

# 干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁组分体外对巨噬细胞活性的影响

余叶红<sup>1</sup>, 郭本恒<sup>2</sup>, 吴正钧<sup>2</sup>, 王荫榆<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 200090; 2. 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200072)

**摘要:** 探讨干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁组分体外对小鼠巨噬细胞功能的影响。以培养液单纯培养小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞作为对照, 研究干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁主要组分磷壁酸和肽聚糖对 RAW264.7 细胞代谢水平、吞噬中性红能力及释放 NO 的影响。不同浓度磷壁酸和肽聚糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞代谢 MTT 能力、吞噬中性红能力有明显增强作用, 并呈一定的剂量效应, 在相同质量浓度时, 两种细胞壁组分激活巨噬细胞能力无显著差异。同时诱导产生 NO 量也随着浓度增大而增加, 当浓度达到 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 磷壁酸诱导能力显现出较高的水平。干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁主要组分磷壁酸和肽聚糖能激活小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞, 提高其代谢水平及吞噬能力, 同时可诱导具有杀瘤作用的活性因子, 并具有一定的剂量效应。

**关键词:** 干酪乳杆菌 LC2W; RAW264.7 巨噬细胞活性; 细胞壁组分

中图分类号: Q2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0110-04

## The Effect of Cell Wall Components of *L. casei* LC2W on Activity of Murine Macrophage Cells

YU Ye-hong<sup>1</sup>, GUO Ben-heng<sup>2</sup>, WU Zheng-jun<sup>2</sup>, WANG Yin-yu<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China;

2. Technology Center, Bright Dairy and Food Co. Ltd, Shanghai 200072, China)

**Abstract:** To investigate the effect of cell wall components of *L. casei* LC2W on the function of murine macrophage cells in vitro. The energy metabolism level, the phagocytic ability to neutral red of murine macrophage RAW264.7 cells and the content of NO derived from the cells were detected with different levels of teichoic acid (TA) or peptidoglycan (PG), two predominant components of the cell wall of the cell *L. casei* LC2W, compared with those macrophage cells cultured without TA or PG. The energy metabolism level, the phagocytic activity were significantly higher than those in control group, and were also in a dosage-dependent manner, no obvious difference existed in RAW264.7 cells challenged with *Lactobacillus* TA and those cells challenged with PG. The content of NO derived from murine macrophage RAW264.7 cells macrophages induced by different levels of TA or PG was enhanced and when it's 50  $\mu\text{g/mL}$ , the content of NO induced by TA is higher than that by PG. TA and PG of the cell wall of *L. casei* LC2W could activate macrophage RAW264.7 cells to secrete active factors with tumoricidal activity, and enhance its energy metabolism level, phagocytic activity to neutral red significantly in a dosage-dependent manner.

**Key words:** *L. casei* LC2W; RAW264.7 macrophage activity; Cell wall components

乳杆菌是一类在肠道内具有免疫佐剂活性的非病原性革兰氏阳性菌, 作为一种重要的益生菌, 可调节肠道免疫系统, 增强机体非特异性免疫功能, 对维持肠道微生物平衡和机体健康具有重要作用。研究表明, 乳杆菌发挥其免疫调节作用的原因之一可能

是其细胞壁组分在发挥作用<sup>[1]</sup>。Kimoto 等<sup>[2]</sup>研究发现, 乳杆菌具有很强的免疫调节作用, 活菌和死菌间并没有显著差异, 可能是细胞壁组分在发挥作用。磷壁酸和肽聚糖作为 G<sup>+</sup> 细胞壁的主要成分, 其免疫调节作用正被人们越来越多的关注, 关于乳杆菌

收稿日期: 2008-09-10

作者简介: 余叶红(1983-), 女, 安徽人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术研究。

通讯作者: 郭本恒(1963-), 男, 山东潍坊人, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。

