

國立台灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

博士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

自克弗爾分離乳酸菌於第一型過敏反應之研究

Investigation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Grains

on Type I Hypersensitivity



Wei-Sheng Hong

指導教授：陳明汝 博士

Advisor: Ming-Ju Chen, Ph. D.

中華民國 99 年六月

June 2010

## 中文摘要

本研究由預備實驗結果得知，分離自蒙古組克弗爾上層液可刺激小鼠巨噬細胞 RAW264.7 細胞株產生 TNF- $\alpha$ ，其為前發炎反應相關之細胞激素，因此第二章試驗擬針對克弗爾免疫調節能力與克弗爾粒中單一乳酸菌菌株之關係進行研究，首先以小鼠巨噬細胞株 RAW264.7 與小鼠腹水細胞為模式，觀察克弗爾上層液與單一菌株對細胞活化之情形，尋找刺激細胞激素分泌的最佳條件；同時研究引發免疫調節之上游機制，此部分試驗針對 Toll-like receptor (TLR) 進行分析。試驗結果顯示，牛乳經克弗爾粒發酵 24 與 48 小時之克弗爾上層液可顯著提昇 RAW264.7 細胞株分泌前發炎反應細胞激素 (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6 以及 IL-1 $\beta$ ) 以及 T helper (Th) 1 細胞激素 (IL-12)；可能的機能性成分為熱穩定性佳 (80°C 加熱 30 分鐘仍具有刺激細胞激素之能力) 之物質。進一步比較四株自克弗爾粒分離的菌株，其免疫調節能力又以 *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 及 *Lb. kefiri* M2 刺激之細胞激素分泌效果最為顯著，與牛乳克弗爾上層液的分泌量無顯著差異。免疫調節路徑方面，以 TLR-2 抗體針對 RAW264.7 細胞株進行試驗，顯示克弗爾上層液、單一菌株與其發酵上層液所刺激之細胞激素分泌量均顯著下降；進一步以 TLR-2 基因剔除鼠之腹水細胞進行實驗，結果顯示 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於刺激其腹水細胞之 IL-6 分泌顯著下降，證實其免疫調節路徑系經由 TLR-2。

第三章抗過敏之動物實驗。試驗中以克弗爾分離乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* M1 及 *Lb. kefiri* M2 進行試驗，首先利用小鼠脾臟及腹水細胞共同培養，刺激其分泌 Th1 與前發炎反應細胞激素，探討熱失活菌株 (85 °C 加熱 30 分鐘) 之免疫調節能力與活菌株與是否產生差異。進一步餵食 *Lb. kefiranofaciens* M1 於 ovalbumin (OVA) 致敏小鼠，測定其 Th1/Th2 細胞激素、調節型 T 細胞之數量及血清中 OVA-specific IgE 之濃度。菌株樣品是以灌食方式直接與腸道接觸，因此試驗亦抽取腸道 Peyer's patch 之 RNA 以進行小鼠全基因微陣列晶片分析，以瞭

解菌株對於過敏小鼠其腸道黏膜系統所引起之整體基因變化。試驗證實熱失活之 *Lb. kefiranofaciens* M1 仍具有刺激脾臟與腹水細胞分泌細胞激素之能力，因此選用熱失活菌株進行動物試驗，結果顯示餵食菌株之 OVA 過敏小鼠，顯著提升脾臟細胞中 Th1 細胞激素 (IL-12)，降低 Th2 細胞激素(IL-5)之分泌；同時提升脾臟中調節型 T 細胞之數量，而令其血中之 OVA-specific IgE 顯著降低。而 RNA 基因微陣列晶片分析之結果顯示，OVA 過敏小鼠餵食菌株後，其 Peyer's patch 之補體的基因表現俱顯著下降，同時顯著提升 *Ifnr*、*Cd2*、*Cd3*、*Cd28*、*Stat4* 與 *Ccr7* 基因之表現。

經第三章動物試驗，已經證實克弗爾粒中之熱失活乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* M1 具有刺激分泌前發炎反應相關細胞激素之能力、提升 Th1 反應，改善 OVA 過敏小鼠之 Th2 傾向之因子。因此第四章試驗以第一型過敏反應之氣喘實驗動物模式進行，評估自克弗爾粒中分離之 *Lb. kefiranofaciens* M1 能否改善呼吸道之臨床症狀。實驗動物先以 OVA 進行腹腔注射外，再令其吸入 OVA 粉塵以產生氣喘，餵食不同濃度以及不同時間長度之樣品後，觀察以乙酰甲膽碱(methacholine) 引起之呼吸道阻力 (enhanced pause,  $P_{enh}$ ) 是否降低；測定脾臟與支氣管沖洗液中之 Th2 (IL-4, IL-5 與 IL-13) 與 Th17 (IL-17 與 IL-17F) 細胞激素之分泌量及血清中 OVA-specific IgE 之含量；並以組織切片觀察肺臟中免疫細胞浸潤與黏液分泌情況。結果顯示，以熱失活之 *Lb. kefiranofaciens* M1 餵食 OVA 氣喘小鼠，其餵食菌數達  $10^8$  CFU 以上，且以試驗全程每日皆餵食之方式，小鼠脾臟與支氣管沖洗液之前發炎反應、Th2 及 Th17 細胞激素顯著下降，並能夠顯著降低由乙酰甲膽碱所誘發的  $P_{enh}$  值；切片結果顯示肺臟切片中免疫細胞之浸潤以及黏液分泌顯著減少，血清中之 OVA-specific IgE 亦顯著下降。

關鍵詞：克弗爾；第一型過敏反應；氣喘；細胞激素；乳酸菌

## Abstract

Kefir has long been considered good for health. Its health benefits include immunoregulatory effects. However, there is a lack of knowledge concerning the immunoregulatory effects induced by kefir lactic acid bacteria (LAB). In addition, the mechanisms responsible for these effects have not been fully determined. Thus, the objective of this study was to investigate the immunomodulating reaction and mechanisms of LAB isolated from kefir grains. Firstly, we investigated the *in vitro* immunomodulating capacity and mechanisms of kefir supernatants and kefir LAB by cytokine profiles through a toll-like receptor (TLR) pathway. Results demonstrated that kefir supernatants, obtained from kefir fermented more than 24 h, induced the production of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ ) in RAW264.7 cells. Among four LAB isolated from kefir grains and their supernatants, *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 and its supernatant had strong potential to induce *in vitro* production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and T helper (Th) 1 (IL-12) cytokine in RAW264.7 cells and murine peritoneal macrophages. Moreover, blocking TLR-2 using anti-TLR-2 mAb and TLR-2<sup>-/-</sup> mice showed a significant inhibition of cytokine production. These findings indicated that kefir influenced the secretion of cytokines through TLR-2.

According to the above results, the LAB may be beneficial for the promotion of Th1/Th2 balances and alleviating of type 1 hypersensitive response. In this context, we examined the anti-allergic effects of *Lb. kefiranofaciens* M1 and *Lb. kefiri* M2 isolated from kefir grains by modulation of Th1/Th2 balances and inhibition of immunoglobulin (Ig) E production in ovalbumin (OVA)-sensitized Th2-polarized mice. This study demonstrated that oral feeding of heat inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 from kefir grains effectively inhibited Ig E production in response to OVA *in vivo*. The pattern of cytokine production by splenocyte cells revealed that the levels of cytokines produced by Th 1 cells increased, and those of cytokines produced by Th2 cells decreased in the heat

inactivated M1 feeding group. These findings indicated that *Lb. kefiranofaciens* M1 in the kefir played an important role in anti-allergic activities. By additional analysis using flow cytometry and microarray, the mechanism of suppression of IgE production by oral feeding of the heat inactivated M1 probably occurs because of up-regulation of the expression of *Cd2*, *Stat4*, and *Ifnr* leading to skewing the Th1/Th2 balance toward Th1 dominance, elevation of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells percentage and reduction of activated CD19<sup>+</sup> B cells. Down-regulation of complement system and components was also involved in suppression of IgE production. Further studies of different type 1 hypersensitivity diseases were necessary to address the anti-allergic effects of lactobacilli isolated from kefir grains.

Allergic asthma, a type 1 hypersensitivity, is characterized by allergen-induced chronic inflammation of the lungs and airway hyperresponsiveness (AHR), associated with the enhancement of allergen-induced eosinophilia, goblet cell hyperplasia, allergen-specific IgE levels and Th2 dominant cytokines. In the third part of this study, we assessed the anti-asthmatic effects of *Lb. kefiranofaciens* M1 and its fermented milk in different feeding procedures and dosages. The cellular mechanisms of *Lb. kefiranofaciens* M1 in anti-allergic asthmatic effects were also evaluated. The mice oral administered M1 sample strongly inhibited the production of Th2 (IL-4, IL-5 and IL-13), proinflammatory (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and CCL20) and Th17 cytokines in splenocytes and bronchoalveolar fluid (BAL) in the OVA-allergic asthma mice in a timing of the intervention and a dose dependent manner. The increase in regulatory T cell population for oral administered M1 in splenocytes in the allergic asthma mice was also observed. Additionally, all features of the asthmatic phenotype, including specific IgE production, airway inflammation, and development of airway hyperresponsiveness (AHR), were depressed in a dose dependent manner.

Taken together, these findings indicate a possibility that the intake of kefir

lactobacilli, *Lb. kefiranofaciens* M1, may be effective in alleviating asthmatic symptoms.

Both the exposure time and the dosage are two important factors affecting the anti-allergic asthmatic effectiveness of *Lb. kefiranofaciens* M1.

Keyword: asthma, cytokine, lactic acid bacteria, kefir, type 1 hypersensitivity



## 目錄

中文摘要	i
英文摘要	iii
研究背景	1
第一章：文獻整理	2
一、免疫調節之介紹	2
(一) 細胞激素(cytokine)	2
1. T 輔助細胞第一型與第二型	2
2. T 輔助細胞第 17 型	3
3. 調節型 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg cell)	4
(二) 第一型過敏反應 (Type I hypersensitivity reaction)	5
(三) 氣喘 (Asthma)	6
(四) 補體 (complement)	7
二、乳酸菌與免疫調節	14
(一) 周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, MNCs)	14
1. T 細胞 (T lymphocytes)	14
2. 調節型 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg cell)	15
3. 自然殺手細胞 (natural killer cells, NK cells)	16
4. 周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, MNCs)	16
(二) 抗原呈現細胞 (Antigen-presenting cells, APC)	17
(三) 次級淋巴組織	18
1. 脾臟	18
2. 腸道淋巴組織	19
(四) 乳酸菌與第一型過敏反應	20
(五) 乳酸菌與氣喘	20
(六) 乳酸菌之免疫調節物質	21
三、克弗爾發酵乳與免疫調節	25
(一) 餵食實驗動物以探討克弗爾之功效	25
(二) 藉由致病動物探討克弗爾改善免疫疾病之功效	25
四、本研究室在克弗爾發酵乳之研究成果	27
(一) 新竹克弗爾發酵乳機能性研究	27
(二) 克弗爾粒中之菌株分離鑑別	28
預備實驗	29
實驗動機及重要性	31
總試驗流程	32

第二章：探討克弗爾上層液與自克弗爾粒分離之乳酸菌經由 Toll-like receptor

刺激巨噬細胞分泌細胞激素之功效 -----	34
一、摘要 -----	34
二、材料與方法 -----	35
(一) 試驗流程 -----	35
(二) 克弗爾樣品之製備 -----	35
(三) 乳酸菌之菌種來源、培養與製備 -----	36
(四) 克弗爾與 RAW264.7 細胞株共培養 -----	36
(五) 克弗爾與小鼠巨噬細胞共培養 -----	37
(六) 細胞激素測定 -----	37
(七) 乳酸菌中免疫物質特性分析 -----	37
(八) Blocking 試驗以確認克弗爾活化之路徑 -----	38
(九) 統計分析 -----	38
三、結果 -----	39
(一) 克弗爾上層液對於 RAW264.7 細胞株分泌細胞激素之影響 -----	39
(二) 克弗爾中乳酸菌與其發酵乳上層液對於 RAW264.7 細胞株分泌細胞 激素之影響 -----	39
(三) 探討克弗爾中具有機能性成分 -----	45
(四) 探討免疫活化之受器 -----	45
四、討論 -----	51
第三章：探討自克弗爾粒分離之乳酸桿菌之抗過敏功效 -----	55
一、摘要 -----	55
二、材料與方法 -----	57
(一) 試驗流程 -----	57
(二) 乳酸菌之菌種來源、培養與製備 -----	57
(三) 體外細胞激素試驗小鼠巨噬細胞與脾臟細胞 -----	57
(四) 致敏小鼠動物實驗 -----	59
(五) 細胞激素測定 -----	60
(六) Microarray -----	60
(七) 統計分析 -----	61
三、結果 -----	62
(一) 自克弗爾分離之乳酸桿菌對於巨噬細胞與脾臟細胞細胞激素分泌之 影響 -----	62
(二) 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於 IgE 與 OVA-specific IgE 分泌 之影響 -----	62
(三) 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於致敏小鼠脾臟細胞激素之 影響 -----	67
(四) 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於致敏小鼠脾臟中 CD4+CD25+ 調節型 T 細胞與 CD19+ B 細胞之影響 -----	67



(五) 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於調控致敏小鼠 Peyer's patch 基因表現之影響 -----	67
四、討論 -----	72
 第四章：探討自克弗爾粒分離之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 與其發酵乳 改善過敏性氣喘反應之功效 -----	75
一、摘要 -----	75
二、材料與方法 -----	76
(一) 試驗流程 -----	76
(二) 乳酸菌之製備與處理 -----	76
(三) 氣喘小鼠之致敏與抗原吸入 -----	76
(四) 乳酸菌餵食之不同處理組 -----	77
(五) 呼吸道阻力測試 -----	77
(六) 支氣管沖洗液之取得與肺臟切片 -----	78
(七) 脾臟細胞之分離與 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節型 T 細胞之分析 -----	78
(八) 血清 -----	79
(九) 細胞激素測定 -----	79
(十) 統計分析 -----	79
三、結果 -----	80
(一) 熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 以不同餵食處理對於氣喘小鼠之影響	80
(二) 不同劑量之 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於氣喘小鼠脾臟與之支氣管沖 洗液之細胞激素分泌之影響 -----	80
(三) 不同劑量之 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於氣喘小鼠血清中 OVA-specific IgE 之影響 -----	81
(四) 不同劑量之 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於氣喘小鼠肺臟切片之影響 ---	81
(五) <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1 對於氣喘小鼠肺功能之影響 -----	81
四、討論 -----	91
 第五章：結論 -----	95
參考文獻 -----	97
附錄 -----	117

## 圖目錄

圖1-1 細胞激素之種類與其產生及調控	9
圖1-2 IL-17活化之不同種類之細胞及組織	10
圖1-3 自然調節型T細胞與其作用機制	11
圖1-4 第一型過敏反應之發生機制	12
圖1-5 補體系統活化之路徑	13
圖1-6 幹細胞分化之免疫細胞	24
圖1-7 不同來源牛乳克弗爾對刺激RAW264.7之TNF- $\alpha$ 分泌之影響	30
圖2-1 不同發酵時間之克弗爾上層液對RAW2647細胞株細胞激素分泌之影響	41
圖2-2 克弗爾上層液與RAW264.7細胞株之不同共培養時間對於細胞激素分泌之影響	42
圖2-3 分離自克弗爾之菌株其菌體對於RAW264.7細胞株分泌細胞激素之影響	43
圖2-4 自克弗爾粒分離之菌株其發酵乳上層液對RAW264.7細胞株分泌細胞激素之影響	44
圖2-5 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1菌體 (M1c) 與其發酵乳上層液(M1s)對小鼠巨噬細胞分泌細胞激素之影響	47
圖2-6 不同加熱溫度對於克弗爾上層液對於RAW264.7細胞株細胞激素分泌之影響	48
圖2-7 藉由anti-TLR2 與anti-TLR4 mAb與RAW264.7細胞株進行反應，以確認克弗爾上層液之活化受體	49
圖2-8 使用TLR2 <sup>-/-</sup> 小鼠巨噬細胞探討分離自克弗爾粒乳酸菌之活化受體	50
圖3-1 致敏實驗流程圖	60
圖3-2 克弗爾粒分離之乳酸桿菌對於小鼠巨噬細胞分泌細胞激素之影響	63
圖3-3 自克弗爾粒分離之乳酸桿菌對於脾臟細胞分泌細胞激素之影響	64
圖3-4 餵食熱失活之 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於致敏小鼠血清中IgE之影響	65
圖3-5 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於致敏小鼠血清中(a)總IgE (b) OVA-specific IgE之影響	66
圖3-6 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA致敏小鼠脾臟分泌細胞激素之影響	69
圖3-7 餵食熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA致敏小鼠脾臟細胞中 (a) CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T細胞與 (b) CD19之影響	70
圖4-1 試驗流程圖	77
圖4-2 熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1之不同餵食處理對於OVA氣喘小鼠脾臟細胞激素分泌之影響	82
圖4-3 熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1之不同餵食處理對於OVA氣喘小鼠支氣管沖洗液細胞激素分泌之影響	83

圖4-4 熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1之不同餵食處理對於OVA氣喘小鼠脾臟調節型T細胞之影響 -----	84
圖4-5 不同劑量之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠支氣管沖洗液細胞激素分泌之影響 -----	85
圖4-6 不同劑量之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠支氣管沖洗液中Th17細胞激素分泌之影響 -----	86
圖4-7 不同劑量之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠血清中OVA-specific IgE之影響 -----	87
圖4-8 不同劑量之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠肺部免疫細胞浸潤之影響 -----	88
圖4-9 不同劑量之熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠肺部黏液分泌之影響 -----	89
圖4-10 熱失活 <i>Lb. kefiranofaciens</i> M1對於OVA氣喘小鼠肺功能之影響 -----	90



表目錄

表3-1 *Lb. kefiranofaciens* M1對OVA致敏小鼠Peyer's patch基因表現之影響---71



## 研究背景

克弗爾發酵乳的機能性已陸續被研究發現，但由於克弗爾菌元 (克弗爾粒，kefir grains) 菌相複雜，大量製備時操作不易、難以維持品質，再加上克弗爾發酵乳口感特殊、具產氣性，導致商業化困難。本研究室過去利用傳統及分子生物法將實驗室中四種不同來源克弗爾粒中的菌株分離鑑定，並研究其在克弗爾粒中的分佈比例 (Chen et al., 2008; Wang et al., 2008); 接著利用體外試驗 (RAW264.7 細胞株) 比較這四種不同來源的克弗爾發酵乳其免疫調節功能，發現只有蒙古組的牛乳克弗爾發酵乳可刺激前發炎反應的細胞激素 (pro-inflammatory cytokines) 大量分泌。為了瞭解是菌體本身或是發酵乳中的哪些成分引起如此之效果，我們進一步將分離自蒙古克弗爾粒中的單一純菌株及其發酵乳與 RAW264.7 細胞共培養，證實只有其中一株乳酸菌之發酵乳具有引發前發炎反應細胞激素的功效。雖然過去本研究室針對新竹組克弗爾發酵乳證實可減緩小鼠皮下腫瘤細胞生長 (Liu et al., 2002)，增加糞便與小便中免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) A 含量，對於白蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏小鼠，餵食克弗爾後可顯著降低血清中的 IgE 與 IgG1 的含量，進而改善小鼠過敏反應 (Liu et al., 2006b)，也有其他研究證實克弗爾發酵乳對免疫機能調節具有顯著的效果 (Liu et al., 2005; de LeBlanc et al., 2006)，但是從未有研究報告顯示其免疫調節與單一菌株有關，也從未分離其有效成分或探討其引發免疫調節之上游機制。本研究若能瞭解克弗爾粒中菌株或其發酵代謝產物可產生提升 T 輔助細胞第一型 (T helper cell type I, Th1) 反應，並進一步探討其對於第一型過敏反應 (Type I hypersensitivity reaction) 之改善與相關機制，除了將有助於抗過敏克弗爾發酵乳的開發，並可利用其分離菌株或其中之機能性成分，以開發新的機能性發酵乳及食品。

## 第一章 文獻整理

### 一、免疫調節之介紹

本研究中以不同細胞模式與動物模式進行，針對克弗爾發酵乳與其分離菌株調節不同細胞與組織之細胞激素分泌與調控，誘導第一型過敏反應之動物模式以及氣喘動物模式，且餵食克弗爾及其菌株觀察症狀改善情況。本章節首先介紹免疫調節與機制。

#### (一) 細胞激素 (cytokine)

##### 1. T 輔助細胞第一型與第二型

T 細胞在骨髓製造，遷移到胸腺中成熟，成熟後細胞膜上表現特殊的抗原結合受體，為 T 細胞受體 (T-cell receptor, TCR)，TCR 不具有辨識抗原之能力，必須由主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex molecules, MHC) 與抗原結合後的複合物活化。T 細胞可分為兩類：T 輔助細胞 (T helper cell, Th cell) 及 T 毒殺細胞 (T cytotoxic cell, Tc cell)，所有 T 細胞膜上皆表現 CD3 醣蛋白分子，T 輔助細胞細胞膜上特殊表現 CD4 醣蛋白分子，需要 class II MHC 與抗原同時活化，可分泌多種細胞激素，進而活化各種免疫細胞；毒殺型 T 細胞膜上特殊表現 CD8 醣蛋白分子，需要 class I MHC 與抗原同時活化，可進一步分化成 cytotoxic T lymphocytes (CTL)，CTL 能夠對自身變異的細胞 (self-altered cells)、感染病毒的細胞及癌細胞進行毒殺作用 (Kuby et al., 2007)。

細胞激素由多種免疫細胞分泌，其分子量範圍為 8~25kD 的醣蛋白，除了作用到免疫細胞，其他細胞如內皮細胞，神經細胞，腦部都會受到影響，它透過與高親和力的激素受體 (cytokine receptor) 結合，令其於低濃度時即能產生功能。細胞激素主要可以分為兩大類：T 輔助細胞第一型 (T helper cell type I, Th1) 及 T 輔助細胞第二型 (T helper cell type II, Th2)。Th1 細胞主要分泌的細胞激素

為介白素 (Interleukin: IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-12、干擾素 (Interferon, IFN)- $\gamma$  與腫瘤致死因子 (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ), 主要功能為幫助 IgG2a 抗體的產生、活化巨噬細胞、自然殺手細胞與 T 毒殺細胞, 強化細胞免疫反應以對抗病毒感染及胞內病原 (intracellular pathogen); Th2 細胞則分泌 IL-4、IL-5、與 IL-13, 以活化 B 細胞分泌抗體, 協助嗜酸性白血球 (eosinophils) 攻擊蠕蟲 (helminth), 吸引且活化嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球 (basophils) 與肥大細胞 (mast cell), 而強化體液免疫反應製造抗體 IgE, 並增加血清中 IgE 的量。Th1 與 Th2 所製造的重要細胞激素, 可促進它們本身類型的發育與活動力; 其次, Th1 與 Th2 反應之間呈現交叉調節 (cross-regulation) 之現象。如 Th1 細胞激素之 IFN- $\gamma$  能夠抑制 Th2 細胞增生與 IL-4 之分泌; 相對而言, Th2 細胞激素之 IL-4 亦可抑制 Th1 反應, 同時抑制 IgG2a 之分泌 (Kuby et al., 2007)。因此正常生物體內之 Th1 與 Th2 之間的反應需達到平衡, 否則容易產生過度發炎或過敏等反應 (圖 1-1)。

## 2. T 輔助細胞第 17 型

近年來發現, Th 細胞除了 Th1 細胞與 Th2 細胞兩種亞型 (subtype) 之外, 還有另一種分泌 IL-17 細胞激素的亞型 Th17 細胞。研究發現, IL-17 可刺激趨化酵素 (chemokine) 與 anti-microbial peptides 產生, 誘發發炎反應並引導嗜中性白血球 (neutrophils) 聚集至發炎區域 (圖 1-2)。除此之外, 在許多自體免疫疾病, 例如類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)、紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus)、克隆氏病 (Crohn's disease)、氣喘 (asthma) 等, 實驗動物模式與臨床研究都已經證明與 Th17 細胞有關。然而關於 Th17 細胞的分化與發育機制卻仍不清楚, 之前研究發現 Th17 細胞的分化與純真 T 細胞 (naïve T cell: 已成熟但尚未活化之 Th 細胞) 在被樹突狀細胞 (dendritic cell, DC) 活化的過程中接受到轉型生長因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  以及 IL-6 的刺激有關, 有趣的是, 與 Th1 路徑相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  以及與 Th2 路徑相關的細胞激素 IL-4 均可以抑制 Th17 細胞的分化, 更可以確認 Th17 是有別於 Th1 及 Th2 兩種亞型

的新亞型。在 Th17 細胞分化的過程需要 IL-6, IL-21, IL-23 與 TGF- $\beta$  參與其中，IL-21 亦屬於 Th17 之細胞激素，負責調控 Th1 細胞分化。IL-21 可藉由自泌 (autocrine) 的方式刺激 T 輔助細胞產生更多 IL-21。而抗原呈現細胞 (Antigen-presenting cells, APC) 所分泌的 IL-23 與 T 輔助細胞的 IL-23 receptor (IL-23R) 結合誘發訊息傳遞，並在 TGF- $\beta$  調控下促使 IL-17 基因表現與令 Th17 細胞分化 (Alcorn et al., 2010)。

近年來研究指出 Th17 在氣喘發病機轉中 (pathogenesis) 扮演重要角色，(Alcorn et al., 2010)。在過敏性氣喘的個體中，肺泡沖洗液中的 IL-17 與 IL-17F 之 mRNA 與蛋白質的表現皆有顯著提升 (Laan et al., 2002)；亦有研究指出，若 IL-17A 的分泌提高，導致過敏性氣喘之個體對於乙醯二膽鹼 (methacholine) 所誘發之哮喘反應亦更加惡化 (Barczyk et al., 2003)。同時 IL-17 在發炎反應中，亦能夠引起不同之發炎媒介物質，如細胞激素中的 IL-6、白血球生長素 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、白血球巨噬細胞生長激素 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  以及趨化因子 (chemokines) 中的 IL-8 與單核球趨化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) (Acosta-Rodriguez et al., 2007)。綜合上述可得知，在過敏性氣喘中的肺部與呼吸道中，Th17 細胞與其細胞激素之分泌是為顯著表現。

### 3. 調節型 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg cell)

除了上述所提之 Th1、Th2 與 Th17 細胞外，T 細胞中尚有一重要亞型為調節型 T 細胞。調節型 T 細胞亦從胸腺分化而來，並且在免疫容忍 (immune tolerance) 方面扮演很重要的作用。調節型 T 細胞之細胞膜上皆表現 CD4 與 CD25 (IL-2 receptor 的  $\alpha$ -chain) 糖蛋白分子，同時 CD25 只表現於活化之 T 細胞上 (Sakaguchi et al., 2004)。調節型 T 細胞能夠維持 T 細胞的平衡和避免嚴重的疾病性免疫反應。「自然調節型 T 細胞」在成熟生物體中的 CD4<sup>+</sup> T 細胞中的分布約



為 5~10 %，先天性與適應性免疫反應皆屬於其調節範圍 (Shevach, 2004; Maloy et al., 2003)。除了自然調節型 T 細胞外，另有可誘導性之「適應性調節型 T 細胞」(Tr1, Th3 等細胞) (Stassen et al., 2004)，主要分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$  等細胞激素以進行免疫調控 (圖 1-3)。

## (二) 第一型過敏反應 (Type I hypersensitivity reaction)

世界各國過敏性疾病日益增加且備受重視，其所造成影響與經濟損失甚鉅。第一型過敏反應為特定過敏原 (allergen) 所誘發。

其過程可分為以下步驟 (圖 1-4)：

1. 首次接觸過敏原，被過敏原活化之 B 細胞分泌 IgE 釋放於血液中。
2. 此類 IgE 之與肥大細胞與嗜鹼性白血球表面之 Fc 抗體具有高度親和力，與 IgE 結合後之肥大細胞與嗜鹼性白血球稱為致敏化 (sensitized) 細胞。
3. 未來若已致敏的肥大細胞與嗜鹼性白血球表面上的 IgE 再度曝露於相同之過敏原時，將會發生交叉反應 (cross-linking)，進而引起一連串訊息傳遞，使免疫細胞發生去顆粒作用 (degranulation)，顆粒中的藥理活化發炎物質會被釋出而影響周遭的組織，如組織胺 (histamine)、白三烯素 (leukotrienes) 與前列腺素 (prostaglandins)、bradykinin、嗜酸性白血球趨化因子 (eosinophil chemotactic factor) 和嗜中性白血球趨化因子 (neutrophil chemotactic factor) 等物質)。

這些物質最主要的影響有兩類，包括血管舒張與平滑肌收縮，而發炎介質之釋出的範圍將決定其為局部性或全身性影響。第一型過敏反應涵蓋多種疾病，如氣喘 (asthma)、食物過敏反應 (food allergy)、蕁麻疹 (urticaria) 以及過敏性鼻炎 (allergic rhinitis) 都屬於此範疇。

過敏原亦會令免疫系統產生記憶型 T 細胞與漿細胞 (plasma cells)。由於第一

型過敏反應者之Th細胞會偏向Th2之反應 (Prescott., 1998)，當首次接觸過敏原時，抗原呈現細胞將過敏原呈現給naïve Th細胞，第一型過敏反應者所分泌的細胞激素以Th2細胞激素 (如：IL-4、IL-5 及IL-13 等)為主，可謂Th2反應與第一型過敏反應之發病機制與臨床特徵息息相關。IL-4可令naïve T細胞分化成為Th2細胞，同時可活化B細胞製造IgE，IL-5與IL-13則是在嗜酸性白血球的趨化與活化的反應扮演重要的角色 (Sanderson, 1992)；肥大細胞亦會分泌IL-4與IL-5，誘導Th2細胞分化以及趨化大量的嗜中性白血球與嗜酸性白血球。由上述可知，Th2細胞激素在第一型過敏反應中為重要指標。

### (三) 氣喘 (Asthma)

過敏性氣喘屬於第一型過敏反應之臨床症狀，為呼吸道發炎之局部過敏性疾病。過敏性氣喘的特徵在臨床上表現為呼吸道過度反應 (hyperresponsiveness) 及肺部呈慢性發炎的病理變化。某些個體會因吸入特定之過敏原而誘發，如花粉、昆蟲、香水、塵埃或病毒等。其致病機制與前述之第一型過敏反應相同，如誘發Th2細胞激素 (如：IL-4、IL-5 及IL-13 等) 及大量的IgE與特定過敏原產生反應。呼吸道之肥大細胞活化後，促使組織胺與白三烯素等介質釋放。氣喘的早期反應發生在與接觸過敏原後幾分鐘內，如血管通透性增加與黏液素 (mucus) 分泌增加等現象；而晚期反應發生於數小時之後，細胞激素之分泌吸引呼吸道黏膜有肥大細胞、單核球、嗜中性白血球及嗜酸性白血球浸潤，造成支氣管水腫、氣管收縮、呼吸道平滑肌功能喪失與增生，使呼吸道阻力增加。同時組織胺進而刺激杯狀細胞 (goblet cell, 因類似高腳杯狀而命名) 製造大量黏液，黏液素主要由醣蛋白 (glycoprotein) 所組成 (Brockhausen et al., 2001)，除了以沾黏的方式阻止異物進入呼吸道之外，其中亦含有抗體以對抗病原。但於氣喘情形下，杯狀細胞過度分泌黏液累積於支氣管，同時支氣管之上皮脫落而造成肺內支氣管狹窄 (Sumi and Hamid., 2007)。

實驗動物的肺功能目前傾向以非侵入式 (non-invasive) 之方法測量，測量動物肺部呼吸道反應程度的方法，以單一艙室 (chamber) 之全身性體積掃描計量機 (whole body plethysmography) 為主，自然呼吸的小鼠置放於 plethysmography 的艙室中，以測定 enhanced pause (Penh)。Penh 值已被報告證實可做為呼吸道阻礙 (airway obstruction) 之指標 (Peak et al., 1987)，它與實驗動物的 IgE 產生、肺部組織的嗜酸性白血球浸潤、及以食道插管所測得之內胸膜壓力 (intrapleural pressure) 相關。

#### (四) 補體 (complement)

補體是一群血清蛋白 (serum proteins)，主要由肝細胞所合成，另外上皮細胞、單核球與巨噬細胞亦能產生，其大量存在於血液中，其功能包括溶解細菌及病毒、針對特定抗原以增進吞噬作用和結合至免疫細胞上之補體受器 (complement receptors, CRs)，以啟動免疫反應等。補體之命名主要以數字命名 (C1~C9)；或以字母符號命名 (如因子D, factor D)，而補體活化代謝產生的片段則以小寫字母表示 (如C3a與C3b)。補體的活化是以連鎖反應 (cascade) 的方式進行，由被激活的補體進而催化下一個補體的活化，引發連續性反應，可分為以下三種途徑 (圖1-5)：

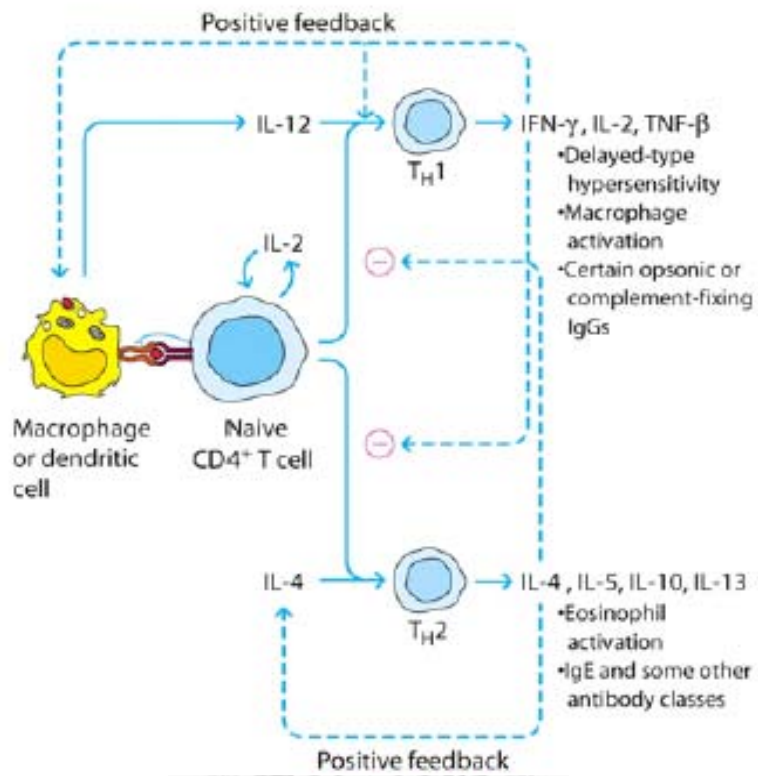
1. 古典途徑 (classical pathway)：此過程起始於抗原-抗體複合體之刺激，當抗體與入侵病原體的抗原發生專一性的結合後，抗體便與補體 (C1) 結合。抗體與補體的結合會激活補體而產生連鎖反應，將C5裂解成C5a、C5b兩部份，C5b則與C6、C7、C8、C9形成膜攻擊複合體 (membrane attack complex)，此複合體能攻擊病菌，使其穿孔導致細胞溶解。
2. 替代路徑 (alternative pathway)：此路徑不需要抗體的參與，其由微生物表面物質所引發，多種細菌、酵母菌、病毒、病毒感染的細胞、原生動物的寄生蟲 (protozoan parasites) 等所含成分可在無抗體的協助下，直接活化補體系統，活化

