TM together with incomplete Freund's adjuvant. Negative control animals received equal amounts of sterile PBS with Freund's adjuvant at each sensitization and challenge point. Allergic symptoms were evaluated by diarrhea, anaphylactic symptoms, HE staining analysis of lung tissue, changes of body weight and splenic viscera coefficient. The levels of specific IgE, IgG2a and histamine in sera were determined by ELISA. The amount of Treg and Th17 cell subsets were analyzed by flow cytometry. The mRNA expression levels of Treg- and Th17-associated cytokines and transcriptional factors were detected by quantitative PCR. [Results] The purity and yield of TM were 84.93% and 60.88%, respectively. *In vivo* study showed that *B. infantis* treatment ameliorated the development of diarrhea, anaphylactic symptoms and inflammation of lung tissue. The splenic viscera coefficient also decreased in *B. infantis* treatment groups compared to positive controls. At the end of experimental period (day 56), the levels of specific IgE and histamine ($P<0.05$) as well as IL-17A mRNA expression ($P<0.01$) significantly reduced, while the Treg/Th17 ratio remarkably increased ($P<0.05$) in *B. infantis* treatment groups compared to positive controls. The level of CD25 mRNA expression significantly enhanced ($P<0.01$) in *B. infantis* therapy group compared to Positive1. In addition, the levels of specific IgE and IL-17A mRNA expression in *B. infantis* therapy group were much lower than those in *B. infantis* prevention group ($P<0.05$), while the Treg/Th17 ratio and CD25 expression level were higher in *B. infantis* therapy group compared to *B. infantis* prevention group ($P<0.05$). [Conclusion] Therapeutic administration of *B. infantis* 13.085 can effectively alleviate TM-stimulated allergic inflammation and symptoms, which may attribute to the balance of Treg/Th17 ratio, increase of Treg-associated cytokines expression, inhibition of Treg-associated cytokines secretion, and thus leading to blockade of inflammatory antibodies and histamine release.

Keywords: *Fenneropenaeus chinensis* tropomyosin, *Bifidobacterium infantis*, sensitization, immunologic regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571770) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY14C200001)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008963; E-mail: fulinglin@zjgsu.edu.cn

Received: 3 October 2016; Revised: 4 November 2016; Published online: 29 November 2016