细胞壁中磷壁酸和肽聚糖的免疫学研究, 目前报道还甚少, 有待进一步研究。巨噬细胞在机体中广泛分布, 是非特异性免疫反应的重要效应细胞, 参与机体对多种病原微生物的抵抗作用。本试验通过体外细胞培养, 测定小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 受到干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁组分肽聚糖和磷壁酸刺激后, RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性的影响; 以 MTT 法检测细胞代谢水平的变化; 用 Griess 试剂测定一氧化氮(Nitric oxide, NO) 的水平, 探讨磷壁酸和肽聚糖对巨噬细胞功能的调节作用。为进一步研究干酪乳杆菌 LC2W 的免疫调节作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基和主要试剂

MRS (Man-Rogosa-Sharpe) 培养基购自德国 Merck 公司; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养液、0.25% 胰酶 EDTA 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司。DMEM 完全培养液由 83% DMEM 培养液、15% 胎牛血清、1% 链霉素( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、1% 青霉素( $\text{U}/\text{mL}$ ) 组成; MTT 购自美国 Sigma 公司; Griess 试剂: 以蒸馏水配制 0.1% 盐酸萘乙二胺(Sigma 产品), 5% 磷酸配制 1% 氨基苯磺酸(Sigma 产品)。临用前两者等量混合即可; 其他试剂均为分析纯或化学纯。

### 1.2 菌种和细胞

1.2.1 菌种 干酪乳杆菌 LC2W (*Lactobacillus casei* CGMCC No. 0828), 由光明乳业技术中心提供; 用含有体积分数为 10% 甘油的 MRS 液体培养基于  $-84^{\circ}\text{C}$  下保存。

1.2.2 细胞 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株, 购自中国科学院上海细胞生物学研究所; 用 DMEM 完全培养液传代培养。

### 1.3 增菌培养

将保存的 LC2W 菌种接种于 MRS 液体培养基,  $37^{\circ}\text{C}$  静置深层培养 18 h, 并转接 2 代。培养完毕后, 迅速降温至  $4^{\circ}\text{C}$ 。8 000  $\times$  g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$  离心收集细菌沉淀, 并用磷酸盐缓冲液(pH7.5)反复洗涤细菌至白色, 备用。

### 1.4 细胞壁分离提取

收集的菌体, 超声破碎 20 min 后, 2 000  $\times$  g 离心 15 min, 收集上清液。上清液 2 000  $\times$  g 离心, 20 min, 收集沉淀, 沉淀经 4% SDS 煮沸处理 30 min, 去除未共价蛋白后, 水洗 5 次, 收集粗细胞壁。将粗细胞壁悬浮于磷酸盐缓冲液, 依次经 DNase (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、RNase (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、胰酶 (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理, 获得纯

化的细胞壁。

肽聚糖的提取: 细胞壁悬浮于 10% TCA 中, 搅拌 16 h, 17 000 g/min 离心 20 min, 收集上清液和沉淀。沉淀重悬于 5% TCA 中, 室温搅拌过夜, 收集沉淀。水洗 3 次, 冻干备用。

磷壁酸的提取: TCA 处理所得的上清液经 2 倍体积冷乙醇, 于  $4^{\circ}\text{C}$ , 24 h 条件下醇析, 收集沉淀, 并用丙酮洗 3 次。  $37^{\circ}\text{C}$  烘干备用。

### 1.5 巨噬细胞代谢水平的测定

采用 MTT 法, 细胞用 DMEM 完全培养基传代培养, 试验时用 0.25% 胰酶消化细胞后收集细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取细胞悬浮液 100  $\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔培养板, 置  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中贴壁培养 2 h, 弃去未贴壁细胞。用 PBS 洗 3 次后, 向试验孔加入不同剂量 10, 20, 30, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品(以 DMEM 不完全培养液配制), 同时设有培养液单纯培养细胞的对照孔。置  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h, 加入 MTT (终浓度为 5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 20  $\mu\text{L}$ /孔, 再于  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 4 h, 弃上清后每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 微量振荡器振荡 5 min, 酶联免疫检测仪 490 nm 下测吸光度(A) 值。取 3 复孔均值。

