

加氏乳杆菌对溃疡性结肠炎小鼠黏膜的干预作用

简正阳^{1,2}, 陈佳敏¹, 刘秀³, 贺青^{1,2}

(1. 中山大学附属第六医院临床营养科, 广东广州 510610; 2. 中山大学附属第六医院消化内科, 广东广州 510610;
3. 中山大学中山医学院药理教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究加氏乳杆菌 TF08-1 对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)小鼠模型的影响及机制。【方法】将24只8周龄C57BL/6N雄鼠随机分为4组, 每组6只, 分别为对照(Control)组、模型(DSS)组、美沙拉秦(5-ASA+DSS)组、加氏乳杆菌(TF08-1+DSS)组, 采用30 g/L葡聚糖硫酸钠饮水饲喂的方法建立小鼠UC模型, 期间记录体重变化、疾病活动指数(DAI)评分, 第8天处死后测量结肠长度, HE染色评估组织病理学变化, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肠组织IL-10、TNF- α 表达量, Western blot检测Bcl-2表达量, TUNEL染色检测细胞凋亡。【结果】与模型组相比, 加氏乳杆菌组DAI评分降低, 结肠缩短程度较轻, HE染色显示加氏乳杆菌组结肠组织损伤减轻; 加氏乳杆菌组结肠组织IL-10、TNF- α 水平下降; Bcl-2蛋白表达量增加, TUNEL染色显示黏膜凋亡细胞显著减少[病理评分: 7.17 vs. 2.83; TNF- α : (691.02 vs. 438.46) pg/mL; IL-10: (277.33 vs. 156.21) pg/mL; $P < 0.05$]; 与美沙拉秦组比较, 病理损伤, IL-10、TNF- α 水平, Bcl-2蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】加氏乳杆菌TF08-1可缓解DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎, 减轻炎症反应, 其可能通过抑制肠黏膜凋亡发挥作用。

关键词: 益生菌; 溃疡性结肠炎; 凋亡; 炎症性肠病

中图分类号: R574.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2021)03-0338-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0103

Effect of Lactobacillus Gasseri on Mucosa of Mice with Ulcerative Colitis

JIAN Zheng-yang^{1,2}, CHEN Jia-ming¹, LIU Xiu³, HE Qing^{1,2}

(1. Department of Clinical Nutrition, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510610, China;
2. Department of Gastroenterology, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510610, China;
3. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: HE Qing; E-mail: heqing5@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To explore the effects of Lactobacillus gasseri TF08-1 on ulcerative colitis (UC) mice induced by Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) and the related mechanisms.【Methods】Twenty-four 8-week-old C57BL/6N mice were randomly and equally divided into Control group, DSS group, 5-ASA+DSS group, and TF08-1+DSS group. UC model was established by feeding with 30 g/L dextran sodium sulfate drinking water for 7 days. During this period, 5-ASA was given to 5-ASA+DSS group and TF08-1 was given to TF08-1+DSS group. The weight change and the disease activity index (DAI) score were recorded every day. The mice were sacrificed after 7 days of administration, and the colon length was measured. HE staining was used to evaluate histopathology, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect intestinal tissue IL-10 and TNF- α level, Western blot to detect Bcl-2 expression, and TUNEL staining to detect cell apoptosis.【Results】No death was observed in all of the mice. Compared with DSS group, the DAI score of the TF08-1+DSS group was lower, and the extent of colon shortening was lighter. HE staining showed that the colonic tissue damage of

收稿日期: 2021-01-27

基金项目: 国家自然科学基金(81470795)

作者简介: 简正阳, 硕士生, 研究方向: 炎症性肠病的防治研究, E-mail: jianzy3@mail2.sysu.edu.cn; 贺青, 通信作者, 博士, 主任医师, 研究方向: 炎症性肠病的防治研究, E-mail: heqing5@mail.sysu.edu.cn

TF08-1+DSS group was reduced. The levels of IL-10 and TNF- α in the colonic tissue decreased in TF08-1+DSS group, while Bcl-2 protein expression increased. TUNEL staining showed a significant decrease in mucosal apoptotic cells [pathological score: 7.17 vs. 2.83; TNF- α : (691.02 vs. 438.46) pg/mL; IL-10: (277.33 vs. 156.21) pg/mL; $P < 0.05$]. There was no significant difference between 5-ASA+DSS group and TF08-1+DSS group in pathological damage, IL-10, TNF- α levels, and Bcl-2 protein expression ($P > 0.05$). [Conclusion] Lactobacillus gasseri TF08-1 alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice and reduces inflammation, which may play a role by inhibiting intestinal mucosal apoptosis.

