

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組  
Food Technology Section

碩士論文  
Master Thesis

指導教授：徐詮亮 博士

Advisor：Chuan-Liang Hsu, Ph. D.

共同指導教授：蔡政志 博士

Co- Advisor：Cheng-Chih Tsai, Ph. D.

乳酸菌減緩過敏之體外和體內功能評估

Functional evaluation of lactic acid bacteria to anti-allergy *in vitro*  
and *in vivo*

研究生：陳鈺馨 撰

Graduate student：Yu-Shin Chen

中華民國一〇一年一月

January, 2012

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 陳鈺馨 君所提之論文

乳酸菌減緩過敏之體外和體內功能評估

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長

符發亮

指導教授：符發亮 共同指導：蔡政志

中華民國一〇一年一月三日

# 碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所科技組 陳鈺馨 君所提之論文

乳酸菌減緩過敏之體外和體內功能評估

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

呂淑芬 弘光科技大學食品營養系助理教授  
謝長奇 東海大學畜產與生物科技學系副教授

指導教授：符麗英 共同指導：蔡政志

中華民國一〇一年一月三日

## 謝誌

感謝恩師 蔡政志博士及徐詮亮博士兩年多來的悉心指導、砥礪與肯定，尤其在實驗遇到瓶頸時所給予的支持與啟發，及提供完善的研究設備和充分的資源，並於論文撰稿期間細心且不厭其煩的校閱斧正，使論文得以順利完成，師恩浩瀚，衷心感謝，謹於卷首致最深謝意。

文稿初成，承蒙弘光科技大學食品營養系助理教授 呂淑芬博士及東海大學畜產與生物科技學系副教授 謝長奇博士撥冗詳加審閱及斧正，並於口試期間給予學生精闢的指導與寶貴意見，特此致上由衷謝意。

研究期間，感謝佩佩學姐在我剛進實驗室懵懂無知時細心教導實驗的細節；感謝冠蓉學姊在這兩年多的時間中，不僅僅是在實驗上給予極大的幫助支持及教導，也總在我慌張不安需要幫助時馬上伸出援手，超超感謝；感謝冠廷學長的勉勵與指點。感謝研究所的好朋友們，芄萱、佳華、希奇，很謝謝你們隨時的幫助以及一起適時的放鬆，可以認識你們並且分享心事、歡笑及淚水，是我最最開心的事情；也感謝曜寬幫助我更新許多學校的消息及資訊並給我很多幫助，讓我不至於太脫節；也感謝其他各位同學的互相砥礪與幫忙；感謝瑋翔、宏仔等每一位學弟妹的協助。感謝你們的幫助，使這段研究所歷程綴上色彩，謹此獻上最深的謝意。

最後，感謝我最親愛的家人：爸爸、媽媽跟哥哥，在離家這麼長的日子，由於你們時常的關心、無悔的付出及家裡的溫暖，讓我因為有你們而覺得滿足、開心、窩心、貼心及感動，雖然家裡發生許多事情，但很開心不管發生什麼事，一家人都還是心連著心，也因著家人的付出及陪伴，才讓我得以順利完成學業。僅以此論文獻給我最最親愛的家人，願與你們一同分享這份喜悅。

陳鈺馨 謹誌於

食品科學研究所科技組

中華民國一〇一年一月

## 目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
圖表目錄.....	1
第一章 文獻整理.....	6
第一節 益生菌及乳酸菌之介紹.....	6
一、益生菌 (probiotics) 之定義.....	6
二、益生菌應具備之條件.....	6
三、益生菌保健之功效.....	7
四、乳酸菌之基本特性.....	7
第二節 免疫與過敏.....	9
一、免疫系統簡介.....	9
二、過敏之介紹.....	15
三、乳酸菌與過敏之關係.....	17
第二章 材料與方法.....	23
第一節 實驗藥品與儀器.....	23
一、試驗菌株.....	23
二、實驗細胞.....	23

三、細胞株.....	23
四、實驗藥品.....	24
五、實驗設備.....	27
六、基本培養基及緩衝溶液之配置.....	27
第二節 乳酸菌基本特性.....	30
一、 乳酸菌樣品製備.....	30
二、 細胞培養.....	30
三、 腸道吸附試驗.....	31
四、 耐酸性試驗.....	32
五、 耐膽鹽試驗.....	33
第三節 減過敏之細胞試驗.....	33
一、 乳酸菌刺激巨噬細胞之免疫測定.....	33
二、 乳酸菌刺激人體周邊單核球細胞之免疫測定 .....	34
三、 酵素免疫連結吸附分析法測定細胞激素.....	35
第四節 動物試驗.....	37
一、 實驗動物及飼養條件.....	37
二、 試驗樣品.....	37
三、 動物實驗 .....	38
四、 血樣及脾臟收集並測定抗體.....	39

五、 酵素免疫連結吸附分析法測定細胞激素.....	42
第五節 統計分析.....	44
第三章 結果與討論.....	45
第一節 乳酸菌特性.....	45
一、 吸附試驗.....	45
二、 耐酸耐膽鹽試驗.....	46
第二節 細胞試驗.....	48
一、 乳酸菌對小鼠巨噬細胞 RAW264.7 分泌細胞激素之影響....	48
二、 乳酸菌刺激 PBMC 之免疫測定.....	50
第三節 動物試驗.....	52
一、 餵食乳酸菌及致敏對特異性免疫小鼠體重變化之影響.....	52
二、 餵食乳酸菌對特異性免疫之小鼠犧牲時脾臟重量之影響...53	
三、 餵食乳酸菌對特異性免疫小鼠血清中特異性抗原抗體含量之 影響.....	53
四、 餵食乳酸菌對特異性免疫小鼠脾臟細胞分泌細胞激素之影 響.....	55
第四章 結論.....	60
第五章 參考文獻.....	80

## 圖表附錄目錄

表 1. 乳酸菌耐酸試驗結果.....	62
表 2. 經酸處理 (pH 2.0) 後膽鹽對益生菌之生長影響.....	63
圖 1. 益生菌對健康之益處.....	21
圖 2. T 細胞與過敏疾病.....	22
圖 3. 動物實驗流程.....	39
圖 4. 乳酸菌吸附 Caco-2 細胞株之情形.....	64
圖 5. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IFN- $\gamma$ 之影響.....	65
圖 6. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IL-12 之影響 .....	66
圖 7. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IL-4 之影響.....	67
圖 8. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞共培養 24 小時後產 生細胞激素 IL-12 之影響.....	68
圖 9. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞共培養 24 小時後產 生細胞激素 IFN- $\gamma$ 之影響.....	69
圖 10. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞共培養 24 小時後 產生細胞激素 IL-4 之影響.....	70
圖 11. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞共培養 24 小時後 產生細胞激素 IL-10 之影響.....	71
圖 12. 餵食乳酸菌對致敏小鼠體重變化.....	72



圖 13. 餵食乳酸菌對致敏小鼠之脾臟重量.....	73
圖 14. 餵食乳酸菌對致敏小鼠血清中 IgE 濃度變化之影響 .....	74
圖 15. 餵食乳酸菌對致敏小鼠血清中 IgG1 濃度變化之影響.....	75
圖 16. 餵食乳酸菌對致敏小鼠血清中 IgG2a 濃度變化之影響.....	76
圖 17. 餵食乳酸菌對致敏小鼠脾臟細胞以不同刺激原培養 48 小時分 泌細胞激素 IFN- $\gamma$ 之影響.....	77
圖 18. 餵食乳酸菌對致敏小鼠脾臟細胞以不同刺激原培養 48 小時分 泌細胞激素 IL-12 之影響.....	78
圖 19. 餵食乳酸菌對致敏小鼠脾臟細胞以不同刺激原培養 48 小時分 泌細胞激素 IL-4 之影響.....	79
附錄 1. 動物實驗審查同意書.....	92

## 摘要

『過敏』為人體免疫功能失調所引起體內不適的症狀。文獻指出乳酸菌具有降低過敏症狀的功效，主要機制為提高 T helper 1 (Th1) 免疫反應，抑制 T helper 2 (Th2) 免疫反應，使過敏反應降低。本研究使用實驗室篩選出之三株乳酸菌 (HK006、HK109 和 HK301)，檢測其耐酸、耐膽鹽及吸附能力，並利用細胞及動物實驗評估其減低過敏免疫反應的能力，細胞試驗將三株乳酸菌分別刺激小鼠腹腔巨噬細胞 RAW264.7 及人類周邊血液單核球細胞 (human peripheral blood mononuclear cells, PBMC)，再以酵素免疫連結吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分析用乳酸菌刺激後所產生之細胞激素，如干擾素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、介白素-12 (Interleukin-12, IL-12)、介白素-4 (IL-4) 和介白素-10 (IL-10)，以評估乳酸菌減過敏之功能。動物實驗採用 BALB/c 品系雄性小鼠以隨機方式分為五組，分別為灌食無菌水、餵食乳酸菌 HK006、HK109、HK301 及市售乳酸菌產品，實驗為期七週。實驗第四和第六週給予腹腔注射雞卵蛋白 (Ovalbumin, OVA)。第零、四和六週以眼窩採血收集血清，檢測特異性免疫球蛋白 E (OVA-specific immunoglobulin E, IgE)，七週後犧牲採集血液及脾臟細胞，檢測血液中 OVA-specific IgE 並檢測脾臟細胞之 IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-4 之分泌量。結果顯示，吸

附能力以 HK109 ( $206 \pm 2.57$  CFU / cell) 最佳，耐酸之能力以 HK301 ( $3.88$  Log CFU / mL)及 HK006 ( $3.78 \pm 0.15$  Log CFU / mL) 較佳，耐膽鹽能力以 HK301 ( $8.51 \pm 0.12$  Log CFU / mL) 最佳。體外試驗方面，在使用 RAW264.7 細胞株試驗中，HK109 導致細胞株分泌 IL-12 與 IFN- $\gamma$ ，分別是控制組的 81 倍與 430 倍。在 PBMC 細胞試驗中，HK301 與 HK109 菌株刺激後分泌 IL-12 與 IFN- $\gamma$  約為控制組的 16 倍與 14 倍。經由細胞試驗後，此三株乳酸菌皆具降低過敏反應之能力，其中以 HK109 能力較佳。在動物試驗中檢測血清中 IgE 的濃度，HK301 與 HK109 的 IgE 下降率約為 37%及 41%，HK109 使小鼠體內之 IgE 降低幅度較大。在脾臟細胞分泌細胞激素方面，HK109 誘導分泌較 spontaneous 高 14 倍的 IFN- $\gamma$  與 5.2 倍的 IL-12，三株乳酸菌皆能增加 Th1 反應之細胞激素的分泌，而達到提升免疫之功效。總括體外及動物試驗結果，此三株乳酸菌皆具有改善過敏之潛力，尤其以 HK109 效果較好，其次為 HK006 與 HK301。

關鍵字：過敏、乳酸菌、雞卵蛋白、干擾素、介白素、免疫球蛋白 E

## Abstract

Allergy is regarded as body discomfort resulted from immune dysfunction. Research indicated the effect of lactic acid bacteria (LAB) on reducing allergy symptoms, as they enhanced the immune reaction of T helper 1 (Th1) and inhibited the immune reaction of T helper 2 (Th2) to reduce the allergy reaction. Three LAB strains (HK006, HK109, and HK301) were selected for testing the acid, bile salt tolerance, and absorptive capacity in this study. Furthermore, the reduced capacity of allergy immune reaction was evaluated with cells and animals. For cell tests, the three LAB strains were utilized for stimulating the macrophages in the abdominal cavity of mice RAW264.7 and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Then, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to analyzing the cytokine generated from the simulation of LAB, such as Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-4 (IL-4) , and Interleukin-10 (IL-10), to evaluate the function of LAB reducing allergy. For animal tests, BALB/c male mice were randomly divided into five groups which were tube fed with sterile water and fed with HK006, HK109, HK301, and the commercial product for seven weeks. In the fourth and the sixth week, the abdominal cavity was injected with Ovalbumin (OVA); and, the serum was collected from the orbital sinus in the zero, fourth, and sixth week for OVA-specific immunoglobulin E (IgE) test. After seven weeks, they were sacrificed for blood and splenocytes collection to test the OVA-specific IgE in blood and the secretions of IFN- $\gamma$ , IL-12, and IL-4 in splenocytes. The results showed HK109 ( $206 \pm 2.57$  CFU / cell) presented the best absorptive

capacity, both HK301 (3.88 Log CFU / mL) and HK006 (3.78 ± 0.15 Log CFU / mL) revealed the best acid tolerance, and HK301 (8.51 ± 0.12 Log CFU / mL) appeared the best bile salt resistance capacity. In regard to in-vitro tests, HK109 caused the cell strain secreting IL-12 and IFN- $\gamma$  being 81 and 430 times more than the control group in the test with RAW264.7 cell strain, while the secreted IL-12 and IFN- $\gamma$  resulted from the stimulation of HK301 and HK109 bacterial strains were 16 and 14 times more than the control group. With the cell tests, the three Lactobacili presented the capability of reducing allergy reactions, in which HK109 appeared the best capacity. In animal tests of the IgE concentration in the serum, HK301 and HK109 revealed the IgE descending rates about 37% and 41%, where HK109 appeared larger IgE descending in mice. In terms of splenocytes secreting cytokine, the inducing secretion of HK109, which presented 14 times for IFN- $\gamma$  and 5.2 times for IL-12, was more than spontaneous. The three LAB strains could enhance the secretion of cytokine in Th1 reaction to promote the effect of immunity. To sum up the *in vitro* and animal test results, the three LAB strains could potentially improve allergy, in which HK109 appeared the best effect, followed by HK006 and HK301.

*Keywords:* Allergy; Lactic acid bacteria; Ovalbumin; Interferon; Interleukin; Immunoglobulin E

## 第一章 文獻整理

### 第一節 益生菌及乳酸菌之介紹

#### 一、益生菌 (Probiotics) 之定義

古希臘醫師 Hippocrates 指出，讓食物成為保健身體的良藥，此引語無疑已是現代人追求健康的宗旨 (Suvarna and Body, 2005)。

Fuller (1989)、Havenaar and Husis (1992) 等學者將益生菌定義為：

「具有改善宿主體內內生性微生物相平衡，並有益於宿主健康的單一或數種微生物」。但是，近年發現某類益生菌所衍生之活性物質，也具有促進宿主健康的功效，因此目前已把活菌體、死菌體、菌體的萃取物，甚至其代謝產物等，都歸屬於益生菌的範疇 (陳等，2007)。

#### 二、益生菌之具備條件

文獻指出成為益生菌須符合幾項特性 (Kaur et al., 2002 ; Ouwehand et al., 2002 ; Shah, 2007 ; Vasiljevic and Shah, 2008)：

1. 能夠對抗胃酸、膽汁酸及氧化作用。
2. 能夠吸附在腸道黏膜上皮細胞。
3. 能夠在人類腸道定殖。
4. 可以產酸、過氧化氫及抗菌物質。

5. 可以調整免疫系統反應，增加營養物質的生物可利用性。
6. 對宿主安全且有益健康。

益生菌經由口服進入腸道中，選用之菌株最好兼具耐酸、耐膽汁酸之特性，且能夠定殖於腸道內。

### 三、益生菌之保健功效

Parvez 等 (2006) 指出益生菌在發酵乳製品所扮演的角色，可維持乳酸菌在乳製品中的菌數、抗微生物物質的合成、風味的產生（如酸酪乳或起司）、增加細胞外多醣體含量（提供消費者在感官上的需求）、改善食物的營養價值（如釋放游離胺基酸或維生素的合成）及癌症的預防等。含有益生菌的乳製品確實具有保健效果，其功效包括抑制致病菌生長、維持腸道內菌相之平衡、緩和乳糖不耐症、抗致突變性、抗癌性、降低血清膽固醇、預防腹瀉、刺激免疫系統、改善大腸急躁症候群和抑制幽門螺旋桿菌的生長（圖 1）(Shah, 2000; 2007)。

### 四、乳酸菌之基本特性

乳酸菌（Lactic acid bacteria，LAB）是相當龐大的菌群，共同特性是指可發酵六碳醣產生乳酸的菌株，且因缺乏電子傳遞系統（Electron transport system）或細胞色素（Cytochrome），而無法進行檸檬酸循環（Citric acid cycle）產生細胞所需要的能量。因此，乳酸

菌的能量需藉由基質磷酸化 (Substrate-level phosphorylation) 而獲得 ( Daeschel, 1989 ; Hammes and Tichaczek, ; 1994 Jay, 2000 ; Klaenhammer et al., 2002 ; Kim et al., 2003 ; 龍, 2004 ) 。乳酸菌通常具下述共同特性 ( Carr et al., 2002 ) :

1. 革蘭氏陽性菌 ( Gram positive bacteria ) 。
2. 桿菌或球菌。
3. 觸酶試驗 ( Catalase test ) 呈現陰性。
4. 厭氧、微好氧、耐氧厭氧或是兼性厭氧，可於有氧的環境下生長，但大部分於無氧的環境生長情況較佳。
5. 缺乏細胞色素。
6. 除了 *Sporolactobacillus* 之外，不產生內孢子 ( Asporogenous ) 。
7. 無運動性 ( Non-motile ) 。
8. 營養需求複雜。



## 第二節 免疫與過敏

### 一、免疫系統簡介

免疫系統主要可分為先天性免疫及後天性免疫兩大類，其組成及功能如下 (Goldsby et al., 2000 ; Abbas et al., 2007) :

#### (一) 先天性免疫反應 (Innate immune response)

##### 1. 身體性屏障 (Anatomic barriers) :

先天性免疫反應是非專一於特定病原的疾病抗體機制，當外來病原要侵犯宿主時，這些非特異性防衛機制會被啟動，利用身體性屏障來阻擋入侵病原，即為抵抗外來病原的第一道防線。

##### 2. 生理性屏障 (Physiologic barriers) :

當病原侵入身體後，免疫系統則啟動生理性屏障，利用溫度、pH 值和一些酵素，溶解細菌的細胞壁影響細菌的增殖，以防止組織感染擴大。

##### 3. 吞噬性屏障 (Phagocytic barriers) :

由吞噬細胞進行胞飲作用 (Endocytosis) 及吞噬作用 (Phagocytosis)，將外來病原吞掉。

#### 4. 發炎性屏障 (Inflammatory barriers) :

對於組織遭到感染後或是受傷所產生的生理反應，當受到感染後，組織的巨噬細胞受到活化而釋放TNF- $\alpha$ 、IL-1 及IL-6 等細胞激素，進而造成B 細胞及T 細胞的活化、血管通透性增加等急性發炎反應，刺激巨噬細胞增加細胞激素的產生和毒殺病原的能力。

#### (二) 後天性免疫反應 (Adaptive immune response)

展現高度的專一性、多樣性、免疫記憶性及辨識自我與非自我之特性，分成體液免疫反應和細胞免疫反應，分別由B 淋巴球和T 淋巴球所主導 (Goldsby et al., 2000 ; Abbas et al., 2007) 。

##### 1. 體液免疫反應 (Humoral immune response)

主要由B 細胞製造抗體，當B 細胞被活化後，會轉變為具有抗原特異性的B 淋巴母細胞，分化成熟為具有相同特異性卻無法再分裂的漿細胞，但可產生大量具有同樣特異性的免疫球蛋白。這些特異性的抗體便能辨識特定抗原而排除外來的抗原。特異性抗體與抗原形成的複合物，能活化補體系統 (Complement system) 且可以與特異性IgG 將抗原進行調理，然後由吞噬細胞進行吞噬。

