维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0338-05

树突状细胞分化发育过程中双歧杆菌的作用研究

熊 菲[1],程 茜[1],刘明方[2],陈淑惠[2]

(1. 重庆医科大学儿童医院儿保教研室,重庆 400014;2. 重庆医科大学检验系微生物教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究双歧杆菌在树突状细胞(Dendritic Cell, DC)分化发育过程中对其数量、形态的影响。方法:体内实验中分别采用活双歧杆菌菌液(1×10⁹CFU/ml)、灭活双歧杆菌菌液(1×10⁹CFU/ml)、双歧杆菌耗尽培养上清(Spent culture supernatant,SCS)、无菌生理盐水给 Balb/c 小鼠灌胃,SP 免疫组织化学法分析检测肠道 DC 数量。体外实验中①用热灭活双歧杆菌单独诱导单核细胞,倒置光学显微镜观察单核细胞形态是否发生改变,能否诱导成为 DC;②以 GM-CSF、IL-4 联合诱导单核细胞生成未成熟 DC,加入不同剂量热灭活的双歧杆菌,观察 DC 形态。结果:体内实验发现 DC 分布于整个空、回肠的黏膜固有层,细胞大小不一,外形不规则。双歧杆菌灌胃后小鼠小肠黏膜固有层 DC 数量增加($P<0.05$),以活菌作用最明显,死菌次之,培养上清作用最弱。体外单用热灭活的双歧杆菌,不能诱导单核细胞为 DC,但能促进单核细胞来源的未成熟 DC 的形态向成熟化发展。结论:双歧杆菌通过胃肠道途径可能影响 DC 的分化、发育、成熟,但在体内复杂的环境中双歧杆菌并不是单独作用的。DC 的分化发育过程可能影响因素众多,体内微环境的变化会影响 DC 的分化、发育。

【关键词】树突状细胞;双歧杆菌

【中国图书分类法分类号】R378.84 【文献标识码】B 【收稿日期】2005-10-14

Effect of bifidobacterium on the differentiation and development of DC

XIONG Fei, et al

(*Department of Children Care,Children' s Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of bifidobacterium on the production and morphology of dendritic cells (DC) in vitro and in vivo. ***Methods***: In vivo, the mice were administrated orally with live bifidobacteria, heat-killed bifidobacteria (1×10⁹CFU/ml), with spent culture supernatant (SCS) or saline normal respectively, and their intestinal samples were used to evaluate the production of intestinal DC by immunohistochemical method.In vitro, the monocyte was induced by heat-killed bifidobacterium alone, to find out whether it could change cell morphology and become DC, Phase-contrast microscope morphological observation was made. On the other hand, normal adult immature DCs were induced by monocyte cultured in granuloeyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4), and they were exposed to various dosages of heat-killed bifidobacterium (100ug/ml,10ug/ml) in experimental groups on the 7th day, while the control group was exposed without heat-killed bifidobacterrium, LPS at 1ug/ml was added to some cultures as positive control. The morphology of DC was observed by phase-contrast microscope and electron microscope. ***Results***: Under the microscope, DCs were present in the intestinal lamina propria of mice, the sizes of which were varied and the appearances were irregular. Counting showed that the bifidobacterium could increase the number of DCs in the small intestine of mice. There was significant difference between the control group and the live bifidobacterium group, the heat-killed bifidobacterium group and SCS group ($P<0.05$). The heat-killed bifidobacterium group was compared with the live bifidobacterium group and the SCS group, It was concluded that there was an obvious difference ($P<0.05$). In vitro, Monocyte could not changed the morphology of cells induced by the heat-killed bifidobacterium, but it could promote the maturation of the morphology of the immature DC, which is derived from the normal adult peripheral blood monocyte. ***Conclusion***: The research shows that the bifidobacterium have an important effect on the differentiation、development and maturation of DC. It is not the sole function of bifidobacterium. The changes of the microenvironment in vivo have an effect on the differentiation and development of DC.

