

文章编号: 1000-5862(2015)03-0253-04

口服益生菌对食物过敏大鼠肠道粘膜免疫及病理变化的实验研究

袁谢芳¹ 李建杰² 李国平¹ 刘志刚² 刘晓宇^{2*}

(1. 泸州医学院附属医院呼吸内科 四川 泸州 646000;

2. 深圳大学医学院过敏反应和免疫学研究所 广东 深圳 518060)

摘要: 采用4周棕色挪威大鼠,随机分为PBS对照组、OVA致敏模型组和益生菌治疗组,检测血清中OVA特异性IgE水平,采用HE染色和甲苯胺蓝染色观察肠道炎症水平以及腹腔肥大细胞变化,用电镜观察肠道超微结构组织形态的变化,建立大鼠食物肠道过敏模型,以研究口服益生菌对食物过敏大鼠肠道的免疫变化以及病理变化。研究结果表明:通过口服益生菌治疗,小鼠血清中特异性IgE水平降低,腹腔肥大细胞减少,肠道黏膜结构破坏减轻。采用口服益生菌疗法对大鼠食物过敏性肠道疾病有一定的治疗效果,对食物过敏性肠道疾病的预防治疗提供了一条新途径。

关键词: 益生菌; 肠道过敏; 超微结构; 疗效

中图分类号: R 392 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.03.06

0 引言

过敏性疾病是临床上的常见病,如哮喘、过敏性鼻炎等。在我国约有2亿多人群患有过敏性疾病。食物过敏是由食物过敏原经消化道进入个体从而引发过敏性疾病。临床上食物过敏性疾病表现并不是单一的,但最常见的是I型过敏反应^[1]。

世界粮农组织(FAO)1995年报告,引起食物过敏的过敏原90%以上的是牛奶、鸡蛋、鱼、贝壳海产品、花生、大豆、坚果类和小麦^[2]。流行病学调查发现,鸡蛋引起的食物过敏占婴幼儿食物过敏的35%,占成年人食物过敏的12%^[3]。益生菌是一类定植于肠道内,维持肠道菌群平衡,并激活肠粘膜免疫组织的有益微生物群落^[4]。随着食物过敏和人们对益生菌关注的提高,益生菌对食物过敏的治疗疗效已经受到相关研究的证实。研究发现口服益生菌可以抑制TH2反应及降低过敏反应症状,提示益生菌可能对食物过敏有一定的治疗作用^[5]。但是益生菌对肠道结构病理变化的改善鲜见文献报道。本文通过建立益生菌治疗OVA致敏的食物过敏模型,观察其肠道结构的病理改变从而研究益生菌对食物过敏的疗效。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4周龄BN大鼠35只,每只体质量70~90g,SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂

OVA(Sigma),硫酸卡那霉素(上海佳伦生物科技有限公司),丽珠肠乐双歧杆菌活菌胶囊(丽珠制药厂),IgE检测试剂盒(美国R.D公司),山羊血清(Solarbio),SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)。其他实验室常用试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

RM2016组织切片机,RT-2100C酶标分析仪,超微量分光光度计(广东云星),Olympus普通光学显微镜,TEC-2500漂烘仪,透射电镜(JEM-100CX)。

1.4 OVA致敏的食物过敏动物模型的建立

将21只BN大鼠随机分为3组,每组7只,分别为PBS对照组(PBS control group)、OVA致敏组(OVA group)、双歧杆菌治疗组(Probiotics group)。PBS组:1 mL·d⁻¹ PBS,持续6周;OVA组:1 mg·

收稿日期: 2014-11-10

基金项目: 国家自然科学基金(81271950 81400591)和深圳市科技计划(JCYJ20140418095735538)资助项目。

通信作者: 刘晓宇(1986-),江西南昌人,助教,硕士,主要从事过敏反应与免疫学基础研究。

d^{-1} OVA $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 持续 6 周;双歧杆菌治疗组:前 2 周为卡那霉素 + OVA,后 4 周为双歧杆菌 + OVA,卡那霉素 $100\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1\text{ mL} \cdot d^{-1}$, OVA, $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1\text{ mL} \cdot d^{-1}$,双歧杆菌活菌约为 $5 \times 10^7\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2\text{ mL} \cdot d^{-1}$.

1.5 血清中特异性 IgE 检测

分别取各组的大鼠血清,按照试剂盒说明书中的步骤检测 OVA 特异性 IgE 的量.