C3以分解為C3a與C3b，C3b並與B、D、P因子結合走入類似古典途徑的步驟。

3. 甘露糖結合凝集素途徑 (mannose-binding lectin pathway)：甘露糖結合凝集素 (mannose-binding lectin, MBL)是先天性免疫系統的一種血漿蛋白，可辨認出病原體表面的甘露糖殘基 (mannose residues) 和果糖殘基 (mannose residues)，與病原體表面結合。甘露糖結合凝集素在補體活化過程中與病原結合後，(MBL-associated serine protease, MASP) 便結合至MBL上，繼續進行類似古典途徑的反應。

以上三種途徑都將產生C3b，C3b可黏附於病原體表面，同時和巨噬細胞上的補體受器結合，再加上C5a的活化，巨噬細胞即會吞噬病原體，此過程是為「調理作用」(opsonization)。另外，三種途徑都可形成膜攻擊複合物 (Kuby et al., 2007)。

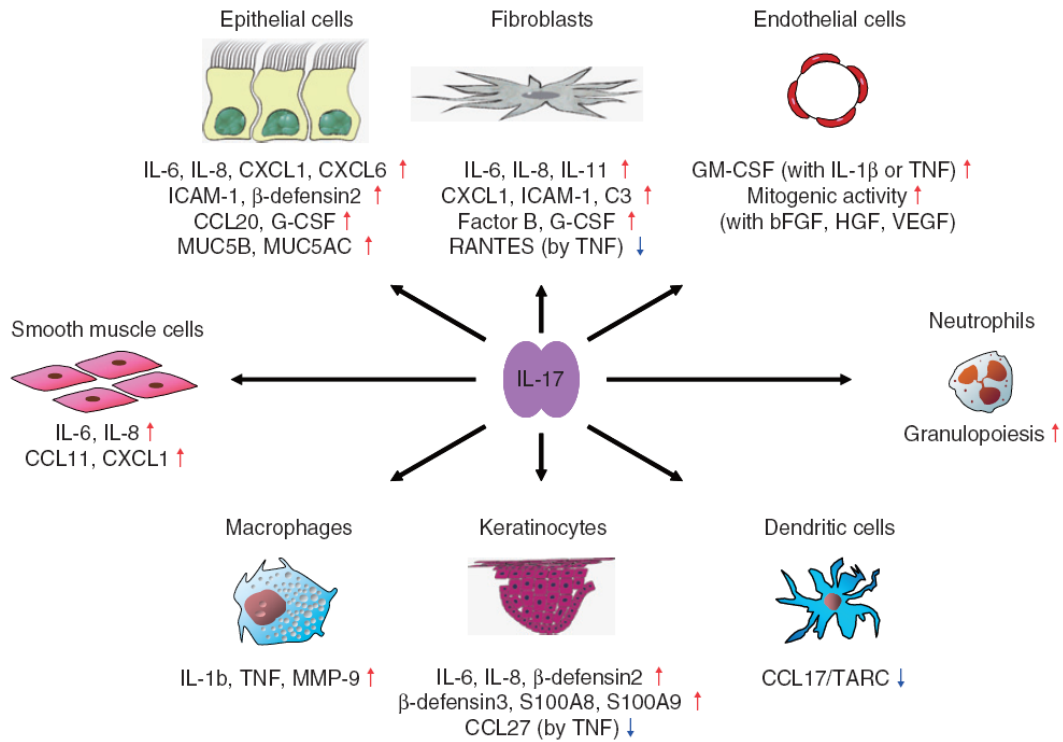
補體活化過程中，補體分解產物如C3a、C4a與C5a又稱為過敏毒素 (anaphylatoxins)，其能夠與含組織胺的細胞 (histamine-containing cells) 如肥大細胞和嗜鹼性白血球結合，會促使其釋出組織胺使局部血流量增加，引起平滑肌收縮等現象。目前亦有文獻指出，此過敏毒素亦參與第一型過敏反應之症狀表現 (Drouin et al., 2001)。



(Kuby et al., 2007)

圖 1-1 細胞激素之種類與其產生及調控。

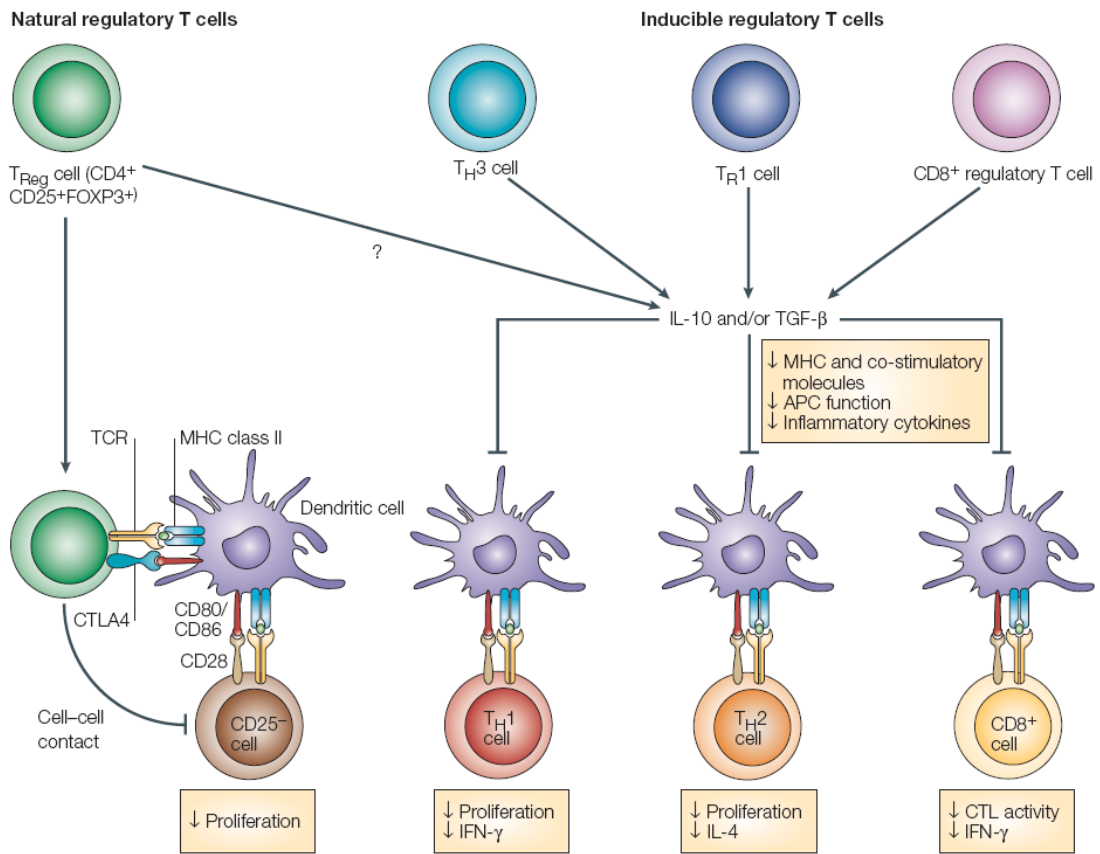
Fig. 1-1 Cytokine-mediated generation and cross-regulation of Th subsets.



(Oboki et al., 2008)

圖 1-2 IL-17活化之不同種類之細胞及組織。

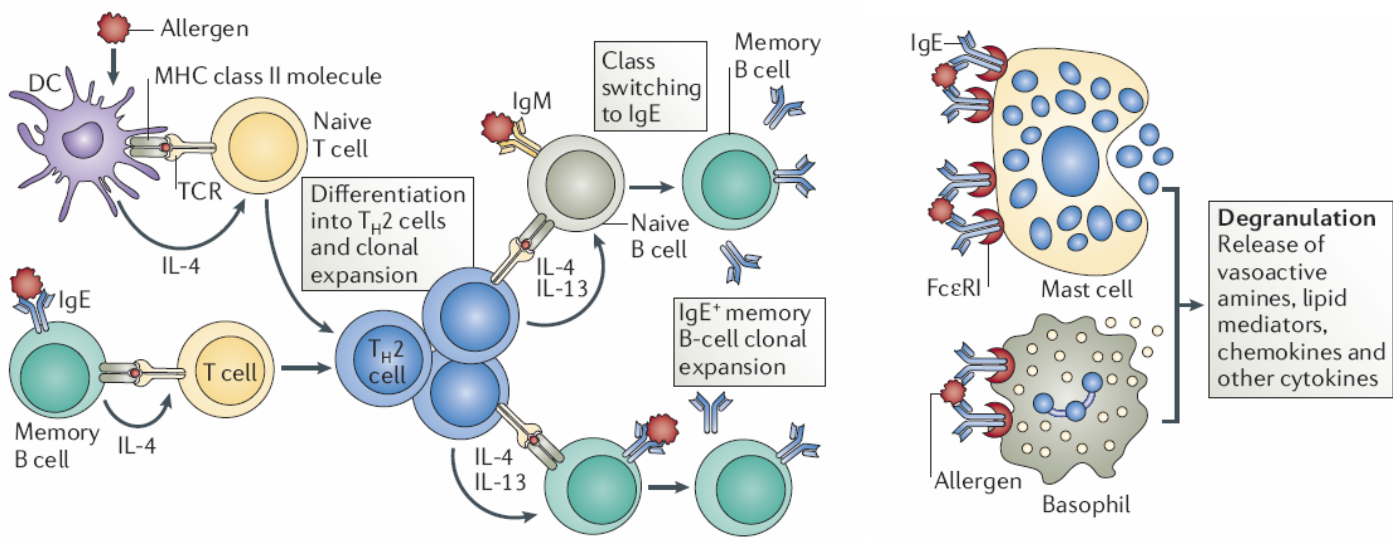
Fig. 1-2 IL-17 activities in various types of cell.



(Kingston and Mills, 2004)

圖 1-3 自然調節型 T 細胞與其作用機制。

Fig. 1-3 Natural and inducible regulatory T cells and mechanisms of suppression.

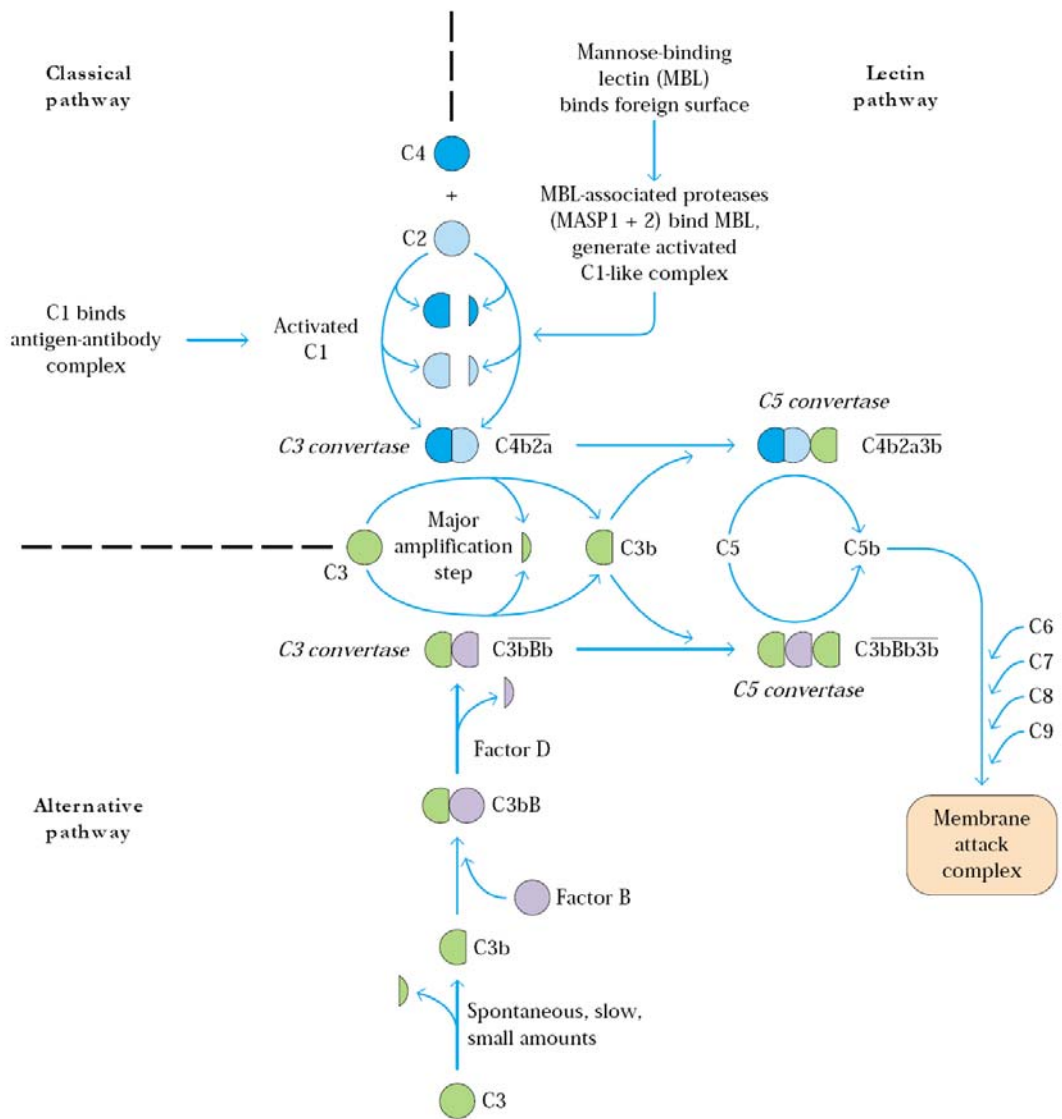


(Mark Larché et al., 2006)

圖 1-4 第一型過敏反應之發生機制。

Fig.1- 4 General mechanism underlying a type I hypersensitive reaction.





(Kuby et al., 2007)

圖 1-5 補體系統活化之路徑。

Fig. 1-5 Overview of the complement activation pathways.

## 二、乳酸菌與免疫調節

克弗爾粒菌元中的微生物菌相主要由乳酸菌及酵母菌構成，而已有許多研究證實，部分乳酸菌株具有活化免疫細胞之能力，可調節免疫細胞分泌細胞激素，進而改善生物體免疫機能。由於生物體中許多免疫細胞都有產生細胞激素的能力或受到細胞激素的調控，亦有許多研究證實，乳酸菌具有促進與調節細胞激素分泌的作用。不同乳酸菌菌株，所引起的免疫反應也不同 (Perdigon et al., 1999)。因此研究大都針對不同細胞及組織觀察細胞激素的種類及分泌量，探討其免疫調節反應。本段落將研究免疫調控常用之細胞及組織，將其分類為周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, MNCs)、抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells, APC) 及次級淋巴組織，整理乳酸菌與免疫調節之相關研究。

### (一) 周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, MNCs)

周邊血液單核球包括 T 細胞、B 細胞與自然殺手細胞等之單核免疫細胞 (圖 1-6)，皆自幹細胞分化而來。

#### 1. T 細胞 (T lymphocytes)

此部分整理之文獻主要以 T 輔助細胞為主，因其功能為分泌細胞激素，因此科學家欲瞭解乳酸菌如何調控細胞激素之分泌，T 輔助細胞即為研究重點。同時 T 輔助細胞分泌之細胞激素的種類，往往決定生物體內之免疫反應傾向 (如偏向 Th1 或 Th2 反應)，亦可由此部分研究結果，判定不同乳酸菌其調節免疫反應之走向。文獻指出餵食 *Lb. casei* 能夠降低小鼠的皮膚發炎反應，主要與調控 CD4<sup>+</sup> T 細胞降低 IFN- $\gamma$  分泌，進一步減少 CD8<sup>+</sup> T 細胞之聚集，同時也降低小鼠血清中之 IgG1 與 IgG2a，以 *Lb. casei* 之細胞壁進行試驗亦有相同效果 (Chapat et al., 2004)。Mohamadzadeh et al. (2006)將 *Lb. Gasseri*、*Lb. Johnsonii* 與 *Lb. Reuteri* 與人類 DC 細胞共同培養，結果顯示此三株菌種能夠顯著提升樹突狀細胞所分泌

的 IL-12 與 IL-18，活化 T 細胞，並且促使 T 細胞之 IFN- $\gamma$  分泌增加，作者推測此三株菌種具有改善過敏的潛力。由人類周邊血液單核球中分離之 T 細胞，與 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 進行共同培養，能夠提升 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 與 IL-10 (Peluso et al., 2007)。

## 2. 調節型 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg cell)

已有動物研究證實，調節型 T 細胞能夠抑制腸道發炎反應 (Giacinto et al., 2005; Korzenik and Podolsky, 2006)；而對於 Th2 趨向之疾病，T 輔助細胞已證實具有重要的調節角色：如改善第一型過敏之花粉熱、異位性皮膚炎等症狀以及 Th2 反應引發之肺部發炎等疾病 (Ling et al., 2004; Stassen et al., 2004)。如前所述，一般認為調節型 T 細胞是以分泌 IL-10 與 TGF- $\beta$ ，進而改善第一型過敏反應的症狀 (Dario et al., 2008)。如 Joetham et al. (2007) 證實調節型 T 細胞能夠和緩過敏性的肺部疾病，即是藉由分泌 IL-10 與 TGF- $\beta$ 。但 T 輔助細胞除了依靠此兩細胞激素的調節路徑之外，亦有文獻指出，在缺乏 IL-10 與 TGF- $\beta$  的情形下，T 輔助細胞仍可存在且具有活性 (Karlsson et al., 2004)，同時作用透過細胞-細胞接觸 (cell-cell contact-dependent mechanism) 的方式進行免疫調節的作用 (Shevach, 2004)。

目前，探討乳酸菌藉由促進調節型 T 細胞之作用的研究尚少，以下整理乳酸菌與調節型 T 細胞之相關研究：小鼠以 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 誘發腸炎，結果顯示餵食 VSL#3 之 8 種混合乳酸菌能夠顯著降低腸道出血之情況，具有保護腸道且降低發炎反應之功能。同時研究指出 VSL#3 乳酸菌之作用機制是經由調節型 T 細胞以分泌 IL-10 與 TGF- $\beta$  進而達到保護之效果 (Giacinto et al., 2005)。而在過敏小鼠測試中，Feleszko et al. (2006) 以白蛋白 (ovalbumin, OVA) 令小鼠產生氣喘反應，餵食 Bb-12 與 LGG 可改善氣喘因子，包括：OVA-specific、嗜酸性白血球浸潤數量以及顯著降低腸繫膜淋巴結 (mesenteric lymph node cell) 之 Th2 細胞激素 (IL-4 與 IL-5)。而餵食 LGG 特別顯著提升腸繫膜淋巴結中分泌 TGF- $\beta$  之調

節型T細胞，同時其細胞之轉錄因子Foxp3之表現亦顯著提升。

### 3. 自然殺手細胞 (natural killer cells, NK cells)

NK 細胞為一群缺乏免疫專一性及記憶性的細胞，為無類別細胞 (null cell)，為不屬於T或B細胞之第三類細胞，負責非特異性免疫系統之一部分。NK 細胞源自骨髓，表面表現CD16、CD25及CD56 抗原，內含顆粒的大型顆粒性淋巴細胞 (large granular lymphocytes, LGLs)，占人體周邊血液單核球之5~10%，主要作用為對抗腫瘤細胞、骨髓移植之排斥作用及使動物體免於病毒感染。NK 細胞與T毒殺細胞之作用機制相似，但NK細胞不具有TCR，無法辨識抗原亦不需要T輔助細胞之輔助，即可辨識病毒感染細胞或腫瘤細胞表面之醣蛋白分子，當NK細胞與標的細胞接觸，可釋放穿孔素 (perforin) 到目標細胞，引發目標細胞之細胞程序性死亡作用。乳酸菌調節NK細胞之相關文獻：Ogawa et al. (2005)以*Lb. casei* ssp. *casei*與dextran共同餵食小鼠後，發現其NK 細胞活性提升；人體試驗中，自願者食用*Lb. casei* ssp. *casei*後，其周邊血液單核球分泌大量IL-12，進而活化NK細胞。*Lb. acidophilus*能夠刺激DC產生大量的IL-12，進而誘導NK細胞分泌IFN- $\gamma$ ，同時成熟NK細胞之表面分子CD25與CD56，並且增強其細胞毒殺作用之活性 (Fink et al., 2007)。

### 4. 周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, MNCs)

免疫試驗中也常以周邊血液單核球作為模式，觀察多種免疫細胞都存在時其相互調節之整體結果。乳酸菌調節周邊血液單核球之相關文獻：Miettinen et al. (1998)以兩株菌種*Lb. rhamnosus* E522與E509與人類周邊血液單核球進行共同培養，結果顯示能夠提升TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6與IL-12之mRNA表現以及蛋白質的分泌。但對於IL-10與IL-4 之分泌則無顯著影響。而*Lb. sakei*與人類周邊血液單核球與菌株共同培養，IL-8, IL-1 $\beta$ 與TNF- $\alpha$ 之mRNA表現顯著提升，其細胞激素分泌量亦顯著增加 (Haller et al., 2000)。而在疾病模式中，Pochard et al. (2002)針對

患有過敏症狀之病患進行試驗，以*Lb. rhamnosus* GG與*Lb. Plantarum*兩株菌與病患之人類周邊血液單核球進行培養，結果顯示兩株菌能夠顯著抑制IL-4與IL-5之分泌，並且提升IL-12 與IFN- $\gamma$ ，改善患者過敏現象。而餵飼*Lb. plantarum* 299v以及對照菌株，結果顯示*S. dublin*及*E. coli*都造成小鼠之單核球 (mononuclear) 大量分泌TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  以及IFN- $\gamma$ ，而餵飼*Lb. plantarum* 299v則此三種細胞激素並無顯著提升，但卻能夠引發單核球與T細胞分泌IL-10，試驗亦證實餵飼*Lb. plantarum* 299v給予潰瘍性結腸炎小鼠，能夠令其提升IL-10 之分泌，進而改善發炎症狀(Pathmakanthan et al., 2004)。

## (二) 抗原呈現細胞 (Antigen-presenting cells, APC)

抗原呈現細胞主要是指巨噬細胞及樹突狀細胞等利用內吞作用(endocytosis)或胞噬作用(phagocytosis)將抗原食入，消化成小分子肽後成為抗原，與class II MHC 結合成 antigen-class II MHC 複合分子。T輔助細胞可辨認並作用於 antigen-class II MHC 複合分子，進一步產生細胞激素調節體液免疫及細胞免疫反應。由於T輔助細胞過度活化將產生自體免疫反應，為了防止其過度活化，T輔助細胞只能辨識由抗原呈現細胞所表現的 antigen-class II MHC 複合分子。而在先天性免疫 (innate immunity) 中，其強大的吞噬能力可用以破壞外來抗原，使抗原成為不具傷害性的物質。同時，如巨噬細胞以樹突狀細胞亦可分泌多種細胞激素以執行先天性免疫反應，因此，以下整理乳酸菌與抗原呈現細胞之相關研究：乳酸菌調節APC之相關文獻：Christensen et al. (2002)將小鼠純化而來之DC與兩菌株*Lb. casei*與*Lb. plantarum* Lb1進行共同培養，經由DC之表面分子CD86之測定得知，兩菌株能夠增進DC成熟，並顯著提升Th1細胞激素分泌；Cyrille et al. (2006)證實*B. breve* C50的上層培養液能夠活化人類的DC (活化表面分子CD40 與CD83)，促進其IL-10的產生同時使IL-12分泌下降，同時作者證實，*B. breve* C50具有調節免疫機能為經由TLR-2路徑以活化DC。而藉由流式細胞儀觀察其細胞表面分子 (CD40、CD83 與CD86)，顯示VSL3能夠促進DC的成熟，增進人類的

DC分泌IL-10，並且經過VSL3活化的DC能夠降低T細胞產生IFN- $\gamma$ ，對於過度發炎反應具有改善的效果(Hart et al., 2004)。而對於巨噬細胞的實驗中：餵飼小鼠 *Lb. acidophilus* 能夠刺激小鼠腸道周圍之巨噬細胞分泌TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 與IL-12 (Perdigon et al., 2002)；Cross et al. (2004)指出添加*Lb. casei* Shirota 與巨噬細胞株 (J774A.1) 進行體外培養，能夠顯著提升巨噬細胞分泌IL-12與TNF- $\alpha$ ，而對於IL-18以及TGF- $\beta$ 則無顯著提升，另外*Lb. casei* Shirota亦無法激活巨噬細胞產生IL-10。另外研究結果亦指出活菌的免疫調節能力顯著高於熱致死的菌株。

### (三) 次級淋巴組織

次級淋巴組織包括了淋巴結、脾臟及黏膜相關淋巴組織 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)。這些組織中富含淋巴細胞，可與抗原作用。

#### 1. 脾臟

脾臟藉由動脈攜帶血液中的淋巴球及抗原進入脾臟的小動脈周圍淋巴鞘 (periarteriolar lymphoid sheath, PALS)中，進而促進B細胞及T細胞的活化。除此之外，B細胞表面表現許多抗原結合受體，即為抗體 (antibody)，抗體為一種醣蛋白，相同B細胞上之抗原結合受體所能結合的抗原皆相同，具有專一性。因此許多抗過敏機能性試驗中，脾臟細胞之活化與抗體產生是為觀察之一大重點。乳酸菌活化脾臟細胞之相關文獻：Matsuzaki et al. (1998) 發現餵食死滅的*Lb. casei* Shirota 於經過過敏原OVA處理之BALB/c公鼠，將脾臟細胞與OVA共同培養，其Th1細胞激素 (IFN- $\gamma$ 、IL-2) 顯著增加，而Th2細胞激素 (IL-4、IL-5、IL-6 與IL-10) 顯著被抑制，且可降低血清中IgE以及抑制脾臟細胞體外與OVA培養時IgE的生成；彭 (2003)則證實，將正常鼠及致敏鼠餵食不同菌株添加之發酵乳，發現正常鼠餵食*Lb. bulgaricus* Lb 發酵乳能顯著促進脾臟細胞IFN- $\gamma$ 分泌。而致敏鼠餵食乳酸菌後則能顯著減少IL-4分泌，可抑制B細胞產生IgE，降低過敏反應發生。

## 2. 腸道淋巴組織

腸道淋巴組織的基本結構，由外到內分別為上皮層 (epithelial)，固有層 (lamina propria)，黏膜底層 (submucosal)，接著則是被平滑肌所圍繞。上皮層內有許多淋巴球細胞，統稱為內上皮淋巴細胞 (intraepithelial lymphocytes, IELs)。固有層內則有淋巴球細胞，包括漿細胞、T輔助細胞、顆粒細胞、巨噬細胞、嗜酸性白血球及肥大細胞等。在黏膜底層可以看到由30~40個淋巴濾泡 (lymphoid follicles) 聚集而成的 Peyer's patch。腸道組織中有一層特殊的運輸細胞—membranous (M) 細胞，它與其他小腸上皮細胞不同，不具有纖毛，但具有袋狀構造 (pocket)，能將B細胞、T細胞及巨噬細胞等容納在內。M細胞藉胞飲作用 (pinocytosis) 主動吸收及運送可溶性抗原與微生物，並將這些抗原處理後呈現給袋狀構造中的淋巴細胞 (Richard et al. 2001)。乳酸菌調節腸道免疫組織之相關文獻：在細胞株的部分，Mccracken et al. (2002) 利用TNF- $\alpha$  誘導HT-29產生IL-8之模式，以*Lb. plantarum* 299v進行共同培養，結果顯示菌株能夠抑制HT-29之IL-8 mRNA之表現，並且確實使IL-8分泌降低，但經由熱致死之菌株則無此效果；Ma et al. (2004)證實*Lb. reuteri*可降低由T84, HT29細胞株中，TNF- $\alpha$ 所誘導產生的IL-8，具有抗發炎的能力，並且將*Lb. reuteri* 與*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 共同培養，結果顯示能夠降低IL-8之分泌。但是以熱抑制或伽瑪射線照射之*Lb. reuteri* 則不具有降低IL-8 之能力，顯示菌體若死亡或其基因變異之後則散失免疫調節機能。而在腸道細胞的部分，*Lb. casei* CRL 431以及*Lb. helveticus* R3892可刺激腸道上皮細胞產生IL-6，而不同菌數對於刺激腸道上皮細胞產生IL-6的程度有所差異；且兩株菌在存活與熱抑制之情況下，對於刺激IL-6生成量亦有不同，在體內試驗中以存活狀態的*Lb. casei* CRL 431可刺激小腸上皮細胞產生較多的IL-6 (Vinderloa et al., 2005)。以OVA致敏的小鼠，若以*Lb. rhamnosus* HN001凍乾菌粉添加於飼糧餵食後，能夠下降IL-4/ IFN- $\gamma$ 與IL-5/ IFN- $\gamma$ 之比例，並且能夠促進IL-12之分泌 (Cross et al., 2002)。

#### (四) 乳酸菌與第一型過敏反應

已有文獻藉由動物試驗探討乳酸菌對改善免疫之效果，動物模式主要有藉由OVA腹腔注射致敏之小鼠，皮膚過敏模式小鼠及過敏性鼻炎大鼠，方法主要於不同時間點餵食乳酸菌且致敏動物。檢測過敏症狀，分析血液中IgE含量及組織中細胞激素分泌情況，但實際乳酸菌作用機制為何，則缺乏實驗證實而尚待釐清。下列文獻為探討乳酸菌與改善過敏之動物試驗：Shida et al. (2002)之試驗以基因改造小鼠進行，其TCR對於OVA異常敏感，試驗1、3、5日以腹腔注射打入*Lb. casei* Shirota，於整體實驗過程四週中每日餵食過敏原OVA，結果顯示先注入乳酸菌之小鼠其血清之IgE與OVA專一性的IgE顯著下降，而脾臟細胞分泌的IL-4與IL-5顯著降低，IL-12與IFN- $\gamma$ 則顯著提升。而系統性之過敏性休克(anaphylactic shock)亦顯著降低，顯示其具有預防過敏之效果。而以*Lb. paracasei* Strain KW3110餵飼BALB/c小鼠15週，其3、6、9、12週以OVA腹腔注射致敏BALB/c小鼠，結果顯示餵食KW3110之小鼠血液中之IgE與OVA專一性IgE顯著降低，並且顯著提升脾臟細胞IL-12，IL-4細胞激素分泌 (Fujiwara et al., 2004)。Wakabayashi et al. (2008)以AD-like symptoms (皮膚過敏模式)小鼠進行試驗，誘發其皮膚過敏起始前，連續餵食21日*Lb. paracasei* KW3110，餵食完成之後連續致敏8週，每週給予一次過敏原刺激。結果顯示KW3110可降低臨床的過敏評分，抑制血清之總IgE含量及降低肥大細胞在耳部之浸潤；脾臟細胞所分泌的IL-4在KW3110組亦顯著降低。在致敏之後七日測試Mesenteric lymph nodes與Submandibular lymph nodes之mRNA，KW3110組別顯著抑制IL-4並且提升IFN- $\gamma$ 之表現。

#### (五) 乳酸菌與氣喘

在人體臨床試驗中，已有文獻證實*Lb. rhamosus* GG對於改善兒童之氣喘症



狀與病毒感染呼吸道之效果 (Hattaka et al., 2001; Karimi et al., 2009), 但其作用之詳細機制仍尚未釐清。因此以下整理動物試驗中, 乳酸菌改善氣喘與呼吸道發炎之症狀之文獻, 進一步探討其機制與改善之因子。下列文獻探討乳酸菌與氣喘之關係: Forsythe et al. (2007)以OVA致敏小鼠並令其吸入OVA以產氣喘之症狀, 餵食*Lb. reuteri* 後可顯著降低氣管中之嗜酸性白血球, 同時降低肺部沖洗液之TNF- $\alpha$ 、IL-5 與 IL-13; Hougee et al. (2010)餵食*B. breve* M-16V與*Lb. plantarum* NumRes8之OVA氣喘小鼠, 其肺部沖洗液之嗜酸性白血球數量顯著減少, 血清中的OVA-specific IgE與IgG1亦顯著下降。同時餵食乳酸菌組別能夠改善氣喘。

#### (六) 乳酸菌之免疫調節物質

乳酸菌屬於革蘭氏陽性菌, 其細胞壁主要由N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)、N-乙醯胞壁酸(N-acetylmuramic acid)所構成的, 為了提供細胞壁的高強度, 菌體必須將這些構築基塊依序串聯在一起 (Meydani and Ha, 2000)。目前已有研究推測乳酸菌的免疫調節機能性可能來自於細胞壁物質, 而其中又以N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯胞壁酸所構成之peptidoglycan (PGN) 以及lipoteichoic acid (LTA) 為目前研究主要探討之物質。

研究顯示PGN與LTA兩者活化免疫細胞之路徑主要透過Toll-like receptor (TLR), TLR為生物體一重要之辨識系統, 其家族龐大, 目前已經發現11種不同TLR; TLR主要參與未引發專一性抗體的先天性免疫反應, 進而誘導後續適應性免疫反應 (adaptive immunity) (Takeda and Akira, 2005)。TLR中不同類型的受體各有負責偵測的對象, 例如TLR-2可辨識革蘭氏陽性菌細胞壁上之成分、TLR-3負責偵測外來的雙股RNA病毒、而TLR-4則負責革蘭氏陰性菌細胞壁上的脂多醣(lipopolysaccharide, LPS), TLR-9則可辨識細菌的CpG DNA。TLR的胞外leucine-rich repeat (LRR) 區域與pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 結合接受刺激後, 由胞內部分Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain進行傳遞。

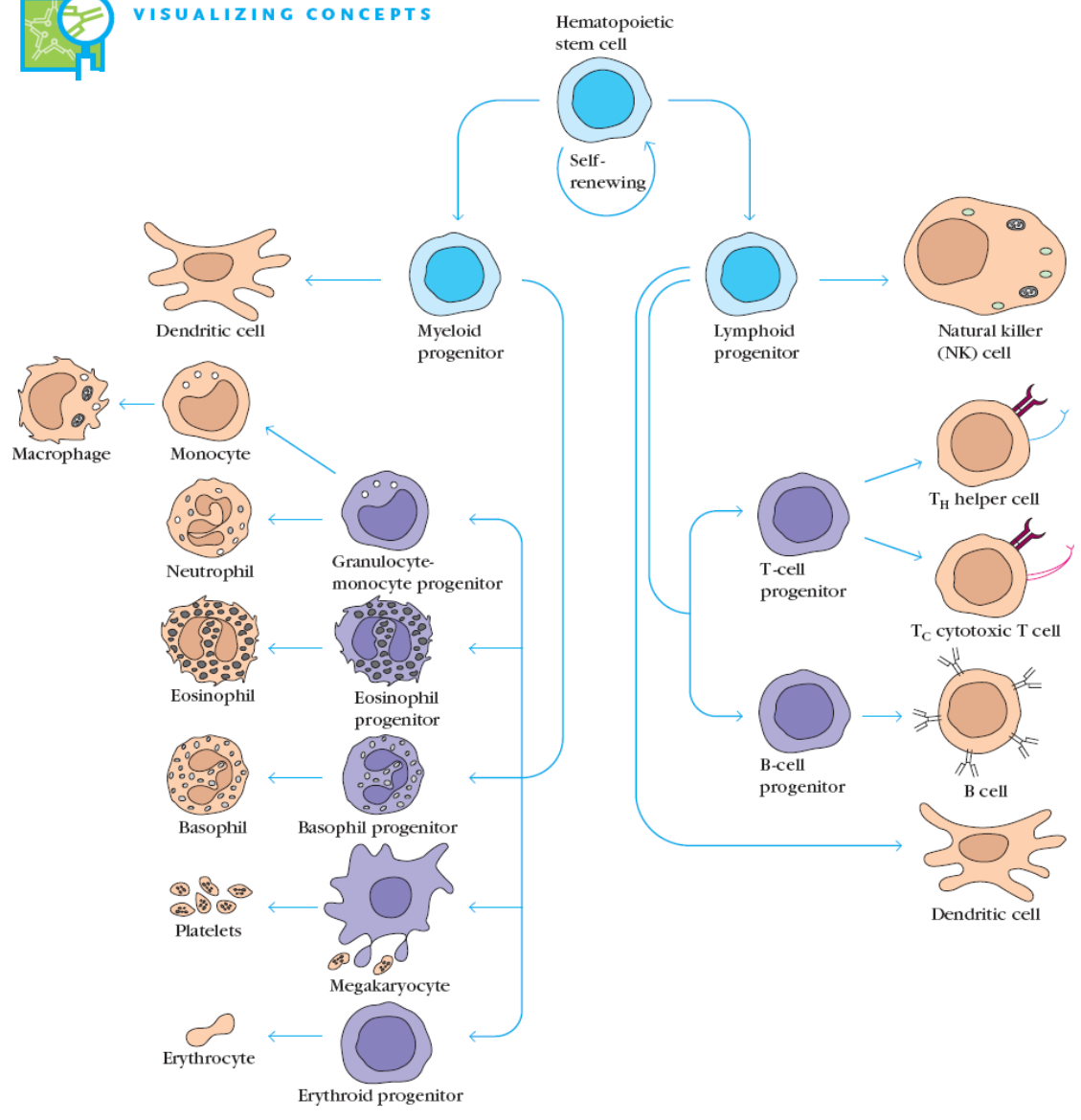
首先轉接分子myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) 會與TLR胞內TIR結合，在細胞質產生一連串的訊息傳導。另外MyD88具有death domain可與IL-1 receptor associated kinase (IRAK) 結合，促使TNF-receptor associated factor 6 (TRAF6) 聚合，進而活化下游的傳導因子，包括MAPK kinase (MKKs)、p38、p50與IkappaB kinase (IKK) complex等。最終為NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) 進入細胞核內，進行基因之調控，進而分泌或合成細胞激素 (Takeda and Akira, 2005)。

乳酸菌免疫調節物質之相關研究多以酵素破壞乳酸菌細胞壁上結構，以觀察其免疫調節能力是否受到影響；或藉由TLR2<sup>-/-</sup>小鼠進行試驗，確認乳酸菌之免疫調節物質。以下為整理乳酸菌細胞壁物質與免疫調節之研究：Sashihara et al. (2006) 將30株乳酸菌分別與以OVA致敏小鼠之脾臟細胞共同培養，結果顯示其中*Lb. gasseri* MEP170413能夠顯著提升IL-12之分泌並且抑制IL-4，進而抑制OVA專一性IgE。進一步以mutanolysin (N-acetylmuramidase) 對細胞壁PGN作用之後，MEP170413刺激細胞激素分泌之能力幾乎消失，顯示其免疫調節能力可能來自於細胞壁上之PGN；Shida et al. (2006)則以 *Lb. casei* Shirota與小鼠腹腔細胞共同培養之後，可顯著提升腹腔細胞的IL-12之分泌。進一步以mutanolysin (50µg/mL) 對Shirota作用兩小時，其誘導細胞激素分泌能力則幾乎消失，菌體之細胞壁完整度也顯著遭到破壞。作者亦完整分離出Shirota的細胞壁與腹腔細胞進行培養，結果顯示其刺激IL-12分泌之能力與Shirota無顯著差異，而細胞質組別則無法刺激IL-12的分泌。在LTA部分的研究中，Matsuguchi et al., (2003) 以小鼠脾臟細胞及RAW264.7細胞株進行篩選，完整的*Lb. casei*能夠顯著提升兩種細胞所分泌的TNF- $\alpha$ ，而由菌體分離出的LTA單獨刺激亦有相同之結果。進一步以無表現TLR的細胞株HEK293T進行轉染，結果顯示LTA與TLR-2質體同時存在時，可促使HEK293T之冷光表現顯著提升；進一步以TLR2<sup>-/-</sup>小鼠的脾臟細胞進行試驗，結果顯示*Lb. casei*無法顯著提升其TNF- $\alpha$ 的分泌。證實*Lb. casei*的免疫調節能力來自

於LTA，並透過免疫細胞上之TLR-2進行活化。

由上述文獻整理得知，乳酸菌與免疫調節的相關研究近年來不斷被探討，不論是各種免疫細胞的活化與調節，或是改善免疫失衡，這些特殊乳酸菌菌株都扮演重要角色。





(Kuby et al., 2007)

圖 1-6、幹細胞分化之免疫細胞。

Fig. 1-6 Immune cells differentiation from hematopoietic stem cell.