Key words: probiotics; ulcerative colitis; apoptosis; inflammatory bowel disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(3): 338-345]

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性和复发性胃肠道炎症性疾病,主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。我国IBD的发病率呈现出逐年上升的趋势^[1]。IBD的发病机制与严重程度受到多种因素影响,其中主要包括遗传因素、免疫反应、肠道菌群和氧化应激等^[2]。目前治疗IBD的药物包括氨基水杨酸(美沙拉秦)、皮质类固醇、生物制剂和免疫抑制剂等,主要通过抑制炎症发挥作用,存在价格昂贵、副作用多、部分患者疗效不佳、不能根治等不足。因此,寻找更为安全有效的治疗药物是IBD研究的热点之一。IBD的突出特征之一是肠道菌群的改变^[3],包括:肠道菌群的多样性下降,变形菌门增加特别是侵袭性大肠杆菌等致病菌占比增高,有益菌属(拟杆菌属、乳杆菌属和真杆菌属等)显著减少。补充有益菌或者针对性的补充IBD患者缺乏的菌群可能有助于IBD的治疗。益生菌是通过定殖在人体内,改变宿主某一部位菌群组成的一类对宿主有益的活性微生物。益生菌主要包括乳酸杆菌、双歧杆菌、粪肠球菌以及不断被发现的新有益菌株,已有的基础研究和临床研究发现益生菌在胃肠道疾病、自闭症、阿尔兹海默症、代谢综合征等疾病有一定的治疗功效^[4],部分菌株对疾病的治疗有较显著的效果^[5],其作用机制包括改善肠道微生态平衡、修复肠黏膜屏障、抑制肠黏膜炎症^[6-8]等。但是目前尚无明确可替代现阶段一线治疗药物的益生菌株用于临床治疗IBD。因此,需要寻找高效安全的益生菌株作为IBD的治疗新选择。本课题组与华大基因公司合作,通过比较IBD患者与健康个体肠道菌群的差异,并分析了经肠内营养治疗的IBD患者以及三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution, TNBS)诱导的IBD小鼠肠道菌群的变化,找出了改变突出的益生菌^[9-10],通过筛选,分离制备出具有显著抗炎作用的益生菌

加氏乳杆菌TF08-1(lactobacillus gasseri TF08-1),并进行了毒理实验,确认了安全性。为进一步明确加氏乳杆菌TF08-1对于IBD的作用及其机制,本实验以葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型为对象,美沙拉秦作为阳性对照治疗的药物,分析加氏乳杆菌TF08-1对溃疡性结肠炎的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24只雄性5~8周龄C57BL/6N小鼠,SPF级,体质量20~25g,购于北京维通利华有限公司【许可证号:SCXK(京)2016-0006】,饲养于中山大学实验动物中心,环境温度(25 \pm 3) $^{\circ}$ C,湿度(55 \pm 5)%以及12h光/暗循环,许可证号:SYXK(粤)2017-0081。本研究符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》以及国家医药管理局颁布的《实验动物管理实施细则》,涉及的所有内容符合中山大学伦理委员会要求。

1.1.2 主要试剂 加氏乳杆菌TF08-1经复苏培养制备成含有 1×10^{10} CFU/mL菌液,4 $^{\circ}$ C保存备用;MRS培养基购自广东环凯微生物科技有限公司,美沙拉秦购自美仑生物技术有限公司,DSS购自MP Biomedicals公司,隐血试剂盒购自广州吉捷生物科技有限公司,TUNEL凋亡检测试剂盒购自Sigma-Aldrich公司,IL-10 ELISA试剂盒购自博士德生物技术有限公司,TNF- α ELISA试剂盒购自欣博盛生物有限公司,BCA试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,Bcl-2、GAPDH一抗、二抗购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.1.3 实验仪器 Western blot制胶板、Western blot电泳转槽(美国Bio Rad公司),Western blot 荧

光感应曝光机(美国Odyssey公司),酶标仪(奥地利TECAN公司),激光扫描共聚焦显微镜(日本Nikon)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化 将保存于4℃的加氏乳杆菌TF08-1以20 g/L的接种量接种在MRS培养基中,37℃培养24 h,连续培养两代后备用。

1.2.2 葡聚糖硫酸钠诱导肠炎模型 将24只8周龄C57BL/6N小鼠随机分为4组,每组6只,即对照组(Control组)、模型组(DSS组)、美沙拉秦组(5-ASA+DSS组)、加氏乳杆菌组(TF08-1+DSS组)。适应性饲养1周后,对照组小鼠自由饮水,其余各组饮用水换为含有30 g/L DSS的饮用水自由饮用7 d诱导小鼠IBD模型^[11]。对照组及模型组每天用磷酸缓冲盐溶液(PBS)灌胃0.2 mL/d,美沙拉秦组将美沙拉秦溶于PBS中,按30 mg/kg灌胃小鼠,加氏乳杆菌TF08-1组按 2×10^9 CFU灌胃,其余饲养条件如温度、湿度、光照、饲料均一致,每天监测体质量,大便性状以及大便隐血情况,第8天处死小鼠,整个实验过程持续1周。

