

Pediococcus Probiotics containing *Pediococcus acidilactici* 5051 strain -
Interaction with gastrointestinal flora and mesenteric lymph nodes
含有乳酸片球菌 5051 菌株的片球菌益生菌与胃肠道菌群和肠系膜淋巴结的相互作用

J. J. Lin¹ Hiroyuki Ito² Shota Nouchi³ Takuo Ishida⁴
葛伊杰 译

- 1) Hood College
- 2) AC Plaza Kariya Animal Hospital
- 3) Daktari Animal Hospital Tokyo Medical Center
- 4) Akasaka Animal Hospital

摘要: 乳酸片球菌有多种菌株。已发现同一属或种的不同益生菌菌株在安全性和有效性方面具有不同的特点。乳酸片球菌 5051 (学名: *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517) 是所有片球菌属中耐热 (高温) 和低 pH 耐受性最好的益生菌。乳酸片球菌 5051 已被加拿大卫生部认证为安全的食品成分。这种益生菌菌株的安全性也在猫、狗和人类身上进行了评估。据相关报告, 使用乳酸片球菌 5051 的片球菌益生菌可有效预防住院犬和猫的压力性消化系统疾病。它还有助于食物消化、减少有毒化合物和调节细胞因子平衡。

关键词: 片球菌, 益生菌, 5051 菌株, 肠道菌群, 免疫调节

益生菌是具有活性的微生物, 如果能摄入恰当的量¹, 则会对宿主的健康有益。在市售的益生菌补充剂当中流行的厌氧菌株, 如双歧杆菌和乳酸杆菌, 缺乏足够的耐热性、耐氧化和耐酸性^{2, 3}。这些特性引起了人们对其的关注, 到底能有多少益生菌能在胃酸中存活下来并成功到达具有健康功能的胃肠道呢? 因此, 重现市售益生菌声称的效果一直具有挑战性。

芽孢杆菌在不利生存条件下能生成芽孢 (内生孢子) 的能力使其成为天然耐热的乳酸菌。这些芽孢可以在高于 100°C 的高温下依旧保持细菌的活力。比如在亚洲被广泛使用的枯草芽孢杆菌可以成为益生菌产品的优秀候选者。然而, 芽孢杆菌属内同时也含有致命的有害病原体, 如炭疽杆菌 (Madigan 和 Martinko, 2005 年), 以及引起食物中毒的蜡状芽孢杆菌 (Kotiranta 等人, 2000 年)。将致病基因从高致病性的炭疽芽孢杆菌或蜡状芽孢杆菌转移到益生菌枯草芽孢杆菌中是存在潜在危险的。

某些芽孢杆菌的菌株可以在高温条件下存活; 芽孢杆菌会通过形成芽孢来获得对于热的耐性。由于芽孢形成后, 细菌会表现出对酒精消毒、高温蒸汽或低浓度次氯酸钠的抵抗力, 由此会增加额外的质量控制程序相关的时间和成本, 因此它们对制造商眼中是不受欢迎的。因此, 在许多国家, 制造商不希望在其设施中使用芽孢杆菌。芽孢杆菌属中含有致命的有害病原体, 如炭疽芽孢杆菌⁴ (会导致炭疽病) 和蜡状芽孢杆菌⁵ (会导致食物中毒) 属于同一属。将致病基因从高致病性炭疽芽孢杆菌或蜡状芽孢杆菌转移到益生菌枯草芽孢杆菌中会存在潜在的危险。

乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 在美国被称为 GRAS, 因为其在人类食品中的长期使用历史, 足以证明其安全性。乳酸片球菌是一种存在于人和动物胃肠道 (GI) 内的天然益生菌⁷。与芽孢杆菌不同, 没有临床报告显



示乳酸片球菌是一种会广泛传染的病原体。同时与炭疽杆菌和蜡状芽孢杆菌不同，乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 在同一属中没有致病菌。乳酸片球菌 5051 (学名: *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517) 是所有小球菌属中耐热 (高温) 和低 pH 耐受性最好的益生菌。它是一种基于植物的非孢子形成益生菌，可以在氧化、高温和胃酸⁸中存活。它在日本的人类、犬、猫、兔子、鸟和马的身上使用已拥有超过 10 年的历史，经证实，乳酸片球菌 5051 没有传染性病原体的迹象。同样还在大鼠、犬和人类身上进行了安全性评估。最近，乳酸片球菌 5051 已被加拿大卫生部认证为食品可添加成分。