### 三、克弗爾發酵乳與免疫調節

克弗爾粒由複合乳酸菌及酵母菌叢所組成，為製造克弗爾發酵乳之天然菌元，其所包含乳酸菌不僅在克弗爾黏稠質地、酸味與機能特性上扮演重要角色，同時也與克弗爾粒形成與增生有密切關聯，而酵母菌則是製品香氣及風味生成之關鍵微生物。近年來克弗爾與免疫調節之機能性逐漸被重視，許多針對克弗爾發酵乳的研究已經被發表，本章節將整理克弗爾發酵乳與免疫調節之相關文獻。

#### (一) 餵食實驗動物以探討克弗爾之功效

Vinderola et al. 團隊以克弗爾發酵乳餵食正常小鼠，觀察調節免疫能力的功效。以下為相關文獻之整理：餵食正常小鼠含活菌及殺菌之克弗爾，皆可提升帶有細胞激素 IL-4 小腸細胞及 IgA 小腸細胞之數量。另外，帶有細胞激素 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-12 之小腸細胞數也顯著增加。顯示餵食正常小鼠克弗爾發酵乳不管是否有活菌存在，皆能夠顯著提升具有 Th1 與 Th2 細胞激素的小腸細胞數量 (Vinderola et al., 2005a)；試驗單以克弗爾沉澱部分餵食正常小鼠，結果顯示帶有 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-12 之小腸細胞數量及 IgA 小腸細胞之數量增加。而在大腸的免疫活化效果顯著低於小腸，推測是因為小腸與大腸兩部位的免疫組織具有差異，或克弗爾沉澱物中活性物質在通過小腸時即受到破壞或吸收，因此克弗爾沈澱物對於大腸的活化效果顯著降低 (Vinderola et al., 2006a)。而餵食小鼠克弗爾發酵乳之上層液與沉澱後，體外培養其腸道巨噬細胞與 Peyer's patch，結果指出在此免疫細胞中，克弗爾之上層液與沈澱均可顯著提升帶有 IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$  與 TNF- $\alpha$  之細胞數量，顯示克弗爾發酵乳對於巨噬細胞與 Peyer's patch 均有活化效果 (Vinderola et al., 2006b)。

#### (二) 藉由致病小鼠探討克弗爾改善免疫疾病之功效

除了正常小鼠外，也有研究針對氣喘、過敏及帶有腫瘤細胞的小鼠探討克弗爾發酵乳改善免疫之功效。Liu et al. (2002) 對小鼠以 Sarcoma 180 腫瘤細胞皮下

注射，令其產生腫瘤，餵食牛奶克弗爾與豆奶克弗爾分別抑制腫瘤生長達到 64.8%與 70.9%。Lee et al. (2006)以氣喘模式小鼠以 OVA 進行致敏，餵食克弗爾後顯著降低支氣管沖洗液之 IgE、IL-4 與 IL-13，並且減少肺臟組織中嗜酸性白血球之聚集，改善小鼠氣喘之臨床症狀。Liu et al. (2006)的研究欲瞭解以豆奶發酵之克弗爾，其產生具有免疫活性物質是否與牛奶發酵之克弗爾有所差異。結果顯示，小鼠以 OVA 進行致敏，餵食牛奶克弗爾與豆奶克弗爾均能顯著降低血液中之 IL-4、IgE 與 IgG2a，兩組克弗爾之間並無顯著差異。

由上述相關研究得知，克弗爾發酵乳確實具有免疫調節功效。但克弗爾中的微生物菌相複雜，目前尚未有相關研究顯示克弗爾免疫調節能力與克弗爾粒中菌株之關係，也從未自克弗爾發酵乳中分離可能有效成分或探討其引發免疫調節之上游機制。



#### 四、本研究室在克弗爾發酵乳之研究成果

##### (一) 新竹克弗爾發酵乳機能性研究

本研究室過去幾年針對四種克弗爾粒中的新竹克弗爾發酵乳，探討其抗致突變性、抗氧化、降低膽固醇、美白肌膚及抗過敏等機能性做一系列的研究。

1. 抗致突變性及抗氧化 (Liu et al., 2005) (Antimutagenic and antioxidant properties of milk kefir and soymilk kefir.) 本研究主要目的是探討牛乳及豆乳克弗爾的抗致突變性及抗氧化性，結果顯示牛乳及豆乳克弗爾皆具有抗致突變性及清除DPPH radicals、抑制linoleic acid peroxidation 等抗氧化能力。
2. 降低膽固醇 (Liu et al., 2006a) (The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora.) 結果顯示以牛乳及豆乳克弗爾給予高膽固醇小鼠，可降低血液中膽固醇含量。
3. 美白肌膚 (Chen et al., 2006) (Study on skin care properties of milk kefir whey.) 本研究主要探討克弗爾對皮膚的功效，包括美白及抗痘，結果顯示克弗爾乳清不但可以抑制黑色素的形成，也會降低*Propionibacterium acne*的生長，預防青春痘。
4. 抗過敏 (Liu et al., 2006) (The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora.) 此試驗欲瞭解以豆奶發酵之克弗爾，其產生具有免疫活性物質是否與牛乳發酵之克弗爾有所差異，結果顯示，小鼠以OVA 進行致敏，餵食牛乳克弗爾與豆奶克弗爾均能顯著降低血液中IgE與IgG2a，且兩組克弗爾之間並無顯著差異。顯示克弗爾粒不論以豆奶或牛奶進行發酵，其產生之活性物質均能有效改善過敏之症狀，惟上游調控機制與活化物質之分離仍須進一步探討。

## (二) 克弗爾粒中之菌株分離鑑別

由於克弗爾粒中的菌株應是克弗爾發酵乳具有機能性的主要關鍵，因此兩年前本研究室開始有系統地利用分子鑑別法，將所有不同來源克弗爾粒中之菌株分離純化並鑑定，以利後續在機能性之研究，且分離的純菌有助於進一步將克弗爾發酵乳商業化。

1. 乳酸菌之純化與鑑別 (Chen et al., 2008) (Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods.) 此試驗乃針對台灣地區四種克弗爾粒，進行乳酸菌之鑑定。以Harrison's disc法自各組克弗爾粒中挑出具代表性之菌株，除了以傳統鑑定方式觀察菌株形態、生化特性外，同時利用變性梯度膠體電泳檢驗技術與DNA定序等分子生物技術以鑑定菌株身分。結果顯示，新竹組中*Lb. kefir*佔53%為最多，其次為 *Lb. kefiranofaciens* (43%)、*Leuconostoc mesenteroides* (3%) 及 *Lactococcus lactis* (1%)；而蒙古組*Lb. kefir*佔58%，其次為*Leuc. mesenteroides* (24%)、*Lb. kefiranofaciens* (16%) 及 *Lc. lactis* (2%)；宜蘭組中只發現三株乳酸菌分別為 *Lb. kefir* (58%)，*Lb. kefiranofaciens* (40%) 及 *Leu. mesenteroides* (2%)。

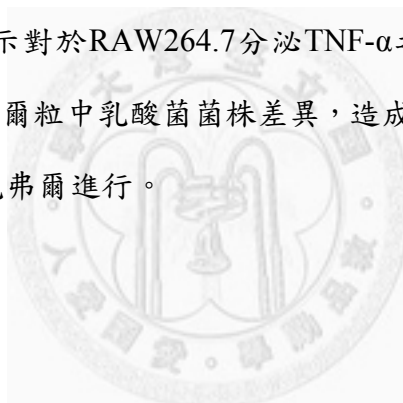
2. 酵母菌之純化與鑑別 (Wang et al., 2008) (Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir grains.) 此試驗乃針對台灣地區二種克弗爾粒進行酵母菌之鑑定，結果顯示，*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis* 及 *Pichia fermentans* 存在於新竹克弗爾粒，其分佈比例分別為76%、22% 及2%；而台北組則發現 *Klu. marxianus*，*S. unisporus*及*P. fermentans* 三種酵母菌，其分布比例分別為58%，11% 及31%。



## 預備實驗

不同來源克弗爾發酵乳及其純化菌株對免疫調節的影響：

由上述相關研究及本實驗室之研究成果，已證實克弗爾發酵乳確實具有活化免疫系統，抑制腫瘤細胞與改善過敏症狀之功效，但研究只針對後續免疫球蛋白之影響與症狀改善進行分析，缺乏上游免疫細胞分泌細胞激素與調控機制之探討，且四種不同來源的克弗爾粒中，目前只針對其中一種克弗爾發酵乳（新竹組）做研究，也從未探討克弗爾粒中菌株對機能性的影響，因此為了瞭解不同來源克弗爾發酵乳及其菌株對免疫調節的影響，我們在預備試驗中探討實驗室所保存之四組克弗爾發酵乳之免疫功效。以本實驗室保存之四組克弗爾與RAW264.7細胞進行共同培養，結果顯示對於RAW264.7分泌TNF- $\alpha$ 之影響以蒙古組最為顯著（圖1-7），可能與四組克弗爾粒中乳酸菌菌株差異，造成免疫調節之表現不同。因此後續試驗將以蒙古組克弗爾進行。



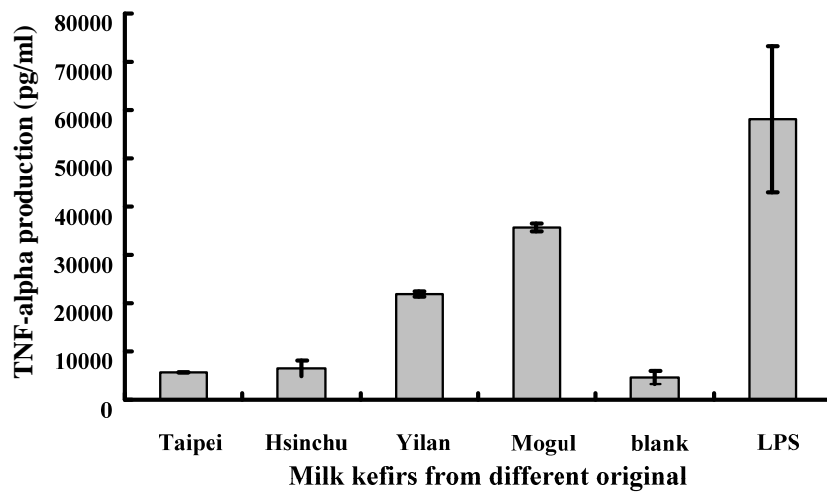


圖1-7 不同來源牛乳克弗爾對刺激RAW264.7之TNF- $\alpha$ 分泌之影響。

Fig. 1-7 Effects of different original kefir grains on TNF- $\alpha$  stimulated by RAW264.7.



## 實驗動機及重要性

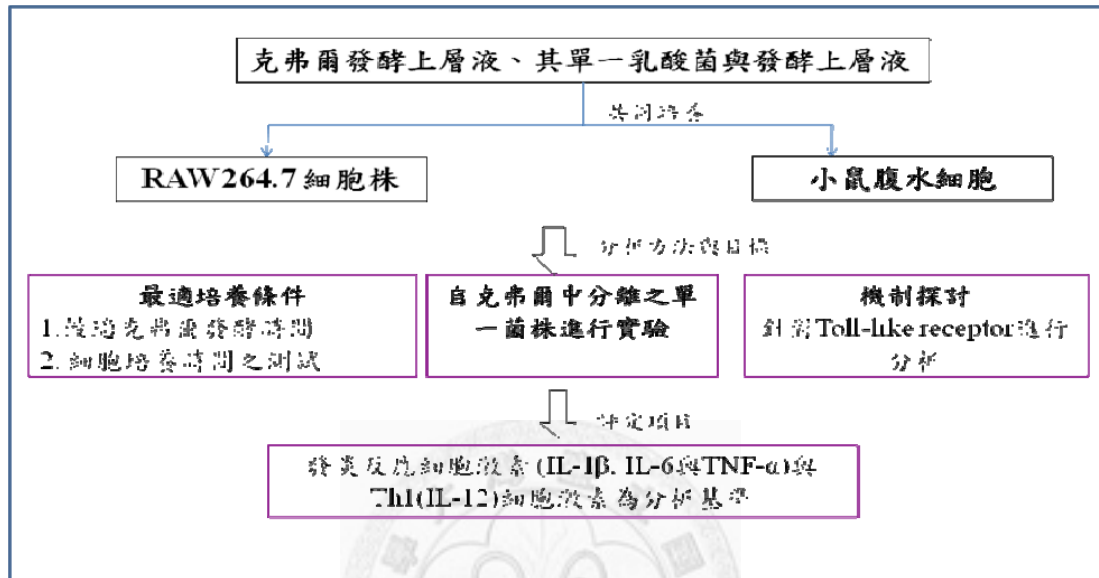
由上述背景介紹與預備實驗結果可得知：

1. 克弗爾發酵乳確實具有免疫調節功效，而克弗爾發酵菌元克弗爾粒中的菌株應是克弗爾發酵乳具有機能性的關鍵，然而目前尚未有相關研究顯示克弗爾免疫調節能力與克弗爾粒中菌株之關係，且研究只侷限於克弗爾對後續免疫球蛋白分泌之影響，缺乏上游免疫細胞分泌細胞激素、調控機制之探討以及症狀改善之分析，也從未自克弗爾發酵乳中分離可能有效成分。
2. 預備試驗中研究四種不同來源的克弗爾發酵乳，只有蒙古組的牛乳克弗爾發酵乳上層液可刺激 RAW264.7 細胞株分泌前發炎反應 (pro-inflammatory cytokines) 的 TNF- $\alpha$  大量分泌，推測其免疫調節效果可能偏向 Th1 反應，且推測其中乳酸菌是為效果來源。
3. 分離自蒙古克弗爾粒之四株乳酸菌 (*Lb. kefiranofaciens*、*Lb. kefir*、*Lb. lactis* 及 *Leu. mesenteroids*) 及其發酵乳上層液鮮少報告探討其機能性。

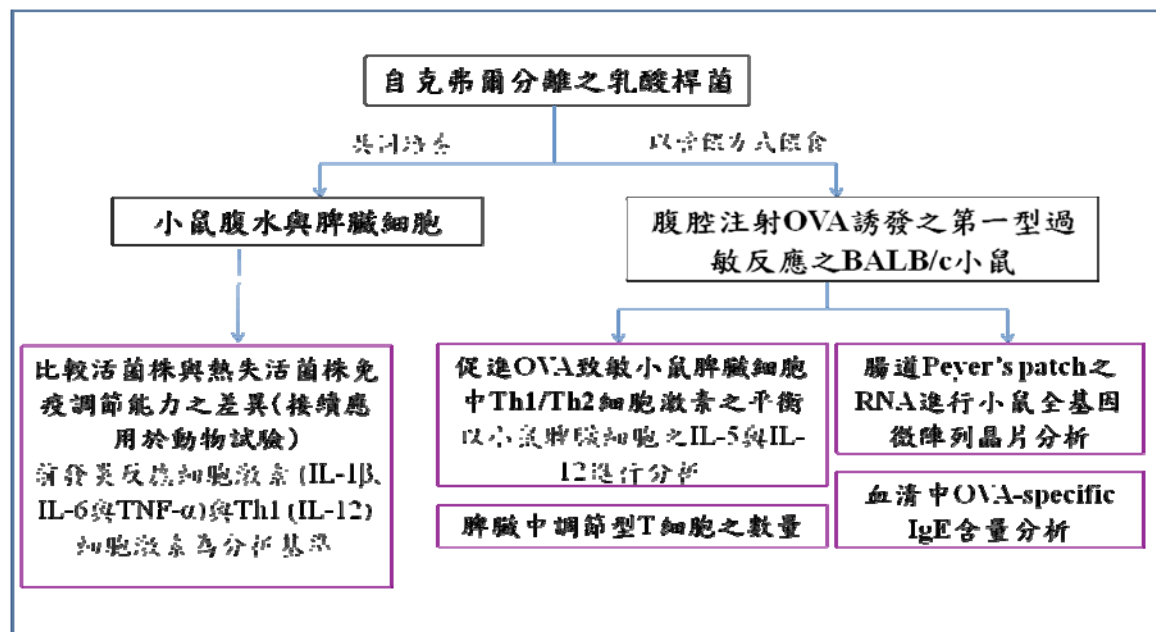
基於以上三點理由，再加上預備試驗結果推測克弗爾與其分離乳酸菌若能顯著提升Th1 細胞激素，則應具有降低Th2反應進而改善過敏反應之潛能，將有助於抗過敏克弗爾發酵乳的開發。因此本研究分為三大部分。第二章先針對蒙古組之克弗爾上層液，以及其中之四株乳酸菌對於巨噬細胞細胞株RAW264.7及小鼠腹水細胞之細胞激素刺激分泌情況進行分析，第三章則依據第一部分的結果為依據，以OVA致敏小鼠做為試驗模式，探討克弗爾粒篩選菌株對於第一型過敏反應之症狀改善並釐清其可能之作用機制；第四章則以氣喘小鼠為模式，評估克弗爾及其篩選菌株對改善氣喘之功效。

## 總試驗流程

第二章、探討克弗爾上層液與自克弗爾粒分離之乳酸菌經由Toll-like receptor刺激巨噬細胞分泌細胞激素之功效

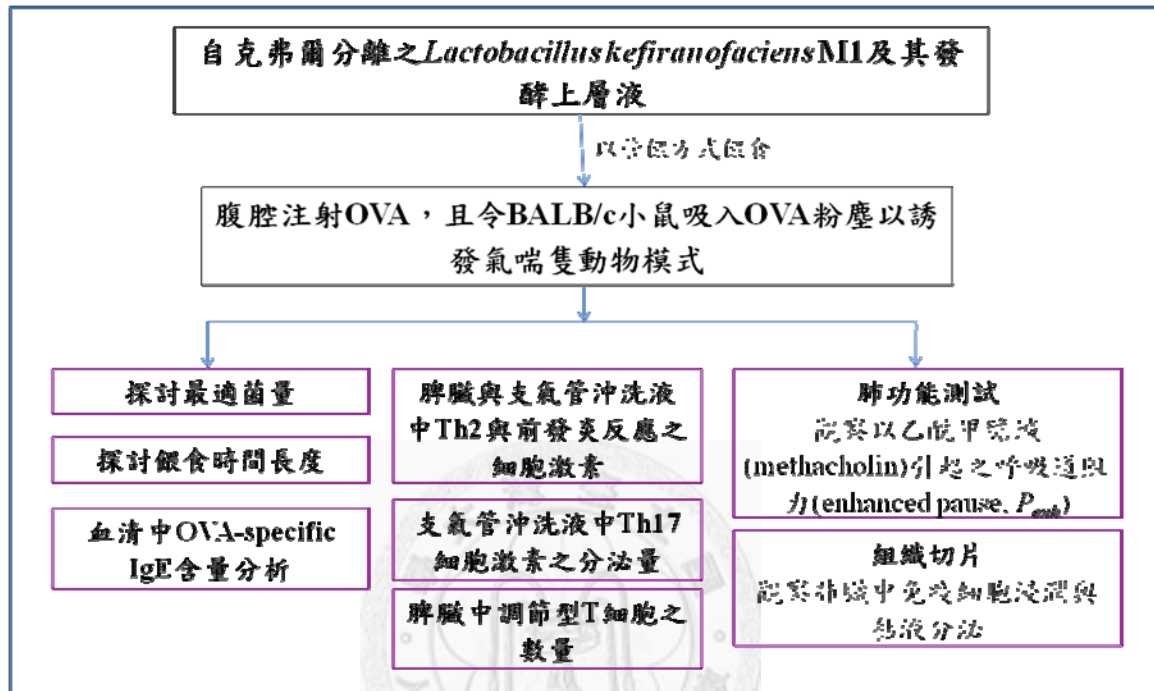


第三章、探討自克弗爾粒分離之乳酸桿菌之抗過敏功效





第四章、探討自克弗爾粒分離之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 與其發酵乳改善過敏性氣喘反應之功效



## 第二章

### 探討克弗爾上層液與自克弗爾粒分離之乳酸菌經由Toll-like receptor刺激巨噬細胞分泌細胞激素之功效

#### 一、摘要

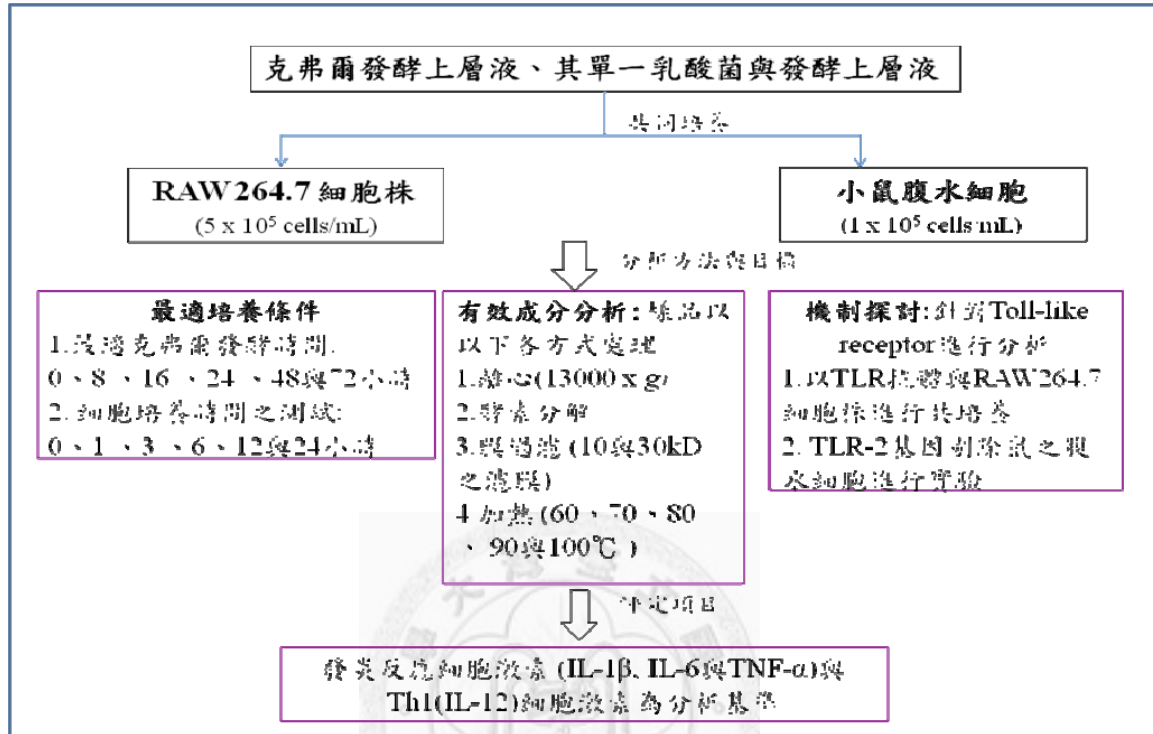
前言與方法：由預備實驗結果得知，蒙古組克弗爾上層液可刺激 RAW264.7 細胞株產生 TNF- $\alpha$ ，其為前發炎反應相關之細胞激素，因此試驗針對克弗爾免疫調節能力與克弗爾粒中單一乳酸菌菌株之關係進行研究，首先以細胞株 RAW264.7 與小鼠巨噬細胞為模式，觀察克弗爾上層液與單一菌株對細胞活化之情形，尋找刺激細胞激素分泌的最佳條件；同時為了釐清發酵上層液中之有效成分，試驗應用離心、酵素分解、膜過濾以及加熱令樣品失活等方法，探討有效成分為何。研究引發免疫調節之上游機制，試驗針對 Toll-like receptor (TLR) 進行分析。

結果：試驗結果顯示，牛乳經克弗爾粒發酵 24 與 48 小時之克弗爾上層液可顯著提昇 RAW264.7 細胞株分泌前發炎反應細胞激素 (TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 IL-1 $\beta$ ) 以及 Th1 細胞激素 (IL-12)；可能的機能性成分為熱穩定性佳(80°C 加熱 30 分鐘仍具有刺激細胞激素之能力) 之大分子胜肽。進一步比較四株自克弗爾粒分離的菌株免疫調節能力，又以 *Lb. kefiranofaciens* M1 及 *Lb. kefir* M2 刺激之細胞激素分泌效果最為顯著，與牛乳克弗爾上層液的分泌量無顯著差異。免疫調節路徑方面，以 TLR-2 抗體針對 RAW264.7 細胞株進行試驗，顯示克弗爾上層液、單一菌株與其發酵上層液所刺激之細胞激素分泌量均顯著下降；進一步以 TLR-2 基因剔除鼠之腹水細胞進行實驗，結果顯示 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於刺激其腹水細胞之 IL-6 分泌顯著下降，證實其免疫調節路徑系經由 TLR-2。

結論：試驗結果證實，牛乳克弗爾上層液、單一乳酸菌及其發酵上層均可促進免疫調節，分泌細胞激素以調節細胞免疫反應，進而促進抗腫瘤以及抗感染之機能性；且由於能夠提升 Th1 細胞激素，亦具有改善第一型過敏反應之潛能。

## 二、材料與方法

### (一) 試驗流程



### (二) 克弗爾樣品之製備

試驗採用四種來源之克弗爾(台北、宜蘭、新竹與蒙古)，以台灣大學農業試驗場之牛乳 (National Taiwan University Dairy Farm, Taipei, Taiwan)進行發酵，在牛乳中加入5%之克弗爾粒(w/v)，以20°C發酵20小時，發酵完成後再將克弗爾粒濾出重複使用，連續活化三次確認克弗爾之活性與穩定性，以利實驗進行，製備克弗爾過程中，所有器皿與用具都以90°C之熱水進行殺菌，減少發酵過程中遭微生物污染的機會。為了釐清克弗爾產生免疫活化物質之最佳發酵時間，試驗接種5% (w/v)之克弗爾粒於牛乳中，分別在20°C發酵8, 16, 24, 48與72小時，發酵完成後將克弗爾以6000 x g離心30分鐘，取上層液之後再以13000 x g離心30分鐘，再以0.22 μm濾膜 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)過濾其上層液，所得之濾液即為試驗中所使用的克弗爾上層液。

### (三) 乳酸菌之菌種來源、培養與製備

*Lb. kefiranofaciens* M1, *Lb. kefir* M2, *Leu. mesenteroids* M3 與 *Lc. lactis* M4 四株乳酸菌皆由本實驗室分離自蒙古組克弗爾菌元 (Chen et al., 2008)。作為對照組之標準菌株 *Lb. kefir* BCRC 14011 與 *Lb. kefiranofaciens* BCRC 16059 則購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan)。以 Lactobacilli MRS 培養液 (Difco Laboratories, Detroit, MI) 活化 lactobacilli，培養於 37°C 培養箱 (Model TC2323, SHEL LAB, Japan)；而 lactococcal 與 leuconostoc 則培養於 30°C 培養箱。活化完成後以 PBS (Amersco, Solon, OH) 溶液進行菌體清洗並將其濃度調整為  $10^7$  CFU/mL，以進行誘導細胞激素分泌之試驗。同時亦以  $10^7$  CFU 之菌數加入 10 mL 牛乳中發酵 48 小時，完成發酵後，以取得克弗爾上層液相同之離心條件與步驟製備樣品。

### (四) 克弗爾與 RAW264.7 細胞株共培養

小鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7, ATCC TIB71) 購於財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，其培養液為 Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO)，並添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) 與 1% 抗生素 (100U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, Sigma)，置於 5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱 (Revco, Santa Fe Springs, CA) 以 37 °C 進行培養。培養 48 至 72 小時使細胞增生之後，以 10 mL PBS 洗去死亡細胞之碎片，去除 PBS 清洗液後加入 10 mL 培養液，以細胞刮杓 (cell scraper 28 cm length, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 將細胞刮下並充分懸浮打散，再以 trypan blue (0.5% Trypan-blue, Invitrogen, Grand Island, NY) 進行細胞數量計算，最終以培養液 (DMEM 中添加 10% 熱失活胎牛血清，血清加熱條件為 56°C 加熱 30 分鐘) 將細胞濃度調整為  $5 \times 10^5$  cells/mL，加入 1 mL 至 24 well 培養盤 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 中備用。待細胞於 37°C 細胞培養箱貼附 2 小時後，分別加入克弗爾上層液、分離菌株與標準菌株發酵上層液各 5  $\mu$ L 以活化 RAW 264.7 細胞株；菌株則以  $10^7$  CFU/mL 之原始濃度加入 5  $\mu$ L，正控制組為 50 ng 脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS, Sigma) 或 20  $\mu$ g pam3CSK4



(Sigma) ， 於 37°C 細胞培養箱培養 24 小時後，將培養液保存於-80°C 待測定細胞激素含量。

#### (五) 克弗爾與小鼠巨噬細胞共培養

實驗以六週齡BALB/c 雌鼠(購於國立台灣大學實驗動物中心, Taipei, Taiwan) 與TLR2 基因剔除鼠 (TLR2<sup>-/-</sup>) (購於國家實驗動物中心, Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan) 進行，以腹腔注射注入2 mL 3% thioglycollate(Gibco, Gaithersburg, MD) (Netea et al., 2005)，使免疫細胞聚集，72小時後將小鼠犧牲，於無菌操作台中以PBS 5 mL注入腹膜內，提起鼠體左右或上下抖動，促使腹腔器官間的免疫細胞均勻的懸浮於PBS中，並以5 mL空針筒抽取腹腔細胞，重複上述步驟兩次，取得8 mL腹水液。腹水以離心機於1500 rpm低速離心10分鐘，捨棄上清液，輕拍細胞沉澱使之分散，加入含10% FBS的RPMI 1640 培養液(Roswell Park Memorial Institute) (HyClone, Logan, UT)，懸浮細胞並培養於24 well培養盤，於37°C細胞培養箱靜置3小時後，洗去懸浮無法貼附的細胞，再加入含10% 熱失活FBS的RPMI 1640培養液將貼附細胞以細胞刮杓刮起，以trypan blue計數細胞數量為 $5 \times 10^6$  cells/mL，取1 mL 細胞懸浮液培養於24 well培養盤，於37°C細胞培養箱培養3小時，令細胞貼附後洗去備用。添加樣品之條件與上述RAW264.7細胞株相同。

#### (六) 細胞激素測定

本試驗以酵素連結免疫吸附法(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)進行。使用小鼠細胞激素測定套組 (mouse cytokine kit, R&D system, Mckinley, MN)測量TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ 與IL-10之濃度。