1.2.3 小鼠一般情况评估 在小鼠给药期间,每日记录小鼠体质量变化、活动状态、粪便状态和便血情况等,按照文献所述的方法进行肠炎疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分并统计^[12]。造模7 d后处死小鼠,立即取出结肠,测量盲肠末端和近端直肠之间的结肠长度。

1.2.4 组织病理学分析 小鼠处死后,于肛门上1 cm处取长约1.5 cm的小鼠结肠组织,纵行剖开后采用40 g/L多聚甲醛溶液脱水固定,室温静置24 h后用不同浓度乙醇溶液梯度脱水,二甲苯透明处理,最后进行石蜡包埋。并用石蜡切片机将组织沿着肠轴纵行切成4 mm厚度切片贴于载玻片上。用苏木精染色后,经过漂洗脱水后,用酒精伊红染色液染色,经过纯酒精脱水,浸泡二甲苯使之透明,中性树脂封片后于光学显微镜下观察肠道病理改变并拍照。根据IBD病理评分标准对每张病理切片进行评分^[13],记录并统计评分结果。

1.2.5 酶联免疫吸附法检测肠组织炎症细胞因子 于肛门上2.5 cm处取肠组织,用预冷的PBS中清洗血液,称取肠壁组织20 mg,加入180 μ L磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS;质量体积比1:9),用眼科剪于冰上剪碎组织块,并于冰上研磨。超声机超声匀浆后,离心机4℃,3 000 r/min($r=7$ cm),离心15 min,将离心过的匀浆液去沉淀,留上清。将上清冻存于-80℃。利用BCA蛋白浓度

测定试剂盒(碧云天),复温溶解后测定蛋白质浓度,并根据总蛋白质浓度稀释到相应的倍数。然后利用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,严格按照说明书测定IL-10和TNF- α 的浓度,最终根据总蛋白浓度计算出单位体积的蛋白质中IL-10和TNF- α 的浓度。

1.2.6 蛋白免疫印迹 处死小鼠后在距肛门上0.5 cm处取新鲜结肠组织20 mg,加入300 μ L蛋白裂解液后剪碎后超声裂解匀浆,4℃冰箱静置30 min。置于4℃离心机12 000 r/min($r=7$ cm)离心30 min取上清。用BCA法检测所提取蛋白的总浓度,根据检测浓度将蛋白样品稀释成等体积等浓度蛋白样品,按4:1加入Loading Buffer后混匀98℃水浴变性5 min,-80℃冰箱保存。配制12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白,以400 mA的恒流下转膜1.5 h,然后用体积分数5%牛血清白蛋白封闭液室温下封闭PVDF膜1 h。封闭结束后,TBST清洗,将相应的条带放入稀释的BCL-2或GAPDH稀释液中,4℃孵育过夜,用TBST清洗后再置于相应的二抗稀释液中常温孵育2 h,滴加显影液,显影并采集图像。

1.2.7 结肠细胞凋亡检测 取冰冻切片,37℃温箱孵育1 h,用PBS溶液清洗OCT胶,并将切片浸入枸橼酸溶液室温静置8 min。PBS清洗后用TUNEL试剂盒按照说明书进行凋亡细胞染色,再用PBS清洗后滴加DAPI室温孵育5 min,PBS漂洗,用抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)封片。将切片置于激光共聚焦荧光显微镜下观察结果并采集图像。

1.2.8 统计学处理 本实验所有数据采用SPSS 25.0软件进行统计分析,采用GraphPad Prism 8.0画图,满足正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差表示,结肠长度,组织病理评分,炎性因子水平,Bcl-2表达量经过正态性检验和方差齐性检验确认为服从正态分布且方差齐后,采用单因素方差分析(One way-ANOVA),多组比较有统计学意义后采用Dunnett's t 检验进行两两比较,所有统计学分析均为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加氏乳杆菌抑制葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠的炎症表现