【Key words】Bifidobacterium; Dendritic Cells

肠道菌群在肠黏膜免疫功能的建立中起决定性作用这一观点已逐渐得到公认[1],但具体机制仍然不十分清楚,目前主要集中于肠道菌群与淋巴细胞、巨噬细胞的研究。但已有学者发现,肠道共生菌对树突状细胞(dendritic cell,DC)的功能有影响[2]。

作者介绍:熊 菲(1979-),女,硕士,
主要研究方向:益生菌和免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DC是目前已知的体内功能最强的专职性抗原提呈细胞（antigen present cell,APC），广泛分布于多种组织，如消化道黏膜上皮、黏膜固有层及相关淋巴组织，是肠道黏膜免疫系统主要的守卫者和重要调节因素之一[3]。双歧杆菌作为最早进入肠道及数量最多的有益菌之一，在DC分化发育过程中发挥的作用可能会影响到肠黏膜免疫的建立与调节。本文通过互补的体内、体外实验对双歧杆菌能否影响DC的分化、发育进行一些初步探讨，为进一步研究DC与双歧杆菌的黏膜免疫功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠抗小鼠DC33D1购自eBioscience公司；SP免疫组化试剂盒DAB显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司；健康成年人外周血，本院研究生中健康志愿者提供；重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素4（rhIL-4）购自Peprotech公司；RPMI1640培养基购自GIBCO公司；RPMI 1640完全培养基补充10%胎牛血清、100U/ml青霉素、100U/ml链霉素。

1.2 菌种来源

两歧双歧杆菌（Bifidobacterium bifidum）标准菌株Bif1101（重庆医科大学临床微生物学教研室分离，中国科学院微生物所鉴定）。

1.3 实验动物

36只生长良好的Balb/c小鼠，4～5周龄，雌雄各半，体重16±2g，由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.4 双歧杆菌培养

双歧杆菌标准菌种接种至BL肉汤培养基，37℃厌氧培养48h后，菌液4000r/min，离心10min，分离得到耗尽培养上清（Spent culture supernatant，SCS），4℃冰箱保存备用。

无菌生理盐水重悬双歧杆菌沉淀，所得菌悬液分为活菌组和死菌组。将死菌组置于65℃水浴，30 min灭活处理（BL肉汤检菌，无活菌存在），再用无菌生理盐水多次洗涤离心（4000 r/min，10 min）直到细菌沉淀呈乳白色。

1.5 体内实验

1.5.1 双歧杆菌液灌服 将36只Balb/c小鼠随机分为活菌组、死菌组、SCS组、阴性对照组4组，每组9只。活菌组采用活双歧杆菌菌液灌胃；死菌组采用灭活的死双歧杆菌菌液灌胃，菌液浓度均为1×10^9CFU/ml；SCS组采用双歧杆菌SCS灌胃；阴性对照组采用无菌生理盐水灌胃。各组灌服量均为0.5ml/（只·天），每日1次，连续7天。于实验第9天处死小鼠，取小肠空、回肠段，肉眼观察大体解剖后做冰冻切片，-70℃冰箱保存。

1.5.2 免疫组化分析 抗体为大鼠抗小鼠DC33D1，SP免疫组化法分析肠道DC数量。结果判断：胞浆及胞膜呈现棕黄色的细胞为阳性细胞。

1.5.3 计数 每只小鼠做3张切片，每张切片随机取3个不重叠的视野计数阳性细胞数，每只小鼠阳性细胞用$\bar{x}$表示，每个实验组阳性细胞用$\bar{x}\pm s$表示。

1.6 体外实验

1.6.1 DC的体外培养 参照朱学军法[4]常规分离健康成年人外周血贴壁的单核细胞，分为两部分实验：

(1) 双歧杆菌诱导单核细胞：直接加入不同剂量的双歧杆菌（100μg/ml、10μg/ml），隔日半量换液；

(2) 细胞因子加双歧杆菌诱导单核细胞：获得贴壁的单核细胞后，加入细胞因子：rhGM-CSF1000U/ml、rhIL-4 500U/ml进行诱导，隔日半量换液，培养第7天将上述细胞分组为：实验组：加入rhGM-CSF、rhIL-4的同时添加双歧杆菌100μg/ml（高剂量组）、10μg/ml（低剂量组）；阳性对照组：加入rhGM-CSF、rhIL-4的同时添加1μg/ml LPS，阴性对照组：只加入rhGM-CSF、rhIL-4。