#### (七) 克弗爾中免疫物質之特性分析

為了釐清克弗爾上層液中具有免疫活化之機能性物質，試驗以加熱、酵素分解與膜過濾方式進行：

1. 加熱處理：樣品分別以 60, 70, 80, 90 與 100 °C 加熱 30 分鐘。
2. 酵素水解：以三種酵素分別對樣品進行水解以推測其特性，以 DNase I (5 U/mL,

Sigma)對樣品於室溫進行反應 20 分鐘；以 proteinase K (0.5 mg/mL, Sigma) 與 trypsin (0.5 mg/mL, Sigma)對樣品於 37 °C 進行水解 20 分鐘。

3. 膜過濾：為推測其中分子量大小，樣品以 YM-30(30 kD)或 YM-10(10 kD)濾膜 (Millipore, Billerica, MA)過濾，過濾後所得之濾液進行後續試驗，同時以 PBS 回溶濾膜上之物質作為對照。

樣品以前述方式處理之後，分別加入 RAW264.7 細胞株之中進行刺激並測定細胞激素分泌情形。

#### (八) Blocking 試驗以確認克弗爾活化之路徑

試驗為證實克弗爾發酵上層液所活化之路徑，試驗先以 anti-TLR-2 與 TLR-4 抗體 (eBioscience, San Diego, CA)與  $5 \times 10^5$  cells/mL RAW264.7 細胞株於 37°C 細胞培養箱進行共培養 2 小時，以結合其 TLR-2 與 TLR-4 受體，置換新細胞培養液之後加入克弗爾上層液 5  $\mu$ L 以活化 RAW264.7 細胞株，於 37°C 細胞培養箱培養 24 小時後，取培養液保存於 -80°C 中測定細胞激素含量，以細胞激素之分泌是否遭到抑制，判定細胞株接受樣品活化的受器是否遭到抗體封鎖。控制組為 50 ng LPS (TLR-4 ligand, eBioscience) 與 20  $\mu$ g pam3CSK4 (TLR-4 ligand, eBioscience)。

#### (九) 統計分析

以 SAS 套裝軟體 (SAS 9.0, SAS institute, Cary, NC)進行變方分析，再以鄧肯式多變域測定法(Duncan's New Multiple Range Test)測定各試驗值間之顯著差異，所有試驗皆進行三重複測定後繪圖。

### 三、結果

#### (一) 克弗爾上層液對於 RAW264.7 細胞株分泌細胞激素之影響

試驗首先以 RAW264.7 細胞株進行試驗，以不同發酵時間之克弗爾上層液與細胞株共同培養，以瞭解細胞激素分泌情形(IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 與 TNF- $\alpha$ )。結果顯示隨著發酵時間的增加，IL-6 與 TNF- $\alpha$  之分泌亦顯著提昇，而發酵 48 與 72 小時之組別則無顯著差異(圖 2-1)。而此共同培養時間(24 小時)卻無法測得 IL-1 $\beta$  與 IL-12 之分泌，因此試驗接著以發酵 48 小時之克弗爾上層液與細胞株進行不同時間之共培養。結果顯示，共同培養 6 小時之時間點，IL-1 $\beta$  與 IL-12 之分泌顯著高於其餘時間點(圖 2-2)。由上述結果可知，克弗爾最佳發酵時間為 48 小時；而與 RAW264.7 之細胞株最佳共同培養時間，對於 IL-6 與 TNF- $\alpha$  之分泌為 24 小時，而對於 IL-1 $\beta$  與 IL-12 之分泌則為 6 小時。

#### (二) 克弗爾中乳酸菌與其發酵乳上層液對於 RAW264.7 細胞株分泌細胞激素之影響

為了確認克弗爾中的細胞激素之活化能力來源，此試驗由克弗爾粒中分離之四株乳酸菌(*Lb. kefiranofaciens* M1, *Lb. kefir* M2, *Leu. mesenteroides* M3 與 *Lc. lactis* M4)，測試其菌體與發酵乳上層液對於 RAW264.7 細胞株誘導細胞激素分泌之能力，(以 *Lb. kefiranofaciens* M1 及 *Lb. kefir* M2 之標準菌株作為對照，並以克弗爾上層液為正控制組)。圖 2-3 為菌體的結果，TNF- $\alpha$  的部份，結果顯示除了標準菌株 *Lb. kefiranofaciens* 之誘導能力顯著低於克弗爾上層液之外，其餘自行分離菌株與克弗爾上層液並無顯著差異；所有分離菌株與標準菌株刺激 IL-1 $\beta$  與 IL-12 之分泌則顯著低於克弗爾上層液；而 IL-6 的部份，只有分離之 *Lb. kefiranofaciens* M1 能夠顯著提昇其分泌，並與克弗爾對照組無顯著差異。圖 2-4 為分離菌株與標準菌株發酵乳上層液與 RAW264.7 細胞株共同培養之結果，*Lb. kefiranofaciens* M1 之發酵乳上層液顯著提昇四種細胞激素分泌，並與克弗爾上層

液無顯著差異。綜觀而言，菌株發酵乳上層液(圖 2-4)對於 IL-1 $\beta$  與 IL-6 之活化顯著高於菌體本身(圖 2-3)。



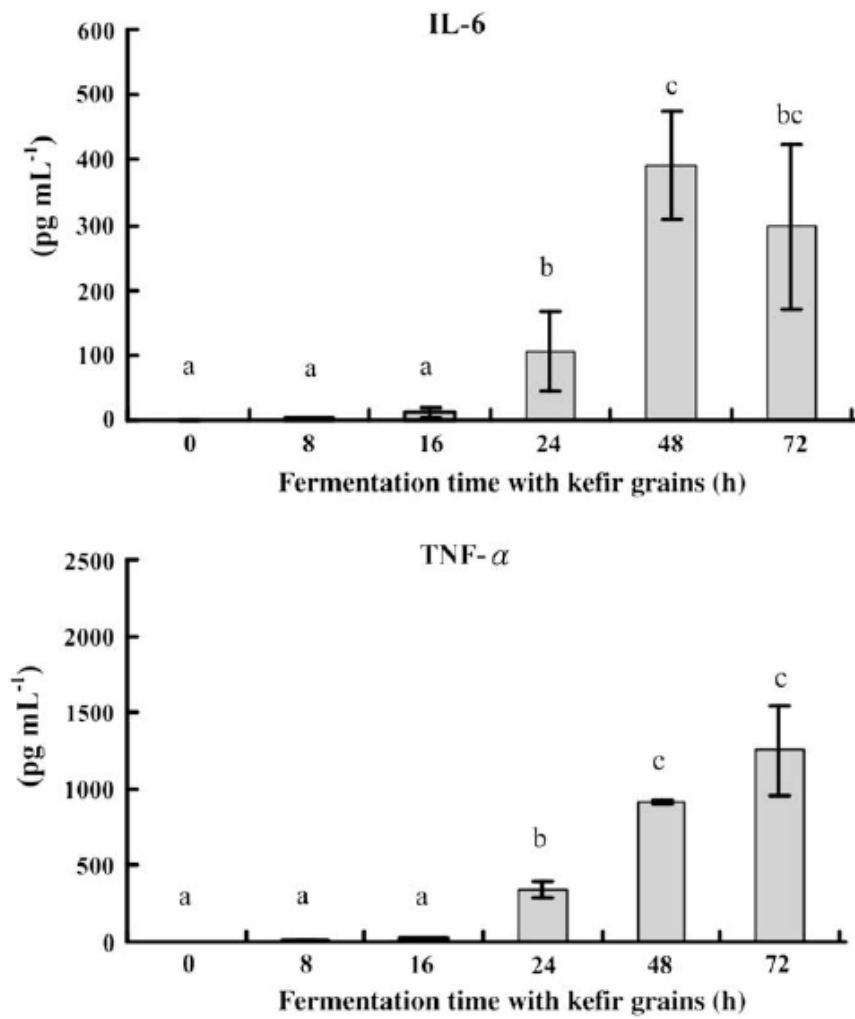


圖 2-1 不同發酵時間之克弗爾上層液對 RAW2647 細胞株細胞激素分泌之影響。

Fig. 2-1 Effects of different fermentation time of kefir supernatants on cytokines production by RAW264.7.

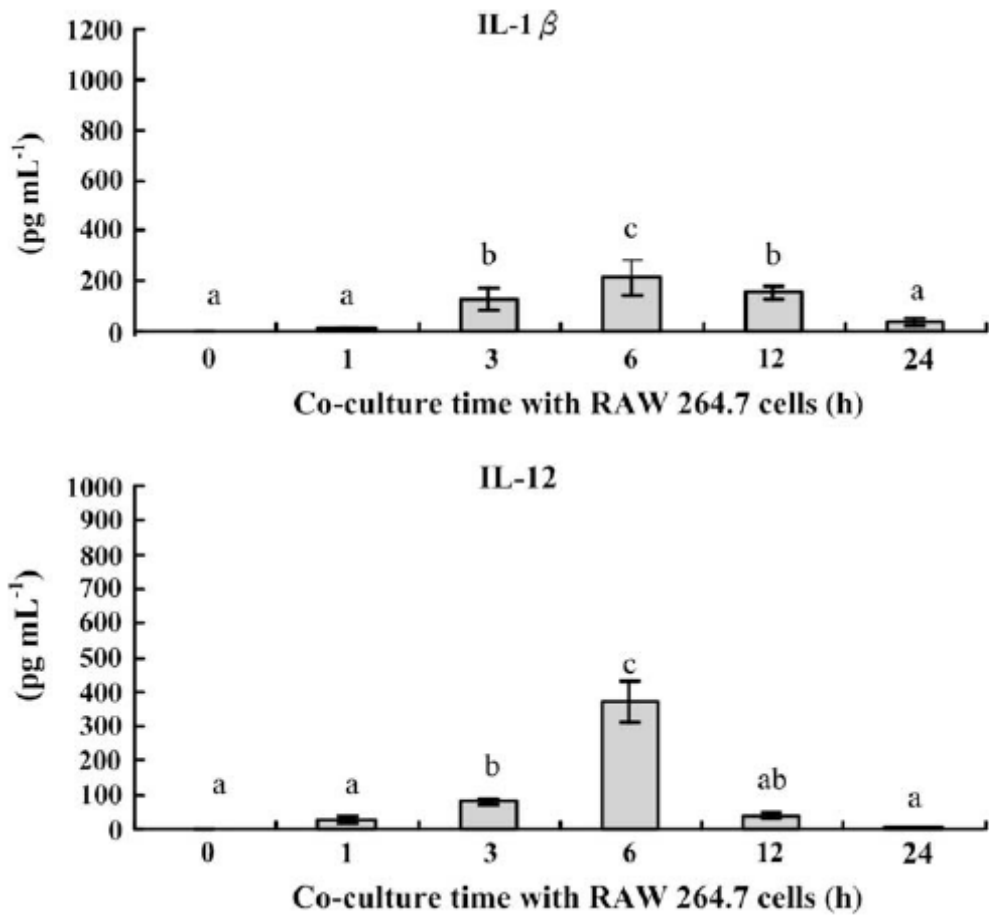


圖 2-2 克弗爾上層液與 RAW264.7 細胞株之不同共培養時間對於細胞激素分泌之影響。

Fig. 2-2 Effects of different co-culture time of kefir supernatants with RAW264.7 on cytokines production by RAW264.7.

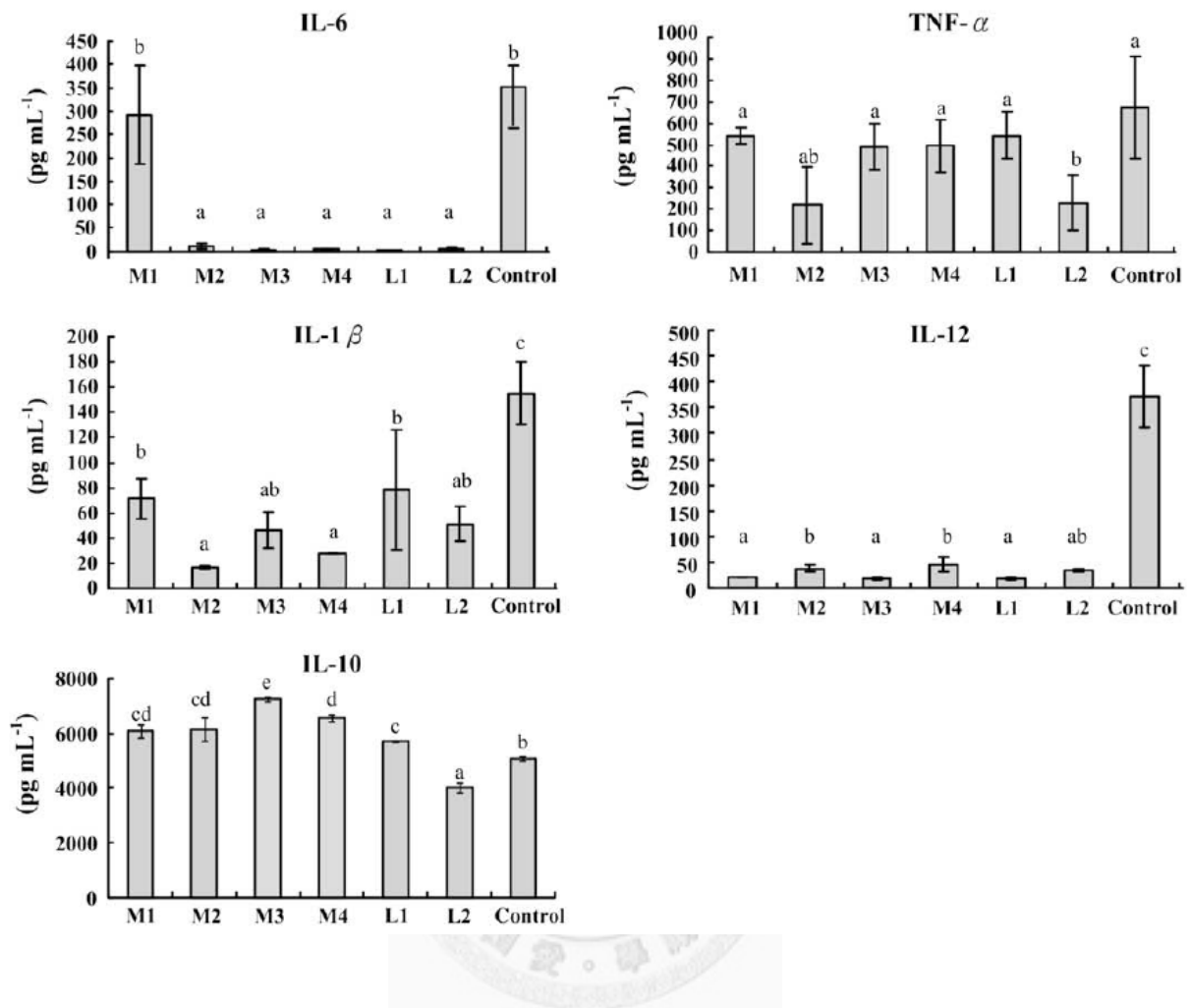


圖 2-3 分離自克弗爾之菌株其菌體對於 RAW264.7 細胞株分泌細胞激素之影響。

Fig. 2-3 Effects of individual bacterial strains isolated from kefir grains on cytokines secretion by RAW264.7. M1, M2, M3, M4, L1, and L2 in the Fig. indicate *Lb. kefiranofaciens* M1, *Lb. kefir* M2, *Leu. mesenteroides* M3, *Lc. lactis* M4, *Lb. kefir* BCRC14011, and *Lb. kefiranofaciens* BCRC16059. Control: kefir supernatant.

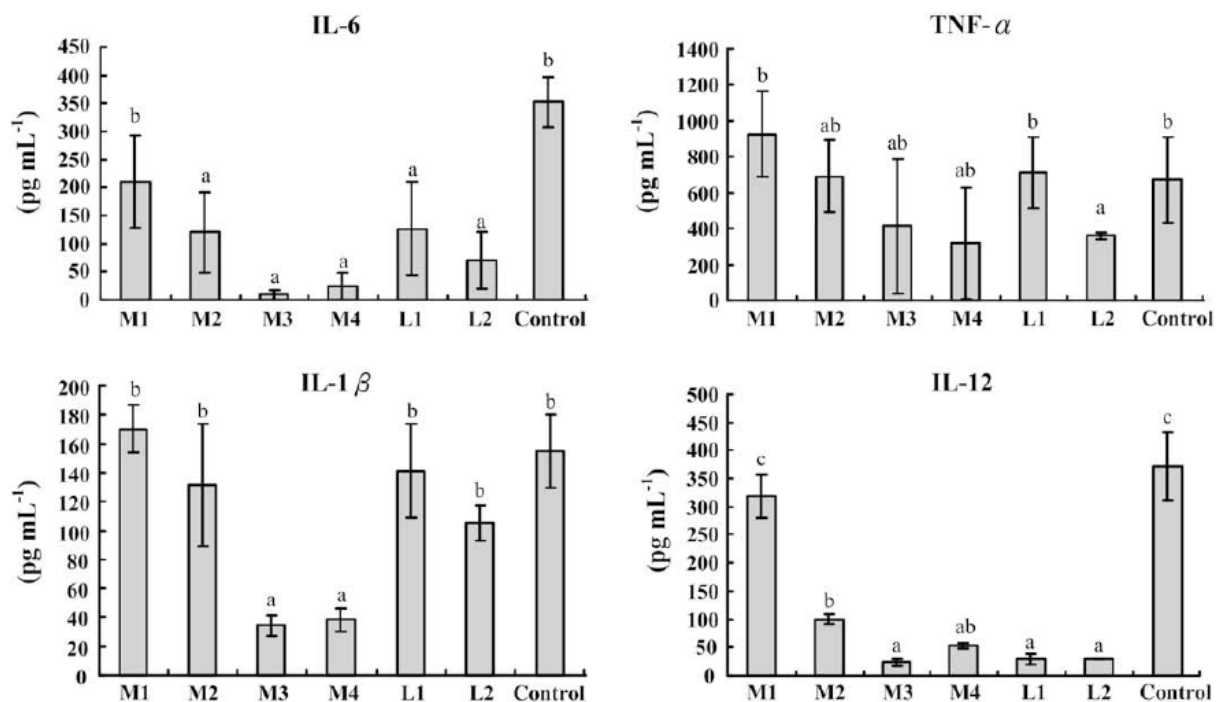


圖 2-4 自克弗爾粒分離之菌株其發酵乳上層液對 RAW264.7 細胞株分泌細胞激素之影響。

Fig. 2-4 Effects of supernatants from individual bacterial strains isolated from kefir grains on cytokines secretion by RAW264.7. M1, M2, M3, M4, L1, and L2 in the Fig. indicate *Lb. kefiranofaciens* M1, *Lb. kefir* M2, *Leu. mesenteroides* M3, *Lc. lactis* M4, *Lb. kefir* BCRC14011, and *Lb. kefiranofaciens* BCRC16059. Control: kefir supernatant.



由上述細胞株之試驗可以得知，*Lb. kefiranofaciens* M1 之細胞激素誘導能力顯著高於其餘分離菌株以及標準菌株，因此試驗進一步以小鼠巨噬細胞與 *Lb. kefiranofaciens* M1 之菌體以及發酵乳上層液進行共培養(圖 2-5)，結果顯示不論是菌體或是發酵上層液俱能顯著提昇小鼠巨噬細胞分泌細胞激素(IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 與 TNF- $\alpha$ )，但與 RAW264.7 細胞株之結果相反，在小鼠巨噬細胞中，菌體活化細胞分泌細胞激素之能力顯著高於發酵乳上層液。

### (三) 探討克弗爾中具有機能性成分

為了瞭解克弗爾上層液中具有免疫調節之機能性物質之特性，此部分試驗首先探討其耐熱程度，將克弗爾發酵上層液以不同溫度處理後，再與 RAW264.7 細胞株進行共培養(圖 2-6)，結果顯示對樣品以 80 $^{\circ}$ C 加熱持續 30 分鐘後，與未加熱處理之克弗爾上層液相較之下，IL-6 與 IL-12 之分泌顯著下降；然而 IL-1 $\beta$  之分泌，樣品之加熱溫度必須高於 90 $^{\circ}$ C，其分泌量才顯著下降；TNF- $\alpha$  之分泌在各種溫度處理下與未加熱處理的克弗爾上層液均無顯著差異。

試驗亦以酵素分解方式，將樣品與 proteinase K，DNase 以及 trypsin 進行共培養，結果顯示經過 proteinase K 之作用後，其細胞激素活化之能力顯著降低，而經過 DNase 以及 trypsin 之作用之樣品則仍保有刺激細胞激素分泌之能力。而與膜過濾之方式推測機能性物質之分子量，結果顯示當樣品透過 10 與 30kD 濾膜後，其細胞激素誘導能力則完全喪失。

此外，為避免克弗爾上層液中含有革蘭氏陽性菌細胞壁上的成分(peptidoglycans)，而誘導細胞激素分泌，試驗亦以套組檢測，結果顯示克弗爾上層液中並未含有 peptidoglycans。

### (四) 探討免疫活化之受器

為探討克弗爾發酵上層液與其中單一菌種之免疫活化路徑，試驗首先以 anti-TLR2 與 anti-TLR4 mAb 針對 RAW264.7 細胞株進行反應，再以樣品對細胞株進行共培養(並以 LPS : TLR4 ligand, pam3CSK4 : TLR2 ligand 作為對照組)，結果證實，經過 anti-TLR2 mAb 處理之細胞株，其對於克弗爾上層液之刺激，

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 與 IL-12 之分泌顯著降低 (圖 2-7), 而以 anti-TLR4 mAb 處理之組別, 經過克弗爾發酵上層液共培養後, 產生之此四種細胞激素之分泌則無顯著改變, 顯示克弗爾上層液乃藉由 TLR2, 而非透過 TLR4 引發細胞激素分泌。

更進一步以 *Lb. kefiranofaciens* M1 以及 *Lb. kefiri* M2 之菌體與發酵乳上層液進行分析, 試驗以 TLR2<sup>-/-</sup>的小鼠巨噬細胞與樣品共同培養, 觀察 IL-6 分泌之情形。結果顯示, *Lb. kefiranofaciens* M1 以及 *Lb. kefiri* M2 的菌體刺激之 TLR2<sup>-/-</sup>的小鼠巨噬細胞, 所產生的 IL-6 顯著低於 wild type (正常小鼠)之小鼠巨噬細胞 (圖 2-8), 顯示其免疫活化路徑經由 TLR2; 而 *Lb. kefiranofaciens* M1 發酵乳上層液的部分則顯示 TLR2<sup>-/-</sup>之小鼠巨噬細胞分泌之 IL-6 亦顯著低於 wild type 之組別, 而 *Lb. kefiri* M2 發酵乳上層液在兩組之間之 IL-6 則無顯著差異。



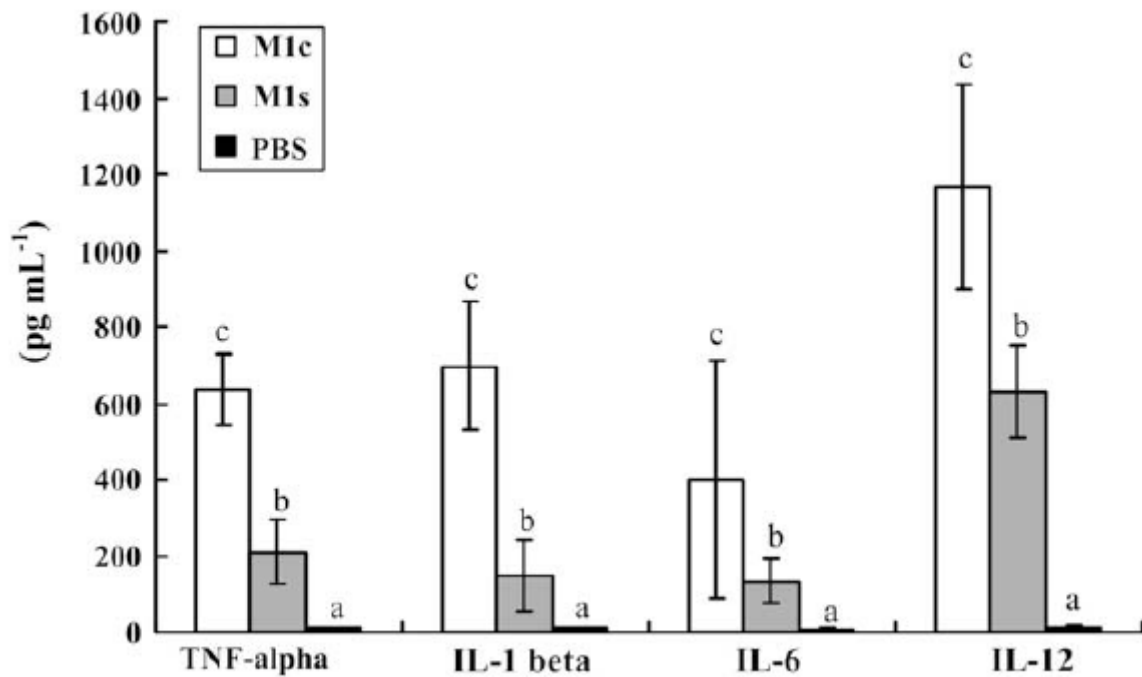


圖 2-5 *Lb. kefiranofaciens* M1 菌體 (M1c) 與其發酵乳上層液(M1s)對小鼠巨噬細胞分泌細胞激素之影響。

Fig. 2-5 Effects of *Lb. kefiranofaciens* M1 (M1c) and its supernatant (M1s) on cytokines secretion by murine peritoneal macrophages.

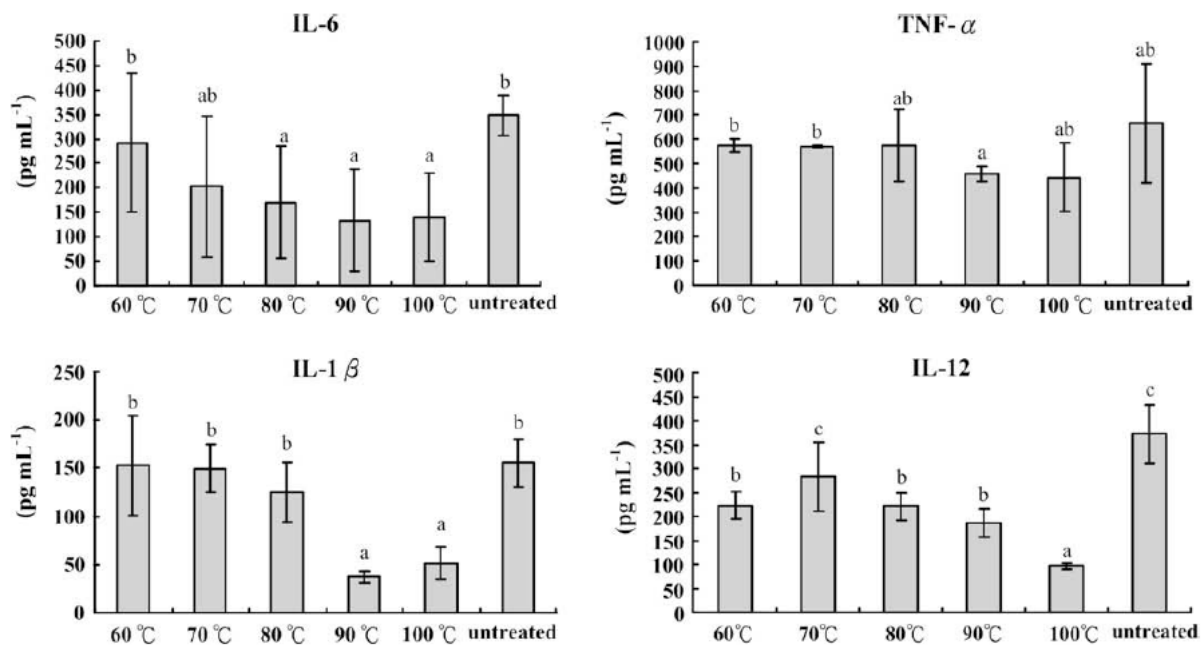


圖 2-6 不同加熱溫度對克弗爾上層液於RAW264.7細胞株細胞激素分泌之影響。

Fig. 2-6 Effects of heat treatment of kefir supernatants on cytokines production by RAW.264.7.

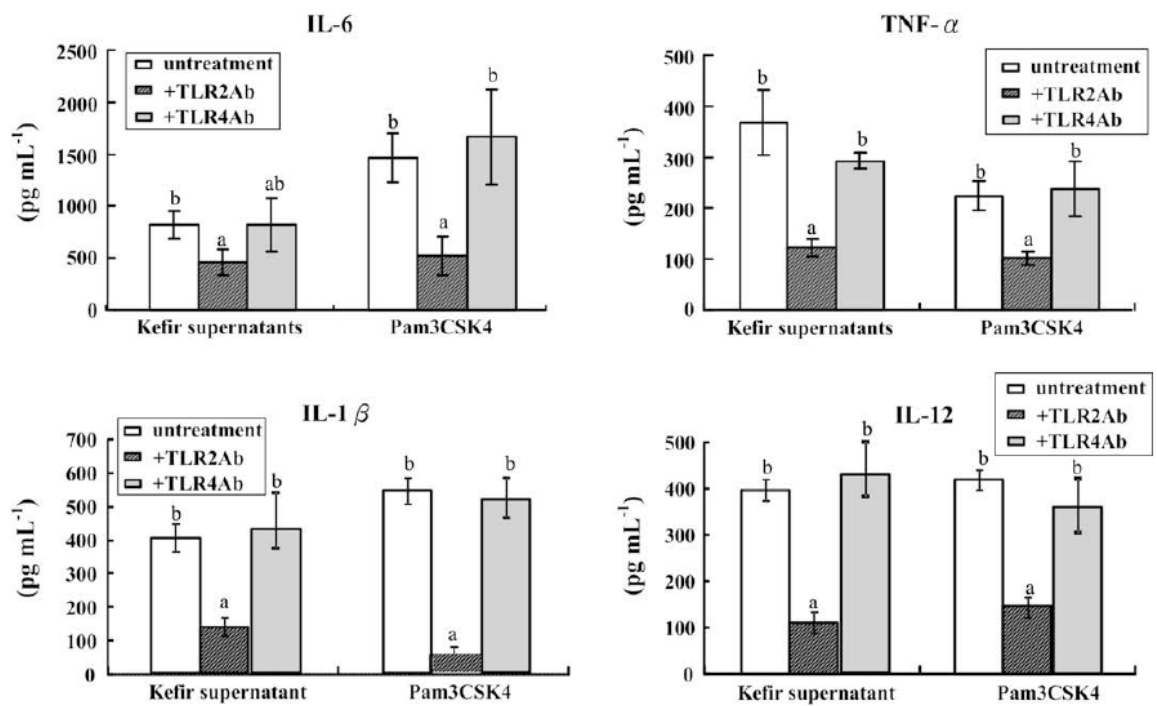


圖 2-7 藉由 anti-TLR2 與 anti-TLR4 mAb 與 RAW264.7 細胞株進行反應，以確認克弗爾上層液之活化受體。

Fig. 2-7 Characterization of the target receptor of the kefir supernatant by using anti-TLR2 and anti-TLR4 mAb to block RAW264.7 with pam3CSK4 (ligand of TLR2) as the control groups.

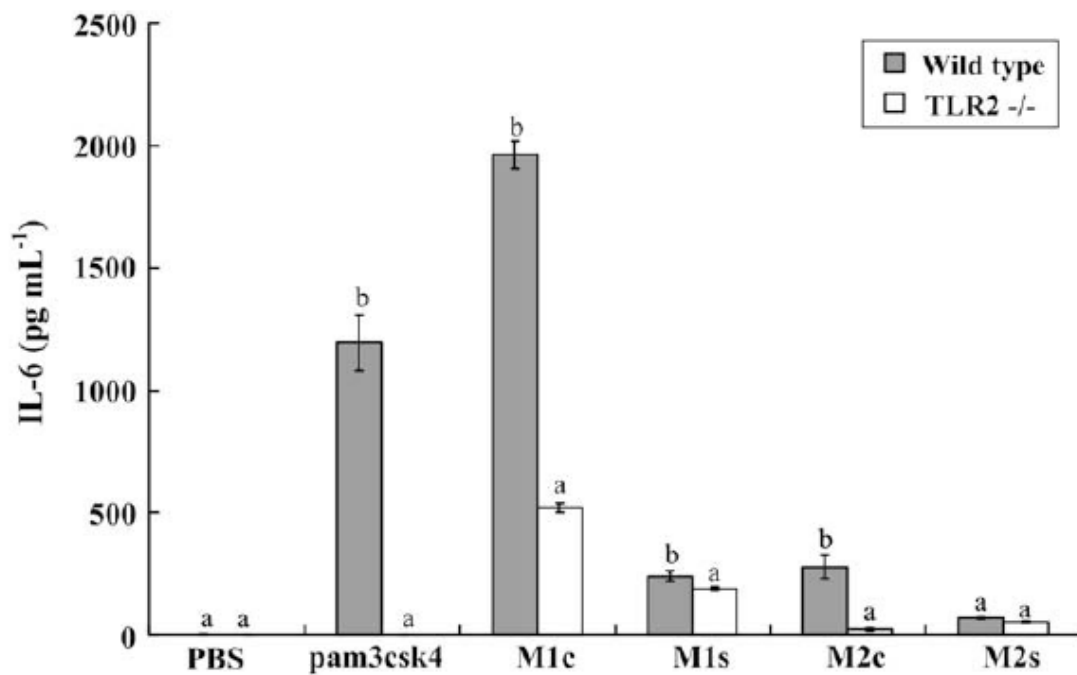


圖 2-8 使用 TLR2<sup>-/-</sup>小鼠巨噬細胞探討分離自克弗爾粒乳酸菌之活化受體。

Fig. 2-8 Characterization of the target receptor of LAB isolated from kefir grains and their supernatant using TLR2<sup>-/-</sup> murine peritoneal macrophages with pam3CSK4 (ligand of TLR2) as the positive control group and PBS as the negative control. M1c and M2c in the Fig. indicate *Lb. kefiranofaciens* M1, *Lb. kefiri* M2. M1s and M2s indicate their supernatants.