1.6 腹腔肥大细胞计数

处死大鼠,腹腔灌洗,取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 腹腔灌洗液均匀涂于载玻片上,自然风干,将一滴甲苯胺蓝滴于载玻片上染色 1 min ,用水缓慢冲洗染液,自然风干,中性树胶封片,显微镜下观察肥大细胞形态,并统计肥大细胞数目和脱颗粒比例.

1.7 肠道组织形态学观察

建模成功后,处死小鼠,取肠道下段组织,每段 0.5 cm ,经固定、脱水透明、包埋及 HE 染色,观察回肠组织形态结构,通过自动成像系统采图拍照.

1.8 肠道黏膜超微结构观察

分别取 PBS 组、OVA 组和双歧杆菌预防组的回肠下段组织,切成约 2 mm 长,用 3% 戊二醛固定, 1% 四氯化锇后固定,树脂包埋,进行超薄切片,醋酸铀、枸橼酸铅染色,透射电镜(JEM-100CX)观察并照相.

1.9 统计学处理

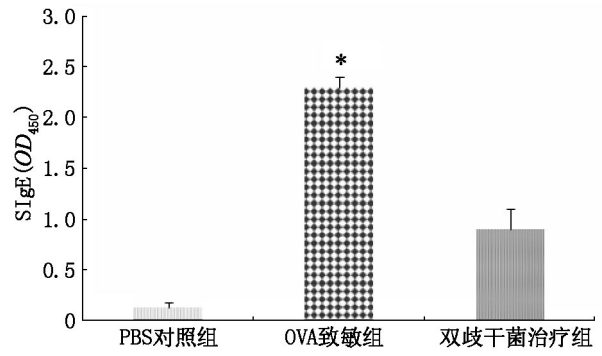
采用 SPSS16.0 统计分析软件包. 所得结果(将菌落总数进行对数转换)均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示.

2 结果

2.1 血清中 OVA-IgE 测定

测定结果如图 1 所示. 由图 1 可知,第 6 周时相对于 PBS 组,实验组 OVA-IgE 含量显著升高,存在

显著性差异;经益生菌治疗后, OVA-IgE 含量显著下降,基本恢复到正常水平,与实验组相比,存在显著性差异.



(* $P < 0.05$ vs Probiotics group)

图 1 血清中 OVA-IgE 测定

2.2 腹腔肥大细胞计数

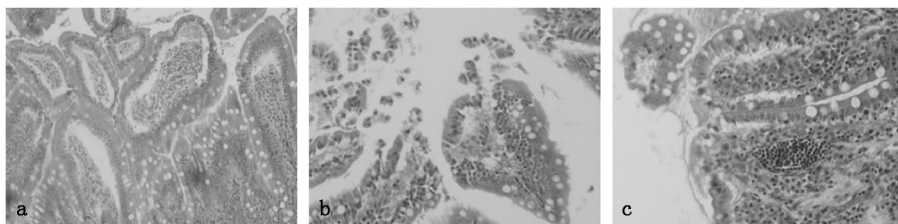
对 3 组大鼠腹腔灌洗液进行肥大细胞观察及统计,统计数据表明实验组中肥大细胞数与对照组相比明显升高($P < 0.01$),甲苯胺蓝肥大细胞特异性染色表明模型组中腹腔灌洗液中肥大细胞明显增大($P < 0.01$),脱颗粒比例明显增多($P < 0.01$);观察治疗组肥大细胞数发现,与实验组相比,肥大细胞数显著下降($P < 0.01$),与对照组相比无显著性差异.

表 1 肥大细胞计数

组别	the total number of mast cells (number/visua field) / %	Degranulation proportion / %
PBS 对照组	3.2 ± 1.2	9.1 ± 3.4
OVA 致敏组	10.0 ± 2.3	67.0 ± 3.1
双歧杆菌治疗组	6.3 ± 2.1	16.2 ± 4.2

2.3 肠组织形态学观察

HE 染色结果如图 2 所示, PBS 组小肠粘膜结构完整,肠绒毛排列整齐,肠粘膜无水肿、溃疡、剥脱,未见粘膜上皮细胞损伤. OVA 组肠粘膜明显出现水肿、溃疡、剥脱现象,肠粘膜结构严重破坏. 益生菌治疗组肠粘膜结构完整,无肠粘膜剥脱、溃疡,偶见水肿及肠粘膜上皮细胞损伤.