1.6.2 形态学检测 细胞培养过程中每天进行倒置光学显微镜观察。

1.7 统计学方法

采用SAS软件完全随机方差分析检验，$P<0.05$为有显著性差异。

2 结 果

2.1 体内实验

2.1.1 小肠大体解剖 肉眼观察空、回肠段标本无充血、肿胀等病理现象。

2.1.2 光镜 高倍镜下观察切片，组织完整，绒毛、黏膜固有层、黏膜肌层、浆膜分界清晰。SP免疫组化方法染色后见DC分布于小鼠整个空、回肠的黏膜固有层，DC细胞外形不规则，大小不一，胞核外形亦不规则，多数呈偏心位，且DC有不规则突起，与周围细胞有紧密接触。各实验组相比，阴性对照组小鼠小肠黏膜固有层DC数量少，分布较稀疏，双歧杆菌活菌组DC数量多，密集分布，形成网络结构（图1~4）。

2.1.3 DC计数 双歧杆菌活菌、死菌、SCS组DC数量较阴性对照组显著升高（$P<0.05$），且组间两两比较提示差异均有显著性（$P<0.05$），活菌组对DC数量增加的作用最明显，死菌次之，培养上清作用最弱（表1）。

2.2 体外实验

2.2.1 单用双歧杆菌诱导单核细胞 培养5天仍未见到细胞形态改变，而且细胞数量逐渐减少，状态变差（图5）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

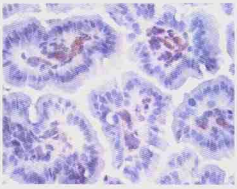


图 1 生理盐水(阴性对照组)肠道 DC (10×40)

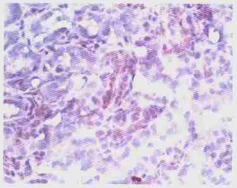


图 2 双歧杆菌活菌组肠道 DC(10×40)

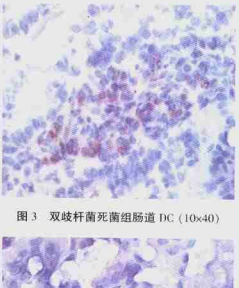


图 3 双歧杆菌死菌组肠道 DC (10×40)

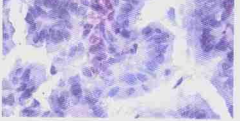


图 4 耗尽培养上清(SCS)组肠道 DC (10×40)

表 1 各实验组小鼠小肠黏膜固有层 DC 的数量($\bar{x}\pm s$)

分 组	DC数量(个)
活菌组	55.2347±3.2869
死菌组	41.8643±2.7788
SCS组	29.9260±4.5542
阴性对照组	19.5433±2.9157

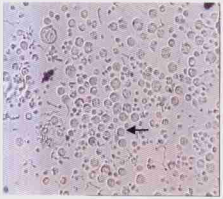


图 5 无细胞因子组培养 5 天光镜下的形态 (×400)

2.2.2 细胞因子加双歧杆菌诱导单核细胞 加入细胞因子 24h 后可见到贴壁细胞有所减少，悬浮细胞增多，呈细胞聚积现象(图 6)，培养 5~7 天悬浮细胞逐渐增多并具有树突样突起。双歧杆菌组加入双歧杆菌、阳性对照组加入 LPS 后发现，DC 突起均较阴性对照组明显，具有突起的细胞数量较阴性对照组多(图 7~10)。双歧杆菌高剂量组、低剂量组与阳性对照组比较，DC 突起及有突起的细胞数量均无明显差异。



图 6 培养 3 天光镜下的形态(×200)

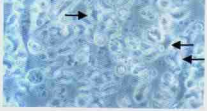


图 7 100μg/ml 双歧杆菌组培养 9 天光镜下的形态 (×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

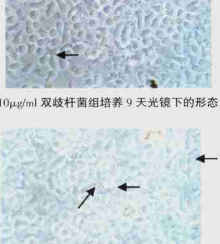


图 8 10μg/ml 双歧杆菌组培养 9 天光镜下的形态 (×400)

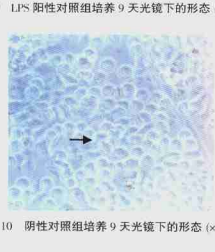


图 9 LPS 阳性对照组培养 9 天光镜下的形态 (×400)