## 2. 細胞免疫反應 (Cellular immune response)

T 細胞在胸腺分化後，進入血液中，再遷移到周邊淋巴器官。這些未成熟的T 細胞稱為處女T 細胞 (Naïve T cell) 。T 細胞需要抗原呈獻細胞 (Antigen-presenting cell, APCs) 及其上的刺激訊號 (Stimulatory signal) 才會開始增殖、分化成輔助型T 細胞 (T helper cell, Th cell) 與毒殺型T 細胞 (T cytotoxic cell, Tc cell) 。當輔助型T 細胞被抗原呈獻細胞活化後，會分泌細胞激素，這些激素會活化B 細胞、毒殺型T 細胞、巨噬細胞及其他參與免疫反應之細胞，啟動免疫系統網路 (圖2)。

## 3. 細胞激素 (Cytokine)

細胞激素可藉由四種作用來調控整個免疫系統，包括：1.親多組織性 (Pleiotropy)：一種細胞激素可以結合在多種的目標細胞上。 2.重複性 (Redundancy)：兩個或多種細胞激素作用在同一目標細胞上。 3.協同作用 (Synergism)：細胞激素協同作用發生在當有兩種細胞激素同時作用於細胞上的活性會大於個別作用的活性。 4.拮抗作用 (Antagonism)：在某些情況下，細胞激素會抑制或停止另一種細胞激素的作用 (Abbas et al., 2007) 。主要細胞激素敘述如下：

### (1) IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$ 為醣蛋白干擾素家族成員之一，此家族包括IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 和IFN- $\gamma$ ，由被病毒感染的細胞釋放出來，並且使附近的細胞可以得到抗病毒的保護。IFN- $\gamma$ 最主要活化巨噬細胞，來抵抗胞內病原菌感染和病毒感染細胞。並促使B 細胞分泌抗體以及促進天然殺手細胞分泌IFN- $\gamma$  (Meydani and Ha , 2000)。

### (2) IL-12

是先天性免疫反應對抗細胞內微生物感染的媒介因子，且為細胞性免疫反應對抗細胞內微生物的重要誘導因子，由巨噬細胞與樹突細胞所分泌。主要可激活自然殺手細胞及毒殺型T細胞，也可刺激輔助型T淋巴細胞分化行程 Th1 細胞產生IFN- $\gamma$  (Kato et al., 1999)。

### (3) IL-4

由Th2 細胞分泌，為B 細胞生長因子，促進B 細胞產生IgE，以及刺激肥大細胞生長 (林和江，2006)。

### (4) IL-10

是一種以活化巨噬細胞和樹突細胞的抑制因子，因此與先天性免疫作用和細胞媒介性免疫的控制有關，主要作用抑制活化的巨噬細胞和樹突細胞產生IL-12，也抑制巨噬細胞和樹突細胞表現輔助刺激因

子和第二類 MHC 分子 (Abbas et al., 1991)。

### (三) 免疫球蛋白 (Immunoglobulins)

免疫球蛋白是 B 細胞細胞膜上的抗原結合蛋白，即為抗體，是由漿細胞所分泌。分泌出的抗體在血液中循環，可作為體液免疫反應的受動器 (Effector)，利用抗體與抗原之間的交互作用去除外來抗原。免疫球蛋白有許多種不同的亞型，其中免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G; IgG) 是血漿中最豐富的一型，約佔所有血漿免疫球蛋白之 80%，其可分為 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 等 4 種亞型；IgG 是藉由與吞噬細胞上的受器結合，而做為調理素 (Opsonin)。IgM 則是佔總血漿免疫球蛋白的 5~10%，是對抗外來抗原之初級反應所產生的第一種免疫球蛋白，為大分子的免疫球蛋白，因為分子較大，擴散力不佳，所以在細胞間組織液內的濃度較低。而 IgA 是外分泌性的免疫球蛋白，主要是由消化道、呼吸道及其他的黏膜所分泌，約佔血漿中總免疫球蛋白的 10~15%，是抵禦細菌和病毒的重要防線。此外，其他亦有 IgE 及 IgD 等不同類型的免疫球蛋白，其中 IgE 抗體具有調節過敏反應的作用，會引起局部肥大細胞的活化，促進不同細胞的聚集。而 IgD 亦是成熟 B 細胞所表現的主要細胞膜結合免疫球蛋白 (Goldsby et al., 2000)。

#### (四) 腸道免疫

腸道是人體內最大的免疫器官，維持腸道內微生物菌相的代謝活性及平衡具相同重要性。人體免疫系統是由許多各式各樣不同功能的免疫細胞（包括T細胞、B細胞、淋巴活化殺手細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞等），經由繁雜精細的各式細胞激素包括干擾素 (Interferon)  $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\gamma$  和腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等細胞激素訊息的傳遞活化，而共同構成對入侵身體內病因的防護網路。其作用機制如下：

##### (1) 乳酸菌細胞壁成分具刺激免疫反應的效果：

乳酸菌的細胞壁含有肽聚糖 (Peptidoglycan)、Polysaccharide 與胞壁酸 (Teichoic acid)，而淋巴細胞和巨噬細胞上具有辨識它們的接受器，因此具有刺激免疫反應的作用 (Takahashi et al., 1993)。

##### (2) 緩和食物過敏現象

藉由益生菌的參與，能夠將第二型輔助型T細胞 (Th2) 免疫反應調節趨向第一型輔助型T細胞 (Th1) 免疫反應，益生菌可能會使腸黏膜通透性增加現象改善、讓腸道內IgA的反應增強、促進IL-10及TGF- $\beta$ 產生、重建腸內菌落使其恢復正常，進而促進腸障蔽功能、促進IFN- $\gamma$ 的產生以抑制由IL-4誘導出IgE的生成作用，以緩解過

度的發炎反應 (陳等, 2007; Isolauri et al., 2001)。

## 二、過敏之介紹

### (一) 過敏性疾病之介紹

過敏是指身體對外來 (過敏原) 所產生的一種免疫反應, 舉凡氣喘、過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、異位性皮膚炎、蕁麻疹、溼疹和食物過敏等, 都屬於這個範疇。根據統計, 台灣約有三分之一的人可能患有過敏性疾病, 這類疾病不但會造成身體不適, 嚴重時亦可能造成死亡。醫學上的研究指出, 過敏性疾病的發生主要與環境及遺傳因子有關。就環境而言, 像是塵蟎、蟑螂、動物毛屑、化學藥品、花粉、空氣污染, 甚至於食物的攝取, 例如: 雞蛋、牛奶等, 都是常見的過敏原。另外, 在遺傳方面, 若是父母親本身患有過敏性疾病, 則所生的小孩罹患過敏性的比例會明顯較高。遺傳性過敏疾病乃是一種多重基因遺傳有關的慢性過敏性發炎反應, 主要染色體發生異常的位置可能位於第五對染色體 5q31-33, 為促成過敏性發炎產生細胞激素的基因所在位置, 與過敏體質的形成關係密切。此外, 第十一對染色體 11q13 與第十四對染色體上 T 細胞接受器基因則影響免疫球蛋白 E (IgE) 的總量及特異性免疫球蛋白 E (Specific IgE) 的形成也具有相關性 (楊, 2001)。

## (二) T 輔助細胞第一型 (T helper cell type I) 及T 輔助細胞第二型 (T helper cell type II) 之平衡與過敏反應

過敏反應分四型，第一型以IgE 抗體為媒介，誘使肥大細胞活化。第二型及第三型則以 IgG 抗體為媒介，隨不同的 IgG 亞型及抗原特性，不同程度地參與補體媒介及吞噬作用機制。第二型對細胞表面或基質抗原直接反應造成，而第三型則是與可溶性抗原形成免疫複合體而造成組織傷害。第四型則以T細胞為媒介，可分為三類。第一類Th1 細胞活化吞噬細胞，造成發炎反應。第二類Th2 細胞活化嗜伊紅性白血球 (Eosinophils) 發炎反應。第三類毒殺型T 細胞直接損壞組織。一般常見的過敏疾病如氣喘 (Asthma) 、過敏性鼻炎 (Atopicrhinitis) 、食物過敏 (Food allergy) 、濕疹 (Eczema) 等，多屬於第一型過敏反應 (Janeway et al., 1994) 。

許多第一型的過敏性疾病是因為Th1 細胞與Th2 細胞之間的免疫反應不平衡，且對過敏原的反應較偏向Th2 細胞的免疫反應。影響Th1 與Th2 細胞之間的平衡主要為環境和遺傳因子，當免疫反應偏向分泌IL-12 或 IFNs 細胞激素為主時，則免疫反應偏向Th1 型 (Romagnani, 1996) 。IL-12 由巨噬細胞所分泌，為早期誘導處女T 細胞分化成Th1 細胞的重要因子，以及加強天然殺手細胞的功能，這兩種功能都可促使IFN- $\gamma$ 分泌增加 (Trinchieri, 1994) 。



Th1 細胞會分泌IL-2、IFN- $\gamma$ 及IL-12，主要功能為幫助IgG2a 抗體的產生、活化巨噬細胞、天然殺手細胞與毒殺型T 細胞，強化細胞免疫反應。Th2 細胞會分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13，而吸引嗜伊紅性白血球 (Eosinophils)、嗜鹼性細胞 (Basophils) 與肥大細胞 (Mast cell) 至發炎部位，而強化體液免疫反應。另外，IL-4和IL-13 可促使B 細胞進行抗體同型轉換 (Isotype switch)，製造抗體IgE，並增加血清中 IgE 的量。在T 細胞分化的早期，藉由細胞激素的調控可抑制Th2 的免疫反應。其中，IFN- $\gamma$ 可減少 IL-4 的表現量，並且抑制B 細胞進行抗體同型轉換，而IFN- $\alpha$ 可增加IFN- $\gamma$ 表現量，誘發Th1 的免疫反應，以減緩過敏反應發生 (Sinigaglia et al., 1999；林，2006)。

### 三、 乳酸菌與過敏之關係

乳酸菌能夠強化免疫系統藉由活化巨噬細胞強化人體內非特異性之先天免疫力。乳酸菌也具有激活淋巴細胞的能力，產生IFN- $\gamma$ ，使免疫系統被刺激以抑制腫瘤的形成。並且能夠調節 Th1及 Th2的免疫反應，促使免疫反應偏向 Th1。所以乳酸菌緩和過敏現象，包括食物及遺傳所造成之過敏 (陳，2004；林，2006)。

乳酸菌為革蘭氏陽性菌，研究顯示革蘭氏陽性菌所誘導的細胞激素為 IL-12，較偏向 Th1 的免疫反應；而革蘭氏陰性菌所誘導的細

胞激素為 IL-10，則較偏向 Th2 的免疫反應 (Hessle et al., 2000)。

乳酸菌的細胞壁成分，包括肽聚糖 (Peptidoglycan) 多醣類 (Polysaccharide) 及磷壁酸 (Teichoic acid) 等，具有免疫調節的性質。例如 *L. lactis* 中的 Phosphopolysaccharide 能刺激小鼠白血球產生 IFN- $\gamma$ ，Teichoic acid 增加受裂殖原刺激的 PBMC 產生 IFN- $\gamma$  (Cross et al., 2001)。並且發現乳酸菌在發酵牛奶時也會釋放一些肽，餵食老鼠後，發現分泌 IgA 的 B 細胞數目有增加的趨勢 (LeBlanc et al., 2002)。

許多研究針對乳酸菌減過敏的能力進行試驗。Theo 等人以乳酸菌刺激 PBMC，*L. rhamnosus* 菌株較其他菌株更能使細胞激素 IL-6 及 IL-10 產量減少並使 IFN- $\gamma$  的分泌量增加 (Theo et al., 2011)。針對 OVA-TCR-Tg 鼠餵食 *L. casei* 四週，結果可抑制血清中 Specific IgE、IgG1 含量，在脾臟細胞體外培養則可觀測到 IFN- $\gamma$  及 IL-12 表現量上升，降低分泌 IL-4 和 IL-5 (Shida et al., 2002)。OVA 致敏 BALB/c 鼠餵食乳酸菌發酵奶 27 天，能降低血清中具有 OVA 特異性 IgE (Ishida et al., 2003)。Shalini 等 (2010) 使用益生菌產品 Dahi 餵食以 OVA 致敏的小鼠，結果顯示 Dahi 能夠有效降低 Total IgE 及 OVA-specific IgE，也提高 IFN- $\gamma$  的產量且抑制 IL-4 分泌，以達到減緩過敏的效果。

在氣喘模式中，當雞卵蛋白以噴霧狀被吸入小鼠體內後，食用 *B. breve* 或 *L. plantarum* 的小鼠，與單純致敏小鼠相比較下，其嗜伊紅白血球數量皆降低，並且 Specific IgE 的含量也降低，而餵食 *B. breve* 的小鼠更可降低 IL-4、IL-10 的含量 (Hougee et al., 2009)。另有 BALB/c 小鼠，注射 OVA 致敏並同時餵食 *B. breve* M-16V，測其血清中 IL-4、IL-10、OVA-specific IgE、IgG1 and IgG2a，餵食 *B. breve* M-16V 與沒有餵食乳酸菌的小鼠比較下，其血清中 IL-4、IL-10、OVA-specific IgE 及 IgG1 均明顯下降 (Hougee et al., 2010)。

學者 Tae 等人從韓國泡菜中分離出 26 株 *Lactobacillus* 菌株分別以與小鼠脾臟細胞及小鼠巨噬細胞株共培養，取上清液並測量 Th1 與 Th2 的細胞激素含量。在小鼠脾臟細胞試驗中，有四株菌株的 IL-12 產量最高且 IL-4 最低，分別是 *L. plantarum* CJLP55, CJLP56, CJLP133 和 CJLP136。而因為此四株菌株有較大量的 IL-12，表示增加 Th1 細胞的活化。在小鼠巨噬細胞株與乳酸菌共培養的實驗中，以菌株 CJLP133 刺激後，Th1 的細胞激素 IFN- $\gamma$  產量較 Th2 的細胞激素 IL-4 高出許多。這些結果發現，從韓國泡菜分離出的 lactobacilli 可以調節巨噬細胞活化 Th2 細胞引起的過敏反應，以達到平衡 Th1/Th2 (Tae et al., 2011)。

許多實驗結果均顯示，不同菌株會依不同的途徑刺激不同的免疫

反應。以 *L. acidophilus*、*L. casei*、*L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* 或 *S. thermophilus* 餵食老鼠後，取其小腸組織切片觀察細胞激素分泌的情形，結果餵食 *L. casei* 或 *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* 者，IL-10與 IL-4 的量均有增加，而餵食 *L. acidophilus* 的老鼠則明顯發現 IL-2 與 IL-12 增加。再者，2000 年 Fang 等人將健康成人分三組，分別攝食 *L. GG*、*Lactococcus lactis* 和安慰劑 (Ethyl cellulose)，在第 1、3、5 天給予 *Salmonella typhi* TY 21a oral Vivotif<sup>TM</sup> vaccine capsule 以模擬腸道病原菌感染的情形，從實驗結果顯示，攝食 *L. GG* 組其血液中分泌型 IgA 有增加趨勢，而攝食 *Lactococcus lactis* 組則促進嗜中性白血球 (Neutrophils) 上 CR3 受器的表現，增進吞噬能力，可見 *Lactococcus lactis* 能促進非特異性的免疫調節，這是由於乳酸菌與小腸交互作用程度不同所致。*L. GG* 能定殖於小腸中，而 *Lactococcus lactis* 不能。也可看出乳酸菌調節免疫反應為菌株依賴性 (Strain-dependent) 和種的特異性 (Species speciality) (Fang et al., 2000; Harsharn and Jaya, 2008)。餵食乳酸菌的量也會影響免疫調節 (Gill and Rutherford, 2001)。此外，宿主在不同生理條件下，乳酸菌所調節的免疫反應也不同，對健康個體有促進免疫反應之效果。

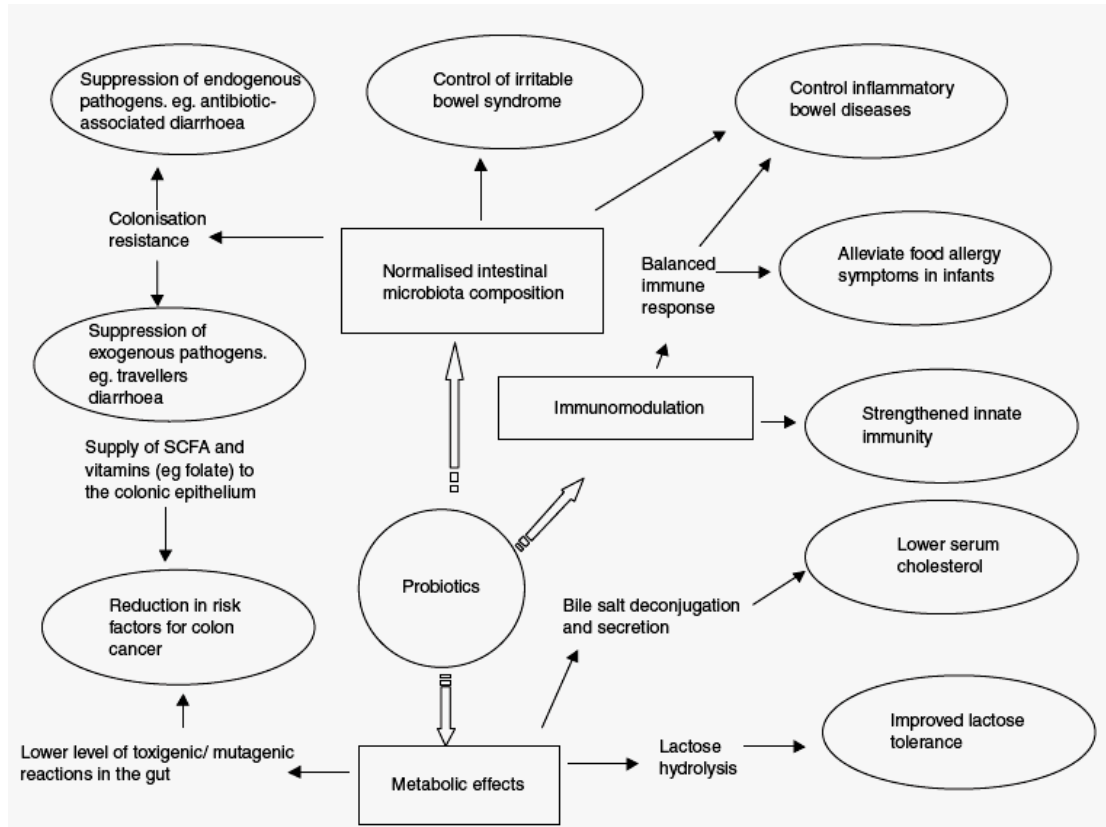


圖 1. 益生菌對健康之益處。 (Parvez et al., 2006)

Fig 1. Various health benefits from probiotics consumption.