30 g/L DSS诱导溃疡性结肠炎后,模型组、加氏

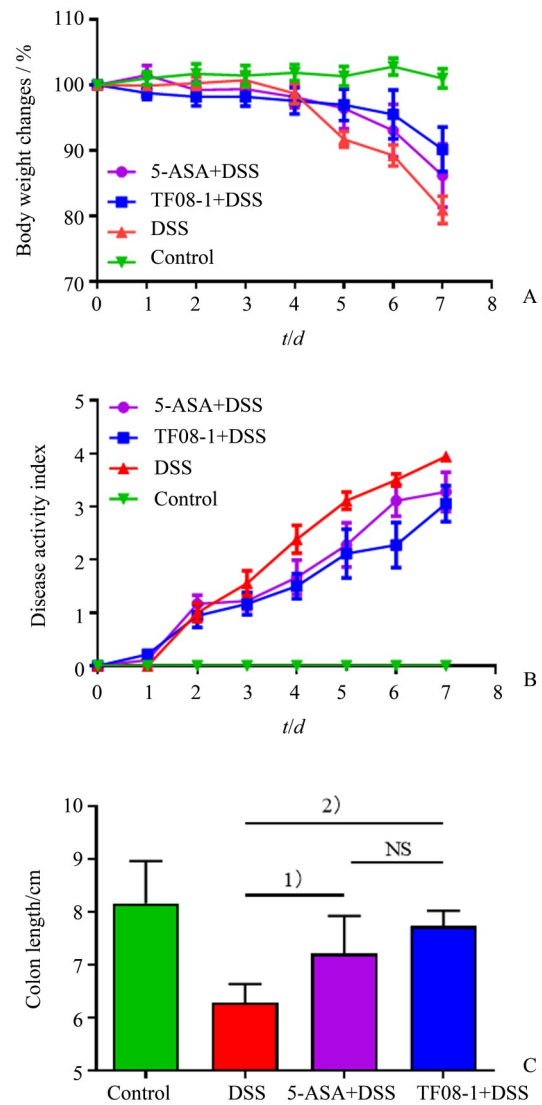
乳杆菌组和美沙拉秦组小鼠体重在第4日均明显下降,之后加氏乳杆菌组和美沙拉秦组下降速度均慢于模型组(图1A);模型组、加氏乳杆菌组和美沙拉秦组DAI评分在DSS诱导后逐日升高,加氏乳杆菌组和美沙拉秦组DAI评分均低于模型组(图1B);处死小鼠后,模型组、加氏乳杆菌组和美沙拉秦组小鼠结肠明显缩短,与模型组比较,加氏乳杆菌组和美沙拉秦组结肠长度缩短程度较轻,单因素方差分析结果显示:各组间差异具有统计学意义($F=10.98, P=0.0002$)。组间两两比较显示:与模型组 $[(6.28 \pm 0.36) \text{ cm}]$ 相比,加氏乳杆菌组 $[(7.74 \pm 0.29) \text{ cm}]$ 和美沙拉秦组 $[(7.22 \pm 0.71) \text{ cm}]$ 结肠结肠缩短程度均减轻,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.001$;图1C);加氏乳杆菌组体重下降程度、DSS评分和结肠缩短程度虽均优于美沙拉秦组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 加氏乳杆菌缓解葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠组织损伤

小鼠结肠组织HE染色后镜下观察和进行评分。镜下观察,对照组结肠组织结构完整,无炎性细胞浸润(图2A);模型组有明显炎性细胞浸润,上皮细胞大量脱落,肌层变厚(图2B);加氏乳杆菌组和美沙拉秦组病理损伤较轻,腺体结构并未完全消失,炎性细胞浸润程度较浅,上皮层细胞尚存(图2C、D)。结肠组织病理学评分采用单因素方差分析,结果显示:各组间差异具有统计学意义($F=10.12, P=0.0016$),组间两两比较显示:美沙拉秦组 (3.67 ± 2.25) 、加氏乳杆菌组 (2.83 ± 1.94) 与模型组 (7.17 ± 0.75) 相比明显有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05; P < 0.05$)。加氏乳杆菌炎症程度略轻于美沙拉秦组,但是两组结肠组织损伤差异并无统计学意义($P=0.79$;图2E)。