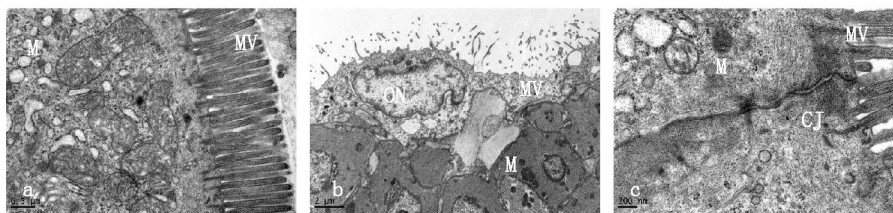
a. PBS 对照组; b. OVA 致敏组; c. 双歧杆菌治疗组

图 2 益生菌治疗后各组肠道 HE 染色

2.4 肠道超微结构观察

电镜观察超微结构结果如图3所示。正常对照组肠粘膜绒毛完整、排列整齐、结构清晰,紧密连接结构严密。而模型组肠粘膜组织缺如,肠绒毛溃烂、

剥脱或水肿;细胞器肿胀,轮廓及结构不清;肠粘膜内炎性细胞浸润;紧密连接结构扩大。治疗组肠绒毛完整、排列整齐;出现2个线粒体肿胀,粗面内质网增多;紧密连接结构较PBS组稍微松散。



a. PBS 对照组; b. OVA 致敏组; c. 双歧杆菌治疗组

电镜图注: MV(microvilli 微绒毛)、CJ(cell junction 细胞连接)、
M(mitochondria 线粒体)、ON(organelles necrosis 细胞器变形坏死)。

图3 益生菌治疗后各组电镜观察肠道超微结构变化

3 讨论

食物过敏是重大的卫生学问题,严格避免接触食物过敏原是目前预防食物过敏的最有效手段,但引起过敏的食物大多为人体必需的营养物质,所以该方法既难以实现又会影响婴幼儿和青少年成长,因此存在很大的局限性。本实验室在前期研究中发现小鼠肠道中微生物以及尘螨蛋白对哮喘小鼠肠道免疫有影响^[6-7]。近年来人群和动物研究结果均提示肠道菌群的构成与食物过敏的发生有关,食物过敏患者伴随肠道菌群紊乱,另外发现益生菌所特有的免疫调节作用可能对防治包括食物过敏在内的一些过敏性疾病具有一定作用^[8]。益生菌在人体中主要以双歧杆菌和乳酸杆菌为主,由于 A. Moreira^[9]等发现补充乳酸杆菌并不能防止食物过敏等过敏反应性疾病的发生。大量研究表明食物过敏时存在肠道菌群紊乱,其主要表现为肠道有益菌群尤其是双歧杆菌较正常机体明显减少^[10-11]。食物过敏最常见是 I 型变态反应, I 型变态反应是血清中的 sIgE 介导肥大细胞脱颗粒,释放组胺等炎症因子,进而导致机体产生的一系列过敏症状。正常人血清 IgE 水平较低,而过敏患者血清中 IgE 水平较正常人明显提高^[12]。益生菌能通过激活 Th3 细胞和 Tr1 细胞分泌 TGF- β 和 IL-10 等细胞因子,诱导免疫耐受,抑制 IgE 的产生,从而抑制 Th2 型免疫应答,使机体的免疫系统抑制大鼠血清中 sIgE 的产生^[13]。因此本文在此基础上选用双歧杆菌治疗 OVA 致敏的食物过敏大鼠模型进行研究。

肠粘膜组织学观察是一种公认的评价肠粘膜屏障功能的方法,通过光镜可直接观察肠道上皮细胞排列、形态、绒毛结构等情况。本实验 HE 染色结果图2显示,PBS 对照组肠粘膜完整,肠道绒毛排列整齐,未见粘膜上皮细胞损伤;益生菌治疗组大鼠回肠下段粘膜各层组织排列完整连续,治疗组可偶见粘膜上皮细胞损伤,绒毛肿胀,未见粘膜溃烂、剥脱等现象;OVA 模型组小肠绒毛大部分剥落,明显粘膜绒毛水肿及溃疡,绒毛结构破坏,上皮细胞出现局灶性坏死。由此可见,OVA 不光能够破坏肠道生物屏障,还能够导致肠道粘膜屏障的破坏,使其完整性降低,更有利于食物过敏原通过肠粘膜进入血液中,促进过敏的发生;而双歧杆菌可以维护肠道粘膜屏障的完整性,减轻食物过敏原对肠粘膜的破坏,在维护肠道生物屏障的同时,加强了肠道的粘膜屏障。由 PBS 组、OVA 组和益生菌治疗组的电镜图可见,PBS 组肠粘膜完整,肠绒毛排列整齐,细胞器轮廓清晰大小正常,紧密连接结构严密;OVA 组肠粘膜组织缺失,肠绒毛出现溃烂、剥脱、水肿现象,紧密连接结构扩大,肠粘膜内有炎症细胞浸润,细胞器轮廓模糊,结构不清;益生菌治疗组肠粘膜完整,肠绒毛排列整齐,偶见线粒体肿胀现象,粗面内质网增多,紧密连接结构较 PBS 组稍微松散。同时,如图1和表1所示,益生菌能够明显降低食物过敏大鼠血清中的 OVA-IgE 和腹腔中的肥大细胞数量。综上,口服益生菌治疗食物 OVA 过敏大鼠能够改善大鼠肠道粘膜上皮细胞的损伤,保持肠道粘膜的完整性,增强肠道粘膜屏障功能,减轻肠道过敏反应,从肠道粘膜组织形态学方面提示益生菌对 OVA 致敏大鼠小肠粘膜有一