### 1.6 巨噬细胞吞噬中性红能力的测定

采用中性红试验, 按 1.5 条件和过程制备 96 孔细胞培养板, 将巨噬细胞与不同浓度的样品置  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温箱孵育 4 h。弃去培养液, 每孔加入中性红 100  $\mu\text{L}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  作用 1 h 后, 用 PBS 洗 3 次, 加 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液(无水乙醇 0.1 mol/L 乙酸 = 1:1), 置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 采用酶联免疫测试仪测定 490 nm 处各孔 A 值, 求每组 A 值平均值, 结果并以巨噬细胞吞噬率表示, 吞噬率 = (试验孔 A 值 - 对照孔 A 值) / 对照孔 A 值  $\times 100\%$ 。

### 1.7 细胞培养上清液中 NO 水平的测定

1.7.1  $\text{NO}_2^-$  标准曲线的制备 将 1 mmol/L 的  $\text{NaNO}_2$  用蒸馏水对倍稀释后, 加入等体积的 Griess 试剂。室温下轻轻摇振 10 min, 于酶标仪上读取波长 490 nm 的 A 值, 每一样品设 3 个复孔, 取其平均值。

1.7.2 NO 水平的测定 按 1.6 制备细胞培养板, 置  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温箱孵育 24 h 后, 取上清液 100  $\mu\text{L}$  加 30% 硫酸锌 5  $\mu\text{L}$  去除蛋白质, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清与等体积 Griess 试剂混合。室温下轻轻摇振 10 min, 于波长 490 nm 处读取 A 值。

### 1.8 统计学处理

试验结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ), 采用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 磷壁酸和肽聚糖对 RAW264. 7 巨噬细胞代谢活力的影响

RAW 264. 7 巨噬细胞与乳杆菌 LC2W 细胞壁主要组分肽聚糖和磷壁酸共培养后, 经 MTT 法测定结果表明, 细胞经两物质诱导, 其代谢 MTT 的能力明显高于对照组, 并成一定的剂量效应, 磷壁酸组和肽聚糖组细胞的代谢能力没有显著差异(表 1)。

表 1 磷壁酸和肽聚糖对 RAW264. 7 巨噬细胞代谢水平的影响

Tab. 1 Effect of teichoic acid and peptidoglycan on RAW264. 7 macrophage metabolism			
组别 Group	浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	$A_{490\text{nm}}(\bar{x} \pm s)$	
		磷壁酸 Teichoic acid	肽聚糖 Peptidoglycan
对照组 Contral	0	0. 661 $\pm$ 0. 063 2	0. 661 $\pm$ 0. 063 2
	10	0. 772 $\pm$ 0. 036 1*	0. 767 $\pm$ 0. 018 1*
	20	0. 791 $\pm$ 0. 016 1*	0. 791 $\pm$ 0. 018 1*
	30	0. 801 $\pm$ 0. 015 6*	0. 799 $\pm$ 0. 017 5*
	50	0. 913 $\pm$ 0. 056 8**	0. 885 $\pm$ 0. 044 8**
	100	0. 956 $\pm$ 0. 055 6**	0. 942 $\pm$ 0. 089 1**

注: \* . 与对照组相比差异显著( $p < 0. 05$ ); \*\* . 与对照组相比差异非常显著( $p < 0. 01$ )。下同。  
Note: \* .  $p < 0. 05$ , \*\* .  $p < 0. 01$ , significantly different, compared with control group. The same as followed.