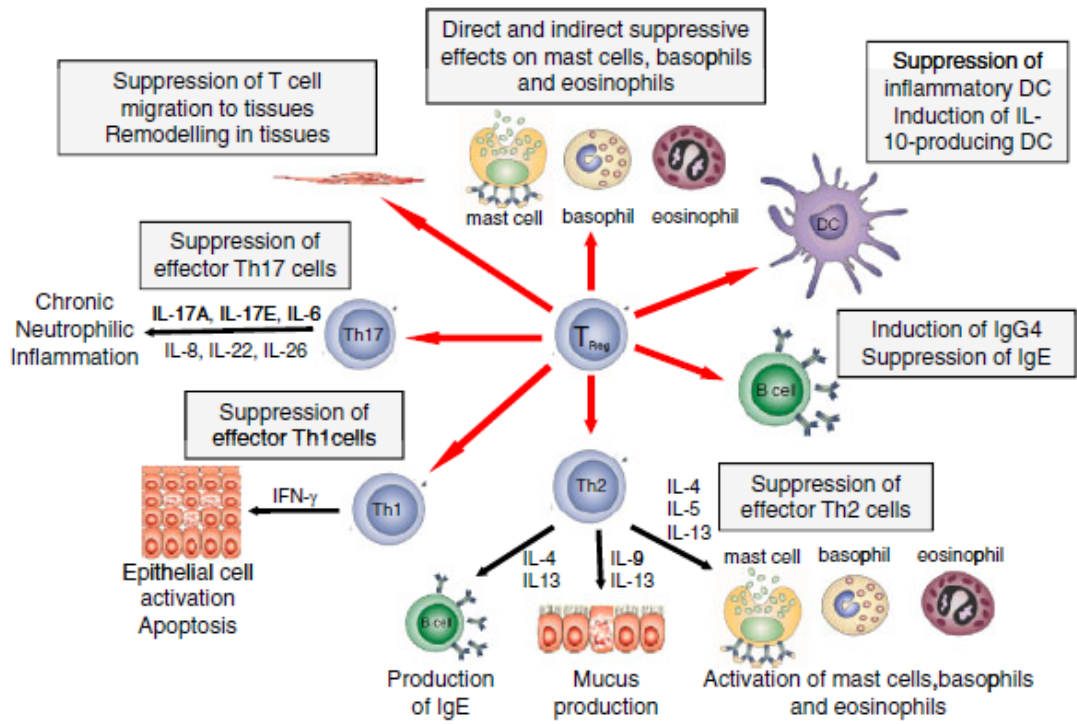


圖 2. T細胞與過敏疾病。(Oscar et al., 2010)

Fig.2. T cell in allergic diseases.

## 第二章 材料與方法

### 第一節 實驗藥品與儀器

#### 一、試驗菌株

本實驗所使用的菌株

菌株代號	菌株名稱	來源
HK301	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pickled cabbage
HK109	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cabbage
HK006	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Infant feces

#### 二、實驗細胞

抽取有過敏症狀之人類靜脈血液後加以分離出周邊單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。

#### 三、細胞株

人類直腸癌細胞 Caco-2 (BCRC 60182) 和老鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 (BCRC 60001, 購自食品工業研究所生物資源保存及研究中心)。

#### 四、實驗藥品

名稱	廠商	產地
Lactobacilli MRS broth	Difco	Detroit, MI, USA
Agar	Difco	Detroit, MI, USA
L-cystenine	Sigma	St. Louis, MO, USA
Oxgall bile salts	Sigma	St. Louis, MO, USA
pancreatin	Sigma	St. Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL	Grand Island, NY, USA
Trypan blue	GIBCO BRL	Grand Island, NY, USA
Non-essential amino acids(NEAA)	HyClone	Logan, UT, USA
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	HyClone	Logan, UT, USA
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)	HyClone	Logan, UT, USA
Fetal bovine serum (FBS)	HyClone	Logan, UT, USA
Sodium bicarbonate	Merck	Darmstadt, Germany
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma	St. Louis, MO, USA
RBC lysis buffer	Sigma	St. Louis, MO, USA
Tween®-20	USB	Cleveland, OH, USA
測定 mouse IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-10 之 ELISA 套組	BD Biosciences	San Diego, USA



---

測定 human IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-4、BD Biosciences San Diego, USA

IL-10 之 ELISA 套組

測定 mouse anti-OVA-specific BD Biosciences San Diego, USA

IgE、IgG1、IgG2a 之 ELISA 套

組

套組包含：

(1) dilution buffer: 0.1M NaHCO<sub>3</sub>  
and 10% FBS pH 8.2

(2) Wash buffer: 0.05% Tween-20  
in PBS buffer pH 7.3

(3) Blocking solution: 1% BSA  
(Bovine serum albumin) in PBS  
buffer pH 7.3

(4) Capture Antibody (anti-mouse  
IL-12、anti-mouse IFN- $\gamma$ 、

anti-mouse IL-10、anti-human

IL-12、anti-human IFN- $\gamma$ 、

anti-human IL-4、anti-human

IL-10、mouse anti-OVA-specific

IgE、anti-mouse IgG1、anti-mouse

IgG2a)

(5) Detection Antibody

(Biotinylated anti-mouse IL-12 、

Biotinylated anti-mouse IFN- $\gamma$  、

Biotinylated anti-mouse IL-10 、

Biotinylated anti-human IL-12 、

Biotinylated anti-human IFN- $\gamma$  、

Biotinylated anti-human IL-4 、

Biotinylated anti-human IL-10 、

Biotinylated mouse

anti-OVA –specific IgE 、

Biotinylated anti-mouse IgG1 、

Biotinylated anti-mouse IgG2a )

(5) Streptavidin-HRP

(6) TMB (Tetramethylbenzidine)

(7) Stop solution: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Ovalbumin (OVA)	Sigma	St. Louis, MO, USA
Concanavalin A (ConA)	Sigma	St. Louis, MO, USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma	St. Louis, MO, USA
Ficoll-Hypaque	HyClone	Logan, Utah, USA

---

## 五、實驗設備

---

中文名稱	廠商	產地
無菌操作台	造鑫公司	台北，台灣
高速冷凍離心機	Hitachi 公司	Tokyo, Japan
桌上型冷凍離心機	Sigma 公司	Harz, Germany
恆溫培養箱	和德公司	台北，台灣
二氧化碳細胞培養箱	Thermo 公司	USA
酸鹼測定儀	Sunteck 公司	台中，台灣
倒立式位相差顯微鏡	Nikon 公司	Tokyo, Japan
分光光度計	NaKa	Tokyo, Japan
恆溫水槽	造鑫公司	台北，台灣
血球計數器	Bright-Line	Buffalo, NY, USA
酵素免疫分析儀	Sunrise, Tecan 公司	Grödig, Austria
手術用具：剪刀、鑷子、注射針筒		

---

## 六、基本培養基及緩衝溶液之配製

### (一) 乳酸菌培養基

#### 1. MRS broth :

Lactobacilli MRS broth powder 55 g 加 0.05% L-cystenine，再加

入去離子水定量至 1000 mL 再將之滅菌 (121°C, 15 分鐘) 後存於 4°C 備用。

## 2. MRS agar :

取 15 g Agar 加入 1000 mL MRS broth 中，再將之滅菌 (121°C, 15 分鐘) 後置於 50°C 烘箱中備用。

## (二) 細胞培養液

### 1. Caco-2 細胞株使用培養液

取 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 加入 Sodium bicarbonate 2.2 g 溶於 890 mL 滅過菌 (121°C, 15 分鐘) 的去離子水中，溶解後調整 pH 值至 7.4，於無菌操作下以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾至滅菌 (121°C, 15 分鐘) 後的血清瓶中，接著加入 10 mL 二合一抗生素 (濃度為：100 U/mL Penicillin 與 100  $\mu$ g/mL Streptomycin)、1% Sodium pyruvate、1% Non-essential amino acid，最後加入 100 mL 胎牛血清(FBS)，過火並封蓋存於 4°C 備用。

### 2. RAW264.7 細胞株使用培養液

取 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 加入 Sodium bicarbonate 2.2 g 溶於 890 mL 滅過菌 (121°C, 15 分鐘) 的去離子水

中，溶解後調整 pH 值至 7.4，於無菌操作下以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾至滅菌 (121°C，15 分鐘) 後的血清瓶中，接著加入 10 mL 二合一抗生素 (濃度為：100 U/mL Penicillin 與 100  $\mu$ g/mL Streptomycin)、1% Sodium pyruvate、1% Non-essential amino acid，最後加入 100 mL 胎牛血清 (FBS)，過火並封蓋存於 4°C 備用。

### 3. PBMC 使用培養液

取 RPMI-1640、Sodium bicarbonate 1.5 g 溶於 890 mL 滅過菌 (121°C，15 分鐘) 的去離子水中，溶解後調整 pH 值至 7.4，於無菌操作下以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾至滅菌 (121°C，15 分鐘) 後的血清瓶中，接著加入 10 mL 二合一抗生素 (濃度為：100 U/mL Penicillin 與 100  $\mu$ g/mL Streptomycin)，最後加入 100 mL 胎牛血清 (FBS)，過火並封蓋存於 4°C 備用。

#### (三) 磷酸緩衝溶液 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS)

0.2 g KCl，0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，8 g NaCl，2.16g NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，先以約 900 mL 去離子水溶解後定量至 1000 mL，調整 pH 至 7.3 ± 0.2，滅菌 121°C、15 分鐘，於 4°C 儲存備用。

## 第二節 乳酸菌基本特性

### 一、 乳酸菌樣品製備

#### (一) 乳酸菌菌種保存

將乳酸菌勾取 one loop 至新鮮配製之 MRS broth 後，在 37°C 培養 18 小時，經活化兩次後，將菌液與滅菌 (121°C, 15 分鐘) 的 MRS 與甘油的保存液中混合均勻，接著將凍菌管儲藏於 -80°C 冷凍櫃，此為菌株冷凍保存管。

#### (二) 乳酸菌菌株之活化

乳酸菌以新鮮配製之 MRS broth 接種 1% 後，在 37°C 培養 18 小時，經活化兩次後即可進行後續試驗。

### 二、 細胞培養

#### (一) Caco-2 細胞

將 Caco-2 細胞株冷凍管從液態氮移至 37°C 水浴鍋中迅速回溫解凍，將細胞液吸至角形培養皿 (T25 flask)，加入適當培養基，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱培養，經 21 天分化繼代培養後開始進行後續實驗。

#### (二) RAW 264.7 細胞

將 RAW 264.7 細胞株之冷凍管從液態氮中移至 37 °C 水浴鍋中，使其迅速回溫解凍，將細胞液抽吸數次使其懸浮後，吸至角形培養皿 (T25 flask) 並加入適當細胞培養基，再置於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱，細胞活化後，待細胞生長穩定後，再進行後續實驗。

### (三) 人體周邊血液單核球的分離

使用含有抗凝血劑的真空抽血管抽取一位有過敏症狀之人的血液後，利用針筒抽取真空管內 5 mL 血液，將血液緩慢延著管壁加入內已含有 6mL Ficoll-Hypaque 的 15 mL 離心管中，加入時要小心莫使兩種液體界面混合。利用密度梯度原理離心 (400  $\times$ g, 30 分鐘, 18 $^{\circ}$ C)，離心後小心吸除上層血漿層，再以無菌滴管吸取淋巴球層，接著與 HBSS 混合，室溫下離心 (100 $\times$ g, 10 分鐘, 18 $^{\circ}$ C)，去除上清液後，清洗後兩次後的沉澱物即為人體周邊血液單核球 (PBMC)，將之培養於 RPMI-1640 medium 內含 10% FBS, 1% 二合一抗生素中，並以血球計數器於顯微鏡下計算活細胞數目。

### 三、腸道吸附試驗:

本實驗方法參考 Fernández 等 (2003)。將培養完全的細胞株 Caco-2 之三角型培養皿 (T75 Flask)，倒掉舊的培養液，用 1X 磷酸緩衝溶液 (Phosphate-buffered saline, PBS) 清洗兩次倒掉，加入 1 mL 1% 胰蛋白酶 (Trypsin/EDTA) 使細胞懸浮。將 1 mL ( $4 \times 10^5$  cell/well) 細胞分別加入 24 孔盤中，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下隔夜培養後，使細胞能夠分裂生長附著 24 孔盤中，用 1x PBS 清洗兩次，換上新鮮不含抗生素的培養液 900 $\mu$ L。將試驗之乳酸菌株取 1mL，以 8000  $\times$ g 離心

10min 後，用 1x PBS 清洗兩次倒掉，用 1 mL 新鮮不含抗生素的培養液回溶，取 100 $\mu$ L 乳酸菌菌液 (約  $N \times 10^7$  CFU/mL) 加入 24 孔盤中，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中作用培養 2 小時。倒掉舊培養液，以 1x PBS 清洗兩次，將未吸附於細胞上之乳酸菌洗掉，加入 5% 福馬林 200  $\mu$ L 靜置 30 min，將吸附於細胞上之乳酸菌固定。倒掉福馬林，再用 1 x PBS 清洗兩次，以結晶紫進行染色 5 分鐘，將染劑吸出後，以倒立式光學顯微鏡下觀察，並且計數細胞上乳酸菌菌數，以三個不同視野，計數每十顆細胞上乳酸菌菌數後平均，求得每細胞上所吸附之乳酸菌菌數。

#### 四、耐酸性試驗:

本次試驗方法參考 Fernandez 等 (2003) 用 3 mL 的 MRS broth 接 2% 的乳酸菌菌液培養在 37 $^{\circ}$ C，24 小時，之後用無菌的磷酸緩衝溶液清洗兩次，以及離心兩次 (8000  $\times$ g、15min)，將離心後的菌體用 1mL 無菌的 1x PBS buffer 回溶，將 1mL (約  $N \times 10^7$  CFU/ml) 此菌分別加入 9mL pH2.0、2.5、3.2 和 7.2 作為控制組的酸液中 (酸液含有 0.1% peptone water 分別以 1.0M HCl 調整為 pH2.0、2.5、3.2 及 7.2)，將含有菌體之酸液放入震盪培養箱中 37 $^{\circ}$ C 振盪培養 (200  $\times$ g)，0 及 3 小時。培養後經序列稀釋，傾倒法培養於 MRS agar，於 37 $^{\circ}$ C 下培養



48 小時，計數存活的乳酸菌數 (Zavaglia et al., 1998)；每一樣進行三重複試驗。

#### 五、耐膽鹽試驗:

本次試驗方法參考 Fernandez 等 (2003)，將培養三小時 pH2.0 酸液取 1mL，用無菌的磷酸緩衝溶液清洗兩次，以及離心兩次 (8000 × g、15min)，將離心後的菌體用 1mL 無菌的磷酸緩衝溶液回溶後，加入 9 mL 之 MRS broth，含 0.3%(W/V) Oxgall bile salts with 0.1 (w/v) pancreatin，pH 8.0，將含有菌體之酸液放入震盪培養箱中 37°C 振盪 (200 ×g) 培養 0、3、12、24 小時。培養後經序列稀釋，傾倒法培養於 MRS agar，於 37°C 下培養 48 小時，計數存活的乳酸菌數 (Zavaglia et al., 1998)；每一樣品進行三重複試驗。

### 第三節 減過敏之細胞試驗

#### 一、乳酸菌刺激巨噬細胞之免疫測定

##### (一) 分裝培養

將培養完整的 RAW 264.7 細胞株之角形培養皿 (T75 flask)，倒掉舊的培養液，加入 2mL 新鮮的細胞培養液後用刮勺將細胞輕輕刮下，計數細胞並調整濃度後，取 24 孔盤，每個孔加入 1 mL 細胞懸浮液 (細胞濃度調為  $5 \times 10^5$  cell / mL)，以 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 於培養箱中

培養至隔夜，使細胞能夠分裂生長並貼附。

## (二) 乳酸菌刺激巨噬細胞

將分裝於 24 孔盤， $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  氣體下培養至隔夜之巨噬細胞，使細胞貼附於盤底後，將舊的培養液吸出，每個 well 加入  $500 \mu\text{L}$   $1\times \text{PBS buffer}$  清洗，洗淨舊的培養液並去除未附著之細胞，重複清洗兩次後。加入  $1 \text{ mL}$  新鮮的細胞培養液 (含 FBS 但不含 penicillin-streptomycin)，再加入  $5 \mu\text{L}$  之乳酸菌體 ( $10^7 \text{CFU} / \text{mL}$ ) 於培養盤之孔洞內，並輕輕以抽吸方式混合均勻，置於  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  中培養 24 小時後取其上清液放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，待酵素連結免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 檢測。

## 二、 乳酸菌刺激人體周邊單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 之免疫測定

### (一) 乳酸菌刺激 PBMC

將製備完成之 PBMC 計數並調整濃度後，取 96 孔盤，每孔加入  $200 \mu\text{L}$  之 PBMC ( $1\times 10^6 \text{ cell} / \text{mL}$ ) 後，再加入  $40 \mu\text{L}$  之乳酸菌體 ( $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7 \text{CFU} / \text{mL}$ ) 於培養盤之孔洞內，並輕輕以抽吸方式混合均勻，置於  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  中培養 24 小時後取其上清液放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，待酵素連結免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay, ELISA) 檢測。

三、 酵素免疫連結吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定細胞激素

採用套組 BD OptEIA™ set Human IFN- $\gamma$ 、Human IL-4、Human IL-10、Human IL-12、Mouse IFN- $\gamma$ 、Mouse IL-12、Mouse IL-4。  
分析方法依照套組 BD OptEIA™ set 的標準步驟測定。

#### 1. 加入 Capture Antibody

以 Coating buffer 稀釋 Capture antibody 至所需的濃度，之後加入 100  $\mu$ L / well 於 96 孔盤中，再用鋁箔紙封起 plate 避免蒸發，於 4°C 下靜置隔夜。

#### 2. Blocking

倒除液體後，以 Wash buffer 清洗 5 次 (>250  $\mu$ L/次) 以去除未附著的 Capture antibody，將培養盤輕拍乾後加入 200  $\mu$ L / well 之 blocking buffer，室溫下反應 1 小時，以減少標準品及樣品之非專一性結合。

#### 3. 加入標準品及樣品

倒除 blocking buffer 後，以 wash buffer 清洗 5 次 (>250  $\mu$ L /

次) 並拍乾。加入 100  $\mu\text{L}$ /well 標準品或樣品，室溫下靜置 2 小時，使抗體與待測樣品或標準品作用。

#### 4. 加入 Detection Antibody

倒除液體後，以 wash buffer 清洗 5 次 ( $>250 \mu\text{L}$ /次) 並拍乾，加入 100  $\mu\text{L}$  / well 的 Detection antibody (以  $1\times$  diluent buffer 稀釋)，室溫下靜置 1 小時。

#### 5. 加入呈色劑與受質

倒除液體後，以 wash buffer 清洗 5 次 ( $>250 \mu\text{L}$ /次) 並輕拍乾，再加入 100  $\mu\text{L}$  / well 的 -HRP (以  $1\times$  diluent buffer 稀釋)，避光靜置於室溫 30 分鐘。倒除液體後以 Wash buffer 清洗 7 次 ( $>250 \mu\text{L}$ /次)，第七次要使 Wash buffer 於 well 內靜置 1 分鐘後再倒除並輕拍乾，加入 100  $\mu\text{L}$  / well TMB Substrate solution，避光靜置於室溫 30 分鐘。

#### 6. 終止反應

最後加入 2 N 硫酸溶液 50  $\mu\text{L}$  / well，以停止呈色反應。

#### 7. 測定吸光值

以 ELISA reader 讀取波長 450 nm 之吸光值，每個試驗樣品皆做 3 重覆，比對標準品濃度曲線計算樣品中細胞激素分泌量。

## 第四節 動物試驗

### 一、 實驗動物及飼養條件

動物為五週齡 BALB/c 品系雄鼠 46 隻，體重約 20-22 g，購自財團法人國家實驗動物中心。動物飼養於獨立通氣飼養籠 (Individual ventilated cages, IVC)，動物房之溫度維持在  $20 \pm 2$  °C，相對溼度在  $55 \pm 5\%$ ，以自動定時器控制光照週期，08:00 A.M. ~ 20:00 P.M. 為光照期 (Light period)，20:00 P.M. ~ 08:00 A.M. 為黑暗期 (Dark period)。實驗期間動物自由飲水及攝食，動物飼料為 Altromin 1326 老鼠標準飼料 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) 購自捷懿企業股份有限公司，動物墊料為 Aspen Chip (Northeastern Products Corp, USA) 購自樂斯科生物科技股份有限公司。