乳酸片球菌 5051 在室温下可保存长达 2 年 (图 1)。在经 85 度高温处理 2 分钟后检测到约 97% 的活益生菌，10 分钟后依旧能检测到 90% 的活菌。虽然许多益生菌菌株在通过胃酸后难以保持活性，但乳酸片球菌 5051 即使在 pH1.2 的环境下也能存活 (图 2)。对大鼠和犬给药后，在它们的粪便⁹中能检测到乳酸片球菌 5051 的存在。乳酸片球菌 5051 是一种未经基因工程改造的天然益生菌菌株。在无芽孢生成的益生菌中，具有乳酸片球菌 5051 这样优良特性的益生菌是非常罕见的。

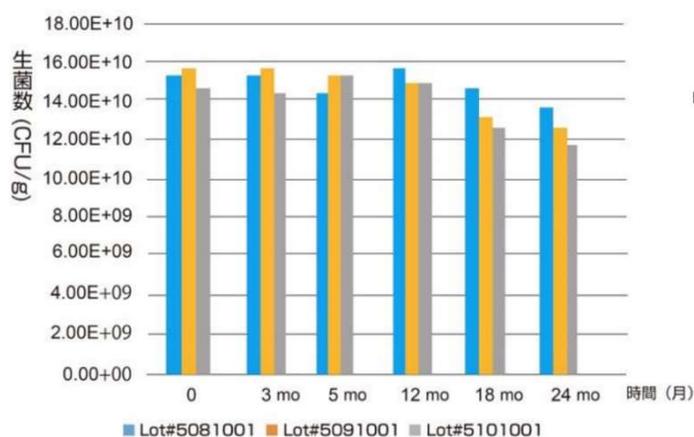


图1: 乳酸片球菌5051在室温下的稳定性
3个不同批次的乳酸片球菌5051在室温下储存2年，并评估其生存能力

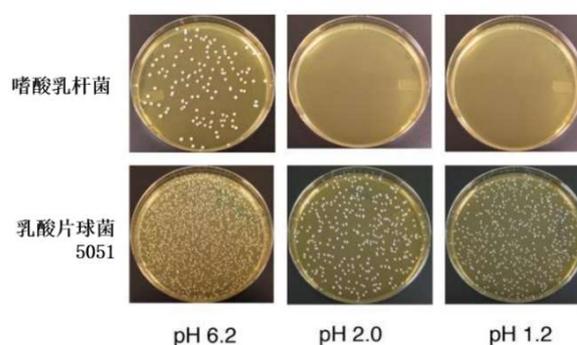


图2: 不同pH对乳酸片球菌5051和嗜酸乳杆菌体外生存的影响

乳酸片球菌5051加入MRS肉汤培养基且调整至pH6.2, pH2.0, pH1.2, 在37°C条件下培养4小时，然后将其转移到pH 6.2的培养基中，在37度孵育过夜后得到结果

在腹泻或呕吐的情况下，益生菌通常会与抗生素一起使用。由于大多数益生菌是革兰氏阳性菌，它们通常会被抗生素杀死，从而失去活力。乳酸片球菌 5051 对抗生素有一定的耐受性，可以一起服用。当含有乳酸片球菌 5051 和布拉迪酵母菌 (*S. boulardii*) 的片球菌益生菌在液体培养液中用不同浓度的氯霉素或四环素处理时，依旧能检测到大量的活性益生菌 (图 3)。

| | | | | |
|--|---------|----------|--|----------|
| | | | | |
| 对照组 | 34mg/mL | 102mg/mL | 25mg/mL | 100mg/mL |
| 将200mg乳酸片球菌与4毫升MRS肉汤培养基加水混匀后，加入34mg/mL和102 mg/mL氯霉素，然后置于37°C环境下孵育4小时，将100u1以不同稀释度接种到MRS培养基内。 | | | 将200mg乳酸片球菌与4毫升MRS肉汤培养基加水混匀后，加入25mg/mL和100 mg/mL四环素，然后置于37°C环境下孵育4小时，将100u1以不同稀释度接种到MRS培养基内。 | |

图3: 氯霉素和四环素对片球菌益生菌生长的影响



现有的研究表明，乳酸片球菌 5051 能提高对球虫病等寄生虫病的免疫力¹⁰。用有丝分裂原反应法试验进行的单独研究表明，喂食乳酸片球菌 5051 的大鼠中 T 细胞和 B 细胞的增殖增加（表 1）。在喂食乳酸片球菌 5051 的马中也描述了类似的免疫反应结果。这些结果表明乳酸片球菌 5051 能够刺激大鼠和马的细胞和体液免疫反应^{11, 12}。淋巴细胞的激活可能是由于巨噬细胞被活化。而巨噬细胞活化有两种方式：经典激活，通过促进炎症（干扰素 γ 激活）和替代途径激活（IL-4 或 IL-13 激活）。巨噬细胞被认为具有抗寄生虫、抗炎和组织修复作用¹³。在一项对大鼠的研究中，乳酸片球菌 5051 被证明会以剂量依赖性的方式来增加巨噬细胞数量（Lin JJ, 未发表）。