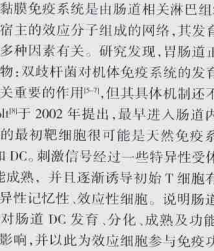


图 10 阴性对照组培养 9 天光镜下的形态 (×400)

3 讨 论

肠黏膜免疫系统是由肠道相关淋巴组织、细胞及保护宿主的效应分子组成的网络，其发育和执行功能与多种因素有关。研究发现，胃肠道正常共生的微生物：双歧杆菌对机体免疫系统的发育和成熟起着至关重要的作用[5-7]，但其具体机制还不完全清楚。Holt[8]于 2002 年提出，最早进入肠道内的微生物刺激的最初靶细胞很可能是天然免疫系统中的细胞，如 DC。刺激信号经过一些特异性受体介导使 DC 功能成熟，并且逐渐诱导初始 T 细胞有效地分化为特异性记忆性、效应性细胞。说明肠道共生菌群可能对肠道 DC 发育、分化、成熟及功能发挥具有重要影响，并以此为效应细胞参与免疫功能的建立和调节。DC 是体内功能最强的专职性 APC，是肠道黏膜免疫系统主要的守卫者，在调节肠道免疫平衡中扮演重要角色。由此可见，双歧杆菌作为首先进入机体、数量最多的异体菌，及很多疾病如腹泻、过敏性疾病等的辅助治疗措施，能否在 DC 分化发育过程中发挥作用关系到黏膜免疫功能的执行。近年来研究者已发现，多种微生物能影响 DC 的分化、成熟，但多集中于一些病原微生物的研究[9-10]，针对肠道正常菌群与 DC 分化、成熟关系的研究甚少。

我们在体内实验中观察到 DC 分布于小鼠整个空、回肠的黏膜固有层，细胞大小不一，有不规则突起，胞核外形亦不规则，多数呈偏心位，与周围细胞有紧密的接触，与 Wright-Browne 等[11]观察到的 DC 的形态特征相符。Pavli 等学者也发现，DC 在整个人肠道黏膜固有层形成网络结构[12]。肠道 DC 如此的形态特征及分布与生理功能有关，有利于小肠黏膜固有层 DC 捕获大部分口服抗原、并迁移至肠系膜淋巴结 CD_4+T 淋巴细胞区域，将抗原信息递呈给周围的淋巴细胞，刺激产生相应的免疫反应[13]。本实验结果还显示，双歧杆菌灌服后小肠黏膜固有层中 DC 的数量明显增多。Macpherson 研究发现小鼠静脉注射内毒素后，肠 DC 向淋巴组织的释放增加，这种 DC 释放的增加并非来自淋巴结，而是来自小肠的黏膜固有层。黏膜固有层中 DC 数量的多少与捕获、提呈抗原及激发肠道 T 淋巴细胞的免疫反应有关，部分决定了免疫反应程度。另一方面，Mowat[14]认为，肠道口服耐受和免疫活化与肠道和输入淋巴组织中 DC 的数量、活化程度有密切关系。由此我们推测，外源性双歧杆菌对 DC 发育分化的影响使 DC 的数量明显增加，可能增强 DC 的肠道免疫作用。我们还发现，双歧杆菌不同的存活状态对 DC 的数量影响是有差异的。活的双歧杆菌对 DC 数量增加的作用最明显，死菌次之，培养上清作用最弱。这可能是由于死菌在加热处理时使一些代谢产物被破坏，而培养上清中只含有双歧杆菌生长繁殖过程中产生的少量可能是具有免疫调节作用的 LTA、多肽和游离脂肪酸。说明肠道菌群的活菌状态对免疫系统的作用更强。双歧杆菌是益生菌中重要的厌氧菌，其生长繁殖要求较高的营养与厌氧环境，我们的实验结果提示保持高活菌状态是益生菌类药物生产技术的重点之一。