#### 四、討論

由本試驗結果可得知克弗爾發酵上層液可誘發 RAW264.7 細胞株分泌前發炎反應細胞激素(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  與 IL-6)與 Th1 細胞激素(IL-12) (圖 2-1 與 2-2), 發炎反應相關的細胞激素可活化吞噬細胞以清除外來病原菌, 在腸道黏膜系統中, 此發炎反應為維持免疫平衡之重要角色 (Monteleone et al., 2002); 而 Th1 的細胞激素則可抑制由特定抗原所引發的 Th2 反應, 以及抑制特定抗原所引起的 IgE 分泌 (Meydani and Ha, 2000)。由此觀點可知, 克弗爾上層液可促進細胞性免疫反應, 對抗腫瘤細胞與胞內感染的病原菌入侵。Vinderola et al (2006b) 餵食正常小鼠克弗爾上層液, 結果顯示可活化小鼠巨噬細胞分泌前發炎反應之細胞激素, 包括 TNF- $\alpha$  與 IL-6, 但 IL-1 $\alpha$  則無顯著分泌。雖然 IL-1 $\alpha$  與 IL-1 $\beta$  其性質與功能相近, 參與發炎反應, 兩者均可由巨噬細胞、單核球與樹突狀細胞所產生, 但不同來源與操作過程不同, 導致克弗爾中之微生物組成有所差異, 亦可能引起不同的免疫反應(Farnworth and Mainville, 2003; Witthuhn et al., 2004); 而生物體中不同組織或器官中免疫細胞, 其受到刺激後所產生的細胞激素也有所差異 (Vinderola et al., 2006b)。有趣的是, 克弗爾的發酵時間必須高於 24 小時, 所得的克弗爾上層液才可顯著誘導前發炎反應細胞激素產生 (圖 2-1), Witthuhn et al. (2005)報告指出克弗爾在不同的發酵時期, 其微生物菌相與代謝產物都會有所差異, 或許是此原因, 特定發酵時間點所得到的克弗爾上層液才具有活化細胞激素分泌的效果。

克弗爾上層液與細胞共培養 24 小時, 可測得最高量的 TNF- $\alpha$  與 IL-6 (圖 2-1), 然而最佳分泌量的 IL-12 與 IL-1 $\beta$  則是 6 小時的共培養(圖 2-2)。推測原因為 IL-12 為 T 細胞早期調控的細胞激素, 其可將 naïve T 細胞導向 Th1 細胞, Th1 細胞可分泌 IFN- $\gamma$  活化吞噬細胞與自然殺手細胞。IL-1 $\beta$  則為發炎反應中重要的參與者 (Dinarello, 1978; Gröne et al., 1998), van Damme et al. (1987)研究指出 IL-1 $\beta$  可刺激 IL-6 之分泌, 亦顯示其為較早分泌的細胞激素。綜合上述, RAW264.7 細胞株所分泌的細胞激素中, IL-12 與 IL-1 $\beta$  為早期產生的種類, 而細胞激素的 half life 非常短暫 (Maimone et al., 1991), 因此實驗必須以較短的共培養時間, 搜集細胞培養液才可測得 IL-12 與 IL-1 $\beta$ 。此外尚有一原因, 測定 IL-10 之最佳共培

養時間則為 24 小時 (圖 2-3)，IL-10 可抑制過度表現的前發炎反應細胞激素，包括 IL-1 $\beta$  (Trittibach et al., 2008)，因此其當 IL-1 $\beta$  於短時間內大量表現時，可能令細胞產生 IL-10 進行抑制。IL-10 近年來被歸類為調節型細胞激素，具有抗過敏與抗發炎之功效 (Giacinto et al., 2005; Korzenik and Podolsky, 2006)。早期即有研究發現平衡的細胞激素分泌可改善體內的過度發炎反應 (Opal et al., 1998)；Hidemura et al. (2003) 則發現隨著 IL-10 濃度的提高，可抑制由多種前發炎反應細胞激素所引發的發炎反應。

目前研究指出，革蘭氏陽性菌的乳酸菌為免疫調節機能性中的重要菌種，因此本研究接續探討克弗爾中乳酸菌的細胞激素刺激能力。自克弗爾粒分離的四株乳酸菌中，誘導 RAW264.7 細胞株產生 TNF- $\alpha$  的能力與克弗爾上層液並無顯著差異，TNF- $\alpha$  為發炎反應中重要的細胞激素，其功能包括趨化巨噬細胞的聚集且令其附著於內皮細胞，並且吸引各種免疫細胞進入發炎部位 (Vinderola et al., 2006a)。相對於 TNF- $\alpha$ ，IL-6 則只有分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1 可刺激巨噬細胞株大量分泌(圖 2-3)，其他研究中也在體內與體外試驗中證實，活菌狀態的 *Lb. casei* CRL 431 與 *Lb. helveticus* R389 可活化腸道上皮細胞分泌 IL-6 (Vinderola et al., 2005)。前發炎反應中，IL-6 亦扮演重要角色，許多發炎部位的免疫細胞與上皮細胞均會分泌 IL-6 (Ng et al., 2003)。IL-6 所涉及的生理機能相當多元，除了參與前發炎反應之外，其為正常 neoplastic 細胞的生長因子、參與腸道免疫系統吞噬病原菌、參與 B 細胞之分化以及幫助抗體的產生 (Goodrich & McGee, 1999)。由上述可知，*Lb. kefiranofaciens* M1 可活化巨噬細胞，令其分泌 TNF- $\alpha$  與 IL-6，對抗外來病原菌入侵，同時於生物體正常狀態下，輔助 B 細胞分化為漿細胞 (plasmocytes)。

試驗結果進一步發現，克弗爾分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1 與標準菌株 *Lb. kefiranofaciens* BCRC16059 所活化的 IL-6 分泌量有所差異，此結果證實了不同來源的乳酸菌，儘管其屬名與種名相同，但由於來源與培養方式之差異，分離之菌株(strain)不同時，其免疫調節之機能性即有所差異。Cross (2002) 報告亦指出乳酸菌活化宿主的免疫反應，需要其特定菌株才可達到不同需求，不同的乳酸桿菌菌株，可造成程度不一的免疫反應 (Tejada-Simon & Pestka, 1999; Cross et al., 2004)。



許多研究指出可溶性的乳酸菌成分，其誘發 IL-12 之分泌的能力顯著低於完整的乳酸菌菌體 (Huang et al., 1999; Hessle et al., 2000)。我們的試驗有相似的發現，*Lb. kefiranofaciens* M1 可刺激小鼠巨噬細胞產生高量的 IL-12，顯著高於 *Lb. kefiranofaciens* M1 的發酵上層液組(圖 2-5)。在導向 Th1 反應與令 Th1 細胞激素分泌之過程中，IL-12 扮演非常重要的角色，並可促進生物體的細胞性免疫反應 (Shida et al., 2006)。Shida et al. (1998) 的研究清楚指出，*Lb. casei* Shirota 可藉由刺激巨噬細胞分泌 IL-12，進而將 naïve T 細胞導向 Th1 細胞之分化。然而，矛盾的是，*Lb. kefiranofaciens* M1 可刺激小鼠巨噬細胞產生 IL-12 (圖 2-5)，但在 RAW264.7 細胞株中卻無法刺激其分泌 IL-12 (圖 2-3); 同時，與 *Lb. kefiranofaciens* M1 發酵上層液相比，菌體可刺激小鼠巨噬細胞分泌顯著高量的 IL-12 (圖 2-5)，此結果亦與 RAW264.7 細胞株的實驗結果相反 (圖 2-3 與 2-4)。儘管在生理特徵上，小鼠巨噬細胞與 RAW264.7 細胞株有許多相似之處，但兩者畢竟是不同細胞來源，尤其細胞株遭到株化，因此對於 *Lb. kefiranofaciens* M1 與發酵上層液的活化，兩種細胞的細胞激素分泌情況仍有所差異。Diaz-Guerra et al. (1996) 指出小鼠巨噬細胞與 RAW264.7 受到 phorbol ester 之作用時，兩者對於 NO 之合成量也有所差異；Kudo et al (1998) 也觀察到 adrenomedullin 可增加小鼠巨噬細胞的 cAMP 產生，但對 RAW 264.7 細胞株則無此效果。上述文獻均證實了新鮮的初代細胞與細胞株，對於相同物質的刺激與活化，其反應仍有所差異。

分離自克弗爾的乳酸菌與其發酵上層液中，*Lb. kefiranofaciens* M1 與其發酵上層液可強烈誘導 RAW264.7 細胞株與小鼠巨噬細胞產生前發炎反應細胞激素 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  與 IL-6) 與 Th1 細胞激素 (IL-12) (圖 2-3、2-4 與 2-5)，並且與克弗爾發酵上層液無顯著差異。克弗爾菌相分佈中，*Lb. kefiranofaciens* 在乳酸菌中所佔的比例相當高 (Chen et al., 2008)，並可產生胞外多醣 (exopolysaccharide, EPS)。Vinderola et al. (2006a) 利用 *Lb. kefiranofaciens* ATCC 43761 所產生的 EPS 進行小鼠體內試驗，結果顯示 EPS 可增進小腸與大腸中 IgA 的分泌，同時促進細胞激素的分泌。

克弗爾中許多物質均可引起免疫反應，如菌體 DNA、發酵牛乳過程的代謝產物 (bioactive peptides) (Matar et al., 2000) 以及水溶性的克弗蘭 (kefiran) (Monteleone et al., 2002)。而乳酸菌細胞壁上的成分，如 peptidoglycan、多醣與

teichoic acid 亦被視為具有免疫調節功能之物質 (Meydani & Ha, 2000)。Bogdanov et al. (1975) 研究指出，在乳製品發酵過程中所產生 glycopeptides，其具有免疫刺激之活性以增進宿主之免疫反應；Muramyl dipeptide (MDP) 為構成 peptidoglycan 之主要物質，Tufano et al. (1991) 發現 MDP 可刺激單核球分泌 IL-1、IL-6 與 TNF- $\alpha$ ，同時可促進淋巴細胞分泌 IL-4。然而在我們的實驗中，為了釐清克弗爾發酵上層液之機能性物質，以 DNase 水解克弗爾發酵上層液後，證實機能性物質並非菌體 DNA；並且以 peptidoglycans 檢測套組，排除了克弗爾發酵上層液中仍殘留乳酸菌細胞壁的 peptidoglycans 成分；實驗並且以 proteolytical digestion 與膜過濾之方式，證實機能性成分為蛋白質或 peptides，且其分子量大於 30 kD。LeBlanc et al. (2002) 研究指出 *Lb. helveticus* R 389 發酵牛乳過程中所產生的 peptide，可引發小鼠的免疫反應並且抑制 fibrosarcoma 之生長；而 Meisel and Schlimme (1990) 的研究也證實 bioactive peptides 可刺激 T 細胞與自然殺手細胞之增生與成熟，同時可幫助小鼠抵抗多種病原菌之感染。

此部分試驗最終探討克弗爾發酵上層液與分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1 之細胞激素刺激的路徑，TLR2 可對革蘭氏陽性菌細胞壁物質產生反應，包含 peptidoglycan、lipoteichoic acid (LTA) 與 lipopeptide 等物質 (Lien et al., 1999; Yoshimura et al., 1999)，因此實驗以 TLR2 抗體與 TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠進行，證實樣品藉由 TLR2 刺激細胞激素分泌 (圖 2-7 與 2-8)。已有部分文獻證實革蘭氏陽性菌之免疫活化路徑，如 *Lb. casei* CRL 431 與 *Lb. helveticus* R389 亦透過 TLR2 而產生免疫反應 (Vinderola et al., 2005b)；除了細胞壁之物質，Hoarau et al. (2006) 亦發現 *Bifidobacterium breve* 之培養液可透過 TLR2 刺激細胞激素產生，然而此研究中並未確認培養液中是何物質活化 TLR2。

### 第三章

#### 探討自克弗爾粒分離之乳酸桿菌之抗過敏功效

##### 一、摘要

前言與方法：由前部分試驗結果可知，克弗爾上層液、克弗爾分離乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* M1及*Lb. kefiri* M2與其發酵上層液均可刺激免疫細胞分泌前發炎細胞激素及Th1細胞激素之分泌，推測具有改善第一型過敏反應之潛能，因此進行抗過敏之動物實驗。試驗中以克弗爾分離乳酸菌*Lb. kefiranofaciens* M1及*Lb. kefiri* M2進行試驗，首先利用小鼠脾臟及腹水細胞共同培養，刺激其分泌Th1與前發炎反應細胞激素，探討熱失活菌株 (85 °C 加熱30分鐘) 之免疫調節能力與活菌株與是否具有差異。進一步餵食*Lb. kefiranofaciens* M1於OVA致敏小鼠，測定其Th1/Th2細胞激素、調節型T細胞之數量及血清中OVA-specific IgE之濃度。菌株樣品是以灌食方式直接與腸道接觸，其可活化腸道周邊血液中吞噬細胞之活性；最後血液與淋巴循環中已被活化的免疫細胞將到達脾臟，產生系統性免疫反應，因此試驗亦抽取腸道Peyer's patch之RNA以進行小鼠全基因微陣列晶片分析，以瞭解菌株對於過敏小鼠其腸道黏膜系統所引起之整體基因變化。

結果：結果證實熱失活之*Lb. kefiranofaciens* M1仍具有刺激脾臟與腹水細胞分泌細胞激素之能力，因此選用熱失活菌株進行動物試驗，結果顯示餵食菌株之OVA過敏小鼠，顯著提升脾臟細胞中Th1細胞激素 (IL-12)，降低Th2細胞激素(IL-5) 之分泌；同時提升脾臟中調節型T細胞之數量，而令其血中之OVA-specific IgE顯著降低。而RNA基因微陣列晶片分析之結果顯示，OVA過敏小鼠餵食菌株後，其Peyer's patch之補體的基因表現俱顯著下降，同時顯著提升*Ifnr*、*Cd2*、*Cd3*、*Cd28*、*Stat4*與*Ccr7*基因之表現。

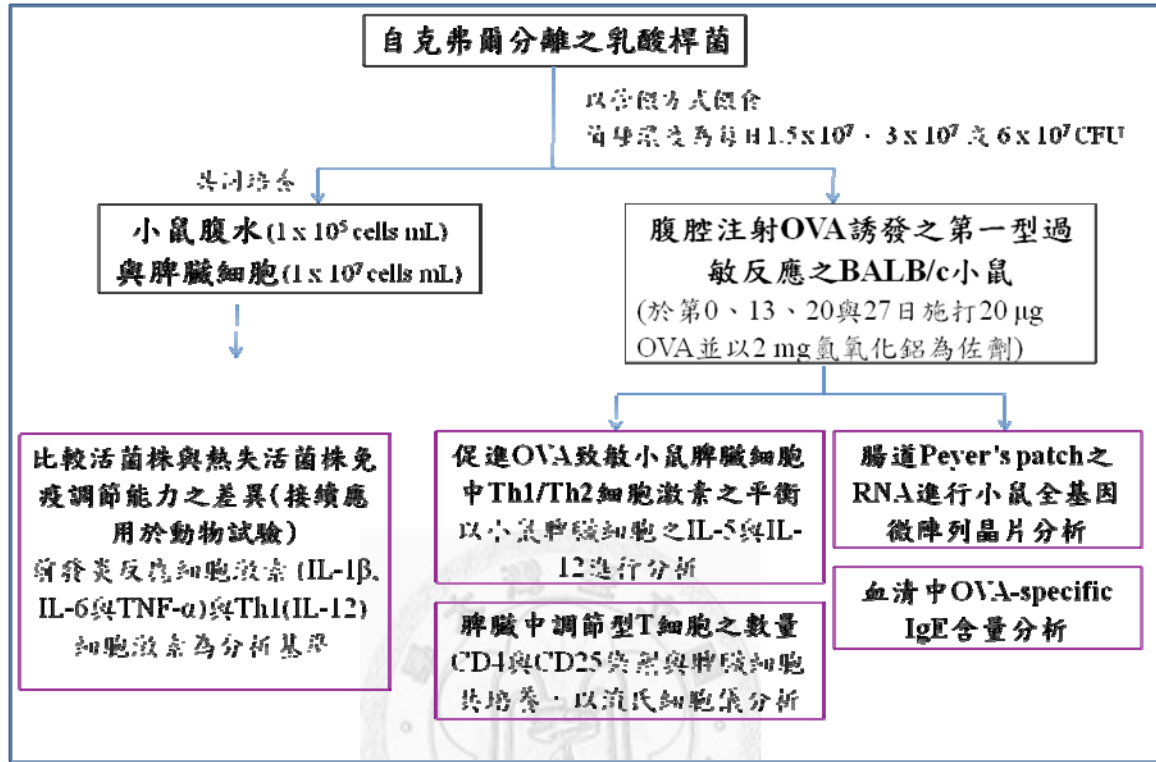
結論：試驗證實，克弗爾分離菌株*Lb. kefiranofaciens* M1以熱失活形式仍可誘導

免疫細胞產生Th1與前發炎反應之細胞激素；於動物實驗中，餵食熱失活菌株亦能夠改善OVA過敏小鼠之Th2傾向之因子，同時瞭解餵食後腸道Peyer's patch之基因表現之變化。



## 二、材料與方法

### (一) 試驗流程



### (二) 乳酸菌之菌種來源、培養與製備

本研究室自蒙古組克弗爾粒中分離*Lb. kefiranofaciens* M1與*Lb. kefiri* M2。以Lactobacilli MRS 培養液(Difco Laboratories, Detroit, MI)活化菌株培養於37°C 培養箱 (CO<sub>2</sub> incubator, Model TC2323, SHEL LAB, Japan)，活化菌株之後以PBS (Amersco, Solon, OH)溶液清洗菌體並將為濃度調整為 $1.5 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 與 $6 \times 10^7$  CFU/mL。熱失活菌株使用PBS溶液懸浮，並以恆溫水浴槽(Water bath Model-B403H, Firstek scientific instrument Co. Ltd., Taipei, Taiwan)加熱至85 °C持續40分鐘，達到熱失活狀態。

### (三) 體外細胞激素試驗小鼠巨噬細胞與脾臟細胞

小鼠巨噬細胞與脾臟細胞分離自六週齡之BALB/c 雌鼠(購於國立台灣大學實驗動物中心)，實驗方法參考Netea et al. (2005)與Hong et al. (2009)。

1. 脾臟細胞之分離：於無菌操作台內將小鼠脾臟取出，將脾臟置於70  $\mu\text{m}$  Nylon cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)上方，以無菌針筒尾端將其磨碎並濾除結締組織，同時加入10 mL無菌PBS進行沖洗，再以1200 rpm離心5分鐘後吸去上清液，且加入5 mL的RBC lysis solution (Qiagen, Germantown, Maryland)，於室溫下充分混合2分鐘，以確保紅血球完全溶解，再以前述條件離心去除上清液後，加入10 mL PBS洗去殘餘的RBC lysis solution，最終以5 mL內含10 % FBS(fetal bovine serum, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria)的RPMI 1640培養液 (HyClone, Logan, UT)充分懸浮，並以trypan blue(Invitrogen, Carlsbad, CA)調整脾臟細胞至 $1 \times 10^7$  cells/mL備用。

2. 巨噬細胞之分離：實驗使用六週齡BALB/c 雌鼠(購於國立台灣大學實驗動物中心, Taipei, Taiwan)，以腹腔注射2 mL 3% thioglycollate (Gibco, Gaithersburg, MD) (Netea et al., 2005)，使免疫細胞聚集，72小時後將小鼠犧牲，於無菌操作台中以PBS 5 mL注入腹膜內，提起鼠體左右或上下抖動，促使腹腔器官間的免疫細胞均勻懸浮於PBS中，並以5 mL空針筒抽取腹腔細胞，重複上述步驟兩次，取得8 mL腹水液。腹水液以離心機 (High speed refrigerated centrifuge, Kubota 1920, Osaka, Japan) 於1500 rpm低速離心10分鐘，捨棄上清液，輕拍細胞沉澱使之分散，加入含10% FBS的RPMI 1640培養液，懸浮細胞並培養於24 well培養盤，置於37°C細胞培養箱(Revco, Santa Fe Springs, CA)培養3小時後，洗去懸浮無法貼附的細胞，再加入含10% 熱失活FBS的RPMI 1640培養液將貼附細胞以細胞刮杓刮起，以trypan blue調整細胞數量至 $5 \times 10^6$  cells/mL，取1 mL 細胞懸浮液培養於24 well培養盤，於37°C培養箱培養3小時，使細胞貼附後洗去以備用。

上述脾臟細胞與巨噬細胞以不同濃度的活乳酸菌(*Lb. kefiranofaciens* M1與

*Lb. kefir* M2) 與熱失活乳酸菌(heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1, HI-M1與 heat-inactivated *Lb. kefir* M2, HI-M2)共同培養，於37°C培養24小時後搜集培養液，保存於-80°C下代細胞激素測定。

#### (四) 致敏小鼠動物試驗

1. 致敏流程：實驗以六週齡BALB/c 雌鼠進行，於第0, 13, 20與27日進行致敏，致敏模式以20 µg之卵白蛋白(ovalbumin, OVA, Sigma, St. Louis, MO)作為過敏原，並與作為佐劑200 mg之Al(OH)<sub>3</sub> (aluminum hydroxide, Sigma)，經由腹腔注射200 µL，在28日實驗期間以管餵方式餵食不同濃度的熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1 300 µL(乳酸菌菌數最終定量為 $1.5 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  與 $6 \times 10^7$  CFU/mL)。

2. 血清取得：試驗並於第0, 7, 14, 21與28日進行臉頰採血(cheek-pouch blood collection)，將血液置於採血管中(BD microtainer chemistry tubes, BD, Franklin Lakes, NJ)以6000 x g離心90秒後取得血清，保存於-80°C下並測量總IgE(mouse IgE ELISA set, BD science)以及OVA-specific IgE(DS mouse IgE ELISA OVA, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)之濃度。

3. 脾臟細胞：試驗第28日犧牲小鼠，於無菌操作台中分離脾臟細胞(方法同上述)，trypan blue染色計數調整脾臟細胞數至 $1 \times 10^7$  cells/mL，取1 mL之細胞懸浮液(RPMI 1640中添10 % FBS與1 % 抗生素(100 U/mL penicillin與100 µg/mL streptomycin, Sigma)於24 well培養盤，再加入已通過0.22µm無菌濾膜的OVA溶液進行刺激，使細胞培養液最終OVA濃度為100 mg/mL於37°C培養箱培養48小時後，以8000 rpm離心3分鐘去除脾臟並搜集上清液，保存於-80°C下以測定細胞激素。

未與OVA共培養之脾臟細胞則取 $5 \times 10^5$  cells/mL的細胞數進行染色，使用anti-mouse PE-CD4 antibody (clone GK1.5)、anti-mouse FITC-CD25 antibody (clone 7D4)與anti-mouse FITC-CD19 antibody (clone 6D5) (Beckman Coulter, Fullerton,

CA)於4°C進行避光染色，以4 mL PBS清洗兩次以洗去細胞上多餘染劑，最終以1 mL PBS懸浮細胞，經70 µm Nylon cell strainer (BD Falcon)過濾打散細胞後，隨即以流式細胞儀(EPICS XL flow cytometer, Beckman Coulter, Fullerton, CT)分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節型T細胞與CD19<sup>+</sup>B細胞之數量。

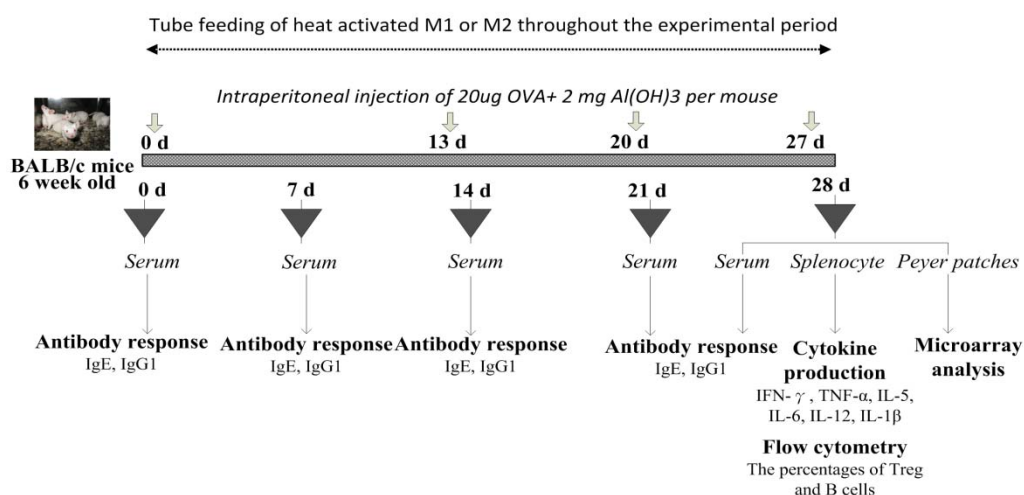


圖 3-1 致敏實驗流程圖。

Fig. 3-1 The experimental design of OVA-induced allergy.

4. Peyer's patches：小鼠犧牲後參考 Torii et al. (2007)之方法，取下小鼠十二指腸至迴腸末端之後，由外觀可見白色突起即為目標 Peyer's patch，每隻小鼠取 6 至 8 顆，以 PBS 清洗後以液態氮保存。後續以 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 進行 RNA 之萃取。

#### (五) 細胞激素測定

本試驗以酵素連結免疫吸附法(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)進行。使用小鼠細胞激素測定套組 (mouse cytokine kit, R&D system, Mckinley, MN)測量 TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ 與IL-10之濃度。

#### (六) Microarray

Peyer's patches 的 RNA 樣品以 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)進行定量，再以 Agilent 2100 Bioanalyser



(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)進行品質判定 (OD 260/280 之比值需大於 2.0, Bioanalyzer 28s/18s 之比例需大於 1.2, 同時 RIN 值需高於 8)。通過品質判定之 RNA 以 Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)進行實驗, RNA 樣品反轉錄為 cDNA 後, 將實驗組之樣品(餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1)以 cyanine 3 標定, 而 OVA 對照組以 cyanine 5 標定, 標定後將兩組樣品於 Agilent Whole Mouse Genome 4x44k oligo microarray (G4122F-014868, Agilent Technologies),進行雜合反應, 樣品以 60°C 加熱 30 分鐘後, 置放於 4 rpm 之轉動式烘箱進行反應 (避光並於 65°C 反應 17 小時), 完成反應後進行清洗並烘乾, 晶片最終於 Agilent microarray scanner (G2565CA, Agilent Technologies)進行掃描, 並以 software 10.5.1.1 (Agilent Technologies)進行分析。

#### (七) 統計分析

以 SAS 套裝軟體 (SAS 9.0, SAS institute, Cary, NC)進行變方分析, 再以鄧肯式多變域測定法(Duncan's New Multiple Range Test)測定各試驗值間之顯著差異, 所有試驗皆進行三重複測定後繪圖。



### 三、結果

#### (一) 自克弗爾分離之乳酸桿菌對於巨噬細胞與脾臟細胞細胞激素分泌之影響

以活菌狀態之 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 或熱失活狀態與小鼠巨噬細胞進行共同培養，結果顯示加熱失活之 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 均可顯著提升 Th1 細胞激素如 IL-12 與 IFN- $\gamma$  (圖 3-2)，與活菌菌體並無顯著差異，同時 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 之間亦無顯著差異；在脾臟細胞的培養，Th1 細胞激素分泌之情況亦有相同趨勢(圖 3-3)，顯示 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 其活化免疫之能力部分來自於其菌體。同時在小鼠巨噬細胞的前發炎反應細胞激素分泌情況，其結果並不一致，熱失活菌株誘導 IL-1 $\beta$  的分泌顯著低於活菌株，對於誘導小鼠巨噬細胞分泌 TNF- $\alpha$ ，熱失活菌株之刺激能力則顯著高於活菌株；而 IL-6 的誘導分泌，兩種狀態的菌株則無顯著差異(圖 3-2)。

#### (二) 餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 IgE 與 OVA-specific IgE 分泌之影響

由上述結果挑選熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 進行後續試驗(能夠誘發最高量之 IL-12 分泌)，以熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 菌體與 *Lb. kefiranofaciens* M1 之發酵乳上層液餵食 OVA 致敏小鼠 28 日後，結果顯示隨著菌體濃度越高，其降低致敏小鼠血清之 IgE 效果越佳(圖 3-4)，每日餵食  $6 \times 10^7$  CFU 之組別顯著抑制致敏小鼠血清中之總 IgE 含量，而餵食 *Lb. kefiranofaciens* M1 之發酵乳上層液則無此效果。此體內試驗中，顯示乳酸菌濃度需達到某濃度，方能引發免疫反應並達到預期減少血清中 IgE 含量之功效。

試驗亦探討 OVA-specific IgE 之變化(圖 3-5b)，結果顯示每日餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1  $6 \times 10^7$  CFU 之組別，第三劑(第 20 日)OVA 過敏原腹腔注射之後，其能夠顯著抑制血清中 OVA-specific IgE 之分泌；而總 IgE 含量的部分，餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 則於第二劑(第 13 日)OVA 注射後，其 IgE 含量均顯著低於 OVA 之對照組(圖 3-5a)。此部分體內試驗結果證實熱失活之 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著改善以 OVA 致敏之小鼠其血第 14 日清中 IgE 與 OVA-specific IgE 之分泌。

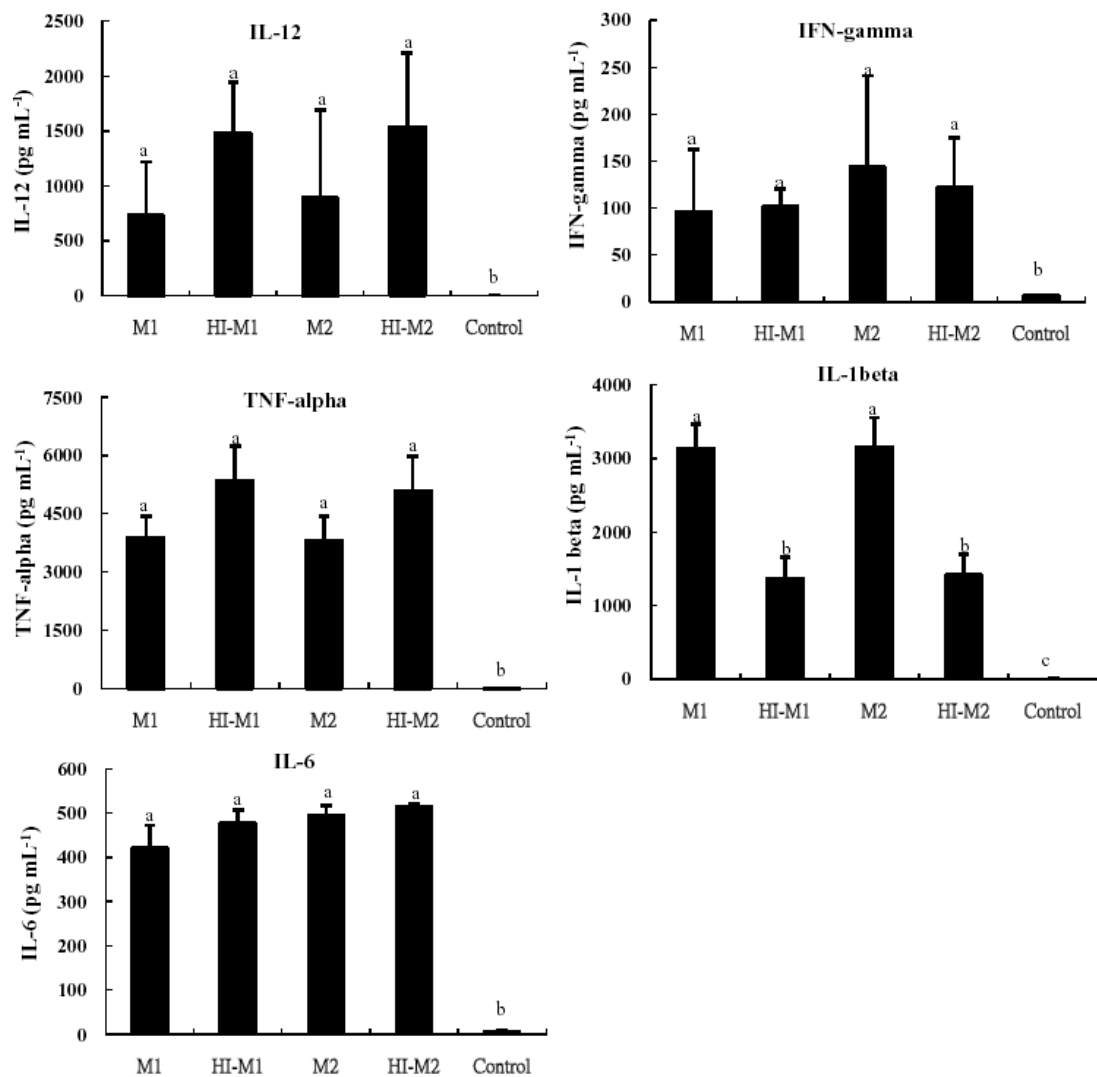


圖 3-2 克弗爾粒分離之乳酸桿菌對於小鼠巨噬細胞分泌細胞激素之影響。

Fig. 3-2 Effect of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir grains on cytokine production using murine peritoneal macrophages. M1: *Lb. kefiranofaciens* M1; HI-M1: Heat inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1; M2: *Lb. kefiri* M2; HI-M2 : Heat inactivated *Lb. kefiri* M2; Control: PBS.

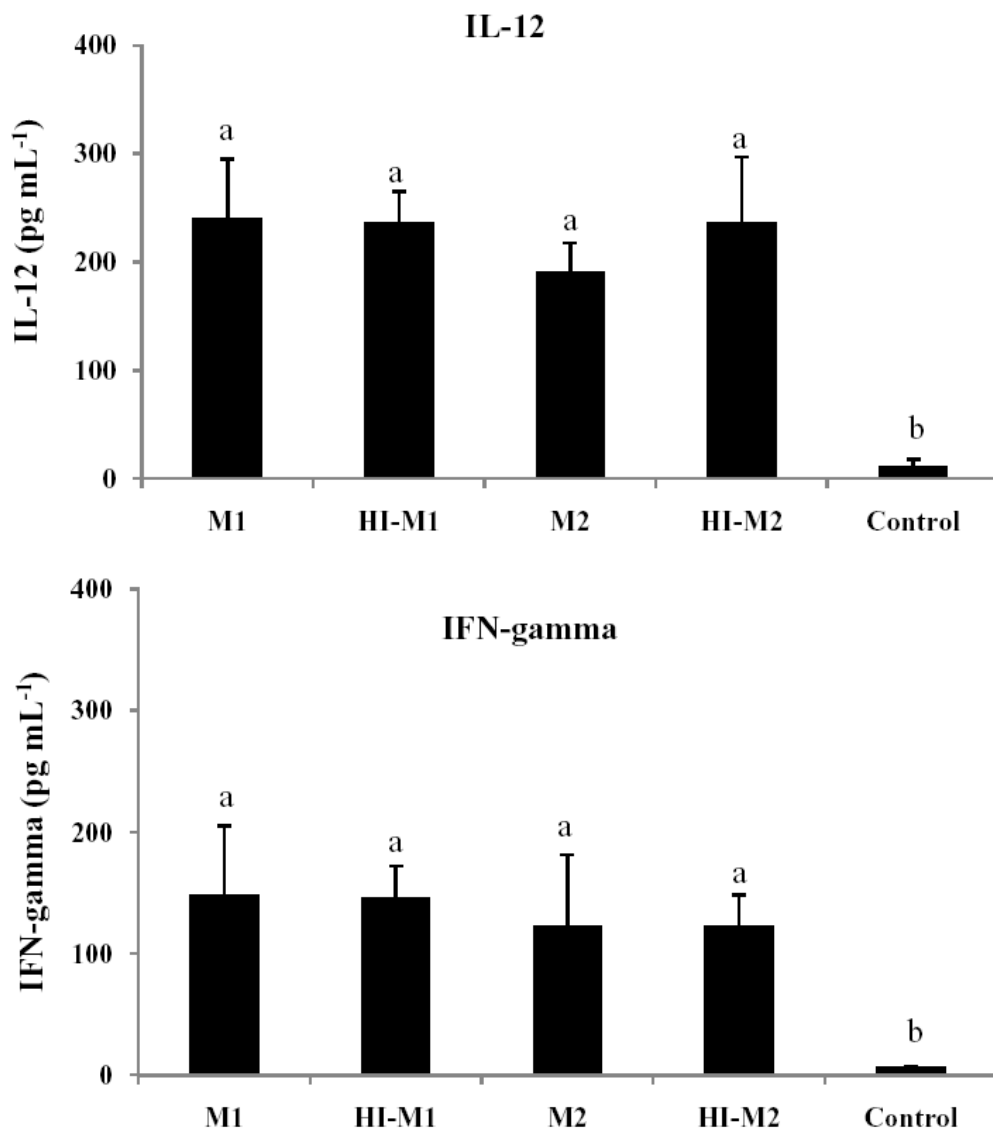


圖 3-3 自克弗爾粒分離之乳酸桿菌對於脾臟細胞分泌細胞激素之影響。

Fig. 3-3 Effect of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir grains on cytokine production using murine splenocyte. M1: *Lb. kefiranofaciens* M1; HI-M1: Heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1; M2: *Lb. kefir* M2; HI-M2 : Heat-inactivated *Lb. kefir* M2; Control: PBS.