2.3 加氏乳杆菌抑制葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠组织炎性细胞因子分泌

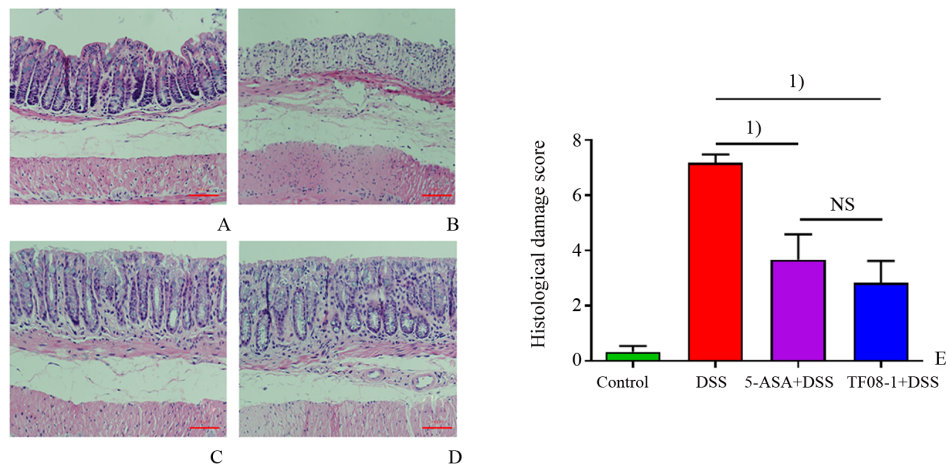
各组小鼠结肠组织中IL-10、TNF- α 促炎细胞因子的水平经ELISA试剂盒检测后。小鼠结肠组织中的IL-10水平经单因素方差分析结果显示:各组间差异具有统计学意义($F=5.53, P=0.017$)。组间两两比较采取Dunnett t 检验分析,结果显示:和对照组比较,模型组结肠组织中IL-10水平明显升高,差异具有统计学意义 $[(95.01 \pm 53.73) \text{ pg/mL vs. } (277.33 \pm 64.63) \text{ pg/mL}, P < 0.05]$,美沙拉秦组和模型组比较,IL-10水平显著降低,差异有统计学意义



A: The change of body weight percent during day 0 to day 7; B: The disease activity index score of mice; C: The colons of mice in each group, $n=6, F=10.98, P=0.0002$, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.001$ between two groups by Dunnett's t test after ANOVA.

图1 TF08-1缓解DSS诱导的IBD小鼠模型炎症表现
Fig. 1 TF08-1 alleviates dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis

$[(121.32 \pm 72.72) \text{ pg/mL vs. } (277.33 \pm 64.63) \text{ pg/mL}, P < 0.05]$,加氏乳杆菌组和模型组比较,IL-10水平显著降低,差异具有统计学意义 $[(156.21 \pm 97.19) \text{ pg/mL vs. } (277.33 \pm 64.63) \text{ pg/mL}, P < 0.05]$ 。加氏乳杆菌组和美沙拉秦组IL-10含量比较,差异无统计学意义 $[(156.21 \pm 97.19) \text{ pg/mL vs. } (121.32 \pm 72.72) \text{ pg/mL}, P=0.50$;图3A]。小鼠结肠组织中的TNF- α 水平经单因素方差分析结果显示:各组间差异具有统计学意义($F=5.32, P=0.019$)。组间两两比较采取Dun-



A: HE staining in control group ($\times 200$); B: HE staining in DSS group ($\times 200$); C: HE staining in 5-ASA+DSS group ($\times 200$); D: HE staining in TF08-1+DSS group ($\times 200$); E: The histological score of HE-stained colons, $n=6$, $F=10.12$, $P=0.001$ 6, 1) $P < 0.05$ between two groups by Dunnett's t test after ANOVA. bar=100 μm .

图2 小鼠结肠组织病理染色和分析

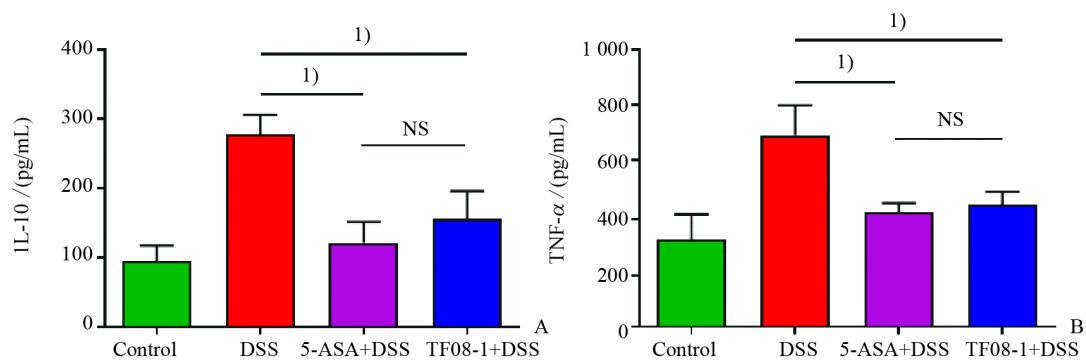
Fig. 2 Histopathological changes of colons in each group

nett t 检验分析,结果显示:和对照组比较,模型组结肠组织中 TNF- α 水平明显升高,差异有统计学意义 [(315.07 \pm 218.42) pg/mL vs. (691.02 \pm 239.81) pg/mL, $P < 0.05$],美沙拉秦组和模型组比较, TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义 [(411.19 \pm 81.33) pg/mL vs. (691.02 \pm 239.81) pg/mL, $P < 0.05$],加氏乳杆菌组和模型组比较, TNF- α 水平显著降低,差异具有统计学意义 [(438.46 \pm 117.20) pg/mL vs. (691.02 \pm 239.81) pg/mL, $P < 0.05$].加氏乳杆菌组和美沙拉秦组 TNF- α 含量比较,差异无统计学意义 [(438.46 \pm 117.20) pg/mL vs.