表 2 磷壁酸和肽聚糖对巨噬细胞 RAW264. 7 吞噬中性红的影响

Tab. 2 Effect of teichoic acid and peptidoglycan on the activity of RAW264. 7 macrophages englobing neutral red					
组别 Group	浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	磷壁酸 Teichoic acid		肽聚糖 Peptidoglycan	
		$A_{490\text{nm}}(\bar{x} \pm s)$	吞噬率/ %	$A_{490\text{nm}}(\bar{x} \pm s)$	吞噬率/ %
对照组 Contral	0	0. 051 $\pm$ 0. 008 0	0	0. 051 $\pm$ 0. 008 0	0
	10	0. 078 $\pm$ 0. 008 9*	53. 5	0. 076 $\pm$ 0. 002 5*	50. 1
试验组 Experiment	20	0. 080 $\pm$ 0. 005 2*	57. 3	0. 078 $\pm$ 0. 001 2*	54. 4
	30	0. 092 $\pm$ 0. 008 0*	81. 8	0. 091 $\pm$ 0. 002 0*	78. 6
	50	0. 127 $\pm$ 0. 025 2**	146. 4	0. 126 $\pm$ 0. 002 9**	144. 6
	100	0. 152 $\pm$ 0. 002 0**	201. 2	0. 148 $\pm$ 0. 002 6**	190. 6

2.2 磷壁酸和肽聚糖对 RAW264. 7 巨噬细胞 NO 释放的影响

将一系列不同浓度的  $\text{NaNO}_2$  标准品与测定的对应  $A$  值作出标准曲线如图 1, 并作直线相关回归分析。将不同标本测得的  $A$  值代入回归方程中得到相应的 NO 含量(图 2)。经试验发现肽聚糖和磷壁酸均能诱导 RAW264. 7 细胞释放 NO, 随着浓度增大, 巨噬细胞释放的 NO 量逐渐增加, 显示出了剂量

2.2 磷壁酸和肽聚糖对巨噬细胞 RAW264. 7 吞噬中性红能力的影响

由表 2 可见, 磷壁酸和肽聚糖在 10~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内均可显著增强巨噬细胞吞噬中性红能力, 并随浓度的增大而增加。与对照组比, 吞噬率分别增加 53. 5% ~ 201. 2% 和 50. 1% ~ 190. 6%, 当两者浓度分别达到 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 两物质都能极显著增强巨噬细胞吞噬中性红能力( $p < 0. 01$ )。在相同质量浓度时, 吞噬结果无显著差异。

依赖关系, 当浓度达到 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 两物质诱导能力出现差异, 磷壁酸诱导产生的 NO 量比较高。

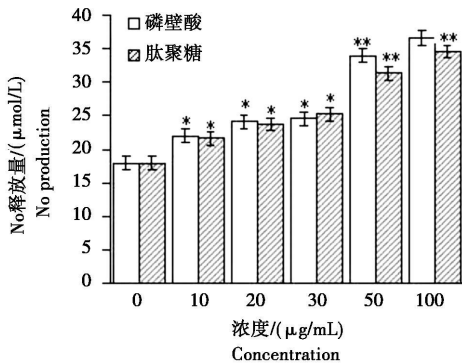


图 2 肽聚糖和磷壁酸对诱导 RAW264. 7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 2 Effect of teichoic acid and peptidoglycan on nitric oxide(NO) in RAW264. 7 cells

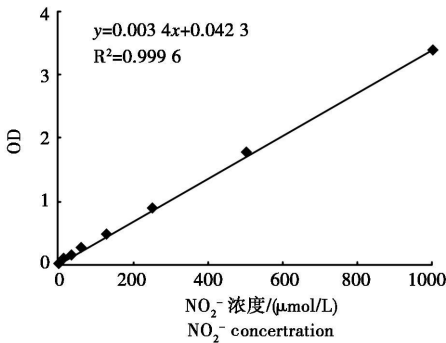


图 1  $\text{NO}_2^-$  的标准曲线

Fig. 1  $\text{NO}_2^-$  standard curve

3 讨论

磷壁酸和肽聚糖是乳杆菌的固有成分, 可作为

一种免疫佐剂,通过诱导各种免疫因子的释放和表达来影响免疫系统发挥其免疫功能。从而提高机体的免疫防御及免疫监视功能<sup>[3]</sup>。Matsuguchi 等<sup>[4]</sup>研究证实,乳杆菌细胞壁提取物磷壁酸可增强小鼠巨噬细胞吞噬能力和肿瘤杀伤能力。苏广伟等<sup>[5]</sup>利用基因芯片技术证实了乳酸杆菌肽聚糖能调控小鼠机体免疫调节细胞因子相关基因的表达,刺激机体释放细胞免疫因子,提高机体的免疫监督作用。