| 乳酸片球菌5051和布拉迪酵母菌总数 | T细胞有丝分裂原 (ConA) * | B细胞有丝分裂原 (LPS) * |
|----------------------|-------------------|------------------|
| 对照组 | 23.34 ± 6.53 | 10.0 ± 1.33 |
| 1 × 10 ⁹ | 34.27 ± 3.08 | 42.51 ± 8.23 |
| 1 × 10 ¹⁰ | 91.14 ± 31.65 | 31.53 ± 5.09 |

*刀豆蛋白对有丝分裂原反应的细胞亚群分析(Con A, 0.4, 0.8 或1.6 μ g/孔, Sigma)或脂多糖(LPS, 1.25, 2.5, 5.0 μ g/孔, Sigma)是按照Babu等人的描述进行的¹⁴。

表1: 喂食乳酸片球菌5051和布拉迪酵母菌对大鼠B细胞和T细胞增殖的影响

对人类受试者的研究也一直在调查乳酸片球菌 5051 的潜在对免疫系统的作用；与服用安慰剂的人类志愿者相比，每天服用乳酸片球菌 5051 坚持 3 个月的健康人类志愿者表现出体脂百分比降低以及促炎症生物标志物 IL-6 和 IL-23 的降低（图 4）。患有代谢综合症的成年人的炎症细胞因子 IL-6 和 TNF- α ^{15, 16}水平升高。同样，患有代谢综合症女性的 IL-23 水平高于没有临床症状¹⁷的女性。在益生菌组中，与安慰剂组相比，炎症细胞因子 IL-6 和 IL-23 降低。与安慰剂组的 0.28 ± 0.19% 相比，体脂也减少了 0.86 ± 0.42%¹⁸。在这项研究中，与安慰剂组相比，抗炎细胞因子 IL-10 增加。这些结果均表明乳酸片球菌 5051 有着可刺激巨噬细胞、抑制炎症性细胞因子并增加抗炎细胞因子的功效。

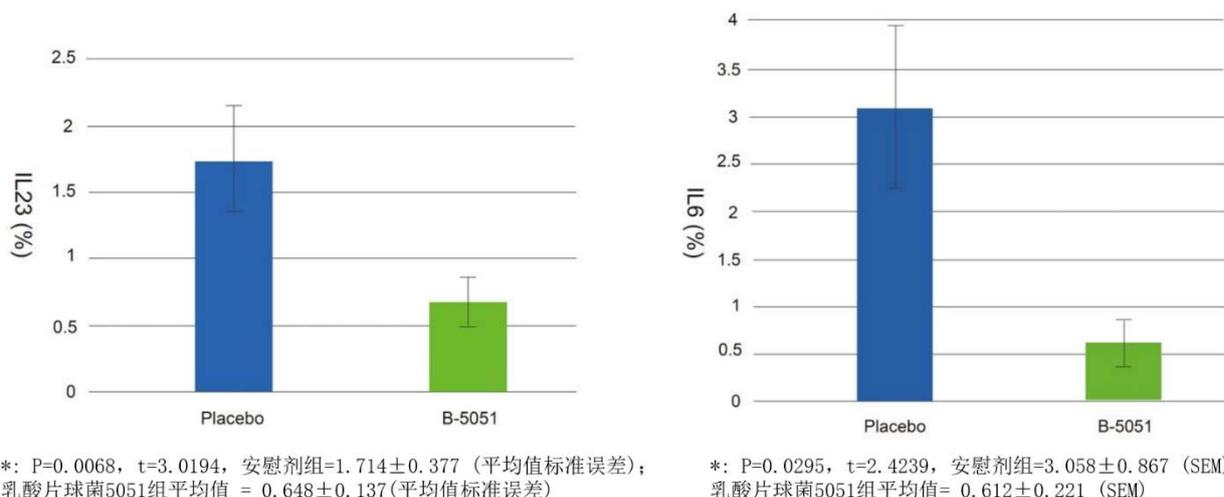


图4: 乳酸片球菌5051对促炎细胞因子的影响

一项针对人类乳酸片球菌5051的随机、双盲安慰剂对照试验研究。这项研究由Sylvana Institute和Frederick扶轮社基于世界医学协会赫尔辛基宣言下进行。在不改变饮食的情况下，给 30 名志愿者服用乳酸片球菌5051 (40 亿 CFU)，持续 12 周。IL-6 和 IL-23 由 Milliplex (St. Louis, MO) 测量。