### 二、 試驗樣品

菌株代號	菌株名稱	來源
HK301	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pickled cabbage
HK109	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cabbage
HK006	<i>Lactobacillus plantarum</i> Pi6	Infant feces
Commercial product	<i>Lactobacillus paracasei</i>	

*Lactobacillus fermentum*  
*Lactobacillus acidophilus*

---

樣品皆為菌粉，並用無菌水回溶並稀釋至  $10^8$  CFU / ml。

### 三、動物實驗

將實驗動物五週齡 BALB/c 公鼠經過 2 週適應期後，依體重隨機分成五組，分別為空白組 (control)、各別餵食乳酸菌 (HK301、HK109 和 HK006) 以及市售商品 (Commercial product)。老鼠於七週齡時開始餵食，管餵量為  $10^7$  CFU / day，且每週秤重。在週齡十週和十二週施以腹腔注射 0.5 mg OVA with 2 mg Al (OH)<sub>3</sub> in PBS，每隻小鼠之免疫致敏量為 0.1mL / 10g of mouse，共致敏二次，於週齡第七、十、十二、十三週 (犧牲時) 採血。餵食乳酸菌樣品 49 天後犧牲各組小鼠，採集其血液、脾臟並培養脾臟細胞，進行各項分析。

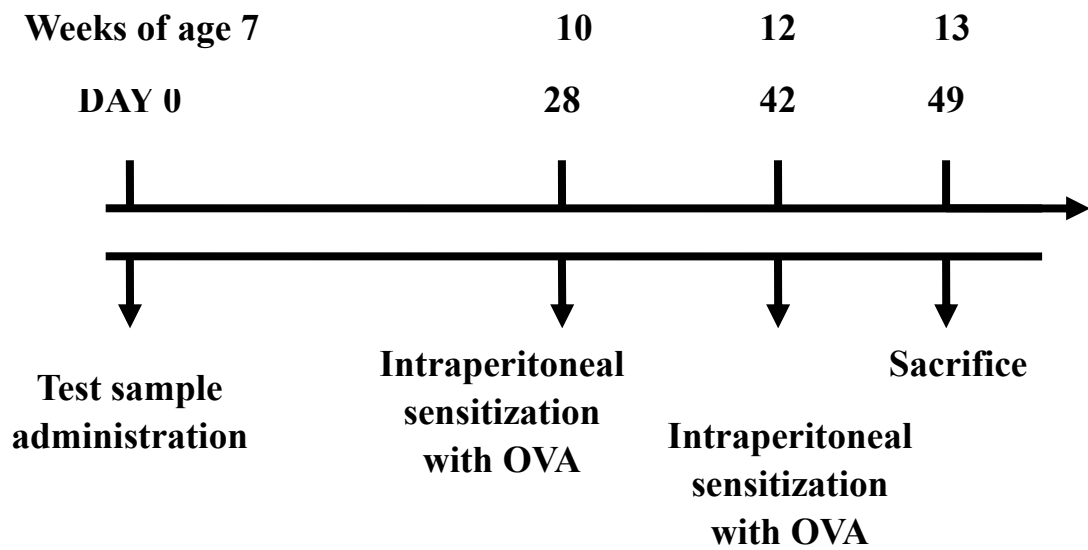


圖 3. 動物實驗流程。

Fig. 3 Experimental procedure of animals.

#### 四、 血樣及脾臟收集並測定抗體

##### (一) 血清收集

以眼窩採血方式取得血液，將全血靜置一小時，待血清分離後，離心  $1500 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 、20 分鐘，取其上清液貯存於  $-20^{\circ}C$ ，以供日後分析特異性抗體。

##### (二) 血清中 OVA-specific IgE、IgG、IgG2a 之測定

採用套組 BD OptEIA™ set OVA-specific IgE、mouse IgG1、mouse IgG2a。

### 1. 加入 Capture Antibody

於 96 well plate 加入濃度  $5 \mu\text{g/mL}$  OVA with dilution buffer  $200 \mu\text{L/well}$ ，室溫下一小時或置於  $4^{\circ}\text{C}$  隔夜。

### 2. Blocking

以 Wash buffer 清洗三次，洗去未結合之 OVA，再加入  $200 \mu\text{L/well}$  之 Blocking solution，室溫下作用 2 小時，減少非特異性結合。

### 3. 加入標準品及樣品

以 Wash buffer 清洗三次，加入稀釋適當倍數的血清樣品  $100 \mu\text{L/well}$ ，室溫下一小時。

### 4. 加入 Detection Antibody

以 Wash buffer 清洗五次，加入  $100 \mu\text{L/well}$  連結生物素之抗小鼠抗體，室溫下反應 1 小時。

### 5. 加入呈色劑與受質

以 Wash buffer 清洗五次，加入  $100 \mu\text{L/well}$  HRP，反應 20 分鐘，以 wash buffer 清洗五次，加入受質  $100 \mu\text{L/well}$  TMB，作用適當時間。



## 6. 終止反應

最後加入 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  以停止呈色反應。

7. 以 ELISA reader 讀取 450 nm 之吸光值，每個試驗樣品皆做 3 重覆，以具有最高吸光值的注射抗原鼠的血清為 positive control。以 ELISA unit 表示血清中特異性抗體含量。

$$\text{ELISA unit} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive}} - A_{\text{blank}})$$

## (三) 製備脾臟細胞

採完血液的 BALB/c 小鼠，無菌下取出其脾臟置於培養皿中，測量脾臟重量後，再放入已加入 3 mL RPMI-1640 培養基之培養品中，再以無菌針筒的橡皮墊及 200 目鋼篩將其擠壓壓碎，吸起細胞懸浮液至 15 mL 離心管中，再加入一次 2 mL RPMI-1640 培養基於沖洗鋼篩及培養皿中剩餘細胞，全部吸起後（避免吸到結締組織），靜置 3-5 分鐘使細胞碎屑及結締組織沉澱，吸取上清液合併於同一離心管中，在 4°C 下以 300 $\times$  g 離心 10 分鐘。吸棄上清液後，將細胞拍散，加入 5 mL 0.1x HBSS，10-15 秒後隨即加入 5 mL 2 x HBSS (混合均勻後還原為 1 x HBSS)，以 300  $\times$  g 離心 10 分鐘後去除上清液，再加入 1 mL RPMI-1640 培養基使細胞懸浮。取適當稀釋之 100  $\mu\text{L}$  細胞

懸浮液，加入 100  $\mu$ L Trypan Blue 染色，以細胞計數盤在顯微鏡下計數，再用 RPMI-1640 調整細胞數至  $2 \times 10^7$  cell / mL RPMI-1640，以待後續細胞激素之分析。計算公式如下：

$$\text{細胞數 (cells / ml)} = \frac{\text{細胞計數器 4 大格總活細胞數}}{4} \times 2 \times 10^4 \times \text{稀釋倍數}$$

#### (四) 脾臟細胞之培養

脾臟細胞分成沒添加刺激物、添加 ConA (培養濃度 5  $\mu$ g/mL)、添加 LPS (培養濃度 10  $\mu$ g/mL)、添加 OVA (培養濃度 25  $\mu$ g/mL) 四種培養方式，細胞濃度最後為  $2 \times 10^7$  cell / mL RPMI-1640，培養 48 小時後取上清液，測其 IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-4 之分泌。

#### 五、 酵素免疫連結吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定細胞激素

採用套組 BD OptEIA™ set Mouse IFN- $\gamma$ 、Mouse IL-12、Mouse IL-4。分析方法依照套組 BD OptEIA™ set 的標準步驟測定。

##### 1. 加入 Capture Antibody

以 Coating buffer 稀釋 Capture antibody 至所需的濃度，之後加入 100  $\mu$ L / well 於 96 孔盤中，再用鋁箔紙封起 plate 避免蒸發，於

4°C 下靜置隔夜。

## 2. Blocking

倒除液體後，以 Wash buffer 清洗 5 次 ( $>250\ \mu\text{L}/\text{次}$ ) 以去除未附著的 Capture antibody，將培養盤輕拍乾後加入  $200\ \mu\text{L} / \text{well}$  之 blocking buffer，室溫下反應 1 小時，以減少標準品及樣品之非專一性結合。

## 3. 加入標準品及樣品

倒除 blocking buffer 後，以 wash buffer 清洗 5 次 ( $>250\ \mu\text{L} / \text{次}$ ) 並拍乾。加入  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  標準品或樣品，室溫下靜置 2 小時，使抗體與待測樣品或標準品作用。

## 4. 加入 Detection Antibody

倒除液體後，以 wash buffer 清洗 5 次 ( $>250\ \mu\text{L}/\text{次}$ ) 並拍乾，加入  $100\ \mu\text{L} / \text{well}$  的 Detection antibody (以  $1\times$  diluent buffer 稀釋)，室溫下靜置 1 小時。

## 5. 加入呈色劑與受質

倒除液體後，以 wash buffer 清洗 5 次 ( $>250\ \mu\text{L}/\text{次}$ ) 並輕拍乾，

再加入 100  $\mu\text{L}$  / well 的-HRP (以 1 $\times$ diluent buffer 稀釋) , 避光靜置於室溫 30 分鐘。倒除液體後以 Wash buffer 清洗 7 次 (>250  $\mu\text{L}$  /次), 第七次要使 Wash buffer 於 well 內靜置 1 分鐘後再倒除並輕拍乾, 加入 100  $\mu\text{L}$  / well TMB Substrate solution, 避光靜置於室溫 30 分鐘。

#### 6. 終止反應

最後加入 2 N 硫酸溶液 50  $\mu\text{L}$  / well, 以停止呈色反應。

#### 7. 測定吸光值

以 ELISA reader 讀取波長 450 nm 之吸光值, 每個試驗樣品皆做 3 重覆, 比對標準品濃度曲線計算樣品中細胞激素分泌量。

### 第五節 統計分析

本實驗數據使用以 SAS 套裝軟體 (The SAS system for windows V8, SAS institute Inc., Cary, NC, USA, 2000) 進行統計分析, 實驗數值以平均值  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 利用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance ; one-way ANOVA) 進行各試驗組內之差異性分析, 使用鄧式新多變域試驗法 (Duncan's New Multiple Range Test) 分析各試驗組平均值間的差異性, 當統計結果  $P < 0.05$  時, 表示具有顯著差異。

### 第三章 結果與討論

#### 第一節 乳酸菌特性

##### 一、吸附試驗

菌體吸附上皮細胞的能力為細菌成為人類腸胃道的優勢菌之重要因素之一，且乳酸菌對宿主細胞的吸附性是具有特異性的 (Harsharn and Jaya, 2008)。Gopal 等學者 (2001) 發現對腸道細胞株具有吸附能力之乳酸菌可有效抑制其它病原菌吸附或侵入腸道細胞，在體內進行乳酸菌吸附試驗較困難，最常使用的方法為利用體外之細胞培養進行試驗，文獻常用之細胞株有人類腸道上皮細胞 Int-407 和結腸上皮細胞 Caco-2 (Tsai et al., 2004; Hirano et al., 2003)。Caco-2 細胞株的優點在於體外試驗可表現型態和功能上的分化，具備成熟腸道細胞的特性，有功能性的微絨毛和分泌水解酶的能力 (Pinto et al., 1982, 1983; Hauri et al., 1985)。

根據 Mishra 和 Prasad (2005) 實驗中篩選 *L. casei* 分析其吸附腸道細胞及抑制病原菌的能力，結果發現 *L. casei* C1 吸附腸道細胞的能力最好，但抑菌能力並非最佳，吸附能力較差的 *L. casei* 63 與 19，卻對 *Salmonella*、*Bacillus cereus* 與 *Shigella dysenteriae* 有較佳的抑制能力。

依據 Pedersen 和 Tannock (1989) 所述每個細胞吸附 15 個菌體以上，認定有吸附作用。本實驗將乳酸菌菌株進行結腸上皮細胞 Caco-2 吸附性試驗，結果顯示以 HK109 ( $206 \pm 2.57$  CFU/mL) 及 HK006 ( $135 \pm 1.49$  CFU/mL) 吸附能力較強，其中 HK301 ( $37 \pm 6.06$  CFU/mL) 與市售商品 ( $39 \pm 4.12$  CFU/mL) 吸附能力較差 (圖 4)。所以，以 HK109 與 HK006 兩株菌株對腸道細胞株具有較佳之吸附能力。乳酸菌菌株對腸道細胞株具有吸附力可有效抑制其它病原菌吸附或侵入腸道細胞 (Gopal et al., 2001)。

## 二、耐酸耐膽鹽試驗

Gilliland 等(1989) 提出耐膽鹽的特性是乳酸菌能否為在腸道中生存的必備條件。 Favaro-Trindade 和 Grosso (2002) 亦指出大部分益生菌耐膽鹽性較耐酸性強。因此，本試驗利用體外磷酸鹽溶液系統，使乳酸菌存在 pH 2.0、pH 2.5、pH 3.2 及 pH 7.2 並添加 0.1% peptone water 的環境下 3 hr 後，進行乳酸菌的耐酸試驗。以 MRS-bile broth (0.3% oxgall) 加 0.1 (w/v) pancreatin 分析乳酸菌對酸的耐受性，菌株之耐酸性分別為 HK301 (3.88 Log CFU/mL)、HK109 ( $1.11 \pm 0.33$  Log CFU/mL) 及 HK006 ( $3.78 \pm 0.15$  Log CFU/mL) (表 1)，耐酸率分別為 48 %、13 %及 45 %。

經 pH 2.0 磷酸鹽溶液處理 3hr 之乳酸菌株分別加入 MRS broth 及 MRS-bile broth 中培養 3 hr, HK301 在添加膽鹽之培養基中菌數較不含膽鹽之培養基少約 3.5 個對數值, 而其餘兩株乳酸菌在 MRS-bile broth 中的菌數比在 MRS broth 中的菌數少約 3.8~4.7 個對數值。而培養至 12 或 24 hr 的乳酸菌菌數顯示, 在 MRS-bile broth 中的膽鹽對三株乳酸菌的生長有明顯抑制, 菌數比在 MRS broth 中少 0.5~5.8 個對數值, 而 HK301 在 MRS-bile broth 中菌數量相較於 pH2, 3hr 多了 4.6 個對數值, 而另外兩株只多了 1.1~1.6 個對數值 (表 2), 而 HK301、HK109 及 HK006 的耐膽鹽率分別為 94 %、32 %、61 %。此三株乳酸菌皆具有耐酸及耐膽鹽之功效, 其中以 HK301 與 HK006 之效果較佳。

Wang 等 (1999) 指出益生菌在不同 pH 值的環境下的存活菌數, 是隨著 pH 的下降及時間的增加而遞減, 且於 pH 1 的環境下, 益生菌皆無存活。Favaro-Trindade 和 Grosso (2002) 研究指出益生菌在 pH 1.0 溶液中 2 個小時之耐酸試驗, 幾無存活菌數, 而 *L. acidophilus* 及 *B. lactis* 在 pH 2.0 溶液中 2 個小時之耐酸試驗其菌數皆可維持  $10^6$  cfu / mL 以上。Tripathi 等學者 (2002) 指出某些乳酸菌在 pH 4.5 的環境下會影響其增殖。本研究之耐酸性試驗結果與文獻具有相同趨勢。

## 第二節 細胞試驗

### 一、乳酸菌對小鼠巨噬細胞 RAW264.7 分泌細胞激素之影響

此次實驗以未刺激之培養基作為空白組，然後三株乳酸菌與 RAW264.7 共培養 24 小時後，以 ELISA 檢測其 Th1 途徑之 IL-12、IFN- $\gamma$  及 Th2 途徑之 IL-4 細胞激素產量。

圖 5 為檢測 IFN- $\gamma$ ，圖中可發現 HK109 之產生 IFN- $\gamma$  能力最佳 ( $101 \pm 22$  pg/mL)，高於控制組其他兩株與控制組及市售產品，約為控制組的 81 倍，而 IFN- $\gamma$  表現量增加，誘發 Th1 的免疫反應，以減緩過敏反應發生 (Sinigaglia et al., 1999；林，2006；Shalini et al., 2010)。圖 6 結果所示，以 HK109 刺激巨噬細胞產生的 IL-12 產量 ( $429 \pm 60$  pg/mL) 為控制組的 430 倍，遠高於 HK301、HK006、控制組及市售商品，有顯著差異。

由以上可發現，經由 HK109 乳酸菌刺激後，Th1 途徑的細胞激素都有不錯的產量。而 IFN- $\gamma$  為主要的活化巨噬細胞之細胞激素，會經由 T 淋巴細胞和 NK 細胞所產生的 IFN- $\gamma$ ，可增強巨噬細胞的殺菌功能藉刺激反應性含氧中間產物 (Oxygen intermediate) 和氧化氮的合成，其反應於溶小體 (Lysosome) 內部執行以破壞微生物 (Zlotnik et al., 2000；Abul et al., 2004)。IFN- $\gamma$  於病毒所引起的免疫



反應扮演重要地角色，不僅可直接作用於輔助型及毒殺型 T 細胞，也可使其分泌 IL-6、IL-12 和 IFN- $\gamma$  之細胞激素 (Blanco et al., 2005; Openshaw, 2005)。在病毒或微生物入侵細胞早期時，會刺激 NK 細胞分泌 IFN- $\gamma$  與巨噬細胞產生協同作用來抵抗病毒 (Zhou et al., 2007)，而 IL-6、IL-12 和 IFN- $\gamma$  可增加血管滲透性、誘導並促進 NK 細胞、嗜中性白血球及淋巴細胞黏附移行至發炎部位 (Panuska et al., 1995; Abul et al., 2004)，而 IFN- $\gamma$  表現量增加，誘發 Th1 的免疫反應，以減緩過敏反應發生 (Sinigaglia et al., 1999; 林, 2006)。

由圖 7 所示，以乳酸菌刺激 RAW264.7 細胞後，此試驗的三株乳酸菌之 IL-4 的產量與控制組和市售商品，無顯著差異。由此可知，以乳酸菌與巨噬細胞共培養後，並不會刺激細胞產生高濃度的 IL-4。

IL-4 為 IgE 抗體產生和初始 CD4<sup>+</sup> 輔助型 T 細胞發育形成 TH2 細胞的主要刺激因子，其主要來源為 CD4<sup>+</sup> T 淋巴細胞中的 Th2 次群和活化肥大細胞及嗜伊紅性白血球。它可促使 T 細胞增生，抑制 Th1 細胞激素產生，和 IgE 產生關係密切，與 T 細胞的增生和分化有關。然而，IL-4 在抗體製造、血球細胞形成 (Hematopoiesis)、發炎反應 (Inflammation) 和形成功能性 T 細胞方面，扮演著非常特殊及重要的角色 (Paul et al., 1991)。在生理方面，IL-4 調節失當會引起過敏 (allergy)、腫瘤細胞自體分泌 (autocrine) 生長及某些感染

疾病之感受性有關。相對的，IL-4 也在生物體中扮演保護的角色，如抵抗細胞外寄生蟲 (Extracellular parasite)、抑制自體免疫反應 (Autoimmune) 和抵抗腫瘤細胞 (林，2006)。