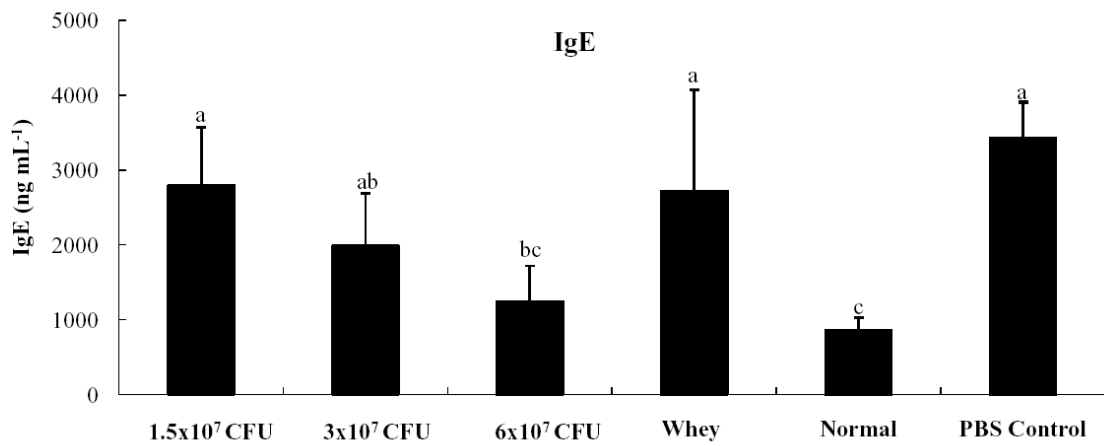


圖 3-4 餵食熱失活之*Lb. kefiranofaciens* M1對於致敏小鼠血清中IgE之影響。乳清組：小鼠每日餵食*Lb. kefiranofaciens* M1發酵乳500  $\mu$ L。

Fig. 3-4 Effect of the heat inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 isolated from kefir grains on sera IgE production using allergy mice. Whey: The mice were tube feeding with 500  $\mu$ L/mouse per day of kefir whey. Control: PBS

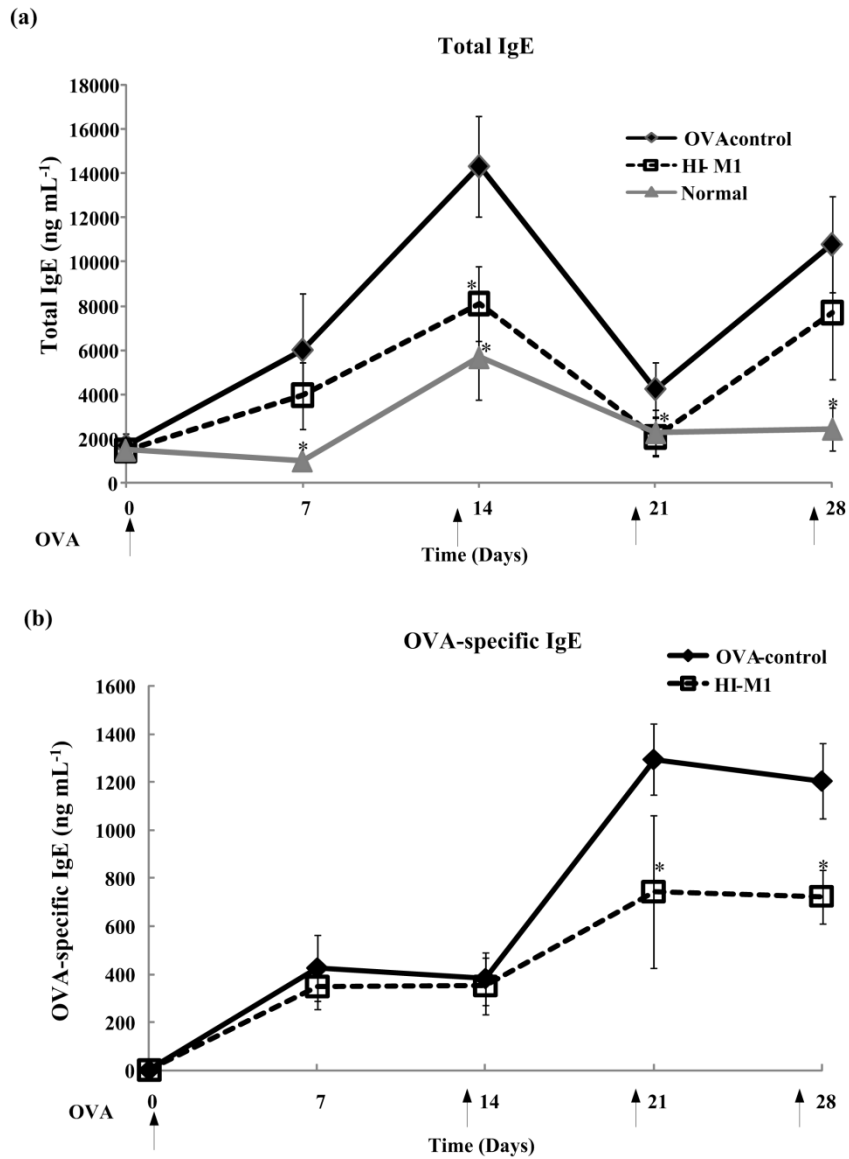


圖 3-5 餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於致敏小鼠血清中 (a) 總IgE (b) OVA-specific IgE 之影響。

Fig. 3-5 Effect of oral administration of the heat inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on (a) total IgE and (b) OVA-specific IgE productions in OVA-sensitized BALB/c mice.

### (三) 餵食熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1對於致敏小鼠脾臟細胞激素之影響

由上述試驗得知*Lb. kefiranofaciens* M1確實能夠抑制第一型過敏反應之血清IgE，為瞭解抑制過敏反應之機制，此部分試驗探討餵食乳酸菌菌體時，致敏小鼠脾臟細胞激素之分泌情形。將小鼠犧牲後，脾臟細胞與OVA共同培養48小時，結果顯示每日餵食 $6 \times 10^7$  CFU之熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1的處理組，其脾臟細胞之IL-12顯著高於OVA之對照組，而IFN- $\gamma$ 則無顯著差異(圖3-6)；同時餵食*Lb. kefiranofaciens* M1之組別，小鼠脾臟細胞所分泌之Th2細胞激素(IL-5)亦顯著低於對照組。結果證實以*Lb. kefiranofaciens* M1餵食致敏小鼠，可調節其脾臟細胞分泌細胞激素，當脾臟細胞於體外再次接受OVA過敏原刺激時，能夠顯著降低其Th2細胞激素並且提升Th1細胞激素。

### (四) 餵食熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1對於致敏小鼠脾臟中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節型T細胞與CD19<sup>+</sup>B細胞之影響

連續餵食28日熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1於致敏小鼠，分離其脾臟細胞並以流式細胞儀進行表面抗原分析，探討是否能夠提升帶有CD4與CD25之T細胞數量(意即調節型T細胞之數量)，結果顯示餵食菌株之小鼠，其脾臟中調節型T細胞數量顯著提升(圖3-7a)。CD19為B細胞早期表現之重要表面抗原，因此於第一型過敏反應之個體其CD19表現較高，而餵食克弗爾分離之菌株後，與OVA對照組相比可顯著降低CD19之表現(圖3-7b)，此部分結果證實連續餵食熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1 28日後，可顯著提升OVA致敏小鼠脾臟中調節型T細胞之數量，並降低脾臟B細胞中CD19之表現。

### (五) 餵食熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1對於調控致敏小鼠Peyer's patch基因表現之影響

Peyer's patch 為小腸黏膜重要免疫組織，大量淋巴球與巨噬細胞在此藉由胞飲或吞噬作用清除病原菌，試驗中的熱失活菌株以口服方式進行，首先接觸之免疫組織即為Peyer's patch。為瞭解受到*Lb. kefiranofaciens* M1調控的免疫相關基因之變化，分離餵食*Lb. kefiranofaciens* M1致敏小鼠的Peyer's patch，抽取其RNA進行cDNA microarray分析，結果顯示共有1034個基因之表現顯著下降；而有534個基因之表現顯著提升，其中與免疫相關的基因列於表3-1，餵食菌株能夠

顯著抑制致敏小鼠之補體系統過度表現，如 *Clr*, *Cls*, *C2* 與 *C3*；同時提升 Th1(*Ifnr* 與 *Stat4*)、前發炎反應(*Ccr7*)與細胞表面訊息傳遞分子相關之基因(*Cd2*, *Cd3* 與 *Cd28*)，上述基因亦以 real-time PCR 證實其表現量。





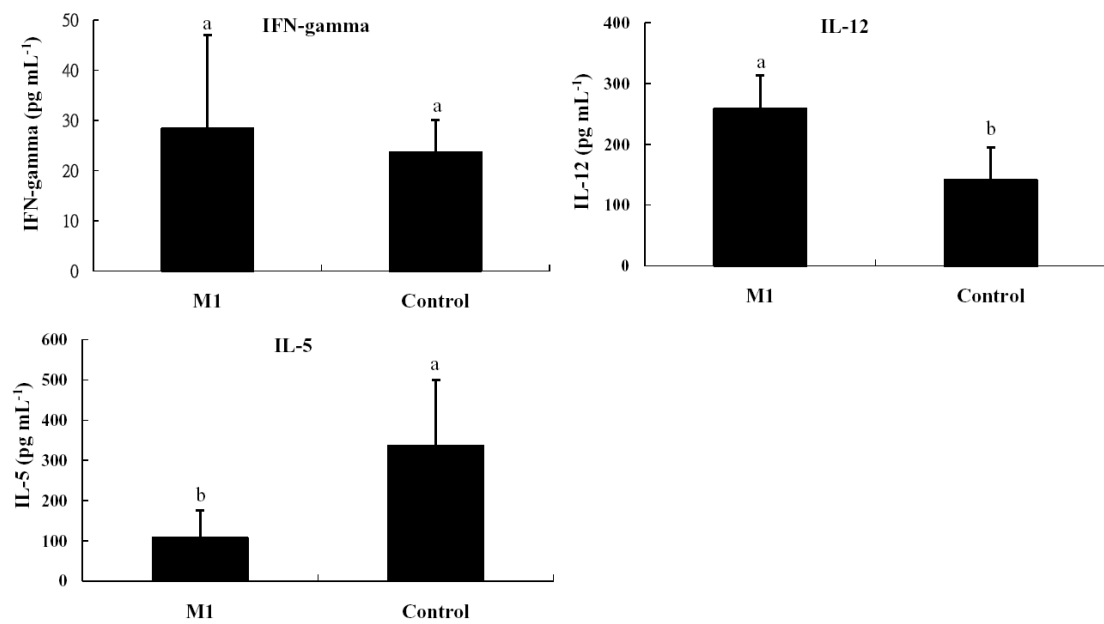


圖 3-6 餵食熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1對於OVA致敏小鼠脾臟分泌細胞激素之影響。

Fig. 3-6 The secretion levels of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-5 regulated by heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 in OVA-sensitized splenocytes.

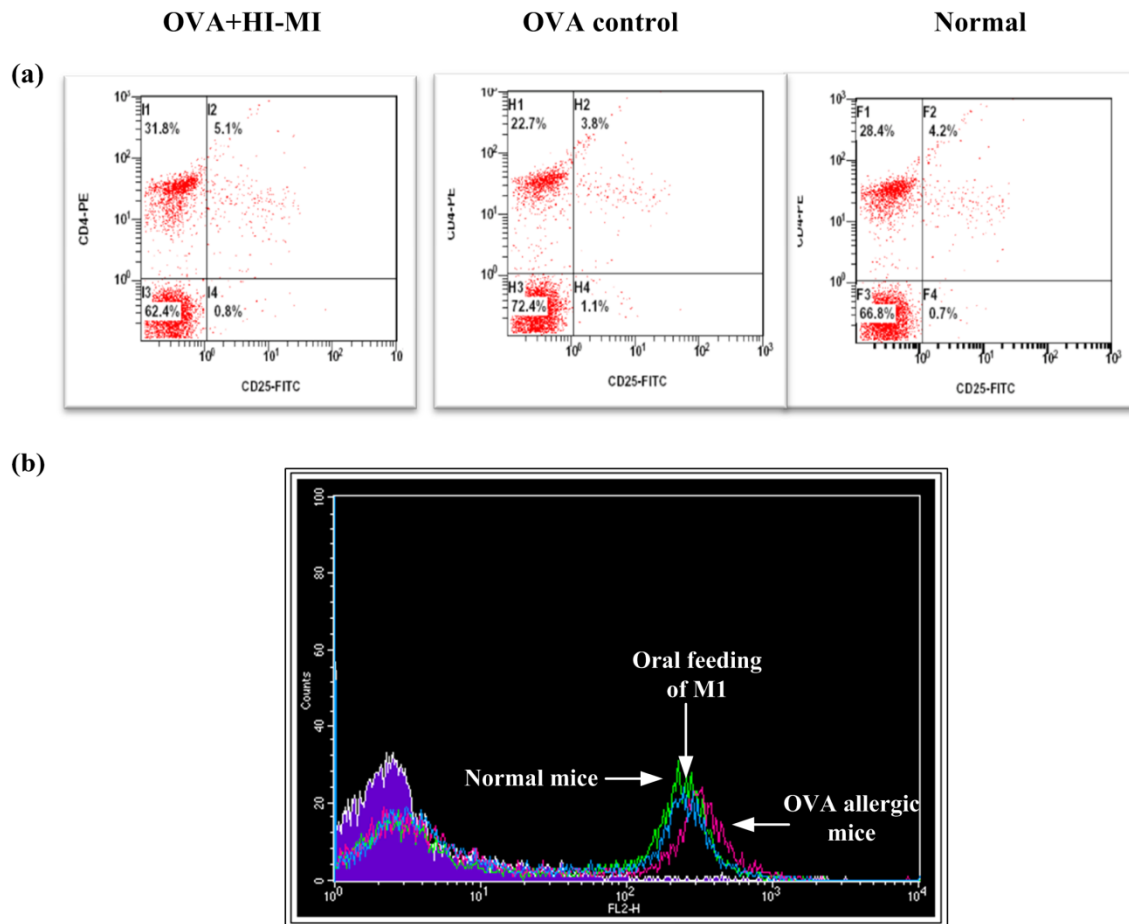


圖 3-7 餵食熱失活 *Lb. kefirifaciens* M1 對於 OVA 致敏小鼠脾臟細胞中 (a)  $CD4^+CD25^+$  T 細胞與 (b) CD19 之影響。

Fig. 3-7 Analysis of the (a)  $CD4^+CD25^+$  T cells and (b) expression of CD19 in splenocytes in normal and OVA-sensitized mice.

表 3-1 餵食*Lb. kefiranofaciens* M1對OVA致敏小鼠Peyer's patch基因表現之影響

Table 3-1 Effect of the heat inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on gene expression in Peyer's patch cells of OVA-sensitized mice

Gene name	Symbol	Accession number	Fold change
<b><i>Down-regulation genes:</i></b>			
Complement component 3	<i>C3</i>	NM_009778	-5.42
Complement component 4b	<i>C4</i>	NM_009780	-3.53
Complement component 2	<i>C2</i>	NM_013484	-3.03
Complement component 1, s subcomponent	<i>C1s</i>	NM_144938	-2.82
Complement component 1, r subcomponent	<i>C1r</i>	NM_023143	-2.42
Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	<i>C1qa</i>	NM_007572	-2.15
Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	<i>C1qb</i>	NM_009777	-2.12
Complement component 1, q subcomponent, C chain	<i>C1qc</i>	NM_007574	-2.07
<b><i>Up-regulation genes :</i></b>			
Interferon gamma	<i>Ifnr</i>	NM_008337	10.4
Chemokine (C-C motif) receptor 7	<i>Ccr7</i>	NM_007719	3.68
CD28 antigen	<i>Cd28</i>	NM_007642	2.82
Chemokine (C-C motif) ligand 4	<i>Ccl4</i>	NM_013652	2.67
Perforin 1 (pore forming protein)	<i>Prf1</i>	NM_011073	2.47
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<i>Cxcr4</i>	NM_009911	2.41
CD3 antigen, delta polypeptide	<i>Cd3d</i>	NM_013487	2.21
CD2 antigen	<i>Cd2</i>	NM_013486	2.11
CD3 antigen, gamma polypeptide	<i>Cd3g</i>	NM_009850	2.08
Signal transducer and activator of transcription 4	<i>Stat4</i>	NM_011487	2.05

#### 四、討論

在此部分實驗中，我們證實了克弗爾乳酸桿菌 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 可刺激小鼠巨噬細胞與脾臟細胞分泌重要的 Th1 細胞激素 (IFN- $\gamma$  與 IL-12)，許多研究也證實乳酸桿菌可在體外試驗中活化免疫細胞 (Shida et al., 1998; Fujiwara et al., 2004)。特定的乳酸桿菌菌株可刺激 IL-12 與 IFN- $\gamma$  之分泌進而活化 Th1 反應與細胞免疫反應 (cellular immunity) (Shida et al., 2006)。而 Shida et al. (1998) 研究證實 *Lb. casei* Shirota 可提升透過巨噬細胞分泌 IL-12 進而活化 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞往 Th1 反應進行。IFN- $\gamma$  為 Th1 細胞所分泌主要的細胞激素，亦為 IL-4 之 antagonist 並可抑制後續 IgE 的生成 (Rousset et al. 1991; Matsuzaki et al. 1998; Segawa et al. 2008)。IL-12 與 IFN- $\gamma$  之功用為活化吞噬細胞以對抗病原菌之入侵，同時其具有抑制 Th2 反應之功能。由此觀點，活菌或熱失活狀態的 *Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* M2 均可刺激 Th1 細胞激素之分泌，則其可能具有抑制 Th2 反應之效力。

本試驗探討克弗爾中熱失活乳酸桿菌改善第一型過敏的功效。熱失活菌株對於刺激 Th1 細胞激素之分泌與活菌狀態並無顯著差異 (圖 3-2 與 3-3)。一般認為，乳酸菌必須生存且定殖於宿主體內才可發揮其機能性 (Nonaka et al. 2008)，然而許多研究亦指出不單只有活菌具有免疫調節功效，熱失活或熱致死之特定乳酸菌菌株亦能夠發揮效果 (Murosaki et al. 1998; Sashihara et al. 2006; Segawa et al., 2008)。一般認為熱失活的乳酸菌，是依賴其細胞壁上的物質，以達免疫活化之機能性，我們的實驗結果證實 peptidoglycans 是為可能的機能性成分，並且在之前的研究中證實克弗爾乳酸菌可經由 toll like receptor (TLR) 2 刺激巨噬細胞分泌前發炎反應細胞激素 (Hong et al., 2009)。免疫細胞的 TLR2 可與革蘭氏陽性菌之細胞壁物質產生反應，進而令細胞產生一連串的訊息傳遞，最終活化 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 以引發細胞激素之分泌 (Lien and Ingalls 2002)。Sashihara et al. (2006) 也指出乳酸菌細胞壁上的 peptidoglycans 成分越高，其刺激 IL-12 分泌之能力則越強。因此後續的動物實驗，我們選擇了 *Lb. kefiranofaciens* M1，可誘導巨噬細胞與脾臟細胞分泌最高量的 IL-12。

以 OVA 致敏小鼠之試驗中，與 OVA 控制組相比，餵食熱失活 M1 可顯著降

低血清中總 IgE (圖 3-4) 與 OVA-specific IgE (圖 3-5)，此抑制現象隨著 *Lb. kefiranofaciens* M1 菌數越高則效果越佳 (圖 3-4)，儘管目前對其原因尚未完全瞭解，推測為高菌數的給予其含有較高的 peptidoglycans；但不同的乳酸菌需給予最適濃度才可最有效率地抑制 IgE 之濃度。Segawa et al. (2008) 指出在飼糧中添加 0.5% 的 *Lb. brevis* SBC8803 可有效降低 OVA 致敏小鼠血清中 IgE 的含量；Matsuzaki et al. (1998) 的研究也發現只有適當濃度的 *Lb. casei* Shirtoa 才可促進過敏小鼠之免疫平衡，過高或過低菌量並無法具備抗過敏之成效。

連續餵食 28 日之後，*Lb. kefiranofaciens* M1 可改善致敏小鼠之脾臟細胞分泌的細胞激素，與 OVA 控制組相比，*Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著提升 IL-12 同時降低 IL-5 之分泌 (圖 3-6)。此 IL-12/IL-5 之比例即表示菌株可促進過敏小鼠體內 Th1/Th2 的平衡。*Lb. kefiranofaciens* M1 藉由細胞激素的調節，改善過度 Th2 的反應，將其導向 Th1 反應，進而改善下游抗體的表現，以抑制過敏個體中的總 IgE 與 OVA-specific IgE。但對於另一重要的 Th1 細胞激素 IFN- $\gamma$ ，菌株則無法顯著提升脾臟細胞中的分泌量，*Lb. kefiranofaciens* M1 處理組與 OVA 控制組並無顯著差異，目前無法確知原因，儘管體外試驗的 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著刺激脾臟細胞產生 IFN- $\gamma$ ，但體內試驗與體外試驗之結果往往有程度上之差異 (Sashihara et al., 2006)。

試驗以流式細胞儀分析 OVA 致敏小鼠脾臟細胞，結果顯示連續餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著增加脾臟中調節型 T 細胞，同時降低 CD19<sup>+</sup> B 細胞之數量 (圖 3-7)。調節型 T 細胞可調節生物體中先天性與適應性免疫反應，避免過度發炎或過敏反應之發生 (Sakaguchi 2004; Shevach 2004; Maloy et al., 2003)。Ling et al. (2004) 指出調節型 T 細胞可抑制由花粉所活化之 T 細胞過度表現，不論是在過敏之患者或是正常個體均有此效果；Stassen et al. (2004) 研究證實，由健康個體分離出活性良好之輔助型 T 細胞，再將其移至過敏個體內，其可藉由抑制 IL-4 進而降低其 Th2 之表現；Karlsson et al. (2004) 認為食物中的抗原可引發健康個體中調節型 T 細胞之增生，以調控抗原引起的免疫反應。另一方面，CD19 是 B 細胞表面特定之訊息傳遞分子 (Rickert et al., 1995)，Jarvinen et al. (1999) 報告指出當生物體中 CD19<sup>+</sup> B 細胞大量表現時，可視為食物過敏之早期徵兆。本研究中 *Lb. kefiranofaciens* M1 降低 CD19<sup>+</sup> 細胞之數量與提升調節型 T

細胞之數量可視為 *Lb. kefiranofaciens* M1 減緩過敏症狀之管道；此外，OVA 致敏小鼠血清中總 IgE (圖 3-4)與 OVA-specific IgE (圖 3-5)之抑制亦與此相關。

試驗為徹底釐清 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 OVA 致敏小鼠的腸道免疫組織之影響，以 Microarray 進行分析 Peyer's patches，與 OVA 控制組相比，結果顯示熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 之投予可降低 5.4 倍的補體分子 3 (complement components 3, C3) 基因之表現 (表 3-1)，而補體系統相關之分子如 *C1*, *C2*, and *C4* 之表現也顯著受到抑制。近來研究發現過敏疾病之個體中，其補體系統活化表現顯著提升，不論是動物實驗或人體臨床試驗都已證實；而補體系統之特定分子更是導致過敏發生的重要分子 (Hawlich, Wills-Karp, Karp, & Köhl, 2004)。Fearon and Carroll (2000) 研究指出，活化 B 細胞之過程，補體系統亦扮演重要的角色，因此在過敏疾病中補體系統亦可使 B 細胞過度分泌 IgE，而令過敏症狀加重。活化補體主要透過三種不同路徑：古典路徑、替代路徑與凝集素路徑 (Walport, 2001a,b)，此三項路徑均可令 C3 分子分解為 C3a 與 C3b；Drouin et al. (2001) 研究證實 C3 缺乏小鼠可抑制小鼠過敏性氣喘之發生，同時減緩呼吸道中 Th2 細胞之作用。另一方面，餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著提升致敏小鼠 Peyer's patches 中 interferon gamma (*Ifnr*) 的表現，顯著高於 OVA 對照組 10.4 倍 (表 3-1)；許多與 Th1 相關之基因表現亦顯著提升，如 T 細胞受體-CD3 (T-cell receptor (TCR)-CD3 antigen) 與 CD2，此兩分子為 T 細胞藉以辨識特定抗原或訊息傳遞以活化自身之重要表面抗原 (Brown et al. 1989)；Ocklind (1988) 亦指出 Th1 細胞激素 (IL-2) 活化 T 細胞令其增生，需要透過 CD2 與 CD3。而 STAT4 更是 T 細胞與單核球受到 IL-12, IL-23 與 IFN- $\gamma$  刺激時，胞內訊息傳遞中之重要轉錄因子，令 Th1 細胞與單核球增生活化，進而促進 IFN- $\gamma$  的分泌 (Korman et al., 2008)。CD28 為 T 細胞表面上 90-kD 的醣蛋白，負責調控 T 細胞之活化，CD28 之表現可透過 IL-12 之刺激，並使細胞偏向 Th1 之反應 (O'Garra and Murphy 1996; Kang et al., 2009)。綜合上述，提升 *Cd2*, *Cd3*, *Cd28* 與 *Stat4* 的表現可輔助 Th1 反應，此結果亦與體外試驗結果相呼應。

## 第四章

### 探討自克弗爾粒分離之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 與其發酵乳改善過敏性氣喘反應之功效

#### 一、摘要

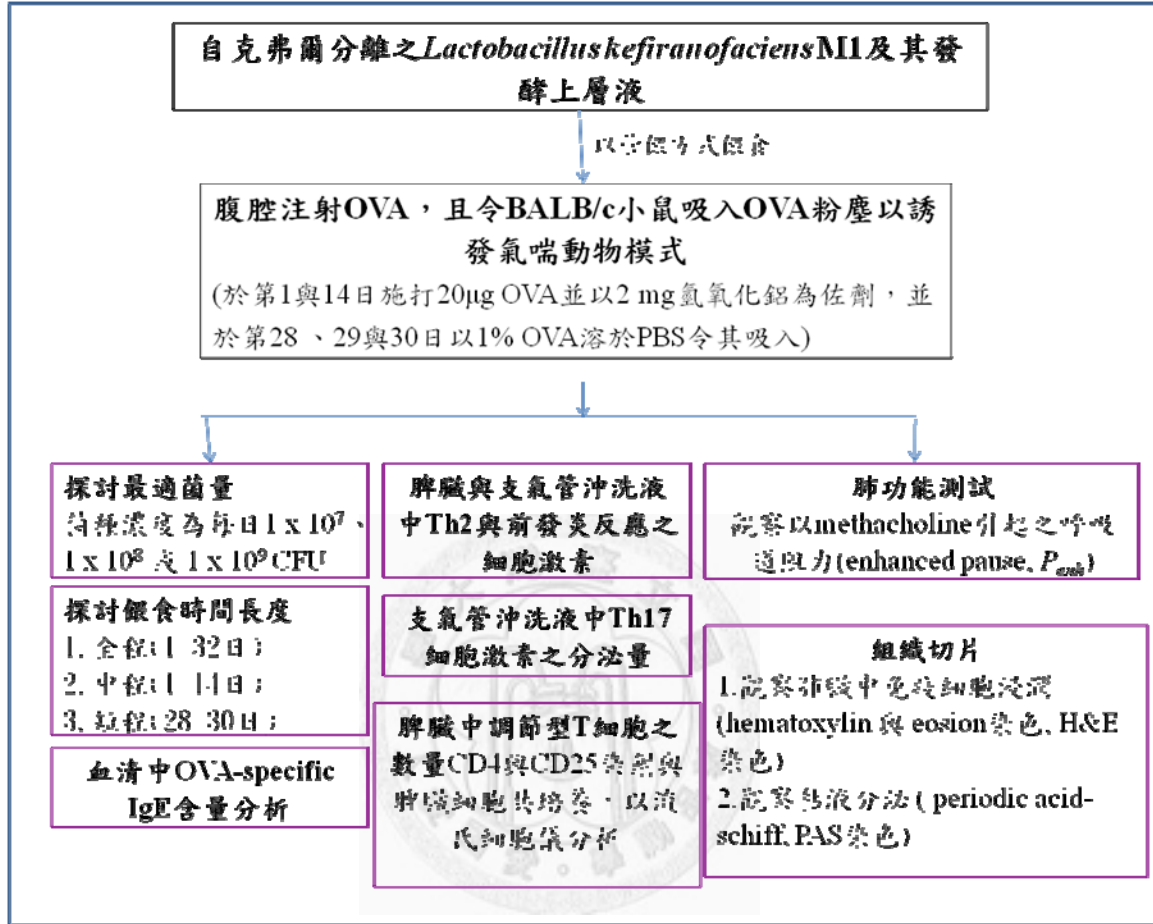
前言與方法：經前部分動物試驗，已證實克弗爾粒中之熱失活乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* M1 具有刺激分泌前發炎反應相關細胞激素之能力、提升 Th1 反應，改善 OVA 過敏小鼠之 Th2 傾向之因子。但以 OVA 進行腹腔注射，誘發第一型過敏反應之動物模式，其為系統性之影響，除了專一性抗體及細胞激素分泌之外，並無明顯的局部性臨床症狀可供觀察，因此本部分試驗以第一型過敏反應之氣喘實驗動物模式進行，評估自克弗爾粒中分離之 *Lb. kefiranofaciens* M1 能否改善呼吸道之臨床症狀。實驗動物先以 OVA 進行腹腔注射外，再令其吸入 OVA 粉塵以產生氣喘，餵食不同濃度以及不同時間長度之樣品後，觀察以甲基膽素 (methacholine) 引起之呼吸道阻力 (enhanced pause, Penh) 是否降低；測定脾臟與支氣管沖洗液中之 Th2 (IL-4, IL-5 與 IL-13) 與 Th17 細胞激素之分泌量及血清中 OVA-specific IgE 之含量；並以組織切片觀察肺臟中免疫細胞浸潤與黏液分泌情況。

結果：結果顯示，以熱失活之 *Lb. kefiranofaciens* M1 餵食 OVA 氣喘小鼠，其餵食菌數達  $10^8$  CFU 以上，且以試驗全程每日皆餵食之方式，小鼠脾臟與支氣管沖洗液中之前發炎反應、Th2 及 Th17 細胞激素顯著下降，並能夠顯著降低由 methacholine 所誘發的 Penh 值；切片結果顯示肺臟切片中免疫細胞之浸潤以及黏液分泌顯著減少，血清中之 OVA-specific IgE 亦顯著下降。

結論：試驗證實，每日以  $10^8$  CFU 菌數之 *Lb. kefiranofaciens* M1 餵食 OVA 誘發之氣喘小鼠，可改善第一型過敏反應之 Th2 傾向之因子，同時臨床反應亦可顯著降低 Penh 值與組織切片中的免疫細胞浸潤與黏液分泌；另外抑制氣管中 Th17 細胞激素之分泌。

## 二、材料與方法

### (一) 試驗流程



### (二) 乳酸菌之製備與處理

本研究室自蒙古組克弗爾粒中分離之 *Lb. kefiranofaciens* M1 (M1) 以 Lactobacilli MRS 培養液(Difco Laboratories, Detroit, MI) 進行活化繼代，實驗前以 PBS 清洗並調整其濃度至  $10^7$ ,  $10^8$  與  $10^9$  CFU/mL 備用。使菌種熱失活之條件為以恆溫水浴槽加熱  $85^\circ\text{C}$  持續 40 分鐘 (Water bath Model-B403H, Firstek scientific instrument Co. Ltd., Taipei, Taiwan) (Hong et al., In Press)。

### (三) 氣喘小鼠之致敏與抗原吸入

試驗流程如圖示(圖 4-1) 六週齡之 BALB/c 雌鼠購於國立台灣大學實驗



動物中心 (National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)，小鼠氣喘模式之致敏參考 Lee et al. (2007)之方法，試驗一共進行 32 日，第 1 日與第 14 日以腹腔注射 20  $\mu\text{g}$  卵白蛋白(ovalbumin, OVA, Sigma, St. Louis, MO)與 20 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (aluminum hydroxide, Sigma)，其注射總體積為 200 $\mu\text{L}$ ，並於第 28, 29 與 30 日將小鼠置於 ultrasonic nebulization (Aerogen Ireland Ltd, Galway, Ireland)中 20 分鐘，給予小鼠吸入 OVA 粉塵 (1% OVA 溶於 PBS 溶液)造成呼吸道過敏，第 31 日進行呼吸道阻力之測試，第 32 日犧牲小鼠並分離脾臟細胞、支氣管沖洗液與血清。

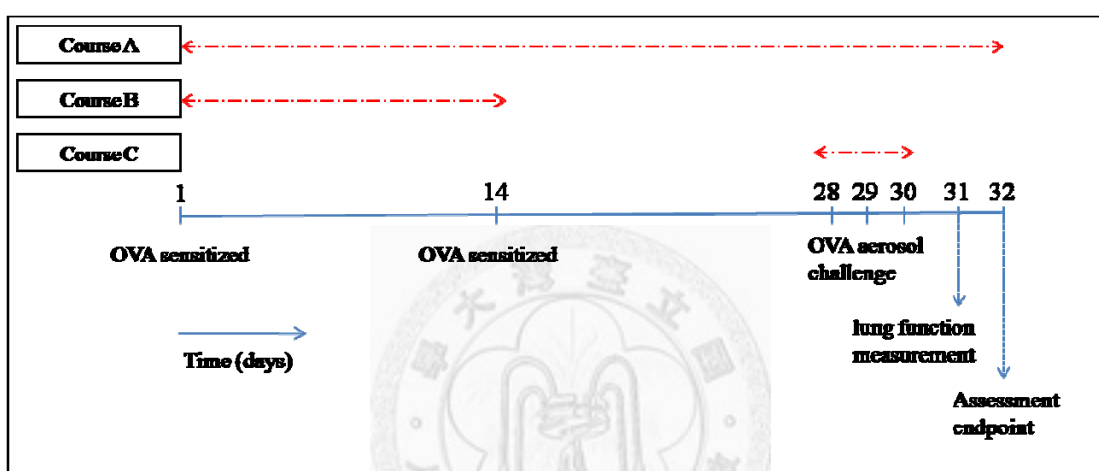


圖 4-1 氣喘小鼠致敏流程圖。

Fig. 4-1 The experimental design of OVA-induced asthma.