(411.19 \pm 81.33) pg/mL, $P=0.65$;图3B]。

2.4 加氏乳杆菌上调凋亡相关蛋白的表达

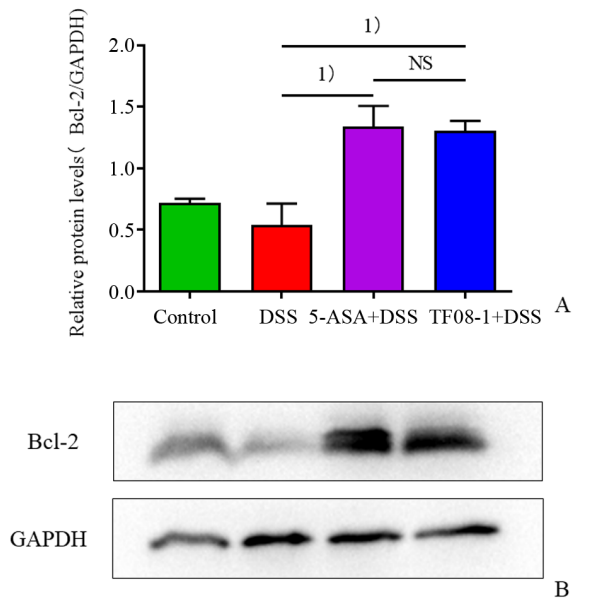
Western blot 结果经单因素方差分析显示:各组间差异具有统计学意义 ($F=10.05$, $P=0.004$ 3)。组间两两比较采取 Dunnett t 检验分析,结果显示:美沙拉秦组 Bcl-2 表达量升高,与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$;图4)。加氏乳杆菌组 Bcl-2 表达量升高,与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$;图4)。加氏乳杆菌组和美沙拉秦组蛋白表达量比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A. the level of IL-10 in colons in each group, $n=6$, $F=5.53$, $P=0.017$, 1) $P < 0.05$ between two groups by Dunnett's t test after ANOVA. B. the level of TNF- α in colons in each group, $n=6$, $F=5.32$, $P=0.019$, 1) $P < 0.05$ between two groups by Dunnett's t test after ANOVA.

图3 小鼠肠组织细胞因子 IL-10、TNF- α 表达量

Fig. 3 Expression levels of cytokines IL-10 and TNF- α in intestinal tissues of mice



A: Bcl-2 protein in colons of mice, $n=3$, $F=10.05$, $P=0.0043$, 1) $P < 0.05$ between two groups by Dunnett's t test after ANOVA; B: Western blot analysis was used.

图4 小鼠肠组织 Bcl-2 表达量

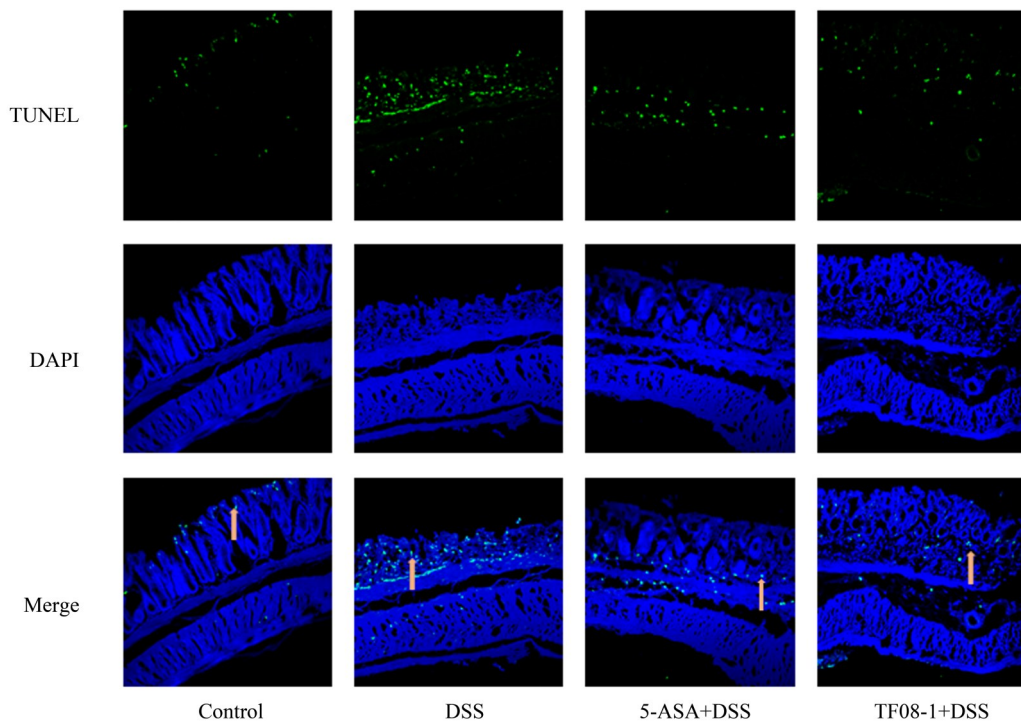
Fig. 4 The expression level of Bcl-2 in intestinal tissues of mice