巨噬细胞是一种具有多种功能的免疫细胞,当细菌、异物等抗原性物质进入机体后,可迅速被单核吞噬细胞系统通过吞噬作用或受体介导的胞饮等作用摄入胞内。因此,单核细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一<sup>[6,7]</sup>。在试验中,与对照组比较,磷壁酸和肽聚糖均能增强其吞噬中性红能力,并呈一定的浓度依赖性。表明组成具有巨噬细胞激活作用,从而增强其吞噬作用。已知活细胞线粒体的乳酸脱氢酶能催化 MTT 形成 MTF-甲复合物,该复合物浓度的高低可反映细胞能量代谢的水平及生长增殖的能力<sup>[8]</sup>。本研究显示,巨噬细胞经肽聚糖和磷壁酸刺激后,其产生的 MTF-甲复合物能力显著高于对照组,结合上述吞噬试验的结果,进一步说明乳杆菌 LC2W 细胞壁组分可活化巨噬细胞 RAW264.7,增强其代谢能力。近年来的研究表明 NO 在巨噬细胞杀伤肿瘤细胞过程中起着决定性作用,NO 能阻断肿瘤细胞的能量代谢,抑制其 DNA 的复制,因而具有明显的抑瘤效果,且巨噬细胞对肿瘤细胞的细胞毒作用与 NO 的产量呈正相关<sup>[9,10]</sup>。本试验研究表明,两种细胞壁组分均能够诱导巨噬细胞 NO 的释放增加,并呈一定的剂量依赖关系,说明干酪乳杆菌 LC2W 细胞壁的磷壁酸和肽聚糖激活的巨噬细胞具有免疫调节和潜在的抗肿瘤活性。

大量研究表明益生菌具有免疫调节的作用,其可能机制是益生菌提供信号物质—病原体相关分子(PAMP),它被表面受体(TLR)识别后,通过 TIR 区域向细胞内传导信号,激活 NF- $\kappa$ B 等转录因子和蛋白激酶,释放细胞因子及 NO 合成酶,在天然免疫和获得性免疫中发挥作用<sup>[4]</sup>。而肽聚糖和磷壁酸可能作为 PAMP,激活信号传导途径,从而发挥其免疫调节作

用。本研究发现磷壁酸和肽聚糖对巨噬细胞代谢及吞噬能力并没有显著差异,可能是其作为 PAMP 激活信号传导途径时,被相同 TLR 的识别<sup>[11]</sup>。然而其如何作用 TLR 机制还不是很清楚,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 104.
- [2] Kimoto H, Mizumachi K. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response[J]. Microbiol Immunol, 2004, 48: 75–82.
- [3] Jacob E Wang, Maria K Dahle. Peptidoglycan and Lipoteichoic acid in Gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction biological effects, and synergism[J]. SHOCK, 2003, 20: 402.
- [4] Matsuguchi T, Ishikawa K. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor  $\alpha$ -inducing activities in macrophages through Toll-Like receptor 2[J]. CLIN DIAGN LAB IMMUNOL, 2003, 3: 259–266.
- [5] 苏广伟, 孙进, 施用晖, 等. 乳酸杆菌肽聚糖对小鼠机体免疫功能的调节作用[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26: 98–102.
- [6] Logan R P H, Robins A, Turner G A, et al. A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells[J]. Immunol Methods, 1998(213): 19–30.
- [7] 顾立刚. 医学免疫学和微生物学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997, 13: 58.
- [8] 王立生, 朱惠明, 王玉林, 等. 双歧杆菌的脂磷壁酸对小鼠腹腔巨噬细胞的激活作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(2): 23–25.
- [9] Dai Fukumura, Rakesh K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 1998, 17: 77–89.
- [10] Maria V, James J. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62: 1435–1444.
- [11] Jorgensen F, Wang E, Mla Almlöf. Peptidoglycan and lipoteichoic acid modify monocyte phenotype in human whole Blood[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001, 8: 515–521.