慢性肠病包括炎症性肠病 (IBD)、非特异性肠病 (NEP) (显示出慢性消化系统疾病的特征但未被诊断为 IBD) 和饮食反应性肠病。在给患有 IBD 和 NEP 的犬只服用片球菌益生菌 (乳酸片球菌 5051 和 布拉迪酵母菌) 时，兽医在治疗时能够减少或完全终止使用类固醇或免疫抑制剂。且在减少这些治疗药物后症状没有复发¹⁹。据



报道，片球菌益生菌中含有的布拉迪酵母菌对因抗生素引起的腹泻和复发性艰难梭菌肠道感染也有一定程度的效果²⁰。也有研究声称布拉迪酵母菌可以增强小鼠肠道的免疫反应，以对抗艰难梭菌毒素 A 相关的腹泻情况²¹。

免疫介导性的慢性疾病，例如犬和猫的慢性消化系统疾病或免疫介导性的溶血性贫血（IMHA），通常需要长期服用类固醇或免疫抑制剂。然而，长期的多药物方案会对狗和猫造成严重的副作用。如果有可能的话，谁都希望能够减少或停止继续使用这些治疗药物。然而不幸的是，要做到这点并不总是那么容易，因为每当药物用量减少时，通常会观察到症状的复发。片球菌益生菌有可能能够通过使犬和猫的肠道菌群正常化来恢复内在的抗炎机制。

参考文献:

1. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001, pp1-34.
2. Talwalkar A, Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* Spp. *Curr Issues Intest Microbiol* 5:1-8, 2004.
3. Hood SK, Zoitola EA. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. food Sci.* 53: 1514-1516, 1988.
4. Madigan M, Martinko J (eds). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. Prentice Hall. 2005.5. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2:189-198, 2000.
6. Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Brevibacillus*. *Comp. Rev. Food Sci Food Safe.* 2:103-10, 2003.
7. Kim SY, Adachi Y. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiol Immunol.* 51:919-928, 2007.
8. Lin, J.J., Busi, SB. High temperature resistant probiotics for food and feed preparations. US patent No.9,289,008, 2006.
9. Lin JJ, 石田卓夫. *Pediococcus* および *Saccharomyces* 混合プロバイオティクス投与動物糞便の細菌学的検索. *JBVP 年次大会プロシーディング*. pp3-231-233, 2009.
10. Lee SH, Lillehoj HS, Dalloul, RA, Park DW, Hong YH, Lin JJ. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poultry Sci* 86:63-66, 2007.
11. Lin JJ, 石田卓夫. ペディオコッカス菌を含むプロバイオティクスの消化器系およびその他の器官系への応用. 伴侶動物治療指針. pp156-166, 2011. 緑書房.
12. Furr, M. Orally administered *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces boulardii*-based probiotics alter select equine immune functional parameters. *J. Equine Vet. Sci.*34:1156-1163, 2014.
13. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3:23-25, 2003.
14. Babu US, Wiesenfeld PW, Collins TFX, et al. Impact of high flaxseed diet on mitogen-induced proliferation, IL-2 production cell subsets and fatty acid composition of spleen cells. *Food Chem Tox.* 41:905-915, 2003.
15. Ellulu MS, Khaza'ai H, Rahmat A, Patimah I, Abed Y. Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults. *Int J Cardiol.* 215:318-324, 2016.
16. Christinana UI, Casimir AE, Nicholas AA, Christian MC, Obiefuna AL. Paslma levels of inflammatory cytokines in adult Nigerians with the metabolic syndrome. *Niger Med J.* 57(1):64-8, 2016.
17. Murphy MS, Tayade C, Smith GN. Evience of inflammation and predisposition toward metabolic syndrom after pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 5(4):354-8, 2015.
18. Lin JJ, O'Connell H, Sinclair S. *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517 as a Safe Probiotics for Regulation of Weight Related Pro-inflammatory Cytokines: A Double-blind Placebo-controlled Pilot study. *Curr Dev Nutr.* pp21-026-19, 2019.
19. Lin JJ, 伊藤裕行, 石原喜代司, 野内正太, 加藤元, 石田卓夫. ペディオコッカス・プロバイオティクスの疾患別応用法. *JBVP プロシーディング*. 3-288 -292, 2014.
20. Czerucha D, Piche T, Rampal P. Review article: Yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii* *Aliment Pharmacol Ther* 26:767-778, 2007.21. Qamar A, Aboudola S, Warny M, et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immune A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect Immun.* 69:2762-2765, 2001.