2.5 加氏乳杆菌对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠肠道细胞凋亡的影响。

结肠组织冰冻切片后采用TUNEL染色检测组织凋亡情况,结果显示,模型组和对照组相比,肠组织黏膜绿色凋亡细胞显著增加,加氏乳杆菌组和美沙拉秦组绿色凋亡的细胞明显减少(图5)。

3 讨论

炎症性肠病是一种主要累及整个消化道的慢性非特异性炎症性疾病^[14-15],严重时可并发消化道穿孔、大出血、中毒性巨结肠和肿瘤,目前尚无法治愈,药物和手术治疗的预后均不理想。因此寻找新的IBD治疗方案尤为重要。益生菌作为对人体有益的活性微生物制剂,在用于治疗IBD的相关研究中一直备受关注,临床研究发现大肠杆菌 Nissle 1917 在诱导和维持 UC 缓解方面作用接近美沙拉秦^[16-17]。Tursi^[18]报道了复合益生菌 VSL#3 作为标准药物治疗的辅助剂,可以缓解轻中度 UC 复发患者的病情,但是对于重度患者效果较差。这些均证明益生菌在 IBD 的治疗上具有广阔前景,需要研发更为有效的益生菌株。



Tunel staining in each group ($\times 400$), yellow arrows pointed to apoptotic cells, $n=6$.

图5 小鼠肠组织 TUNEL 染色

Fig. 5 TUNEL staining of mouse intestinal tissue

加氏乳杆菌 TF08-1 是我们和华大基因共同研发分离的新型益生菌,具有良好的抗炎效果。在本研究中,我们发现在 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎疾病模型中,小鼠出现明显体质量下降、血便、结肠缩短,组织病理切片发现肠黏膜正常结构消失,大量炎性细胞浸润,加氏乳杆菌 TF08-1 能抑制溃疡性结肠炎小鼠体质量下降趋势,降低 DAI 评分,改善结肠病理损伤。美沙拉秦作为 UC 的一线治疗药物,虽然对于重度的 UC 往往无效,对于轻中度的 UC 能够减轻炎症、诱导黏膜愈合。在本研究中加氏乳杆菌 TF08-1 效果与美沙拉秦相当,提示加氏乳杆菌 TF08-1 对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎具有缓解作用。遗传和免疫学研究表明,细胞炎性因子直接参与了 IBD 的发病机理,在调控肠道炎症和 IBD 相关的临床症状中起着重要的作用^[19],在 IBD 的小鼠模型中研究发现,可通过调节细胞因子功能进而治疗 IBD^[20]。例如, TNF- α 的阻断已经在临床上用于治疗 IBD^[21],因此,我们检测了结肠组织中 IL-10 和 TNF- α 水平,加氏乳杆菌 TF08-1 可显著下调 DSS 鼠的 IL-10 和 TNF- α 水平,与美沙拉秦治疗组比较差异无统计学意义,可以认为加氏乳杆菌 TF08-1 具有良好的抗炎作用,作用效果接近美沙拉秦。

肠黏膜细胞的异常死亡是炎症性肠病的发病机制之一,肠黏膜细胞死亡方式包括凋亡、失巢凋亡、细胞焦亡、坏死性死亡等^[22],肠黏膜细胞的异常死亡与 IBD 炎症的发生发展密切相关^[23],本研究首先通过检测肠组织凋亡抑制蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 表达量,发现 DSS 诱导的模型鼠肠组织 Bcl-2 表达量明显下降,加氏乳杆菌组 Bcl-2 表达量明显增高,且差异具有统计学意义,表明肠黏膜

组织细胞凋亡水平受到明显抑制,其结果与美沙拉秦组相当。TUNEL 染色结果显示, DSS 诱导的模型组肠黏膜细胞凋亡细胞明显增多,这表明肠黏膜细胞的凋亡在 IBD 的发生发展中具有重要作用,加氏乳杆菌组肠黏膜细胞凋亡明显降低,尤其肠黏膜上皮细胞凋亡明显减少,其结果与美沙拉秦组相当,这表明加氏乳杆菌可能通过抑制肠黏膜细胞凋亡进而缓解 IBD 表现。这些结果表明加氏乳杆菌 TF08-1 和美沙拉秦均可缓解小鼠溃疡性结肠炎,且疗效相近,其机制可能与抑制肠上皮细胞凋亡相关。