綜合以上結果，單此三株乳酸菌做比較，HK109 刺激 RAW264.7 後產生偏向 Th1 的細胞激素分泌量較多，其次是 HK006，最後是 HK301。

## 二、乳酸菌刺激 PBMC 之免疫測定

不同菌數的乳酸菌刺激 PBMC 對分泌細胞激素 IL-12 和 IFN- $\gamma$  皆有不同的效果。在圖 8 中以三株菌株分別以菌數  $10^5$  CFU/mL (MOI = 0.1)、 $10^6$  CFU/mL (MOI = 1) 及  $10^7$  CFU/mL (MOI = 10) 的乳酸菌刺激 PBMC 後 IL-12 之產量，HK006 ( $1330 \pm 156$  pg/mL) 與市售商品 ( $1627 \pm 70$  pg/mL) 則是在菌數  $10^5$  CFU/mL 產量較佳，而 HK301 ( $1533 \pm 73$  pg/mL) 與 HK109 ( $1339 \pm 60$  pg/mL) 在菌數  $10^6$  CFU/mL 的 IL-12 有較好的產量，分別為控制組的 16 倍與 14 倍。

圖 9 所示以及  $10^6$  CFU/mL 刺激 PBMC 後，IFN- $\gamma$  分泌量效果較其他菌數好，又以市售商品與 HK006 之分泌量偏高。以乳酸菌菌數  $10^5$  CFU/mL 刺激 PBMC 後，市售商品 ( $2711 \pm 25$  pg/mL) 的產量最

佳，其次為 HK006 ( $2467 \pm 254$  pg/mL)，其他無顯著差異。乳酸菌菌數  $10^6$  CFU/ mL時，HK006 ( $2546 \pm 182$  pg/mL) 與市售商品 ( $2355 \pm 383$  pg/mL)，約為控制組的2.8倍與3倍。

Niers等學者 (2005) 針對 13 株乳酸菌與 PBMC 共培養 24 小時，發現 13 株乳酸菌能增加 PBMC 分泌 IFN- $\gamma$ ，特別是 *B. bifidum* ( $12,514 \pm 1,690$  pg/ mL)、*B. infantis* ( $13,820 \pm 1,002$  pg/ mL)、*L. plantarum* ( $12,737 \pm 1,099$  pg/ mL)、*L. salivarius* ( $12,821 \pm 1,383$  pg/mL) 增加 Th1 途徑反應。Theo 等人 (2011) 也用乳酸菌 *L. rhamnosus* 與 *L. casei*. 刺激 PBMC 後，以 *L. rhamnosus* 能促使 PBMC 分泌較多的 IFN- $\gamma$ ，以達到降低過敏反應之功效。

不同菌數導致 IL-4 及 IL-10 分泌量也有所不同。在圖 10 中各菌數刺激 PBMC 所產生之 IL-4 的產量，其中以 HK006  $10^7$  CFU/ mL ( $1.5 \pm 0.3$  pg/mL) 及市售商品之三個菌量 ( $0.61 \pm 0.11$  pg/mL、 $0.78 \pm 0.14$  pg/mL、 $1.23 \pm 1.74$  pg/mL) 之產量最低。在圖11中，檢測以乳酸菌刺激 PBMC 後 IL-10 之產量，圖中 IL-10 的產量以菌數  $10^6$  CFU/ mL (MOI=1) 及  $10^7$  CFU/ mL (MOI=10) 之產量較高，在菌數  $10^5$  CFU/ mL (MOI=0.1) 時，HK301與HK109較低，與其他組別有顯著差異。

有研究以 *L. plantarum* NCIMB8826、*L. lactis* MG1363、*L. casei* ATCC393 及 *L. rhamnosus* GG 與經 staphylococcal enterotoxin A (SEA) 刺激 PBMC 共培養 3 小時，發現這四株乳酸菌能降低PBMC 分泌IL-4 (約 46% ~ 57%) 及IL-5 (約42% ~ 71%)具有抑制Th2途徑反應的能力 (Pochard et al., 2002)。

以乳酸菌刺激 PBMC 後產生偏向 Th1 的細胞激素之菌株以 HK301 之分泌量最好，其次是 HK006，最後為 HK109。

### 第三節 動物試驗

#### 一、餵食乳酸菌及致敏對特異性免疫 BALB/c 雄鼠體重變化之影響

本次研究是將實驗動物五週齡 BALB/c 公鼠經過 2 週適應期後，依體重隨機分成五組，分別為空白組 (control)、各別餵食乳酸菌 (HK301、HK109 和 HK006) 以及市售商品 (Commercial product)。老鼠於七週齡時開始餵食，管餵量為  $10^7$  CFU / day，且每週秤重。在週齡十週和十二週施以腹腔注射 0.5 mg OVA with 2 mg Al (OH)<sub>3</sub> in PBS，每隻小鼠之免疫致敏量為 0.1mL / 10g of mouse，共致敏二次，於週齡第七、十、十二、十三週 (犧牲時) 採血。餵食乳酸菌樣品 49 天後犧牲各組小鼠，採集其血液、脾臟並培養脾臟細胞，進行各項分析。

圖 12 為餵食乳酸菌對特異性免疫性 BALB/c 雄鼠體重變化之影響。結果顯示在 10 週齡及 12 週齡腹腔致敏後，11 週齡及 13 週齡時，有致敏之組別體重皆有明顯下降。由此可知致敏對小鼠體重有較明顯影響，其他皆隨餵食時間增長，各組體重皆逐漸上升。

## 二、 餵食乳酸菌對特異性免疫之 BALB/c 雄鼠犧牲時脾臟重量之影響

圖 13 可以看到餵食乳酸菌對特異性免疫之 BALB/c 雄鼠犧牲時脾臟之重量，Control 組與其他以 OVA 致敏的各組皆有明顯差異，以 OVA 致敏後發現脾臟會因發炎而發生腫脹且脾臟淋巴增加之狀況。餵食乳酸菌後再腹腔注射 OVA，可使脾臟發炎腫脹之情況略為降低。而以數值來看，HK301 ( $0.162 \pm 0.02$  g) 與 HK006 ( $0.168 \pm 0.01$  g) 之腫脹效果較 HK109 組較輕微。

## 三、 餵食乳酸菌對特異性免疫 BALB/c 雄鼠血清中特異性抗原抗體 (IgE、IgG1、IgG2a) 含量之影響

小鼠於 7 週齡未餵食乳酸菌和致敏前先行採血，開始餵食後週齡第 10、12 週施以抗原致敏，並於實驗開始前、第一次致敏前、第一次致敏後兩週及犧牲時採集血清進行 anti-OVA-IgE 分析。而 IgG1、IgG2a 則使用犧牲後之血清檢測。圖 14 為餵食乳酸菌對注射 OVA

with Al(OH)<sub>3</sub> 之致敏模式下，BALB/c 雄鼠分別在週齡 7 週、10 週、12 週、13 週血清中 anti-OVA-IgE 含量之影響。由圖顯示，實驗開始前及致敏前，各組體內之 IgE 均無明顯差異。於致敏後，各組之 Anti-OVA-IgE 的數值皆上升，直至週齡 13 週的血清測得結果，餵食乳酸菌的老鼠血清中 Anti-OVA-IgE 抗體，以週齡 12 週與 13 週比較，餵食 HK301 ( $0.39 \pm 0.06$  unit)、HK006 ( $0.56 \pm 0.11$  unit)、HK109 ( $0.38 \pm 0.04$  unit) 及市售商品 ( $0.41 \pm 0.04$  unit) 之乳酸菌，IgE 下降率約分別為 37%、16%、41%及 32%，HK109 使小鼠體內之 IgE 降低幅度較大，可顯著減少特異性免疫 BALB/c 雄鼠致敏後血清中 Anti-OVA-IgE 抗體。有研究指出針對 OVA 特異性 T cell 接受器隻基因轉殖鼠 (OVA-TCR-Tg mice) 經餵食 *L. casei* strain Shirota 能抑制脾臟細胞分泌 IgE，也降低血清中 OVA-specific IgE 的含量，達到預防食物過敏之效果 (Shida et al., 2002)。也有學者提出 BALB/c 鼠經過 Ovomuroid (OVM) 誘導模式下，餵食 *Lactococcus lactis* G50 能降低血清中 IgE 的濃度 (Kimoto et al., 2004)。Liu 等 (2006) 提出 BALB/c 鼠經過 OVA 致敏模式，餵食以 kefir 發酵牛奶及豆奶，確實能降低 OVA-specific IgE 的含量，抑制過敏反應的發生。

犧牲後之血清檢測 IgG1 (圖 15) 中，控制組與餵食市售商品及乳酸菌各組有明顯差異，而餵食市售產品及乳酸菌各組皆無顯著差異，

且數值皆落在 0.96~0.99 之間。圖 16 為檢測血清中 IgG2a 之含量，控制組與其他各組有顯著差異，而餵食市售商品與乳酸菌之組別無顯著差異。此次實驗中，餵食市售商品與乳酸菌各組之 IgG1 與 IgG2a 無顯著差異。Jinho 等(2010) 以 BALB/c 小鼠實驗，餵食 *L.s casei rhamnosus* Lcr35 並以 OVA 致敏，在實驗 24 天後犧牲小鼠，並取其血清檢測 OVA-specific IgE、IgG1 和 IgG2a，結果發現餵食乳酸菌 *L. casei rhamnosus* Lcr35 之組別與單純致敏組比較，IgG1 和 IgG2a 均無顯著差異。

有過敏反應的人比無過敏的人 IgE 抗體的產量較高，顯示 T 細胞分化偏向 Th2 細胞，降低 IgE 抗體的產生應可減緩過敏反應的發生(林，2006)。Hougee 等學者 (2010) 實驗 BALB/c 小鼠，注射 OVA 致敏並同時餵食 *B. breve* M-16V，測其血清中 IL-4、IL-10、OVA-specific IgE、IgG1 和 IgG2a，餵食 *B. breve* M-16V 與沒有餵食乳酸菌的小鼠比較下，其血清中 IL-4、IL-10、OVA-specific IgE 均明顯下降，此文獻與本實驗結果相符。

四、餵食乳酸菌對特异性免疫 BALB/c 雄鼠脾臟細胞分泌細胞激素 (IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-4) 之影響

LPS、Con A、OVA 等裂殖速 (Mitogens) 對於淋巴細胞之刺激反

應，主要是藉由和細胞表面上的醣蛋白 (glycoproteins) 作用，而刺激細胞轉型與分裂增殖 (Meydani and Ha, 2000)。本實驗中以雞卵白蛋白 (OVA) 輔以完全佐劑腹腔注射 BALB/c 雄鼠，將小鼠餵食不同菌株的乳酸菌後，取其脾臟細胞並利用 LPS、Con A、OVA 刺激細胞後，對於產生細胞激素 (IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-4) 之影響。

### 1. 對 IFN- $\gamma$ 分泌之影響

IFN- $\gamma$  最主要活化巨噬細胞，來抵抗胞內病原菌感染和病毒感染細胞。並促使 B 細胞分泌抗體以及促進天然殺手細胞分泌 IFN- $\gamma$  (Meydani and Ha, 2000)。圖 17 為餵食乳酸菌發酵乳對不同培養方式之特異性免疫性 BALB/c 雄鼠脾臟細胞分泌細胞素 IFN- $\gamma$  之影響。其中以 ConA 刺激小鼠脾臟細胞後，所測得的 IFN- $\gamma$  產量較其他刺激原高，而又以 HK301 ( $6899 \pm 631$  pg/mL) 及 HK109 ( $8029 \pm 1126$  pg/mL) 最高，而 HK109 以 ConA 刺激後較 spontaneous 數值高出約 14 倍。有研究指出，乳酸菌能夠強化免疫系統藉由活化巨噬細胞強化人體內非特異性之先天免疫力。乳酸菌也具有激活淋巴細胞的能力，產生 IFN- $\gamma$ ，使免疫系統被刺激以抑制腫瘤的形成。並且能夠調節 Th1 及 Th2 的免疫反應，促使免疫反應偏向 Th1。所以乳酸菌可以緩和過敏現象，包括食物及遺傳所造成之過敏 (陳，2004；林，



2006)。

## 2. 對 IL-12 分泌之影響

IL-12 主要可激活自然殺手細胞及毒殺型 T 細胞，也可刺激輔助型 T 淋巴細胞分化形成 Th1 細胞產生 IFN- $\gamma$  (Kato et al., 1999)。圖 18 為餵食乳酸菌對不同培養方式之特異性免疫性 BALB/c 雄鼠脾臟細胞分泌細胞素 IL-12 之影響。圖中以 ConA 為刺激原，可促使小鼠脾臟細胞分泌較多的細胞激素 IL-12。以 ConA 刺激脾臟細胞所產生的 IL-12 產量，菌株 HK301、HK006 與 HK109 跟市售產品及控制組比較有顯著差異。以數值來看，HK109 ( $8329 \pm 1343$  pg/mL) 與 HK301 ( $9842 \pm 1213$  pg/mL) 之組別分泌 IL-12 較高，分別約為 spontaneous 的 5.2 倍與 4.5 倍。有實驗以失活的 *L. pentosus* 注射小鼠後，血清中的 IL-12 顯著上升 (Yuji et al., 2008)。

## 3. 對 IL-4 分泌之影響

IL-4 由 Th2 細胞分泌，為 B 細胞生長因子，促進 B 細胞產生 IgE，以及刺激肥大細胞生長 (林和江，2006)。圖 20 為餵食乳酸菌對不同培養方式之特異性免疫性 BALB/c 雄鼠脾臟細胞分泌細胞素 IL-4 之影響。有四個組別，分別以不添加刺激原、添加 ConA、LPS 與 OVA 三種刺激原，測其 IL-4 的分泌量。以 ConA 刺激的菌株，IL-4

的分泌量較高，菌株 HK301、HK109、HK006 與控制組、市售產品組有顯著差異；使用 LPS 刺激後，IL-4 產量較低，其中以 HK301 ( $24 \pm 11$  pg/mL)、HK109 ( $41 \pm 20$  pg/mL) 及市售商品 ( $45 \pm 31$  pg/mL) 之產量較低且與控制組無顯著差異。2004 年 Fujiwara 等人以 *L. paracasei* strain KW3110 餵食雞卵蛋白致敏小鼠，發現血清中的 IgE、Specific IgE 顯著下降，而脾細胞分泌的 IL-4、IL-12 提升。同一乳酸菌於皮膚過敏模式 (AD-like symptoms) 小鼠試驗中，餵食 *L. paracasei* strain KW3110 可以抑制 Total IgE 含量，脾細胞分泌的 IL-4 也顯著降低 (Wakabayashi et al., 2008)。

Peng 等學者 (2007) 以 BALB/c 鼠經 OVA 致敏，餵食 *Streptococcus thermophilus* MC、*L. acidophilus* B、*L. bulgaricus* LB、*L. bulgaricus* 448、*B. longum* B6 發酵乳六週後犧牲，取其脾臟細胞以未添加刺激物及添加  $30\mu\text{g}/\text{mL}$  OVA 培養 48 小時，結果顯示餵食乳酸菌發酵乳確實能增加 IFN- $\gamma$  的分泌，抑制 IL-4 的產生，以 *L. bulgaricus* LB 效果較佳。Torii 等學者 (2007) 以 OVA 致敏 BALB/c 鼠，餵食 *L. acidophilus* strain L-92 四周後犧牲，取其脾臟細胞添加  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  OVA 培養七天，結果顯示 IFN- $\gamma$  產量增加，IL-4 和 IL-10 的產量降低，也降低脾臟細胞中 IgE 與 OVA-specific IgE 的含量，具有調節 Th1 與 Th2 反應的能力。Nonaka 等學者(2008) 針對 OVA

致敏 BALB/c 鼠餵食 *L. pentosus* strain S-PT84 四週，取脾臟細胞添加 100 µg/mL OVA 進行培養，檢測 IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-10 和 IL-4 發現餵食 S-PT84 會降低小鼠脾臟細胞分泌 IL-4，增加 IL-10 的產生，但對於 IFN- $\gamma$  和 IL-12 的產生沒有影響。有研究顯示餵食某些 *Lactobacillus* 菌株可促進經裂殖素刺激的老鼠脾臟細胞分泌 IFN- $\gamma$ ，然而對 IL-4 和 IL-5 分泌並無影響 (Gill, 1998; Kato et al., 1999; Tejada-Simon et al., 1999; Gill et al., 2000)。

在細胞 RAW264.7 試驗中，以乳酸菌刺激細胞後，以菌株 HK109 產生較多 Th1 的細胞激素 (IFN- $\gamma$  及 IL-12)，其次為 HK006 與 HK301。而 PBMC 試驗中，則是以 HK301 與 HK006 分泌較多 Th1 的細胞激素。動物實驗中，以乳酸菌餵食小鼠，並取其脾臟細胞加入刺激原培養後，取其上清液檢測細胞激素，整體而言，菌株 HK109 能分泌較多偏向 Th1 之細胞激素，其次為 HK301，再來是 HK006，與細胞 RAW264.7 試驗之結果較為符合。

## 第四章 結論

此次實驗利用 Caco-2 細胞株作為乳酸菌吸附性試驗，將 HK301、HK006 與 HK009 三株乳酸菌進行 Caco-2 細胞株吸附性試驗，結果顯示 HK109 菌株吸附能力最好，而 HK301 吸附能力最差。在模擬腸道消化程序進行耐酸性耐膽鹽試驗，觀察乳酸菌在 pH 2.0 的環境下 3 小時對其生長之影響及對膽鹽的耐受性，結果顯示此乳酸菌株 HK301 具良好的耐酸性 (48 %) 和耐膽鹽 (94 %) 特性。由實驗結果可知，此三株進行實驗之菌株，皆具有定殖於腸道並耐酸及膽鹽之能力，尤以 HK301 效果最佳。

體外試驗方面分別使用 RAW264.7 及 PBMC 兩種細胞做試驗，在使用 RAW264.7 細胞株試驗中，HK109 導致細胞株分泌較多 Th1 的 IL-12 與 IFN- $\gamma$ ，分別是控制組的 81 倍與 430 倍。使用 PBMC 細胞的試驗中，菌株刺激後分泌 Th1 的 IL-12 與 IFN- $\gamma$  之細胞激素較多，HK301 與 HK109 約為控制組的 16 倍與 14 倍。經由細胞試驗後，此三株乳酸菌皆具降低過敏反應之能力，其中以 HK109 能力較佳。

在動物試驗中 OVA 致敏模式下 BALB/c 雄鼠餵食乳酸菌產品與控制組比較，對於每週體重沒有太大影響。而對脾臟重量而言，乳酸菌能減少脾臟發炎腫脹之情況。檢測血清中 IgE 的濃度，HK301 與

HK109 的 IgE 下降率約為 37%及 41%，HK109 使小鼠體內之 IgE 降低幅度較大。在脾臟細胞分泌細胞激素方面，HK109 誘導分泌較 spontaneous 多 14 倍的 IFN- $\gamma$  與 5.2 倍的 IL-12，而此次實驗的三株乳酸菌皆能增加 Th1 反應之細胞激素的分泌，而達到提升免疫之功效。總括體外及動物試驗結果，此三株乳酸菌皆具有改善過敏之潛力，尤其以 HK109 效果較好，其次為 HK006 與 HK301。

表 1. 乳酸菌耐酸試驗結果。

Table 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) .