#### (四) 乳酸菌餵食之不同處理組

不同餵食處理分為三組，餵食菌數濃度每日每隻小鼠為  $10^8$  CFU/mL，以管餵方式餵食總體積 200  $\mu\text{L}$ 。(1) 試驗全程 32 日每日餵食(course A)；(2) 由第 1 日至第 14 日連續餵食 14 日(course B) 與(3) 第 28, 29 與 30 日，在小鼠粉塵吸入前一小時餵食菌株 (course C)。正控制組為餵食 200  $\mu\text{L}$  PBS 之 OVA 氣喘小鼠(positive control, PC)，負控制組為餵食 200  $\mu\text{L}$  PBS 之 PBS 致敏與吸入之小鼠(negative control, NC)。

#### (五) 呼吸道阻力測試

於最後一次吸入OVA粉塵後24小時，將自然呼吸的小鼠置放於全身性體積掃描計量機 (whole body plethysmography) (Buxco WBP, Buxco. Electronics, Wilmington, NC)的艙室中，靜置5分鐘待小鼠平靜後，以漸高濃度(12.5, 25與50 mg/mL)之甲基膽素(methacholine, Sigma)使小鼠產生呼吸道過敏反應現象(airway hyperresponsiveness)，儀器將測定enhanced pause (Penh)作為呼吸道阻礙 (airway obstruction) 之指標 (Peak et al., 1987)。

#### (六) 支氣管沖洗液之取得與肺臟切片

支氣管沖洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BAL)之取得方法參考Forsythe et al. (2007)，將1 mL PBS 經由氣管(tracheal cannulation)灌入呼吸道中反覆沖洗獲得BAL，同樣步驟重複三次，所獲得支氣管沖洗液再以200 x g 離心15 分鐘，取上清液保存於-80°C冰箱，以待後續測定細胞激素。

肺臟則以10% 福馬林 (formalin, Wako, Chuo-Ku, Osaka, Japan)溶液固定24小時，接著以石蠟包埋，樣品切片後再以hematoxylin與eosin (IMEB Inc., San Marcos, CA)進行免疫細胞的染色；切片另外以periodic acid-Schiff (PAS) (IMEB Inc., San Marcos, CA)進行高腳杯細胞 (goblet cell)與黏液 (mucus)的染色。

#### (七) 脾臟細胞之分離與CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節型T細胞之分析

於無菌操作台中分離脾臟細胞(方法同前述)， trypan blue染色計數調整脾臟細胞數至 $1 \times 10^7$  cells/mL，取1 mL之細胞懸浮液(RPMI 1640中添加10 % FBS與1 % 抗生素(100 U/mL penicillin與100  $\mu$ g/mL streptomycin, Sigma)於24 well培養盤，再加入已通過0.22  $\mu$ m無菌濾膜的OVA溶液進行刺激，使細胞培養液最終OVA濃度為100 mg/mL，於37°C細胞培養箱(Revco, Santa Fe Springs, CA)培養48小時後，以8000 rpm離心3分鐘去除脾臟並搜集上清液，保存於-80°C冰箱以待細胞激素測定。

未與OVA共培養之脾臟細胞則取 $5 \times 10^6$  cells/mL的細胞數進行染色，使用anti-mouse PE-CD4 antibody (clone GK1.5)、anti-mouse FITC-CD25 antibody (clone 7D4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA)於4°C進行避光染色，以4 mL PBS清洗兩次以洗去細胞上多餘染劑，最終以1 mL PBS懸浮細胞，經70  $\mu$ m Nylon cell strainer

(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)過濾打散細胞後，隨即以流式細胞儀(EPICS XL flow cytometer, Beckman Coulter, Fullerton, CT)分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節型T細胞。

#### (八) 血清

第32日犧牲小鼠，以臉頰採血並分離血清，將血液置於採血管(BD Microtainer Chemistry Tubes, BD, Franklin Lakes, NJ)以6000 x g離心90秒後取得血清，保存於-80°C並測量總IgE (mouse IgE ELISA set, BD)以及OVA-specific IgE (DS mouse IgE ELISA OVA, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)之濃度。

#### (九) 細胞激素測定

本試驗以酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunoassay, ELISA)進行。使用小鼠細胞激素測定套組 (mouse cytokine kit, R&D system, Mckinley, MN)測量TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-5, IL-17, IL-17F, CCL-20與IL-13之濃度。

#### (十) 統計分析

以 SAS 套裝軟體進行變方分析，再以鄧肯式多變域測定法(Duncan's New Multiple Range Test)測定各試驗值間之顯著差異，所有試驗皆進行三重複測定後繪圖。

### 三、結果

#### (一) 熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 以不同餵食處理對於氣喘小鼠之影響

試驗首先以三種不同餵食處理進行，氣喘小鼠犧牲後，脾臟細胞分泌之細胞激素結果顯示，以全程餵食菌株(course A)之組別，可顯著抑制其 Th2 細胞激素 (IL-4 與 IL-13) 與前發炎反應細胞激素 (IL-6 與 TNF- $\alpha$ ) (圖 4-2)，另外兩組餵食流程亦能夠顯著降低 IL-6 與 TNF- $\alpha$ ，然而對於 IL-4 與 IL-13 的分泌則無顯著抑制效果。

支氣管沖洗液中亦有相似之結果，全程餵食(course A)之組別可顯著減低氣喘小鼠呼吸道中的前發炎反應細胞激素 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CCL20) 與 Th2 細胞激素 (IL-5 and IL-13) 之分泌；相較之下，另外兩餵食處理組則無法降低氣喘小鼠呼吸道之前發炎反應與 Th2 之細胞激素 (圖 4-3)。

此外，試驗中亦測定不同餵食處理組，對於氣喘小鼠脾臟中調節型 T 細胞數量之影響。結果顯示，全程餵食之處理組，其脾臟中調節型 T 細胞數量顯著提升，反觀其他兩個處理組則與正控制組無顯著差異 (圖 4-4)。

此部分結果得知，於三個餵食處理組中，僅有全程餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著抑制氣喘脾臟與支氣管沖洗液中前發炎反應與 Th2 之細胞激素，同時提升脾臟中調節型 T 細胞之數量。

#### (二) 不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於氣喘小鼠脾臟與之支氣管沖洗液之細胞激素分泌之影響

上述試驗證實，全程餵食熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著改善氣喘小鼠前發炎反應與 Th2 之細胞激素分泌，因此試驗採用全程餵食之模式，接續探討不同劑量之菌株對於氣喘小鼠之影響。試驗結果顯示氣喘小鼠脾臟細胞所分泌的高量 Th2 (IL-4, IL-5 and IL-13) 與前發炎反應 (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) 細胞激素，在每日餵食  $10^8$  與  $10^9$  CFU *Lb. kefiranofaciens* M1 的劑量下可顯著抑制 (圖 4-5)，而餵食 *Lb. kefiranofaciens* M1 發酵乳之氣喘小鼠，與正控制組相比則無顯著差異。試驗亦觀察餵食 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於支氣管沖洗液中的 Th17 細胞激素之影響 (圖 4-6)，結果顯示每日餵食  $10^7$ ,  $10^8$  與  $10^9$  CFU 可顯著抑制 IL-17

之分泌，但對於 IL-17F，則只有  $10^9$  CFU 之組別顯著低於正控制組。

### (三) 不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於氣喘小鼠血清中 OVA-specific IgE 之影響

此部分試驗探討不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於氣喘小鼠血清中 OVA-specific IgE 之影響(圖 4-7)，與負控制組相較之下，正控制組之 OVA-specific IgE 顯著上升，而每日餵食  $10^7$  CFU 以上的 *Lb. kefiranofaciens* M1 可顯著抑制 OVA-specific IgE 之含量，餵食 *Lb. kefiranofaciens* M1 發酵乳之組別，氣喘小鼠血清中的 OVA-specific IgE 則與正控制組無顯著差異。

### (四) 不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於氣喘小鼠肺臟切片之影響

為觀察氣喘小鼠呼吸道過敏的嚴重程度，此部分試驗探討不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於肺臟中免疫細胞浸潤情況是否有所改善。染色結果指出，與正控制組相比之下，*Lb. kefiranofaciens* M1 發酵乳與  $10^7$  CFU 之組別並無法顯著改善免疫細胞浸潤於呼吸道(圖 4-8C 與 8D)，然而每日餵食濃度提升至  $10^8$  與  $10^9$  CFU 時，則可顯著改善免疫細胞浸潤呼吸道(主要是單核球)(圖 4-8E 與 8F)。試驗亦以 PAS 染色觀察高腳杯細胞分泌黏液之情形，結果顯示正控制組之氣喘小鼠，其呼吸道充滿黏液(圖 4-9A)，而餵食不同劑量之 *Lb. kefiranofaciens* M1 均可減少氣喘小鼠呼吸道中黏液之分泌(圖 4-9D,9E 與 9F)，其中又以每日餵食  $10^9$  CFU 之組別改善程度最為顯著(圖 4-9F)。

### (五) *Lb. kefiranofaciens* M1 對於氣喘小鼠肺功能之影響

試驗以不同濃度之甲基膽素刺激氣喘小鼠，與正控制組相比，餵食  $10^9$  CFU 之 *Lb. kefiranofaciens* M1 小鼠，於甲基膽素濃度 25 與 50mg/mL 之下，可顯著改善 Penh 值之上升(圖 4-10)，緩和其呼吸道阻力。

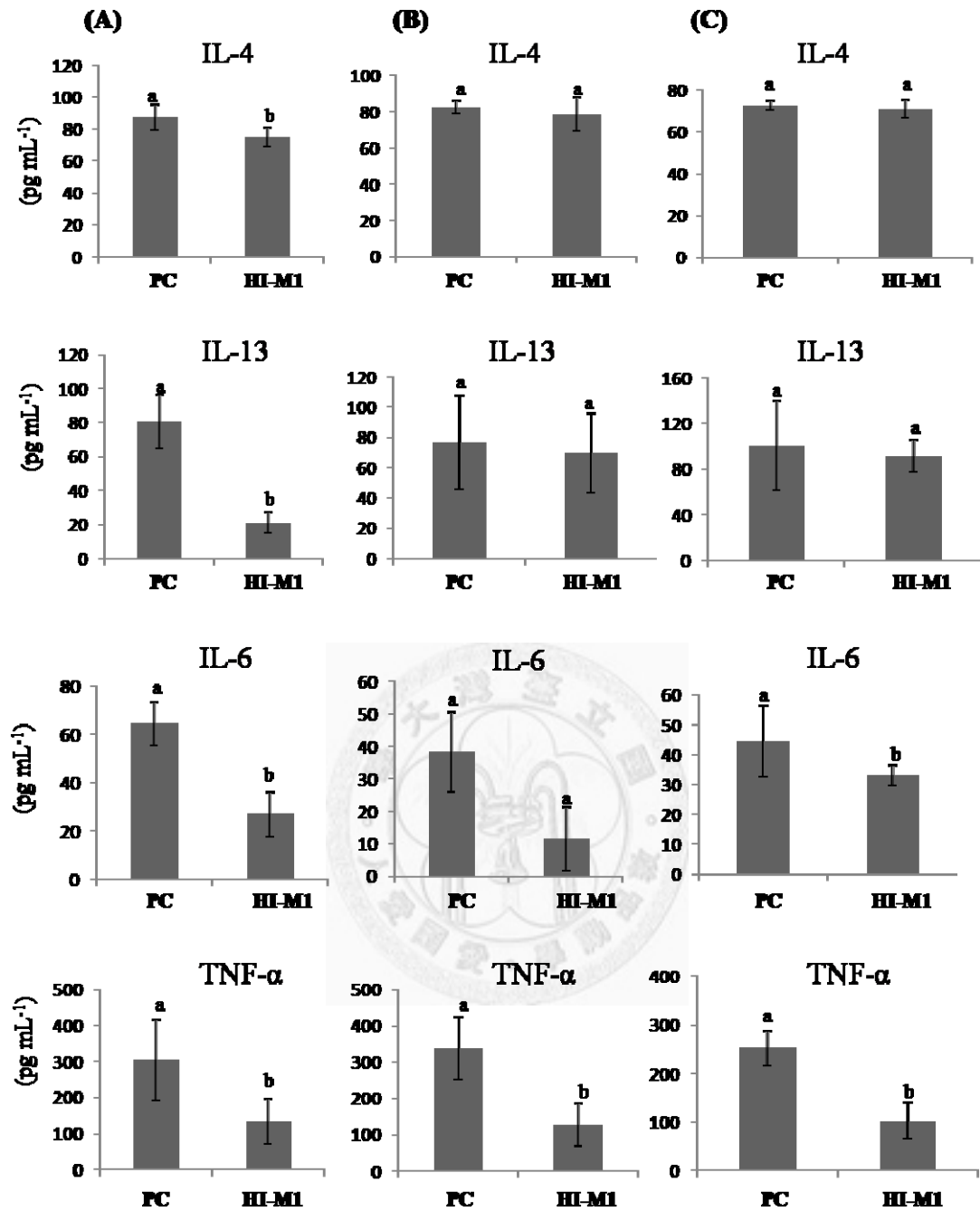


圖 4-2 熱失活 *Lb. kefirifaciens* M1 之不同餵食處理對於 OVA 氣喘小鼠脾臟細胞激素分泌之影響。

Fig. 4-2 Effects of the different feeding procedures of heat-inactivated *Lb. kefirifaciens* M1 (HI-M1) on cytokines in splenocytes of OVA-sensitized mice after OVA challenge.

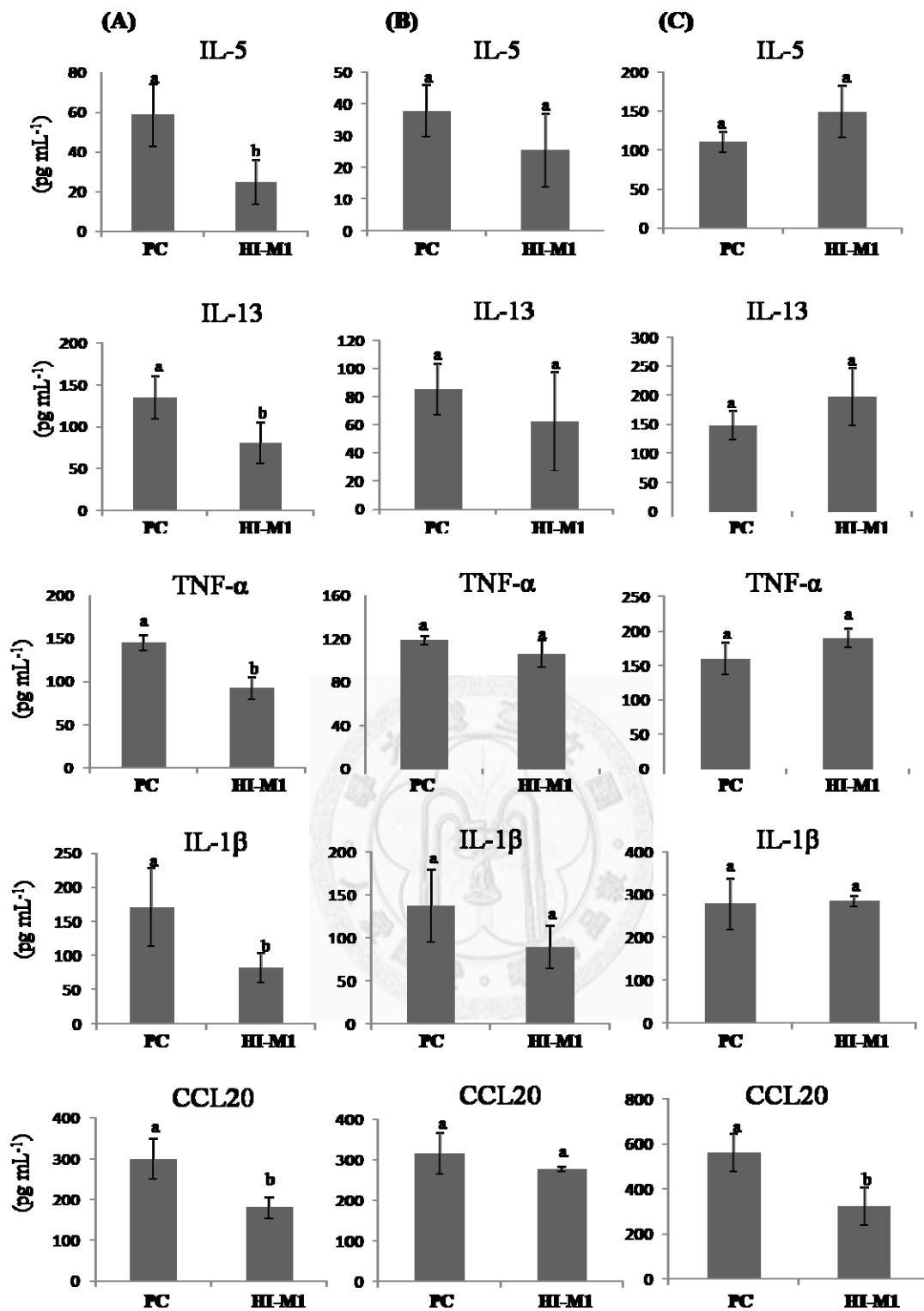


圖 4-3 熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 之不同餵食處理對於 OVA 氣喘小鼠支氣管沖洗液細胞激素分泌之影響。

Fig. 4-3 Effect of the different feeding procedures of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 (HI-M1) on cytokine level in BAL fluid of OVA-sensitized mice after OVA challenge.

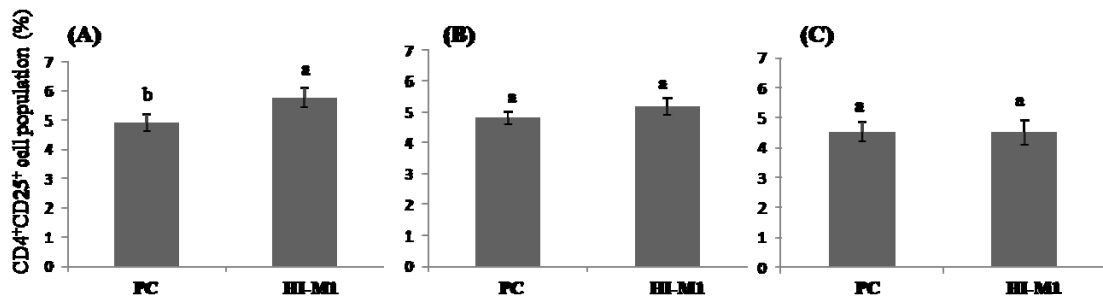
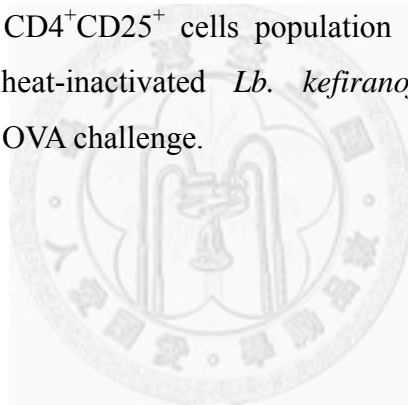


圖 4-4 熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 之不同餵食處理對於 OVA 氣喘小鼠脾臟調節型 T 細胞之影響。

Fig. 4-4 Analysis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells population in splenocytes in different feeding procedures of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 (HI-M1) in OVA-sensitized mice after OVA challenge.





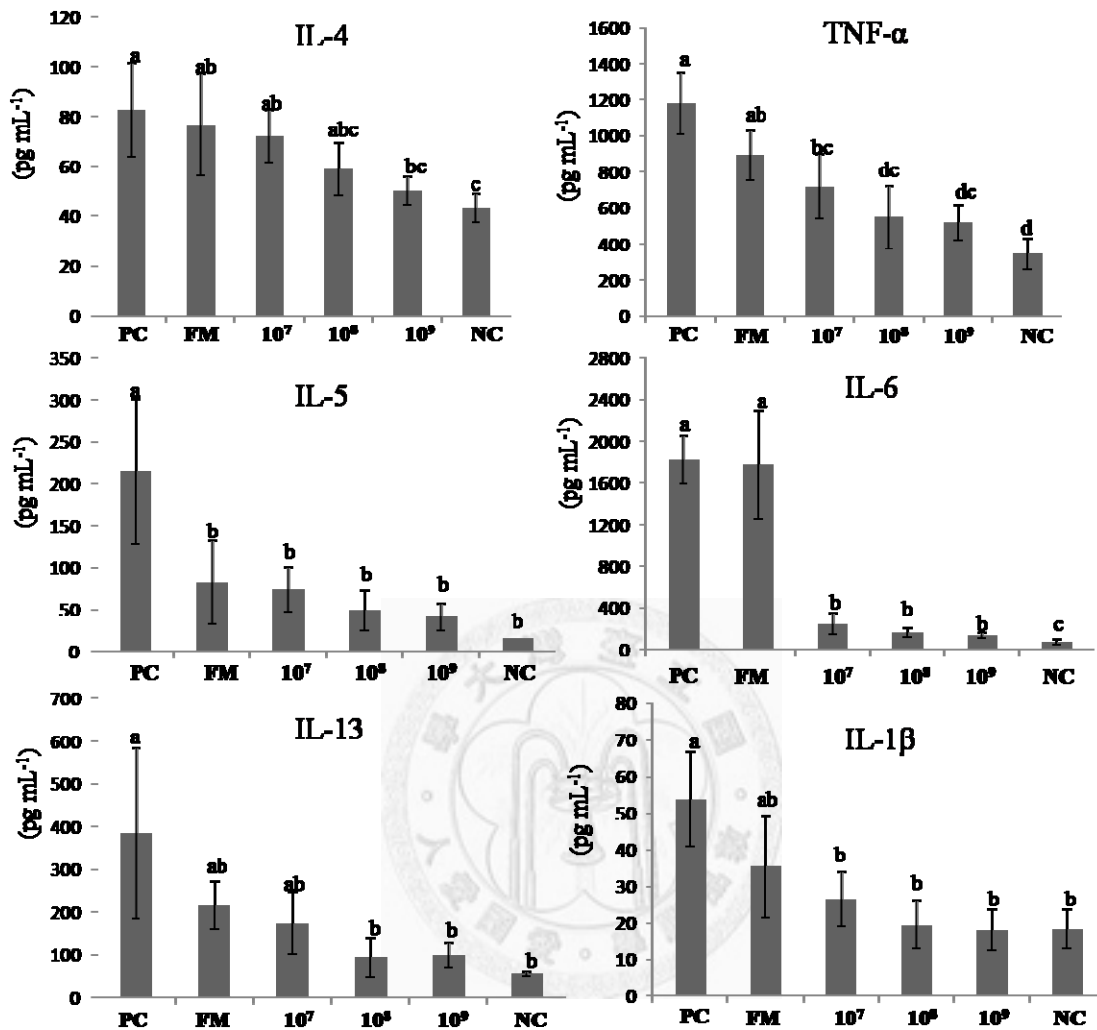


圖 4-5 不同劑量之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠支氣管沖洗液細胞激素分泌之影響。

Fig. 4-5 Effect of oral administration of different dosages of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on cytokine secretion BAL fluids of OVA-sensitized mice after OVA challenge.

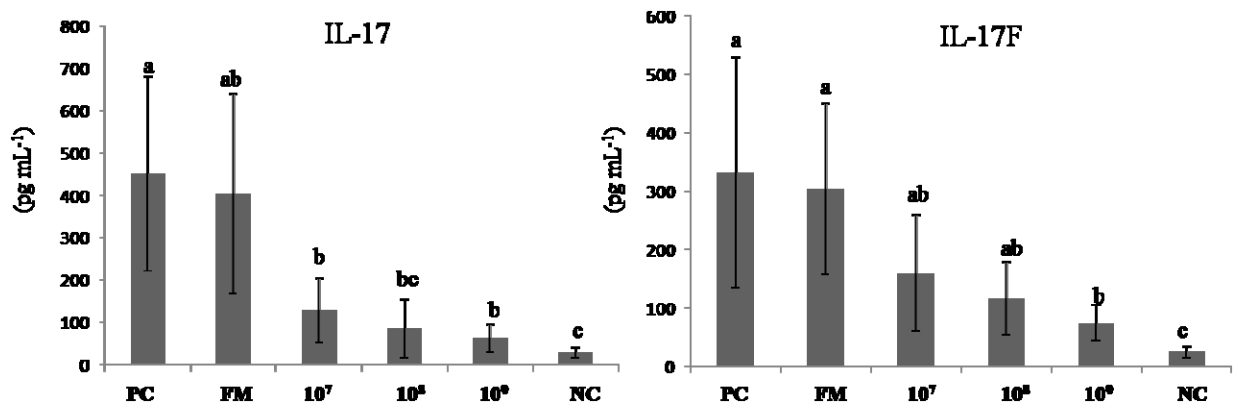


圖 4-6 不同劑量之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠支氣管沖洗液 Th17 細胞激素分泌之影響。

Fig 4-6 Effect of different dosages of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on Th17 cytokine secretion in BAL fluid of OVA-sensitized mice after OVA challenge.

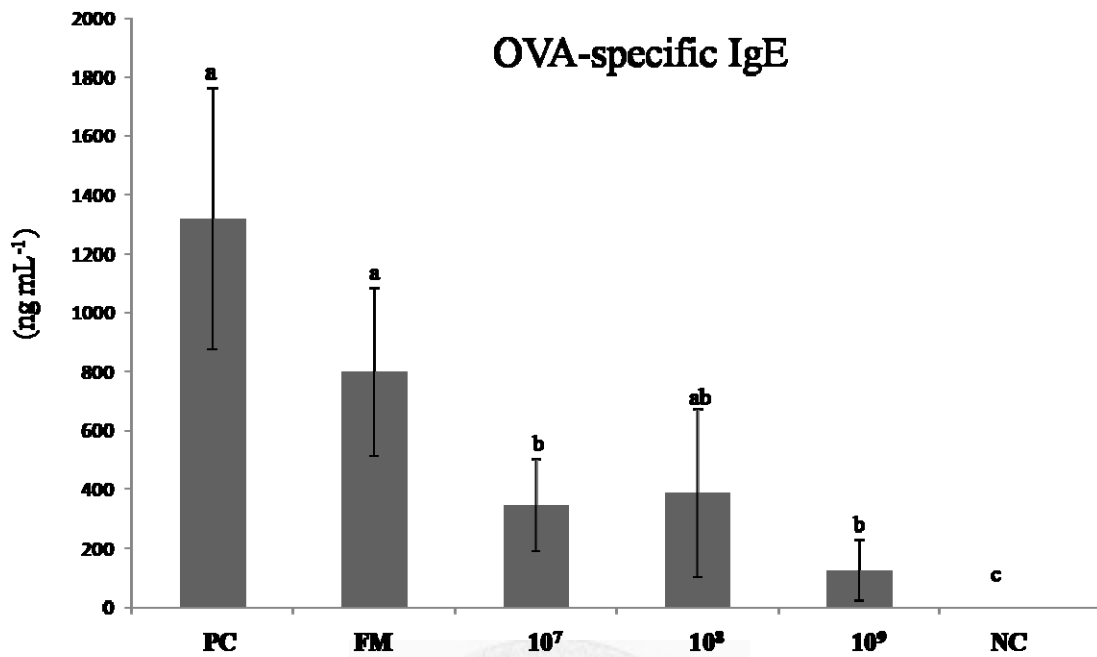


圖 4-7 不同劑量之熱失活 *Lb. kefirifaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠血清中 OVA-specific IgE 之影響。

Fig. 4-7 Effect of oral administration of different dosages of heat-inactivated *Lb. kefirifaciens* M1 on OVA-specific IgE productions in OVA-sensitized mice after OVA challenge.

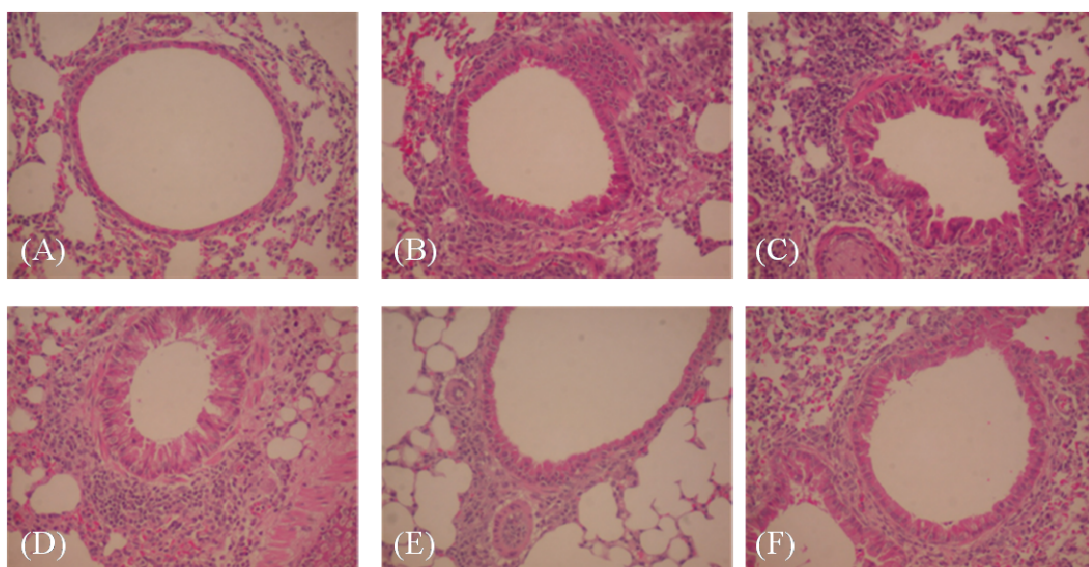


圖 4-8 不同劑量之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠肺部免疫細胞浸潤之影響。

Fig. 4-8 Effect of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on lung tissue inflammatory cells infiltrated in OVA-sensitized mice after OVA challenge. Representative sections of lung tissue from (A) negative control, (B) positive control, (C) *Lb. kefiranofaciens* fermented milk-treated group, (D)  $10^7$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group, (E)  $10^8$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group, (F)  $10^9$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group.

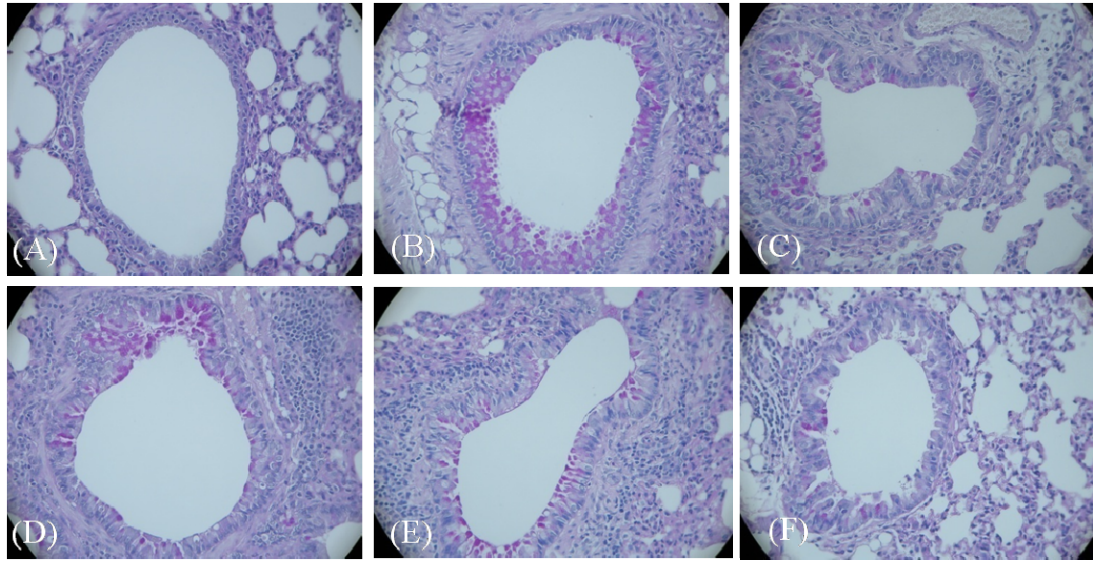


圖 4-9 不同劑量之熱失活 *Lb. kefiranofaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠肺部黏液分泌之影響。

Fig. 4-9 Effect of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 on mucus production in OVA-sensitized mice after OVA challenge. Representative sections of lung tissue from (A) negative control, (B) positive control, (C) *Lb. kefiranofaciens* fermented milk-treated group, (D)  $10^7$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group, (E)  $10^8$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group, (F)  $10^9$  CFU/daily/mouse of heat-inactivated *Lb. kefiranofaciens* M1 treated group.

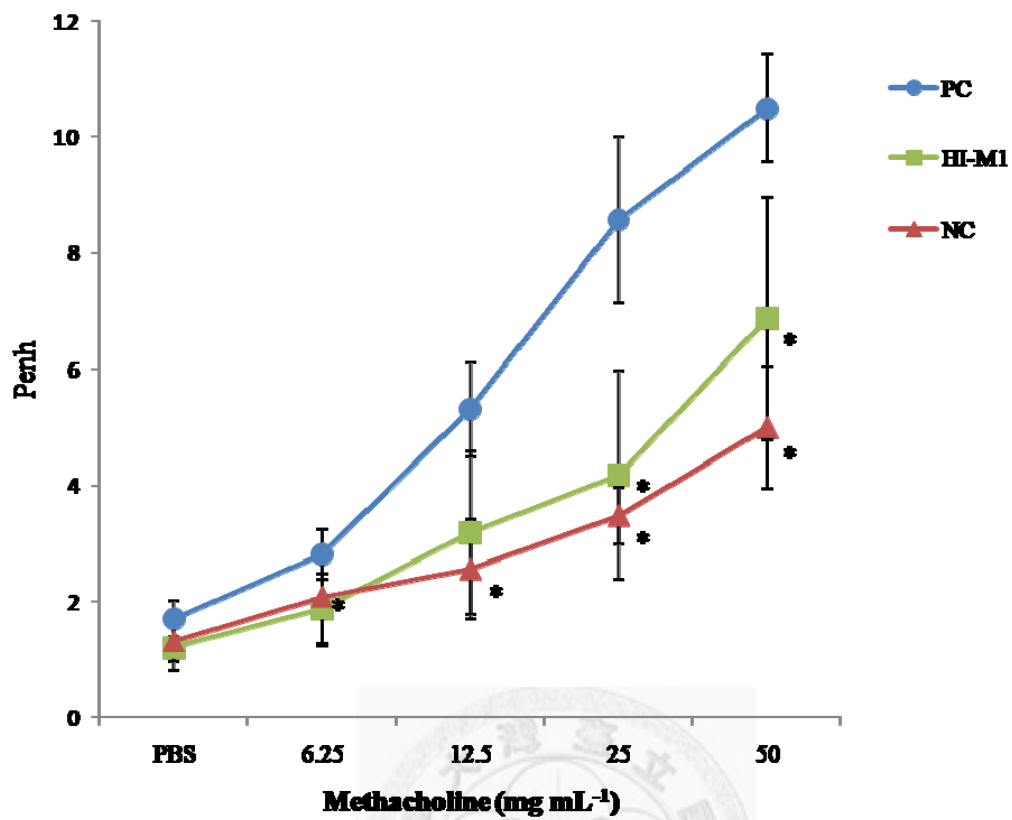


圖 4-10 熱失活 *Lb. kefirifaciens* M1 對於 OVA 氣喘小鼠肺功能之影響。

Fig. 4-10 Effect of heat-inactivated *Lb. kefirifaciens* M1 (HI-M1) on the airway response in OVA-sensitized mice as expressed by Penh.