本研究尚存在以下不足,首先,经过加氏乳杆菌 TF08-1 干预后 TNF- α 水平降低,表明结肠炎症得到了很好的抑制,但是抗炎因子 IL-10 经过干预后也同步降低,这提示加氏乳杆菌可能通过其他炎性因子调控结肠炎^[24-26]。在后续研究中需要进一步检测血清、组织中各类炎性因子水平,进一步明确其在炎性调控中的作用。其次,目前本研究发现加氏乳杆菌 TF08-1 的缓解溃疡性结肠炎的作用机制可能与线粒体通路介导的凋亡相关,但是需要用特异性信号通路抑制剂进一步进行实验验证。最后, TF08-1 还可能影响肠道其他的微生物及黏膜屏障,尚需要进一步试验进行验证。我们将在后续研究中扩大样本量,进一步通过急性炎症模型和慢性炎症模型探究加氏乳杆菌对 UC 的疗效及其机制。

综上所述,本研究证明加氏乳杆菌 TF08-1 可以改善 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎,且疗效接近美沙拉秦,其作用机制可能与抑制肠黏膜细胞凋亡相关。本研究证明了一个新型菌株的有效性,口服益生菌或可作为 IBD 治疗的有效手段之一。

参考文献

- [1] Qiao Y, Ran Z. Potential influential factors on incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in mainland China [J]. *JGH Open*, 2020, 4(1): 11-15.
- [2] Zhao M, Burisch J. Impact of genes and the environment on the pathogenesis and disease course of inflammatory bowel disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(7): 1759-1769.
- [3] Caruso R, Lo BC, Núñez G. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(7): 411-426.
- [4] De Greef E, Vandenplas Y, Hauser B, et al. The use of probiotics in IBD and IBS [J]. *Minerva Pediatr*, 2014, 66(5): 491-500.
- [5] Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, et al. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammato-

- ry bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 505878.
- [6] Coconnier-Polter MH, Lievin-Le Moal V, Servin AL. A *Lactobacillus acidophilus* strain of human gastrointestinal microbiota origin elicits killing of enterovirulent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by triggering lethal bacterial membrane damage [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 6115-6120.
- [7] Bron PA, Kleerebezem M, Brummer RJ, et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? [J]. *Br J Nutr*, 2017, 117(1): 93-107.
- [8] Kwon HK, Lee CG, So JS, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(5): 2159-2164.
- [9] He Q, Gao Y, Jie Z, et al. Two distinct metacommunities characterize the gut microbiota in Crohn's disease patients [J]. *Gigascience*, 2017, 6(7): 1-11.
- [10] He Q, Li X, Liu C, et al. Dysbiosis of the fecal microbiota in the TNBS-induced Crohn's disease mouse model [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(10): 4485-4494.
- [11] Kuo WT, Shen L, Zuo L, et al. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1323-1337.
- [12] Shi C, Yue F, Shi F, et al. Selenium-containing amino acids protect dextran sulfate sodium-induced colitis via ameliorating oxidative stress and intestinal inflammation [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 85-95.
- [13] Lin Y, Xiong W, Xiao S, et al. Pharmacoproteomics reveals the mechanism of Chinese dragon's blood in regulating the RSK/TSC2/mTOR/ribosome pathway in alleviation of DSS-induced acute ulcerative colitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113221.
- [14] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [15] Torres J, Mehandru S, Colombel JF, et al. Crohn's disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1741-1755.
- [16] Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial [J]. *Lancet*, 1999, 354(9179): 635-639.
- [17] Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine [J]. *Gut*, 2004, 53(11): 1617-1623.
- [18] Tursi A, Brandimarte G, Papa A, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(10): 2218-2227.
- [19] Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 495-549.
- [20] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. *Nat Med*, 2002, 8(6): 567-573.
- [21] D'Haens GR, van Deventer S. 25 years of anti-TNF treatment for inflammatory bowel disease: lessons from the past and a look to the future [J]. *Gut*, 2021: doi:10.1136/gutjnl-2019-320022.
- [22] Patankar JV, Becker C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 543-556.
- [23] Parker A, Vaux L, Patterson AM, et al. Elevated apoptosis impairs epithelial cell turnover and shortens villi in TNF-driven intestinal inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 108.
- [24] Ha J, Oh H, Oh NS, et al. Anti-inflammatory effect of a peptide derived from the synbiotics, fermented *Cudrania tricuspidata* with *Lactobacillus gasseri*, on inflammatory bowel disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3572809.
- [25] Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5): 329-342.
- [26] Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 992-1006.

(编辑 孙慧兰)