LAB strains	Bacterial counts [Log (cfu/mL)]							
	0hr				3hr			
	pH2.0	pH2.5	pH3.2	pH7.2	pH2.0	pH2.5	pH3.2	pH7.2
HK301	2.08±0.17 <sup>b</sup>	7.18±0.45 <sup>b</sup>	8.41±1.00 <sup>a</sup>	8.24±0.80 <sup>a</sup>	3.88±0.00 <sup>a</sup>	4.88±0.00 <sup>b</sup>	8.06±1.52 <sup>a</sup>	8.15±1.82 <sup>a</sup>
HK109	5.18±0.00 <sup>ab</sup>	8.00±1.35 <sup>ab</sup>	8.34±1.57 <sup>a</sup>	8.35±1.35 <sup>a</sup>	1.11±0.33 <sup>b</sup>	5.93±0.00 <sup>ab</sup>	8.21±1.19 <sup>a</sup>	8.43±1.76 <sup>a</sup>
HK006	4.00±0.00 <sup>ab</sup>	8.62±0.93 <sup>a</sup>	8.75±0.33 <sup>a</sup>	8.83±0.85 <sup>a</sup>	3.78±0.15 <sup>a</sup>	6.55±1.98 <sup>a</sup>	8.20±1.60 <sup>a</sup>	8.49±1.53 <sup>a</sup>
Commercial product	7.32±1.37 <sup>a</sup>	8.41±1.60 <sup>a</sup>	8.41±1.66 <sup>a</sup>	8.40±1.05 <sup>a</sup>	2.70±0.69 <sup>b</sup>	6.62±0.96 <sup>a</sup>	8.38±1.49 <sup>a</sup>	8.26±1.49 <sup>a</sup>

Data are presented as means ± SD. <sup>a, b</sup> Values in the same column with different letters are significant difference (P < 0.05)

by Duncan's multiple-range tests.

表 2. 經酸處理 (pH 2.0) 後膽鹽對益生菌之生長影響。

Table 2. Effect of bile salts on the growth after low pH (pH 2.0) treatment.

LAB strains	Bacterial counts [Log (cfu/mL)]							
	0 hr	pH 2 , 3 hr	3 hr*		12 hr		24 hr	
			MRS	** Bile+Pan	MRS	Bile+Pan	MRS	Bile+Pan
HK301	9.46±0.63 <sup>a</sup>	3.88±0.00 <sup>a</sup>	5.85±0.85 <sup>a</sup>	2.26±0.33 <sup>ab</sup>	6.91±0.96 <sup>a</sup>	2.54±0.12 <sup>b</sup>	9.04±0.33 <sup>a</sup>	8.51±0.12 <sup>a</sup>
HK109	8.10±0.14 <sup>b</sup>	1.11±0.33 <sup>b</sup>	5.85±0.55 <sup>a</sup>	1.18±0.00 <sup>b</sup>	6.86±0.75 <sup>a</sup>	1.60±0.15 <sup>c</sup>	8.63±0.33 <sup>ab</sup>	2.74±0.55 <sup>b</sup>
HK006	9.80±1.77 <sup>a</sup>	3.78±0.15 <sup>a</sup>	6.38±1.15 <sup>a</sup>	2.18±1.12 <sup>ab</sup>	6.67±0.33 <sup>a</sup>	3.40±0.00 <sup>a</sup>	8.05±0.85 <sup>b</sup>	4.88±0.15 <sup>b</sup>
Commercial product	8.95±0.15 <sup>b</sup>	2.70±0.69 <sup>ab</sup>	3.68±0.75 <sup>b</sup>	3.24±0.55 <sup>a</sup>	4.76±2.11 <sup>b</sup>	4.31±0.00 <sup>a</sup>	9.06±1.35 <sup>a</sup>	8.41±2.52 <sup>a</sup>

\* LAB in de Mann Rogosa Sharpe (MRS) or Bile+Pan after 3 h treatment at pH 2.

\*\* Bile+pan means MRS broth with 0.3% oxgall and 0.1% pancreatin

Data are presented as means ± SD. <sup>a, b</sup> Values in the same column with different letters are significant difference (P < 0.05)

by Duncan's multiple-range tests.

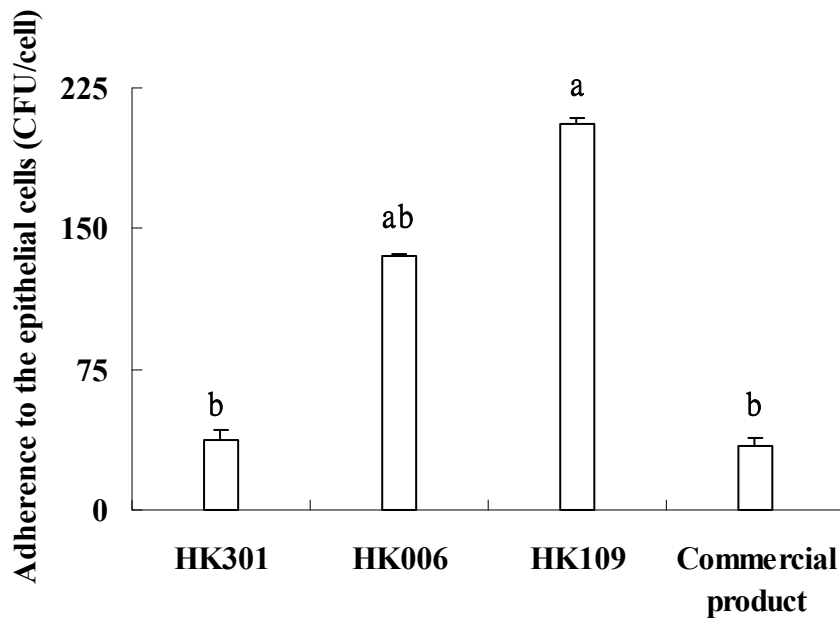


圖 4. 乳酸菌吸附 Caco-2 細胞株之情形。

Fig. 4. Adhesion of lactic acid bacteria strains onto the Caco-2 cell line.

Each adhesion assay was conducted in duplicate with cells from three successive passages. Adhesion assays were monitored after 2 h of incubation.

Data are presented as mean numbers  $\pm$  SD of bacteria adhering per epithelial cell. ( $P < 0.05$ ).<sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .



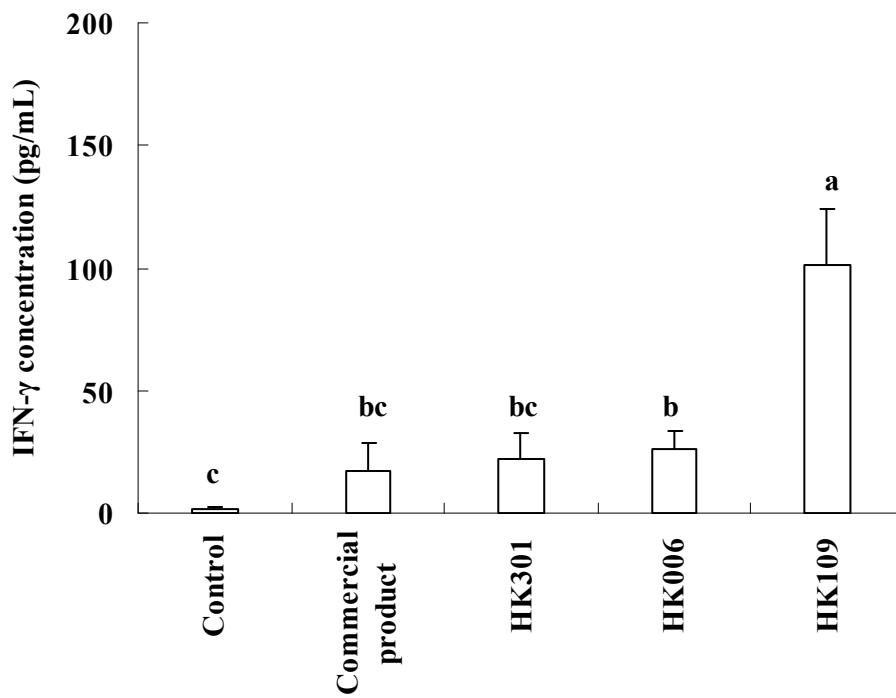


圖 5. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IFN- $\gamma$  之影響。

Fig. 5. Effect of lactic acid bacteria on IFN- $\gamma$  secretion RAW264.7.

Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

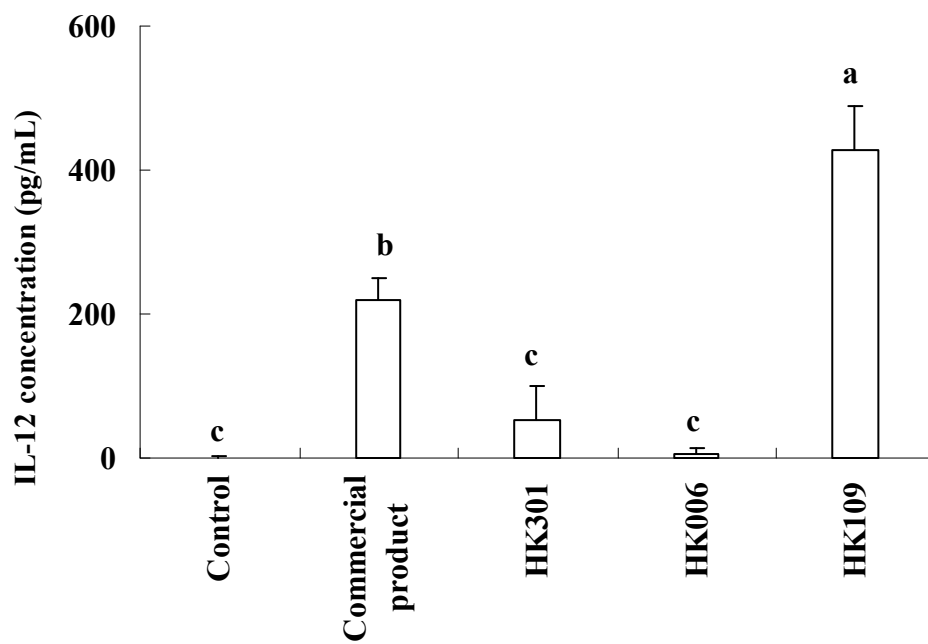


圖 6. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IL-12 之影響。

Fig. 6. Effect of lactic acid bacteria on IL-12 secretion of RAW264.7.

Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

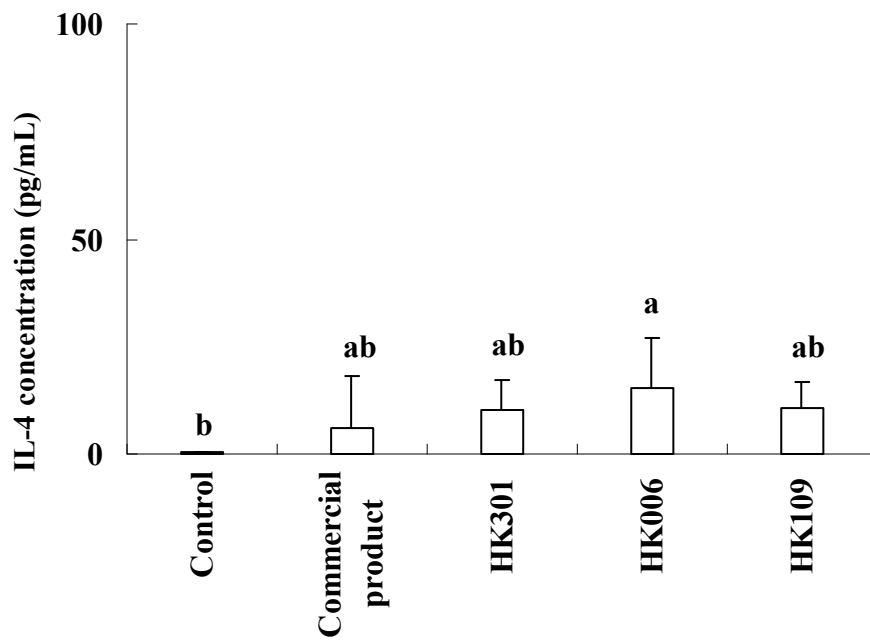


圖 7. 乳酸菌對小鼠巨噬細胞產生細胞激素 IL-4 之影響。

Fig. 7. Effect of lactic acid bacteria on IL-4 secretion of RAW264.7.

Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

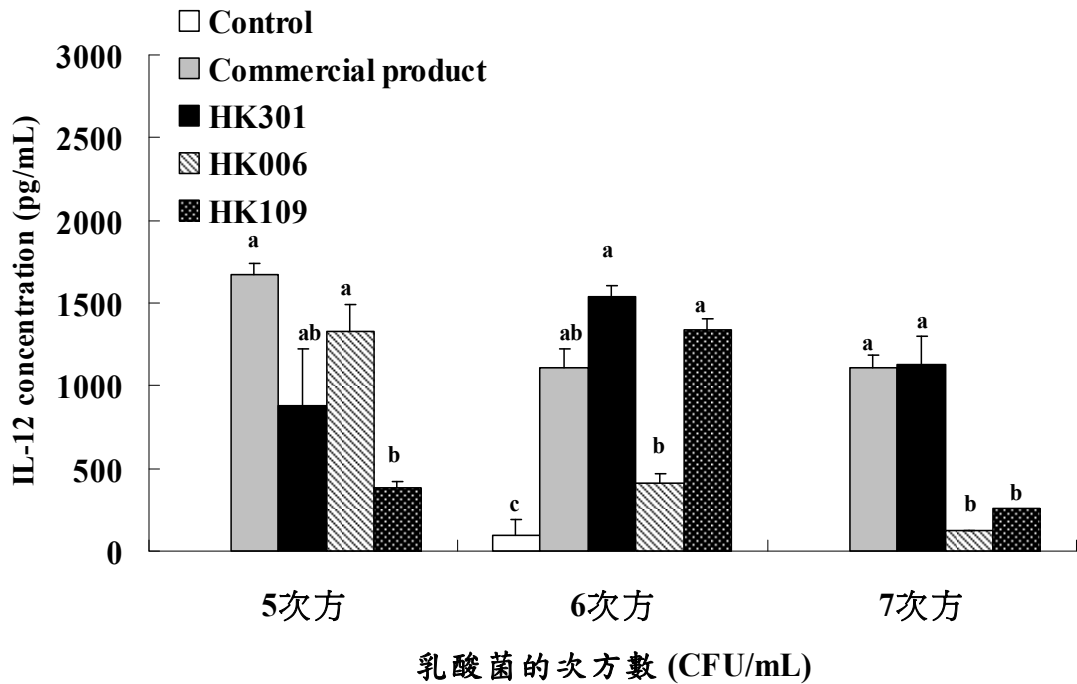


圖 8. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞 ( $2 \times 10^6$  cell / mL) 共培養，於 24 小時後產生細胞激素 IL-12 之影響。

Fig. 8. IL-12 production from PBMC ( $2 \times 10^6$  cell / mL ) after stimulation 24hrs with different bacteria counts of lactic acid bacteria. Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are various bacteria counts of LAB in various groups are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

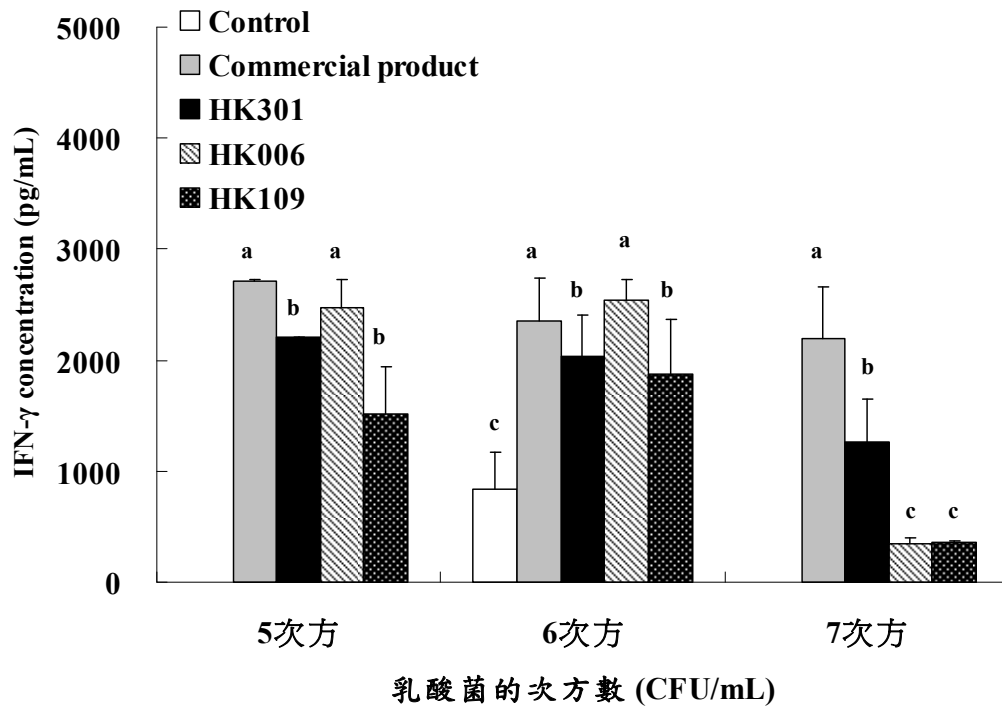


圖 9. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞 ( $2 \times 10^6$  cell / mL) 共培養，於 24 小時後產生細胞激素 IFN- $\gamma$  之影響。

Fig. 9. IFN- $\gamma$  production from PBMC ( $2 \times 10^6$  cell / mL) after stimulation 24hrs with different bacteria counts of lactic acid bacteria. Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are various bacteria counts of LAB in various groups are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

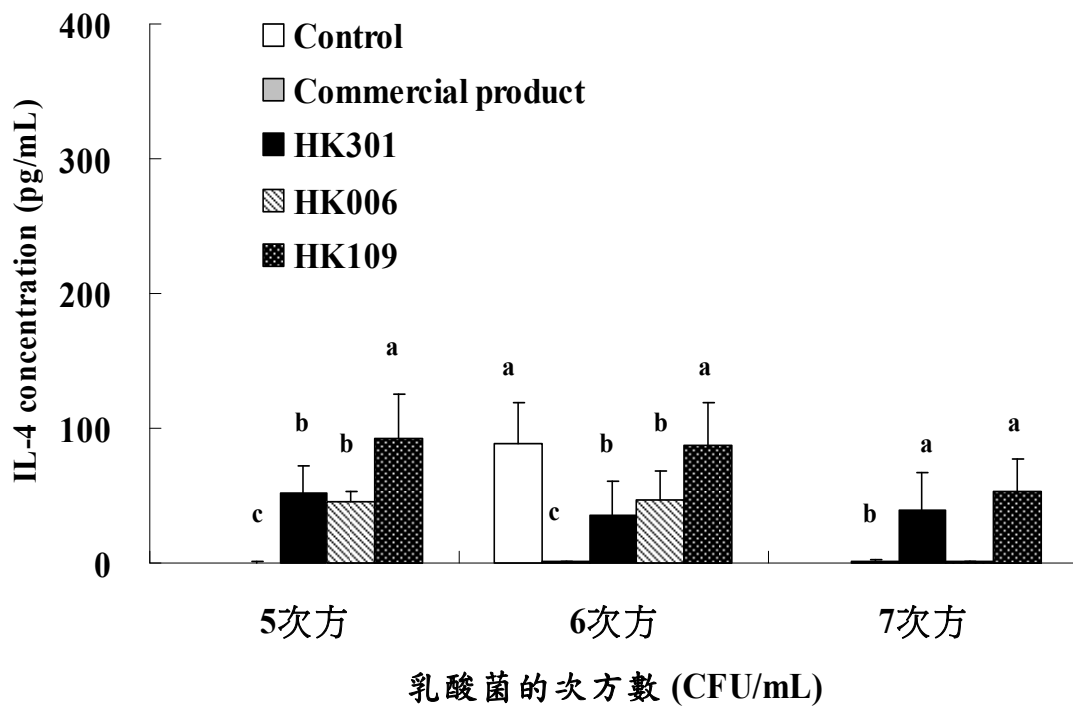


圖 10. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞 ( $2 \times 10^6$  cell / mL) 共培養，於 24 小時後產生細胞激素 IL-4 之影響。