#### 四、討論

此部分試驗以OVA致敏與吸入之氣喘小鼠進行，探討熱失活之*Lb. kefiranofaciens* M1是否可改善氣喘小鼠各方面的表現，餵食菌株之氣喘小鼠，其脾臟細胞與支氣管沖洗液的Th2 (IL-4, IL-5與IL-13)與前發炎反應(IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 與CCL20)細胞激素均可顯著降低，同時支氣管沖洗液的Th17細胞激素亦在餵食*Lb. kefiranofaciens* M1之後顯著降低，試驗證實全程餵食(圖4-2與4-3)與高劑量的投予菌株(圖4-5與4-6)，其改善效果越佳；同時高劑量的*Lb. kefiranofaciens* M1能夠提升氣喘小鼠脾臟中調節型T細胞數量(圖4-4)，進行細胞激素之調節。

在呼吸道過敏個體的致病機制中，過量增生的CD4<sup>+</sup> T細胞大量分泌Th2細胞激素是為主因 (Wills-Karp et al., 1998)，而在動物試驗與人類臨床上，氣喘反應亦由於過量的Th2 (IL-4, IL-5與IL-13)細胞激素所引發 (Yssel and Groux, 2000)。Robinson et al. (1993)研究發現氣喘個體支氣管沖洗液中的淋巴細胞，其IL-4 與IL-5的mRNA表現均顯著提升，而IL-4與IL-5對於呼吸道中免疫細胞的浸潤與嗜酸性球之活化佔有關鍵的地位；而另一種Th2細胞激素-IL-13，其與IL-4使用同一細胞激素受器，對於引發呼吸道發炎與氣喘反應甚為重要(Wills-Karp et al., 1998; Wong et al., 2001)。IL-13或IL-4在氣喘個體中更能與 TNF- $\alpha$ 進行協同作用，進而活化嗜酸性球 (Luttmann et al., 1999)。此外，氣喘個體之支氣管沖洗液中亦發現顯著提升的TNF- $\alpha$  (Cembrzynska-Norvak et al., 1993), IL-1 $\beta$  (Borish et al., 1992) 以及 IL-6 (Gosset et al., 1992)等前發炎反應的細胞激素，這些前發炎反應細胞激素也會與呼吸道的上皮細胞作用，進而加劇局部發炎反應 (Haworth et al., 1991)。

Th17細胞所分泌的IL-17，可刺激支氣管上皮細胞釋放前發炎反應因子，如IL-6 與 CCL2 (Traves and Donnelly, 2008)，IL-17亦能夠誘發CXC chemokines、IL-1 $\beta$ 與 TNF- $\alpha$ 分泌，進而吸引大量嗜中性球聚集 (Ferretti et al., 2003)。近期研究指出，IL-17與氣喘反應息息相關，Laan et al. (2002) 報告證實，當大量嗜中性球聚集於人類氣管中產生發炎反應時，大量的IL-17亦伴隨於其中；而令小鼠肺臟過量表現IL-17F亦趨化嗜中性球的聚集 (Oboki et al., 2008)。在OVA致敏的氣喘小鼠試驗中，氣喘小鼠肺部的均質液可測得大量表現的IL-17與IL-17F之mRNA與其蛋白質 (Alcorn et al., 2010)。Acosta-Rodriguez et al. (2007)指出IL-6可引發

IL-17之分泌，同時IL-6又可抑制調節型T細胞之分化增生，此動作亦降低調節型細胞抑制Th17細胞，因而對T17細胞之發展有所助益(Traves and Donnelly, 2008)。調節型T細胞在體內作用為抑制effector T細胞之增生與細胞激素之分泌，亦可抑制毒殺型T細胞之增生(Joetham et al., 2007)。近年有許多研究指出乳酸菌細胞壁之成分或其代謝物質可提升調節型T細胞之作用，進而抑制過度Th1或Th2之反應 (Karimi et al., 2009)。Feleszko et al. (2007) 指出給予氣喘個體*Lb. rhamnosus* GG可增進調節型T細胞之表現，進而改善氣喘反應。Karimi et al. (2009) 也證實*Lb. reuteri*可透過調節型T細胞之作用而減緩呼吸道過敏症狀。上述文獻與我們的試驗結果相符，熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1可顯著降低氣喘小鼠呼吸道中Th17細胞激素之分泌，同時提升調節型T細胞之數量，或許即是此兩因子之作用，進而降低氣喘小鼠體內高量表現的 Th2 與前發炎反應細胞激素。

上述實驗結果證實*Lb. kefiranofaciens* M1確實可改善氣喘個體之細胞激素分泌，因此進一步分析過敏性氣喘小鼠之症狀是否改善。氣喘個體中主要特徵為呼吸道高度反應 (airway hyperresponsiveness, AHR)，臨床症狀為嗜酸性球浸潤、黏液大量分泌與IgE顯著提升 (Wills-Karp et al., 1998)。本試驗後續以不同劑量的熱失活菌株給予氣喘小鼠，結果顯示劑量越高，越可顯著改善血清中OVA-specific IgE之表現、抑制呼吸道發炎反應與AHR之發展 (圖4-7, 4-8, 4-9與4-10)。抗原引發之IgE可引發嗜酸性球、嗜鹼性球與肥大細胞釋放細胞激素，以活化Th細胞偏向Th2反應，並令Th2細胞產生 IL-4, IL-5與IL13 (Wong et al., 2001; Larché et al., 2006)。AHR之表現中，肥大細胞聚集於呼吸道之平滑肌為一重要特徵，可視為氣喘個體之致病機轉(Brightling et al., 2007; Nauta et al., 2008)。

本試驗中氣喘小鼠病徵之改善，其原因為*Lb. kefiranofaciens* M1可減緩脾臟細胞與支氣管沖洗液中前發炎反應 (TNF- $\alpha$ , IL-6與IL-1 $\beta$ )、Th2(IL-4, IL-5與IL13)與Th17(IL-17與IL-17F)細胞激素之高量分泌 (圖4- 5與4- 6)。此免疫抑制之結果與文獻相符。Lim et al. (2009) 指出餵食熱致死的*Lb. casei* 於過敏性氣喘小鼠，由組織切片證實其可減緩肺部免疫細胞聚集與發炎反應，並且降低支氣管沖洗液中Th2與前發炎反應之細胞激素。Forsythe et al. (2007)亦證實管餵活菌株*Lb. reuteri* 可顯著改善氣喘反應與呼吸道發炎反應，而其病徵改善原因與調節型T細胞之作用息息相關 (Karimi et al., 2009)。然而乳酸菌中並非所有菌種均有改善氣



喘之效果，只有特定菌株可達成目的，菌株來源不同或許為其原因，而菌種是否定殖於腸道並存活增生亦為刺激免疫反應之重要因素(Forsythe et al., 2007)。目前文獻指出 Lactobacilli 菌屬中，可改善氣喘反應之菌種已有 *Lb. casei* (Lim et al., 2009)、*Lb. rhamnosus* (Feleszko et al., 2007)、*Lb. acidophilus* (Wheeler et al., 1997) 與 *Lb. reuteri* (Forsythe et al., 2007)，然而在本試驗之前，並無文獻探討克弗爾中 *Lb. kefiranofaciens* 之抗過敏性氣喘的效果。

目前科學界已清楚瞭解，活化狀態之乳酸菌定殖於腸道後可提供宿主不同之機能性，然而部分文獻指出熱失活或熱致死的特定菌株亦具有免疫調節之功效 (Murosaki et al., 1998; Sashihara et al., 2006; Segawa et al., 2008)，此觀點與本研究室之前的研究成果相互吻合，關於 *Lb. kefiranofaciens*，其可改善氣喘的機能性物質，實驗顯示為細胞壁上的 peptidoglycan (PGN) (Huang et al., 2010)，因此熱失活的 *Lb. kefiranofaciens* 亦可刺激免疫細胞分泌細胞激素與調節第一型過敏反應 (Hong et al., 2009)。Chapat et al. (2004) 研究也指出乳酸菌細胞壁上成分可有效抑制小鼠的接觸性皮膚炎 (contact dermatitis)。亦有報告指出乳酸菌細胞壁上 PGN 的總含量，或許為具備機能性與否之關鍵因素 (Shida et al., 2006)。

本研究使用不同餵食時間處理與不同菌種劑量，結果顯示特定的餵食處理與劑量才可顯著改善氣喘小鼠，儘管三種餵食處理組均有文獻證實效果 (Lee et al., 2007; Forsythe et al., 2007; Hougee et al., 2010)，但我們的試驗結果顯示僅有全程餵食之處理 (course A，餵食32日)(圖4-2, 4-3與4-4)與高劑量 *Lb. kefiranofaciens* M1 之投予(圖4-5-圖4-9)才可顯著降低氣喘小鼠之 Th2 與前發炎反應細胞激素，並提升脾臟中調節型 T 細胞數量。此結果使我們瞭解欲令 *Lb. kefiranofaciens* M1 達到最佳改善氣喘之功效，需要每日連續服用同時菌數達到  $10^8$  CFU 以上，且最好在接觸過敏原之前即開始服用。已有許多研究指出，對於改善第一型過敏反應之疾病，除菌株的挑選外，服用菌株的時間與劑量亦為是否達到成效之主因 (Osborn and Sinn, et al., 2007; Lee et al., 2009)。此外，值得注意的是，*Lb. kefiranofaciens* M1 發酵乳並無法改善氣喘小鼠之細胞激素分泌與症狀(圖4-5-圖4-9)，此結果說明發酵乳中的代謝物質並不具備抗氣喘之功效，同時發酵乳中的菌數僅達  $10^6$  CFU，其低含量菌數亦無法對氣喘小鼠有所助益。

綜合上述，本部分研究證實克弗爾中的熱失活*Lb. kefiranofaciens* M1可降低氣喘小鼠AHR反應、改善呼吸道中免疫細胞之浸潤發炎，同時降低血清中特異性IgE表現，這些症狀之改善可歸功於*Lb. kefiranofaciens* M1抑制氣喘小鼠脾臟與支氣管沖洗液中Th2、前發炎反應與Th17細胞激素，而提升脾臟細胞中調節型T細胞數量對於調節細胞激素之分泌亦甚為重要，這些結果顯示克弗爾中的乳酸菌-*Lb. kefiranofaciens* M1對於氣喘疾病有所助益，此部分實驗為首篇證實*Lb. kefiranofaciens* M1抗氣喘機能性之研究。



## 第五章 結論

一、牛乳克弗爾上層液、單一乳酸菌及其發酵上層均可促進免疫調節，分泌細胞激素以調節細胞免疫反應，進而促進抗腫瘤以及抗感染之機能性；且由於能夠提升 Th1 細胞激素，亦具有改善第一型過敏反應之潛能，並證實克弗爾上層液與其分離之菌株藉由 TLR2 刺激細胞激素分泌。

二、克弗爾分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1 以熱失活形式仍可誘導免疫細胞產生 Th1 與前發炎反應之細胞激素；於動物實驗中，餵食熱失活菌株亦能夠改善 OVA 過敏小鼠以下症狀：

1. 顯著提升脾臟細胞中 Th1 細胞激素 (IL-12)，降低 Th2 細胞激素 (IL-5) 之分泌。
2. 提升脾臟中調節型 T 細胞之數量。
3. 令血中之 OVA-specific IgE 顯著降低。
4. RNA 基因微陣列晶片分析之結果顯示，OVA 過敏小鼠餵食菌株後，其 Peyer's patch 之補體的基因表現俱顯著下降，同時顯著提升 *Ifnr*、*Cd2*、*Cd3*、*Cd28*、*Stat4* 與 *Ccr7* 基因之表現。

三、每日以  $10^8$  CFU 菌數之 *Lb. kefiranofaciens* M1 餵食 OVA 誘發之氣喘小鼠，可改善以下症狀：

1. 小鼠脾臟與支氣管沖洗液中之前發炎反應、Th2 及 Th17 細胞激素顯著下降。
2. 顯著降低由 methacholine 所誘發的  $P_{enh}$  值，減少呼吸困難現象。
3. 肺臟切片中免疫細胞之浸潤以及黏液分泌顯著減少。
4. 血清中之 OVA-specific IgE 亦顯著下降。

綜合上述，本實驗為首篇研究探討克弗爾上層液與分離菌株對於誘導細胞激素分泌之影響，並證實可提升Th1反應；後續動物試驗證實自克弗爾粒分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1可改善第一型過敏反應與氣喘，亦為首篇釐清克弗爾乳酸菌影響腸道免疫系統基因變化之研究，希望本研究有助於抗過敏克弗爾發酵乳的開發，並可利用其分離菌株 *Lb. kefiranofaciens* M1開發機能性發酵乳產品。



## 參考文獻

- 彭瑄第。2003。乳酸菌發酵乳對降低過敏反應之影響。國立中興大學食品科學所碩士論文。
- 劉雨如。2003。益生菌與其發酵乳抗氧化能力和免疫功能之探討。中興大學畜產學研究所碩士論文。
- Aattouri, N., and Lemonnier, D. (1997). Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus*: role of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 8:25-31.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunology* 8:639-646.
- Adolfsson, O., Meydani, S. N., and Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:245-256.
- Alcorn, J. F., Crowe, C. R., and Kolls, J. K. (2010). TH17 cells in asthma and COPD. *Annual Review of Physiology* 72:495-516.
- Andrew, J., and Versalovic, J. (2003). Lactobacillus rhamnosus GG decrease TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology* 5:277-285.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C. A., Liew, F. Y., and Moncada, S. (1994). Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology* 24:672-676.
- Barczyk, A., Pierzchala, W., and Sozanska, E. (2003). Interleukin-17 in sputum

- correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory Medicine* 97:726-733.
- Bogdanov, I. G., Dalev, P. G., Gurevich, A. I., Kolosou, M. N., Malékova, V. P., Plemyannikova, L. A., and Sorokina, I. B. (1975). Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters* 57:259-261.
- Borish, L., Mascali, J. A., Beam, W. R., Martin, R. J., and Rosenwasser, L. J. (1992). Detection of alveolar macrophage-derived interleukin 1~3 in asthma: inhibition with corticosteroids. *Journal of Immunology* 149:3078-82.
- Brightling, C. E., Bradding, P., Symon, F. A., Holgate, S. T., Wardlaw, A. J., and Pavord, I. D. (2003). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *The New England Journal of Medicine* 346:1699-1705.
- Brockhausen, I., Vavasseur, F., and Yang, X. (2001). Biosynthesis of mucin type 1-glycans: Lack of correlation between glycosyltransferase and sulfotransferase activities and CFTR expression. *Glycoconjugate Journal* 18:685-697.
- Brown, M. H., Cantrell, D. A., Brattsand, G., Crumpton, M. J., and Gullberg, M. (1989). The CD2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* 339:551-553.
- Cembrzynska-Norvak, M., Szklarz, E., Inglot, A. D., and Teodorczyk-Injeyan, J. A. (1993). Elevated release of TNF- $\alpha$  and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *The American Review of Respiratory Disease* 147:291-295.
- Chapat, L., Chemin, K., Dubois, B., Bourdet-Sicard, R., and Kaiserlian, D. (2004). *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *The European Journal of Immunology* 34:2520-2528.
- Chen, H. C., Wang, S. Y., and Chen, M. J. (2007). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent

- methods. *Food Microbiology* 25:492-502.
- Chen, M. J., Liu, J. R., Sheu, J. F., Lin, C. W., and Chuang, C. L. (2006). Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 19:905-908.
- Christensen, H. R., Frøkiær, H., and Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology* 168:171-178.
- Cross, M. L., Ganner, A., Teilab, D., and Fray, L. M. (2004). Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 42:173-180.
- Cross, M. L., Mortensen, R. R., Kudsk, J., and Gill, H. S. (2002). Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Medical Microbiology and Immunology* 191:49-53.
- Cyrille, H., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 117:696-702.
- de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., and Perdigon, G. (2006). Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine* 34:1-8.
- Diaz-Guerra, M. J. M., Bodelon, O. G., Velasco, M., Whelan, R., Parker, P. J., and Bosca, L. (1996). Up-regulation of protein kinase C- $\epsilon$  promotes the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells. *Journal of Biological Chemistry* 271:32028-32033.
- Dinarello, C. A. (1987). The biology of interleukin 1 and comparison to tumor

necrosis factor. *Immunology letters* 16:227-231.

Drouin, S. M., Corry, D. B., Kildsgaard, J., and Wetsel, R. A. (2001). Cutting edge: the absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *Journal of Immunology* 167:4141-4145.

Farnworth, E. R., and Mainville, I. (2003). Kefir: a fermented milk product. In E. R. Farnworth (Ed), *Handbook of Fermented Functional Foods* (pp. 77-112). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M., and Arditi, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275:11058-11063.

Fearon, D. T., and Carroll, M. C. (2000). Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annual Review of Immunology* 18:393-422.

Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R. D., Steinhausen, S., Avagyan, A., Jaudszus, A., Ahrens, B., Groneberg, D. A., Wahn, U., and Hamelmann, E. (2006). Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 37:498-505.

Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E., and Trifilieff, A. (2003). IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *Journal of Immunology* 170: 2106-2112.

Fink, L. N., Zeuthen, L. H., Christensen, H. R., Morandi, B., Frøkiær, H., and Ferlazzo, G. (2007). Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent



- dendritic cell-mediated NK cell responses. *International Immunology* 19:1319-1327.
- Forsythe, P., Inman, M. D., and Bienenstock, J. (2007). Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175:561-569.
- Fujiwara, D., Wakabayashi, H., Watanabe, H., Nishida, S., and Iino, H. (2005). A double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in Patients with Pollen Allergy. *Allergology International* 54:143-149.
- Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T. (2004). The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *International Archives of Allergy and Immunology* 135:205-215.
- Galdeano, C. M., and Perdigón, G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:219-226.
- Giacinto, C. D., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W., and Boirivant, M. (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- $\beta$ -bearing regulatory cells. *Journal of Immunology* 174:3237-3246.
- Goldin, B. R., Gualtieri, L. J., and Moore, R. P. (1996). The effects of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutrition and Cancer* 25: 197-204.
- Goldin, B. R., and Gorbach, S. L. (1977). Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine. *Cancer* 40:2421-2426.

- Goodrich, M. E., and McGee, D. W. (1999). Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion: enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF-beta on IgA+ B cells. *Immunology Letters* 67:11-14.
- Gosset, P., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Joseph, M., Capron, A., and Tonnel, A. B. (1992). Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE dependent stimulation. *The American Review of Respiratory Disease* 146:768-74.
- Gröne, A., Frisk, A. L., and Baumgärtner, W. (1998). Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65:11-27.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M. A., Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2000). Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47:79-87.
- Hart, A. L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M. A., Knight, S. C., and Stagg, A. J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53:1602-1609.
- Hattaka, K., Savilhati, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M., and Korpela, R. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *British Medical Journal* 322:1318-1327.
- Hawlish, H., Wills-Karp, M., Karp, C. L., and Köhl, J. (2004). The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. *Molecular Immunology* 41:123-131.
- Hessle, C., Andersson, B., and Word, A. E. (2000). Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria

preferentially stimulate IL-10 production. *Infection and Immunity* 68:3581-3586.

Hidemura, A., Saito, H., Fukatsu, K., Matsuda, T., Kitayama, J., Keda, S., Kang, W., and Nagawa, H. (2003). Oral administration of *Bifidobacterium longum* culture condensate in a diet-restricted murine peritonitis model enhances polymorphonuclear neutrophil recruitment into the local inflammatory site. *Nutrition* 19:270-274.

Hirayama, K., and Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection* 2:681-686.

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a toll-like receptor 2 pathway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117:696-702.

Hong, W. S., Chen, H. C., Chen, Y. P., and Chen, M. J. (2009). Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophages. *International Dairy Journal* 19:244-251.

Hougee, S., Vriesema, A. J. M., Wijering, S. C., Knippels, L. M. J., Folkerts, G., Nijkamp, F. P., Knol, J., and Garssen, J. (2010). Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International Archives of Allergy and Immunology* 151:107-117.

Huang, L. Y., Krieg, A. M., Eller, N., and Scott, D. E. (1999). Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. *Infection and Immunity* 67:6257-6263.

Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Hirata, H., Nishimura, A., Kajimoto, O., and Fujiwara, S. (2005). Clinical effects of *Lactobacillus*

- acidophilus* Strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dairy Science* 88:527-533.
- Jarvinen, K. M., Makinen-Kiljunen, S. M., and Suomalainen, H. (1999). Cow's milk challenge through human milk evokes immune responses in infants with cow's milk allergy. *The Journal of Pediatrics* 135:506-512.
- Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y. H., Dakhama, A., and Gelfand, E. W. (2007). Naturally occurring lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 Induction of TGF- $\beta$ . *The Journal of Immunology* 178:1433-1442.
- Kang, H., Myung, E. J., Ahn, K. S., Eom, H. J., Han, N. S., Kim, Y. B., Kim, Y. J., and Sohn, N. W. (2009). Induction of Th1 cytokines by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (KCTC 3100) under Th2-type conditions and the requirement of NF- $\kappa$ B and p38/JNK. *Cytokine* 46:283-289.
- Karlsson, M. R., Rugtveit, J., and Brandtzaeg, P. (2004). Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of Experimental Medicine* 199:1679-1688.
- Karimi, K., Inman, M. D., Bienenstock, J., and Forsythe, P. (2009). *Lactobacillus reuteri* induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179:186-193.
- Kawase, M., He, F., Kubota, A., Hata, J., Kobayakawa, S., and Hiramatsu, M. (2006). Inhibitory effect of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 and *Lactobacillus* GG on enhanced vascular permeability of nasal mucosa in experimental allergic rhinitis of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70:3025-3030.
- Korman, B. D., Kastner, D. L., Gregersen, P. K., and Remmers, E. F. (2008). STAT4: Genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Current Allergy and*

Asthma Reports 8:398-403.

Korzenik, J. R., and Podolsky, D. K. (2006). Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 5:197-209.

Kubo, A., Naoto, M., Yoshitaka, I., Takeshi, K., Kenji, K., Kazuhiro, D., and Hisayuki, M. (1998). Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *The Journal of Biological Chemistry* 273:16730-16738.

Laan, M., Palmberg, L., Larsson, K., and Lindén, A. (2002). Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *The European Respiratory Journal* 19:534-537.

Larchē, M., Akdis, C. A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 6:761-771.

LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J. C., Leblanc, J., and Perdigon, G. (2002). Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 85:2733-2742.

Lee, M. Y., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Kim, M. J., Kim, M. K., Lee, I. Y., Oh, S. R., and Lee, H. K. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effect of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology* 212:647-654.

Lidbeck, A., Nord, C. E., Gustafsson, J. A., and Rafter, J. (1992). *Lactobacilli*, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *European Journal of Cancer Prevention* 1:341-353.

Lien, E., and Ingalls, R. R. (2002). Toll-like receptors. *Critical Care Medicine* 30:S1-S11.

Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D., and Golenbock, D. T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *The Journal of Biological Chemistry* 274:33419-33425.

- Lim, L. H., Li, H. Y., Huang, C. H., Lee, B. W., Lee, Y. K., and Chua, K. Y. (2009). The effects of heat-killed wild-type *Lactobacillus casei* Shirota on allergic immune responses in an allergy mouse model. *International Archives of Allergy and Immunology* 148:297-304.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, P. M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. (2004). Relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., Chen, M. J., Yueh, P. Y., and Lin, C. W. (2006a). Hypocholesterolemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition* 95:939-946.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., Chen, M. J., Yueh, P. Y., and Lin, C. W. (2006b). The anti-allergenic properties of milk-kefir and soymilk-kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2527-2533.
- Liu, J. R., Chen, M. J., and Lin, C. W. (2005). Antimutagenicity and antioxidant activity of milk kefir and soymilk kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2467-2474.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., Liu, Y. Y., and Lin, C. W. (2002). Antitumor activity of milk-kefir and soymilk-kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer* 44:182-187.
- Luttmann, W., Matthiesen, T., Matthys, H., and Virchow, J. C. (1999). Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor-alpha on eosinophil activation *in vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20:474-80.
- Ma, D., Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2004). Live *Lactobacillus reuteri* is

essential for the inhibitory effect on tumor-necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity* 72:5308-5314.

Maassena, C. B. M., Holten-Neelena, C., Balka, F., Bak-Glashouwera, M. J. H., Leerb, R. J., Lamana, J. D., Boersmac, W. J. A., and Claassenc, E. (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 18:2613-2623.

Maimone, D., Gregory, S., Arnason, B. G., and Reder, A.T. (1991). Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 32:67-74.

Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J., and Powrie, F. (2003). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine* 197:111-119.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., and Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16:189-199.

Marshall, V. M., and Cole, W. M. (1985). Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *The Journal of Dairy Research* 52:451-456.

Matar, C., Goulet, J., Bernier, R., and Brochu, E. (2000). Bioactive peptides from fermented foods: their role in the immune system. In: Fuller, R., Perdigon, G. (Eds.), *Probiotics 3: Immunomodulation by the gut microflora and probiotics*. Kluweer Academic Publishers, Dordrecht:193-212.

Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., and Yoshikai, Y. (2003). Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*

10:259-266

- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., and Yokokura, T. (1998). The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* Shirota on immunoglobulin E production in mice. *Journal of Dairy Science* 81:48-53.
- Mccracken, V. J., Chun, T., Baldeón, M. E., Ahrné, S., Molin, G., Mackie, R. I., and Gaskins, H. R. (2002). TNF-alpha sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal Lactobacilli. *Experimental Biology and Medicine* 227:665-670.
- Meisel, H., and Schlimme, F. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology* 1:41-43.
- Menard, S., Candalh, C., Bambou, J. C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2004). Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53:821-828.
- Meydani, S. N., and Ha, W. K. (2000). Immunologic effects of yogurt. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71:861-872.
- Miettinen, M., Matikainen, S., Vupio-Varrkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M., and Julkunen, I. (1998). Lactobacilli and Streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18 and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* 66:6058-6062.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., Bavari, S., and Klaenhammer, T. R. (2006). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:2880-2885.
- Monteleone, I., Vavassori, P., Biancone, L., Monteleone, G., and Pallone, F. (2002). Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 50 Suppl. 3: iii 60- iii 64.
- Montgomery, D. C. (1991). *Experiments with a single factor: The analysis of variance.*



- In: D. C. Montgomery (Ed), Design and Analysis of Experiments (pp. 75-77).  
New York, NY, USA: John Wiley and Sons.
- Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y. (1998). Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102:57-64.
- Nauta, A. J., Engels, F., Knippels, L. M., Garssen, J., Nijkamp, F. P., and Redegeld, F.A., (2008). Mechanisms of allergy and asthma. *European Journal of Pharmacology*. 585:354-360.
- Netea, M. G., Gerben, F., Dirk, J. J., Catherine, W., Ivo, G. B., Muguette, J., Jos, W. M. van der M., Dominique, M. L., Philippe, J. S., Dana, J. P., Se'bastien, D., and Stephen, E. G. (2005). The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also Nod1-activating peptidoglycan agonists. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 35859-35867.
- Ng, E. K., Panesar, N., Longo, W. E., Shapiro, M. J., Kaminski, D. L., Tolman, K. C., and Mazuski, J. E. (2003). Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. *Mediators of Inflammation* 12:3-8.
- Nonaka, Y., Izumo, T., Izumi, F., Maekawa, T., Shibata, H., Nakano, A., Kishi, A., Akatani, K., and Kiso, Y. (2008). Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *International Archives of Allergy and Immunology* 145:249-257.
- Noverr, M. C., and Huffnagle, G. B. (2004). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut. *Trends in Microbiology* 12:562-568.
- Oboki, K., Ohno, T., Saito, H., and Nakae, S. (2008). IL-17 and allergy. *Allergology*

International 57:121-134.

Ocklind, G. (1988). Activation of human T lymphocytes through CD3 and CD2 (T11) with anti-CD3-coupled sheep erythrocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 27:609-613.

O'Garra, A., Murphy, K. (1996). Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chemical Immunology* 63:1-13.

Ogawa, T., Asai, Y., Tamai, R., Makimura, Y., Sakamoto, H., Hashikawa, S., and Yasuda, K. (2005). Natural killer cell activities of symbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical and Experimental Immunology* 143:103-109.

Opal, S. M., Wherry, J. C., and Grint, P. (1998). Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 27:1497-1507.

Pathmakanthan, S., Li, C. K., Cowie, J., and Jhawkey, C. (2004). *Lactobacillus plantarum* 299: Beneficial *in vitro* immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19:166-173.

Peat, J. K., Woolcock, A. J., and Cullen, K. (1987). Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *European Journal of Respiratory Diseases* 70:171-179.

Perdigon, G., Vintint, E., Alvarez, S., Medina, M., and Medici, M. (1999). Study of the possible mechanism involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 82:1108-1114.

Perdigon, G., Galdeano, C. M., Valdez, J., and Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:Suppl 4:S21-S26.

Peluso, I., Fina, D., Caruso, R., Stolfi, C., Caprioli, F., Fantini, M. C., Caspani, G.,

- Grossi, E., Iorio, L. D., Paone, F. M., Pallone, F., and Monteleone, G. (2007). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-Cell proliferation. *Infection and Immunity* 75:1730-1737.
- Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A. B., Pestel, J., and Mercenier, A. (2002). Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Basic and Clinical Immunology* 227:665-670.
- Prescott, S., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P. D., and Holt, P. G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *Journal of Immunology* 160:4730-4737.
- Reddy, B. S., and Rivenson, A. (1993). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4.5f] quinoline, a food mutagen. *Cancer Research* 53:3914-3918.
- Rickert, R. C., Rajewsky, K., and Roes, J. (1995). Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376:352-355.
- Robinson, D. S., Bentley, A. M., Hartnell, A., Kay, A. B., and Durham, S. R. (1993). Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 92:313-324.
- Rousset, F., Robert, J., Andary, M., Bonnin, J. P., Souillet, G., Chrétien, I., Brière, F., Pène, J., and Vries, J. E. (1991). Shifts in interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *The*

Journal of Allergy and Clinical Immunology 87:58–69.

- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annual Review of Immunology 22:531-562.
- Sanderson, C. J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood 79:3101-3109.
- Sashihara, T., Sueki, N., and Ikegami, S. (2006). An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. Journal of Dairy Science 89:2846-2855.
- Segawa, S., Nakakita, Y., Takata, Y., Wakita, Y., Kaneko, T., Kaneda, H., Watari, J., and Yasui, H. (2008). Effect of oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. International Journal of Food Microbiology 121:1-10.
- Shevach, E. (2004). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. Nature Reviews. Immunology 2:389-400.
- Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K., and Nanno, M. (2006). Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. Journal of Dairy Science. 89:3306-3317.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., Habu, S., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. (2002). *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. Clinical and Experimental Allergy 32:563-570.
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kunagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S. (1998). *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine

- production in murine splenocyte cultures. *International Archives of Allergy and Immunology* 115:278-287.
- Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., and Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 35:75-80.
- Stassen, M., Jonuleit, H., Müller, C., Klein, M., Richter, C., Bopp, T., Schmitt, S., and Schmitt, E. (2004). Differential regulatory capacity of CD25<sup>+</sup> T regulatory cells and preactivated CD25<sup>+</sup> T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *Journal of Immunology* 173:267-274.
- St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., and Jones, P. J. H. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2:1-7.
- Sumi, Y., and Hamid, Q. (2007). Airway remodeling in asthma. *Allergology International* 56:341-348.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptor in innate immunity. *International Immunology* 17:1-14.
- Tejada-Simon, M. V., and Pestka, J. J. (1999). Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 62:1435-1444.
- Traves, S. L., and Donnelly, L. E. (2008). Th17 cells in airway diseases. *Current Molecular Medicine* 8:416-426.
- Trittibach, P., Barker, S. E., Broderick, C. A., Natkunarajah, M., Duran, Y., Robbie, S. J., Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Sarra, G. M., Dick, A. D., and Ali, R. R. (2008). Lentiviral-vector-mediated expression of murine IL-1 receptor antagonist or IL-10 reduces the severity of endotoxin-induced uveitis. *Gene*

Therapy 2008:1-11.

Tufano, M. A., Cipollaro, de l'Ero G., Ianniello, R., Galdiero, M., and Galdiero, F. (1991). Protein A and other surface components of *Staphylococcus aureus* stimulate production of IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma. *European Cytokine Network* 2:361-366.

van Damme, J., de Ley, M., van Snick, J., Dinarello, C.A., and Billiau, A. (1987). The role of interferon-b1 and the 26-kDa protein (interferon-b2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* 139:1867-1872.

Vinderola, C. G., Perdigón, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., and Matar, C. (2006a). Effect of kefir fraction on innate immunity. *Immunobiology* 211: 149-156.

Vinderola, C. G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., and Matar, C. (2006b). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research* 73:472-479.

Vinderola, C. G., Matar, C., and Perdigon, G. (2005a). Role of intestinal epithelial cells in immune effect mediated by gram-positive probiotic bacteria: Involvement of Toll-like receptors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:1075-1084.

Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., and Matar, C. (2005b). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research* 70: 195-202.

Wakabayashi, H., Nariai, C., Takemura, F., Nakao, W., and Fujiwara, D. (2008). Dietary supplementation with lactic acid bacteria attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice in a strain-dependent manner.

- International Archives of Allergy and Immunology 145:141-151.
- Walport, M. J. (2001a). Complement. Second of two parts. The New England Journal of Medicine 344:1140-1144.
- Walport, M. J. (2001b). Review articles: advances in immunology: complement (first of two parts). The New England Journal of Medicine 344:1058-1066.
- Wang, S. Y., Liu, J. L., Lin, Y. C., and Chen, M. J. (2008). Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. Journal of Dairy Science 91:3798-3805.
- Weston, S., Halbert, A., Richmond, P., and Prescott, S. L. (2005). Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. Archives of Disease in Childhood 90:892-897.
- Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. Annual Review of Immunology 17:255-281.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., and Britz, T. J. (2005). Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. International Dairy Journal 15: 383-389.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., and Britz, T. J. (2004). Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. International Journal of Dairy Technology 57:33-37.
- Wong, C. K., Ho, C. Y., Ko, F. W. S., Chan, C. H. S., Ho, A. S. S., Hui, D. S. C., and Lam, C. W. K. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. Clinical and Experimental Immunology 125:177-183.
- Yasutake, N., Matsuzaki, T., Kimura, K., Hashimoto, S., Yokokura, T., and Yoshikai, Y. (2000). The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in the antitumor effect of intrapleural injection of *Lactobacillus casei* strain Shirota in mice. Medical

Microbiology and Immunology 188:9-14.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. (1999). Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like receptor 2. *Journal of Immunology* 163:1-5.

Yssel, H., and Groux, H. (2000). Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. *International Archives of Allergy and Immunology* 121:10-18.

Zock, J. P., Heinrich, J., Jarvis, D., Verlato, G., Norback, D., Plana, E., Sunyer, J., Chinn, S., Olivieri, M., and Soon, A. (2006). Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the european community respiratory health survey II. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118:682-690.