定的保护作用.

4 参考文献

- [1] 何韶衡, 刘志刚. 基础过敏反应学 [M]. 北京: 科学出版社 2009: 706-708.
- [2] WHO Workshop. Asthma management and prevention [R]. The Global Initiative for Asthma Ascretariate, 1996: 122.
- [3] Poms R E, Klein C L, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review [J]. Food Addit Contam, 2004, 21: 1-31.
- [4] 王友湘, 陈庆森. 益生菌和肠道粘膜免疫关系的研究进展 [J]. 食品科学, 2007, 28(8): 537-542.
- [5] Schiavi E, Barletta B, Butteroni C, et al. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy [J]. Allergy, 2011, 66(4): 499-508.
- [6] 杨小猛, 王俊轶, 陈涛, 等. 尘螨肠道微生物蛋白核二磷酸激酶的克隆、表达及纯化 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 38(5): 485-488.
- [7] 万倩, 陈献雄, 孙新, 等. 粉尘螨 Der f4 基因的克隆和蛋白分子特征分析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 38(3): 319-323.
- [8] Hendra T. Passing the food allergen test [J]. Cereal Foods World, 2003, 48(1): 20-28.
- [9] Moreira A, Kekkonen R, Korpela R. Allergy in marathon runners and effect of *Laetobacillus* GG supplementation on allergic inflammatory Markers [J]. Res Pir Med, 2007, 101(6): 1123-1131.
- [10] 王念蓉, 黎海芪, 刘明方, 等. 食物过敏婴儿和健康婴儿肠道菌群的差别 [J]. 中国实用儿科杂志, 2006, 21(1): 57-58.
- [11] Tariq S M, Stevens M, Matthews R, et al. Cohort study of peanut and tree nut sensitization by age of 4 years [J]. JBMJ, 1996, 313(31): 514-517.
- [12] 唐文静, 黄娟, 钟燕, 等. 益生菌干预对卵清蛋白过敏小鼠模型的免疫调节作用 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(1): 4-8.
- [13] Pessi T, Sutas Y, Hurme M, et al. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2000, 30(5): 1804-1808.

The Research on Intestinal Pathological Change and Mucosal Immunity in Rat Intestinal Allergy Model Treated with Probiotics

YUAN Xiefang¹, LI Jianjie², LI Guoping¹, LIU Zhigang², LIU Xiaoyu^{2*}

(1. First Department of Respiration, Affiliate Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000, China;

2. Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

Abstract: To establish rat intestinal allergy model. Then the model was treated by taking probiotics and the effect had be observed. 35 Brown-Norway rats were randomly divided into 3 groups: PBS control group, OVA group, probiotics group. Blood of rats was collected to detect serum OVA specificity IgE and OVA specificity IgG. The pathological changes of the lung tissue and the intestinal mucosa mast cells were observed by HE staining and Toluidine blue Benzen esulfonic acid (TB) stain, respectively. Morphologic changes of intestinal mucosa ultra-structure of the mice were observed by electron-microscope. The levels of OVA specific IgE and IgG decreased sharply in mice treated with probiotics. The degranulated mast cells decreased statistically and the damage of intestinal mucosa alleviated. Probiotics can be used to treat the intestinal allergy mice effectively, which will offer a new therapeutic regimen for peanut allergic gastroenteritis.

Key words: probiotics; intestinal allergy model; ultrastructure; therapeutic effect

(责任编辑: 刘显亮)