体外实验中，由于肠道 DC 数量相对较少，直接

维普资讯 http://www.cqvip.com

分离纯化技术要求高，体外培养扩增技术不成熟，因此选用了取材较方便、培养技术成熟的外周血单核细胞作为扩增 DC 的来源，间接证实双歧杆菌对肠道 DC 形态、数量的作用。单核细胞虽然是巨噬细胞和 DC 的共同前体，但在单核细胞中仅仅加入双歧杆菌后并没有发现细胞形态发生改变，说明没有诱导出 DC。显示在体外培养条件下，细胞因子的诱导作用十分关键。而 GM-CSF 和 IL-4 联合诱导 24h 后贴壁细胞有所减少，悬浮细胞增多，呈细胞聚积现象，培养 5~7 天即可见到有突起的 DC，且数量较多。培养晚期加入双歧杆菌后，DC 表面树突样突起明显增多，细胞形态不规则，且具有突起的细胞数量明显增多，较阴性对照组 DC 形态有显著差别，与文献中体外培养成熟 DC 所观察到的细胞形态结果相符，同加 LPS 的阳性对照组 DC 形态变化一致。说明双歧杆菌在体外可促进 DC 的形态向成熟化发展。尽管体外单用单用双歧杆菌不能诱导单核细胞成为树突状细胞，但在体内实验中，仅仅单独灌服双歧杆菌后就引起了黏膜固有层 DC 数量的增加。结合体外诱导过程表明，在体内复杂的环境中双歧杆菌可能并不是单独作用的，DC 分化发育影响因素众多，如肠道各种细胞因子及其他微生物等。由此推测：体内微环境的变化会影响 DC 的分化、发育。双歧杆菌作为最早进入肠道及生命过程中数量最多的有益菌之一，通过 DC 这一重要的抗原提呈细胞调节机体免疫功能，也是 DC 发挥免疫作用的重要调节因素之一。

本实验结果证实，双歧杆菌通过胃肠道途径可能促进 DC 的分化、发育、成熟，可能增强 DC 的肠道免疫作用；在 DC 分化发育过程中发挥的作用可能也是双歧杆菌影响机体免疫功能的重要环节，但这一过程受体内复杂微环境的影响[15,16]。虽然在肠道 DC 这一重要的肠道免疫启动因子的分化发育过程中双歧杆菌发挥了一定作用，但双歧杆菌数量、种类在不同年龄、不同身体状态下是有差别的。机体是复杂的统一体，双歧杆菌在生理、病理状态及多种影响因素下对肠道 DC 的影响及与肠道免疫的关系如何尚有待研究。

参 考 文 献

[1] Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, et al. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy:a prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months [J]. Arch Dis Child, 2000;83(3):F186-192.

[2] Christensen HR, Frokiar H, Pestka JJ, et al. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers inn murine dendritic cells[J]. J Immunol, 2002;168 (1): 171-178.

[3] Mayer L. Review article: Local and systemic regulation of mucosal immunity[J].Aliment Pharmacol Ther,1997;11 (S3):81-88.

[4] 朱学军,曹学涛.人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J].中国肿瘤生物治疗杂志, 1997;4(4):302-304.

[5] Mahida YR, Rolfe VE. Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease[J].Clin Sci(Lond),2004;107(4):331-341.

[6] Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats[J].Br J Nutr, 2003;89(5): 597-606.

[7] Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murime and human intestinal epithelial barrier function.[J] Gastroenterology, 2001;121(3):580-591.

[8] Holt PG. The role of airway dendritic cell populations in rgulation of T-cell responses to inhaled antigens:atopic asthma as a paradigm[J]. J Aerosol Med, 2002;15(2):161-168.

[9] Li L, Liu D, Hutt-Fletcher L, et al. Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony- stimulating factor and interleukin- 4 [J]. Blood, 2002;99(10):3725-3734.

[10] Lopez CB, Fernandez-Sesma A, Czelusniak SM, et al. A mouse model for immunization with ex vivo virus-infected dendritic cells[J]. Cell Immunol, 2000;206(2):107-115.

[11] Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, et al. Physiology and pathophysiology of dendritic cells[J]. Hum Pathol, 1997;28 (5):563-579.

[12] Pavli P, Maxwell L, Van de Pol E, et al. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages [J].Clin Exp Immunol, 1996; 104(1): 124-132.

[13] Mowat AM. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens[J]. Vaccine, 2005; 23(15): 1797-1799.

[14] Mowat AM, Donachie AM, Parker LA, et al. The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance [J]. Novartis Found Symp, 2003; 252: 291-302 discussion 302-305.

[15] Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance and disease[J]. Gastroenterology, 2004;127(1):300-309.

[16] Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, et al. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria [J]. Gut, 2003;52(10):1522-1529.