Fig. 10. IL-4 production from PBMC ( $2 \times 10^6$  cell / mL) after stimulation 24hrs with different bacteria counts of lactic acid bacteria. Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are various bacteria counts of LAB in various groups are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

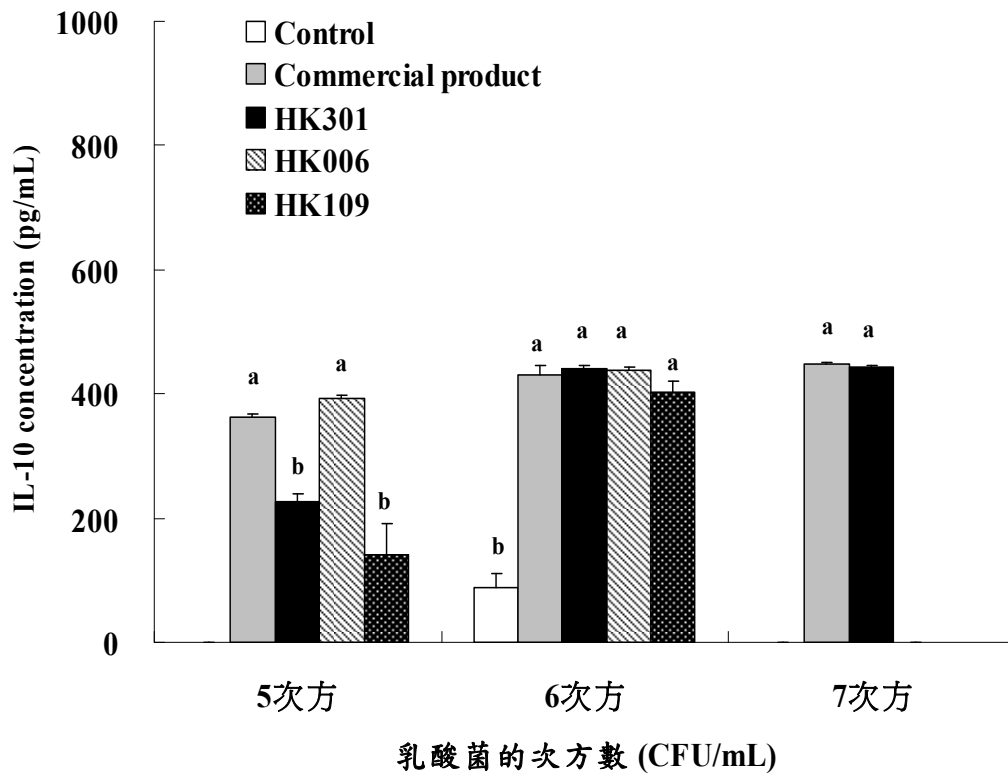


圖 11. 不同菌數乳酸菌與人類周邊血液單核球細胞 ( $2 \times 10^6$  cell / mL) 共培養，於 24 小時後產生細胞激素 IL-10 之影響。

Fig. 11. IL-10 production from PBMC ( $2 \times 10^6$  cell / mL) after stimulation 24hrs with different bacteria counts of lactic acid bacteria. Data are presented as means  $\pm$  SD. <sup>a,b</sup> Values with different symbols are various bacteria counts of LAB in various groups are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

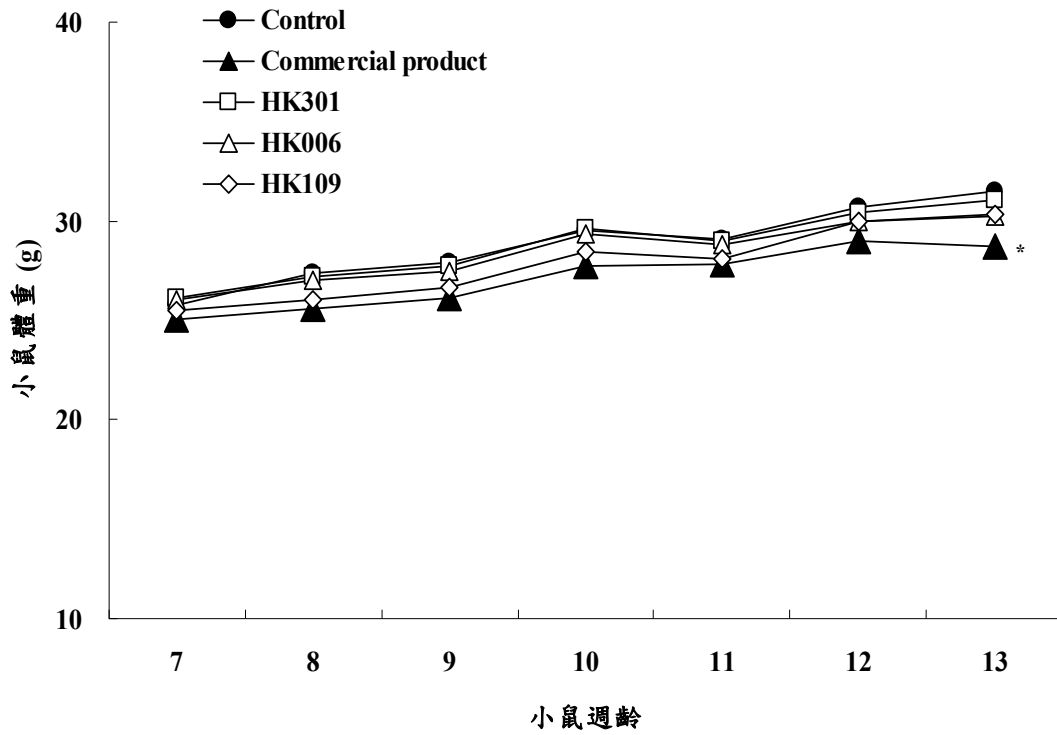


圖12. 餵食乳酸菌產品對OVA致敏BALB/c雄鼠體重變化。

Fig. 12. The body weight of BALB/c mice fed lactic acid bacteria for seven weeks. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9) (\* P < 0.05).



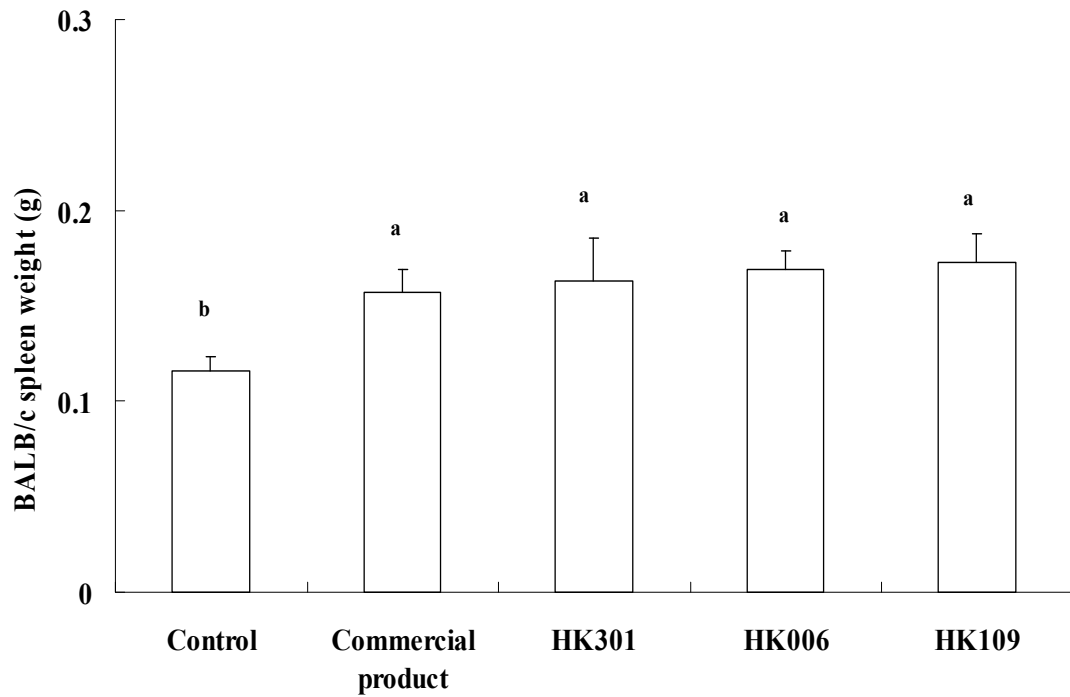


圖13. 餵食乳酸菌產品對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠之脾臟重量。

Fig. 13. The spleen weight of BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

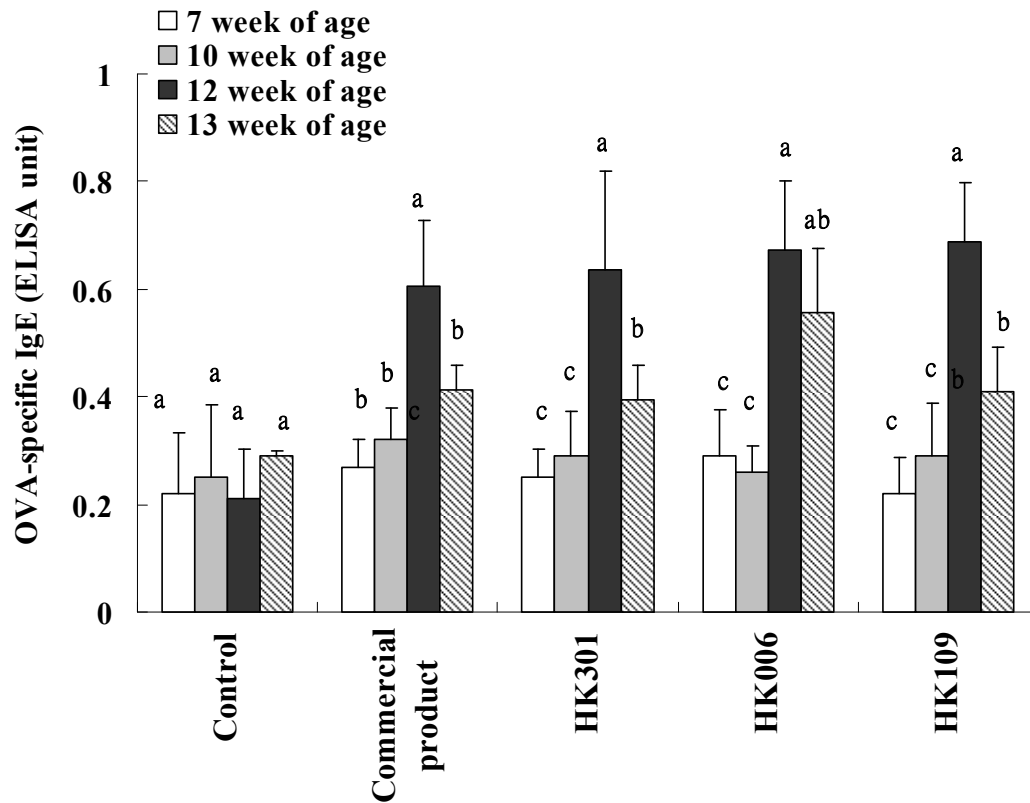


圖14. 對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠餵食乳酸菌後血清中 IgE 之濃度。

Fig. 14. Serum OVA-specific IgE titers of male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols at various time points in various groups are significantly different at the level of  $P < 0.05$ .

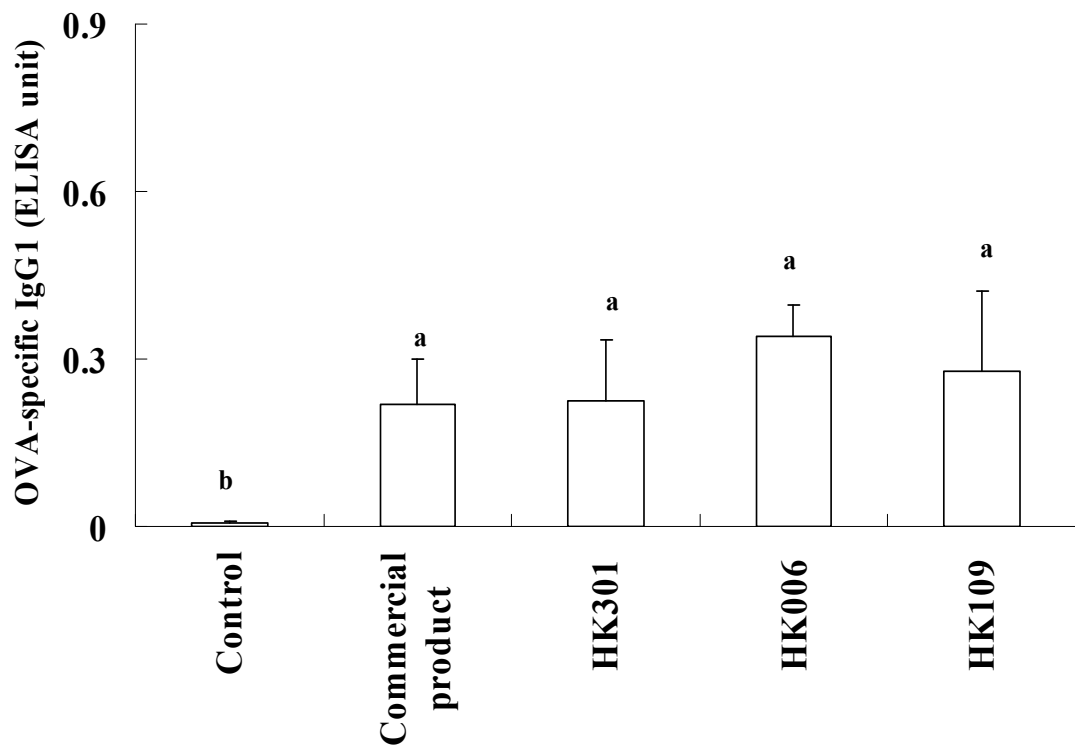


圖15. 對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠餵食乳酸菌後血清中 IgG1 之濃度。

Fig. 15. Serum OVA-specific IgG1 titers of male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of P < 0.05.

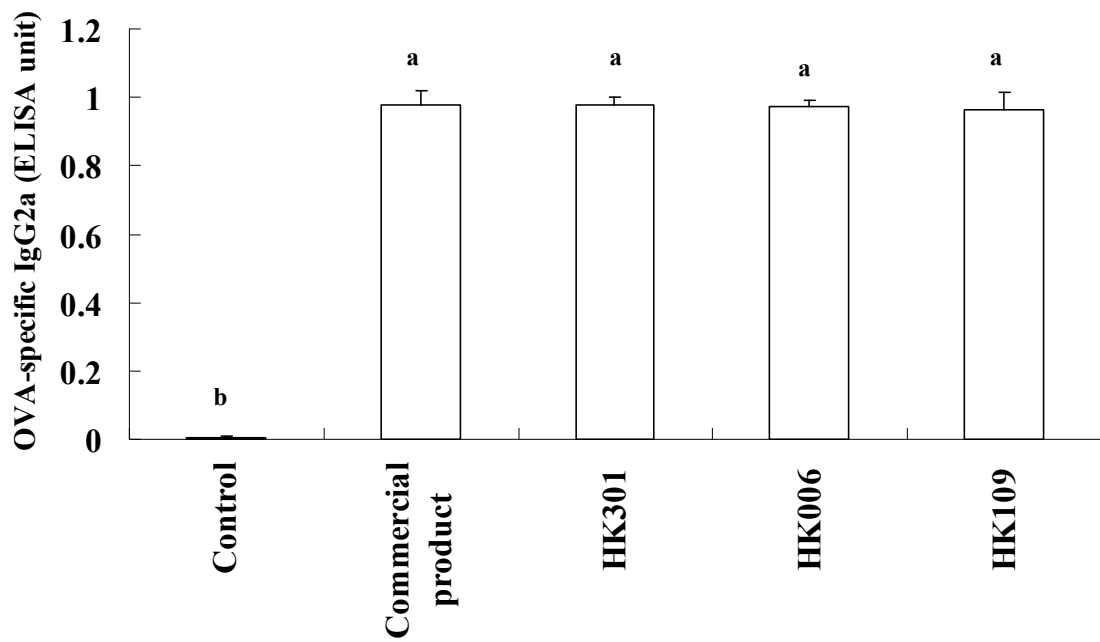


圖16. 對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠餵食乳酸菌後血清中 IgG2a 之濃度。

Fig. 16. Serum OVA-specific IgG2a titers of male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of P < 0.05.

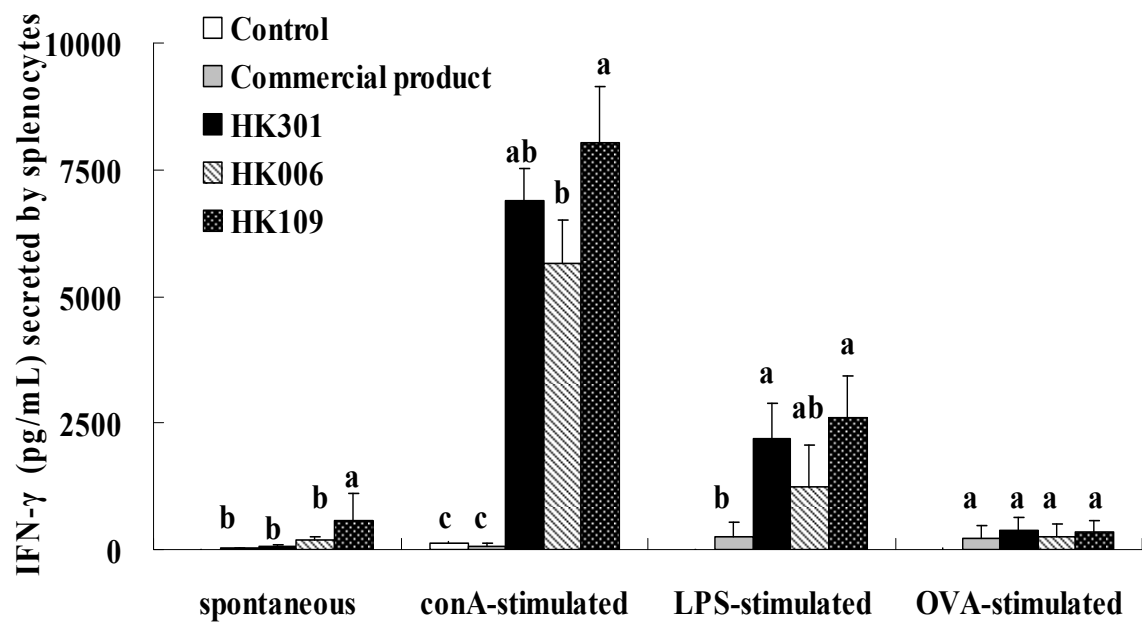


圖17. 餵食乳酸菌對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠脾臟細胞以不同刺激原 (ConA、LPS and OVA) 刺激後分泌 IFN- $\gamma$  之濃度。

Fig. 17. IFN- $\gamma$  secretion of splenocytes stimulated by ConA、LPS and OVA from male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of P < 0.05.

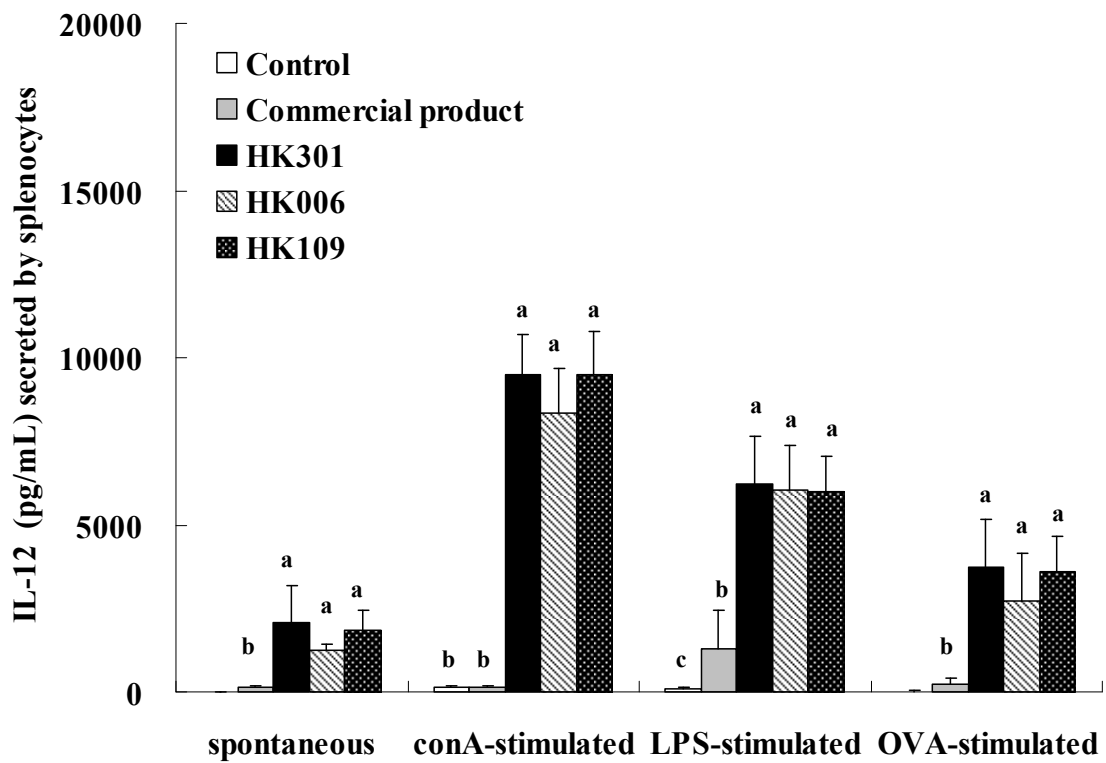


圖18. 飼食乳酸菌對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠脾臟細胞以不同刺激原 (ConA、LPS and OVA) 刺激後分泌 IL-12 之濃度。

Fig. 18. IL-12 secretion of splenocytes stimulated by ConA、LPS and OVA from male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria.

Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b,c</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of P < 0.05.

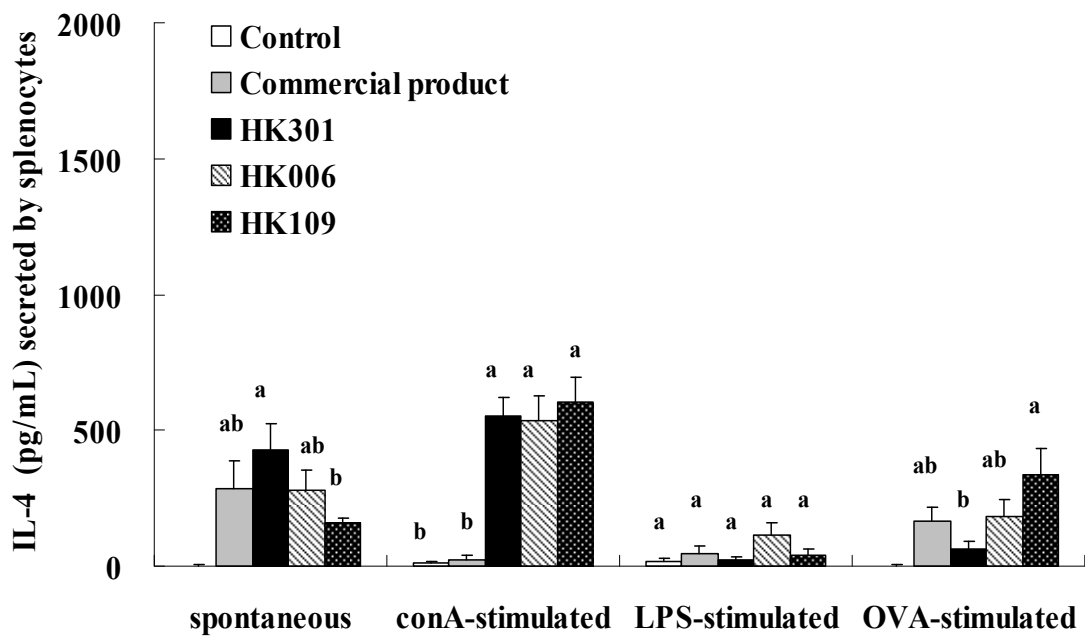


圖19. 餵食乳酸菌對 OVA 致敏 BALB/c 雄鼠脾臟細胞以不同刺激原 (ConA、LPS and OVA) 刺激後分泌 IL-4 之濃度。

Fig. 19. IL-4 secretion of splenocytes stimulated by ConA、LPS and OVA from male OVA-immunized BALB/c mice fed lactic acid bacteria. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 6 ~ 9). <sup>a,b</sup> Values with different symbols are significantly different at the level of P < 0.05.

## 第五章 參考文獻

- 江伯倫 (2002) 過敏性疾病的致病機轉。科學發展。353:14-19。
- 林璧鳳、江伯倫 (2006) 基礎免疫學: 免疫系統的功能和異常。藝軒圖書出版社。
- 行政院衛生署 (1999) 健康食品功效評估辦法。健康食品之免疫調節功能評估方法。行政院衛生署公告衛署食字第88037803 號。台北。
- 李坤美、林應然 (2005) 益生菌在臨床上的使用。北市醫學雜誌，2:410-422。
- 陳慶源、林富美 (2004) 益生菌之保健功效。食品工業。36:1-3。
- 陳慶源、黃崇真、邱雪惠、廖啟成 (2007) 乳酸菌之保健功效與產品開發。食品生技(11): 11-16。
- 彭瑄第 (2004) 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系碩士論文。
- 楊惠聿 (2001) 介白質-4 和介白質-13 之基因多型性與台灣過敏病童之關係。中山醫學院毒理學研究所碩士論文。
- 龍湘美 (2004) 乳酸細菌素抗菌作用及其在食品上應用之回顧。國立台灣海洋大學食品科學系碩士在職專班學位論文。
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 2007. Cellular and Molecular



Immunology. Philadelphia, Pennsylvania.

- Abdolamir, B., Roushan, Z.M., Razmik, B., Julayi, H., Sohrabi, Z., Mazloomi, S.M., Eskandari, M., 2010. Effects of probiotic yoghurt consumption on the serum cholesterol levels in hypercholesteremic cases in Shiraz, Southern Iran. *Scientific Research and Essays*. pp. 2206-2209.
- Abul, O., Alhajj, R., Polat, F., Barker, K., 2005. Finding differentially expressed genes for pattern generation. *Bioinformatics*. 21:445-450.
- Blanco, B., Pérez-Simón, J.A., Sánchez-Abarca, L.I., Carvajal-Vergara, X., Mateos, J., Vidriales, B., López-Holgado, N., Maiso, P., Alberca, M., Villarón, E., Schenkein, D., Pandiella, A., San, M.J., 2006. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood*. 107:3575-3583.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol*. 28:281-370.
- Chiu, H.H., Tsai, C.C., Hsieh, H.Y., Tsen, H.Y., 2007. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the Salmonella invasion in mice. *J. Appl. Microbiol*. 4:605-612
- Cross, M.L., Stevenson, L.M., Gill, H.S., 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: An important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int. Immunopharmacol*. 1: 891-901.
- Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol*. 43:164-167.
- de Almeida, M.C., Sila, A.C., Barral, A., Netto, M.B., 2000. A simple

- method for human peripheral blood monocyte isolation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 95:221-223.
- Fang, H., Elina, T., Heikki, A., Seppo, S., 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 29:47-52.
- Fávaro, T.C.S., Grosso, C.R., 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. J. Microencapsul. 19:485-494.
- Felley, C.P., Corthésy, T.I., Rivero, J.L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L., Michetti, P., 2001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13:25-29.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 94:449-455.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- Gill, H.S., 1998. Stimulation of the immune system by lactic cultures. Int. Dairy J. 8:535-544.
- Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J.G., 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). Brit. J. Nutr. 83:167-176.
- Gilliland, S.E., 1989. Acidophilus milk products : A review of potential

- benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72:2483-2494.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., 2000. *Kuby Immunology*. Fourth edition. W. H. Freeman and Company. USA.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S., 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 207-216.
- Hammes, W.P., Tichaczek, P.S., 1994. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensmittel Forsch.* 198:193-201.
- Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A., Marxer, A., 1985. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 101:838-851.
- Havennar, R., Husis, J.H.J., 1992. The lactic acid bacteria. *Wood B. J.B.* 99:151-170.
- Hessle, C., Andersson, B., Wold, A. E., 2000. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun.* 68:6.
- Hirayama, K., J. Rafter., 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Micro and Infection.* 2:681-686.
- Hong, W.S., Chen, Y.P., Chen, M.J., 2010. The antiallergic effect of Kefir lactobacilli. *J. Food Sci.* 75:244-253.
- Hougee, S., Vriesema, A.J.M., Wijering, S.C., Knippels, L.M.J., Folkerts,

- G., Nijkamp, F.P., Knol, J., Garssen, J., 2010. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *Int Arch Allergy Immunol* 151:107-117.
- Huang, J., Zhong, Y., Cai, W., Zhang, H., Tang, W., Chen, B., 2010. The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60:132–141
- Ishida, Y., Bandou, I., Kanzato, H., Yamamoto, N., 2003. Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67:951-957.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S., 2001. Probiotics: effect on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:444s-450s.
- Jain, S., Yadav, H., Sinha, P.R., Kapila, S., Naito, Y., Marotta, F., 2010. Anti-allergic effects of probiotic Dahi through modulation of the gut immune system. *Turk. J. Gastroenterol.* 21:244-250
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 1994. *Immunobiology*. Fifth edition. Garland Publishing.
- Jay, J.M., 2000 *Modern Food Microbiol.* 6nd Ed. Apac Publishers. Las Vegas, Nevada. p.269-271.
- Jinho, Y., Jang, S.O., Kim, B.J., Song, Y.H., Kwon, J.W., Kang, M.J., Choi, W.A., Jung, H.D., Hong, S.J., 2010. The Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the Prevention of Asthma in a Murine Model. *Ann. Allerg. Asthma. Im.* 2:199-205
- Kato, I., Tanaka, K., Yokokura, T., 1999. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by

- mouse selenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 21:121-131.
- Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A., 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1-9.
- Kim, T.S., Hur, J.W., Yu, M.A., Cheigh, C.I., Kim, K.N., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Pro.* 66:3-12.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., Mckay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R., 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82:29-58.
- Klaver, F.A., van der Meer, R., 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt de-conjugating activity. *Appl. Environ. Micro.* 59:1120-1124.
- Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Res* 397:169-182.
- LeBlanc, J.G., Matar, C., Valdez, J.C., LeBlanc, J., Perdigon, G., 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 85: 2733-2742.
- Lee do, K., Jang, S., Baek, E.H., Kim, M.J., Lee, K.S., Shin, H.S., Chung,

- M.J., Kim, J.E., Lee, K.O., Ha, N.J., 2009. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids health dis.* 8:21.
- Liong, M.T., Shah, N. P., 2006. Effects of a *Lactobacillus casei* symbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acid in rats. *J. Dairy Sci.* 89:1390-1399.
- Liu, J.R., Wang, S.Y., Chen, M.J., Yuen, P.Y., Lin, C.W., 2006. The anti-allergenic properties of milk kefir and soy milk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *J. Sci. Food Agric.* 86:2527-2533.
- Mancuso, M., Filosto, M., Hirano, M., DiMauro, S., 2003. Spinal muscular atrophy and mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol* 105:621-622.
- Maria, A.J., Ylva, M.S., Persson, J.O., Caroline, N., Eva, S.E., 2011. Early colonization with a group of lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PloS. One.* 6:e23031.
- Marteau, P., Seksik, P., Jian, R., 2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal* 88:S51-S57.
- Meydani, S.N., Ha, W.K., 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:861-872.
- Mishra, V., Prasad, D.N., 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol.* 103:109-115.
- Niers, L.E.M., Timmerman, H.M., Rijkers, G.T., van Bleek, G.M., van Uden, N.O.P., Knol, E.F., Kapsenberg, M.L., Kimpen, J.L.L.,

- Hoekstra, M.O., 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin. Exp. Allergy*. 35:1481-1489.
- Nonaka, Y., Izumo, T., Izumi, F., Maekawa, T., Shibata, H., Nakano, A., Kishi, A., Akatani, K., Kiso, Y., 2008. Antiallergy effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/ Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int. Arch. Allergy Imm.* 145:249-257.
- Openshaw, P.J., Tregoning, J.S., 2005. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:541-555.
- Oscar, P., Gořrkem, Y., Ahmet, K.A., Tunc, A., Muřbecel, A., Cezmi, A.A., 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.* 40:1232–1240.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:279–289.
- Panuska, J.R., Merolla, R., Rebert, N.A., Hoffmann, S.P., Tsivitse, P., Cirino, N.M., Silverman, R.H., Rankin, J.A., 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J. Clin. Invest.* 96:2445-2453.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A., Kim, H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100:1171-1185.
- Paul, W.E., 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory

- lymphokine. *Blood* 77:1859-1870.
- Pedersen, K., Tannock, G.W., 1989. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 55:279-83.
- Peng, S., Lin, J.Y., Lin, M.Y., 2007. Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. *J. Agric. Food. Chem.* 55:5092-5096.
- Perdigón, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J.C., Medici, M., 2002. Interaction of lactic bacteria with the gut immune system. *European Eur. J. Clin. Nutr.* 56:21s-26s.
- Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A.B., Pestel, J., Mercenier, A., 2002. Lactic acid bacteria inhibit Th2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 617-623.
- Romagnani, S., 1996. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends in Microbiology* 4: 470-473.
- Sandy, P., Lin, J.Y., Lin, M.Y., 2007. Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. *J. Agric. Food Chem.* 55:092-5096.
- Shah, N. P., 2000. Effects of milk-derived bioactives: An overview. *Br. J. Nutr.* 84:S3–S10.
- Shah, N. P., 2007. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17:1262-1277.
- Shah, N.P., Fedorak, R.N., Jelen, P., 1992. Food consistency effects of quark in lactose absorption by lactose intolerant individuals. *Int. Dairy J.* 2:257–269.



- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., Habu, S., Kaminogawa, S., 2002. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin. Exp. Allergy*. 32:563-570.
- Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., Rogge, L., 1999. Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm. *Dev. Comp. Immunol*. 23:657-663.
- Suvarna, V.C., Bobby, V.U., 2005. Probiotics in human health: A current assessment. *Curr. Sci*. 88:1744-1748.
- Tae, J.W., Bongjoon, K., Dong, S.S., Young, T.L., Eun, S.O., Do Ik, L., Eon, S.P., Hyeyoung, M., Park, S.Y., Hwang, K.W., 2011. Modulation of Th1/Th2 balance by *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi via stimulation of macrophage cell line J774A.1 in Vitro. *J. Food Sci*. 76:55-61.
- Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T., Yamamoto, Y., 1993. Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 57:1557-1560.
- Tejada-Simon, M.V., Ustunol, Z., Pestka, J.J., 1999. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J. Food Pro*. 62:162-169.
- Theo S. P., Wendy W. C., van Maren, Jeroen van B., Marjolijn H., Stefan N., Cor J., Dirk J. de J., Leo A. B. J., Belinda van't L., Johan G., Gosse J. A., Mihai G. N., 2011. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. *Clin. Vaccine*

- Immunol. 18:621-628.
- Torii, A., Torii, S., Fujiwara, S., Tanaka, H., Inagaki, N., Nagai, H., 2007. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. Allergol. Int. 56:293-301.
- Trinchieri, G., 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type I and cytotoxic lymphocytes. Blood 84:4008-4027.
- Tripathi, A.K., Misra, A.K., Batish, V.K., Chander, H., 2002. Performance of lactic starter cultures adapted to varied pH in Elliker's broth. Indian J. Dairy Sci. 55:17-21.
- Tsai, C.C, Hsih, H.Y, Huang, L.F., Lin, C.C., Tsen ,H. Y., 2004. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strains of *Enterococcus faecium* TM39. Int. J. Food Microbiol. 96:1-12.
- Tsai, C.C., Huang, L.F., Lin, C.C., Tsen, H.Y., 2004. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strains of *Enterococcus faecium* TM39. Int. J. Food Microbiol. 96: 1-12.
- Une, C., Andersson, J., Eloranta, M.L., Sunnemark, D., Harris, R.A., Orn, A., 2000. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol. 121:499-505.
- van de Water, J., Keen, C.L., Gershwin, M.E., 1999. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. J. Nutr. 129:1492s

-1495s.

- Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics — From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.
- Wang, X., Brown, I.L., Evans, A.J., Conway, P. L., 1999. The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *J. Applied Microbiol.* 87:631-639.
- Xiao, J. Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Hosono, A., 2003. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J. Dairy Sci.* 86:2452-2461.
- Zavaglia, A.G., Kociubinski, G., Perez, P., Antoni, G., 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J. Food Prot.* 61:865-873.
- Zhou, J., Yang, X.Q., Fu, Z., Zhao, X.D., Jiang, L.P., Wang, L.J., Cui, Y.X., 2008. Increased pathogenesis and inflammation of airways from respiratory syncytial virus infection in T cell deficient nude mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:345-351.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.
- Zweibaum, A., Triadou, N., Kedinger, M., Augeron, C., Robine-Léon, S., Pinto, M., Rousset, M., Haffen, K., 1983. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int. J. Cancer.* 32:407-412.

弘光科技大學動物實驗管理小組審查同意書  
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol  
HungKuang University

動物實驗申請表暨收件書編號：99029

計畫申請人：曾浩洋 職稱：教授

單位：民生學院食品科學系

飼養/應用地點：N607 動物房

計畫名稱：功能性益生菌開發及產業應用3年計畫(分項計畫一：功能性益生菌之開發)(分項計畫三：功能性益生菌種及資料庫建立)

本計畫之「動物實驗申請表」業經動物實驗管理小組 實質 形式審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	計畫執行期間(西元)
BALB/c	300 隻	2011 年 01 月至 2011 年 06 月
SPF 雞	200 隻	2011 年 01 月至 2011 年 06 月
Wistar rats	80 隻	2011 年 01 月至 2011 年 06 月

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Protocol Title : \_\_\_\_\_

IACUC Approval No : \_\_\_\_\_

Period of Protocol : Valid From: \_\_\_\_\_ To: \_\_\_\_\_ (mm/dd/yyyy)

Principle Investigator (PI) : \_\_\_\_\_



動物實驗管理小組召集人

曾浩洋

日期

Date

附錄1. 動物實驗審查同意書