

嗜酸乳杆菌胞壁粗提物及 DNA 对实验性结肠炎结肠上皮 NF- κ B 表达的影响 *

练光辉^{1,2} 陈旻湖^{1△} 彭侠彪² 阮巍山² 叶建明²

(1 中山大学附属第一医院消化内科 广东 广州, 510080; 2 中山市人民医院消化内科 广东 中山, 528403)

摘要 目的:研究嗜酸乳杆菌 BCW 和 DNA 对溃疡性结肠炎小鼠结肠粘膜上皮 NF- κ B 表达的影响。**方法:**雌性 BABL/c 小鼠 40 只随机分为正常组、嗜酸乳杆菌 BCW 组、嗜酸乳杆菌 DNA 组和生理盐水对照组,除正常组小鼠外,其余各组自由饮用 1.5%DSS 7 天建立小鼠结肠炎模型,随即给予嗜酸乳杆菌 BCW(20ug/10g)、嗜酸乳杆菌 DNA(0.2ug/10g)和生理盐水灌肠 7 天,每天观察小鼠情况,实验结束时处死小鼠,去结肠组织行 HE 染色观测结肠炎症情况,并行结肠上皮 NF- κ B 免疫组化。**结果:**饮用 DSS 小鼠 DAI 积分显著增高,结肠组织粘膜破坏、炎症细胞浸润,结肠上皮 NF- κ B 表达增加(9.15 ± 0.43),嗜酸乳杆菌 BCW 和 DNA 能降低小鼠 DAI 积分,减轻粘膜损伤,降低结肠上皮 NF- κ B 的表达($4.67 \pm 0.56/6.03 \pm 0.60$)。**结论:**嗜酸乳杆菌 BCW 和 DNA 能缓解急性溃疡性结肠炎,降低结肠上皮 NF- κ B 的表达。

关键词:溃疡性结肠炎; 乳酸杆菌; 胞壁成分; DNA; 细胞核因子 - κ B

中图分类号:R574.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-468-04

Effects of L. Acidophilus BCW and DNA on Expression of NF- κ B in Murine with Acute Ulcerative Colitis*

LIAN Guang-hui^{1,2}, CHEN Min-hu^{1△}, PENG Xia-biao², RUAN Wei-shan², YE Jian-ming²

(1 Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, 510080;

2 Department of Gastroenterology, Zhongshan City people's Hospital, Guangdong 528403, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of L. acidophilus BCW and DNA on the expression of NF- κ B in murine intestinal mucosa with UC. **Methods:** 40 specific pathogen free, BALB/c female mice were randomly divided into acute normal group, L. acidophilus BCW-treated group, L. acidophilu DNA-treated group and NS control group. Mice were induced by 1.5% DSS water for 7 days free drinking except normal group. The mice were respectively received L. acidophilus BCW (20ug/10g), L. acidophilu DNA(0.2ug/10g) and physiological saline, while mice of normal control group were untreated. The animal were recorded daily and killed after 7days for assaying the NF- κ B with immunohistochemical staining. **Results:** Both DAI scores and lesions of colonic mucosa of DSS-induced mice decreased markedly by L. acidophilus BCW and it's DNA, while they were more severe than that of normal. Compared with the model control group (9.15 ± 0.43), the expression of NF- κ B decreased significantly (BCW: 4.67 ± 0.56 , DNA: 6.03 ± 0.60), but which was still higher than that of normal. **Conclusion:** The L. acidophilus BCW and it's DNA alleviate DSS-induced ulcerative colitis and decreased the expression of NF- κ B in intestinal mucosa.

Key words: Ulcerative colitis; Lactobacillus; Bacterial cell walls; DNA; NF- κ B

Chinese Library Classification(CLC): R574.62 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-468-04

前言

溃疡性结肠炎是一种多因素的慢性疾病,在我国的发病率呈逐年增高的趋势,其具体发病原因还不清楚,但通常认为与遗传、机体免疫和肠道微生态失衡有关。多个研究证实益生菌的胞壁抗原以及 DNA 能调节机体免疫,增加 IL-12、TNF- α 、IL-10 等细胞因子分泌,抑制肿瘤细胞生长,增强抗炎效果^[1-2]。NF- κ B 是一种与炎症因子产生、炎性细胞活化和细胞凋亡密切相关的转录因子,与溃疡性结肠炎的发生、发展与迁延有重要的关系^[3-9]。本实验研究嗜酸乳杆菌 BCW 及 DNA 对实验性结

肠炎小鼠结肠上皮组织学及 NF- κ B 表达的影响,探讨其治疗结肠炎初步的机理,为下一步的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

DSS 分子量 36000-50000,购自 Sigma 公司,用生理盐水配制成 1.5%浓度, L. acidophilus 为湖南康哲中南医药研究有限公司提供,实验小鼠购自湖南农业大学东创实验动物科技服务部。兔抗鼠单克隆抗体 NF- κ B:购于晶美公司;SP 试剂盒、DAB

* 基金项目:中山市科技局资助项目(20091A060)

作者简介:练光辉(1978-),男,博士,主治医师,主要研究方向:消化系统疾病的益生菌治疗

△通讯作者:陈旻湖, E-mail: chenminhu@vip.163.com

(收稿日期:2010-11-05 接受日期:2010-11-29)

显色剂、EDTA 抗原修复液均购于晶美公司。

1.2 实验动物及分组

雌性 Balb/c 小鼠 40 只,6-8 周龄,体重 20.0 ± 2.0 克,购于湖南农业大学东创实验动物科技服务部,饲养于清洁级动物房。随机分成 4 组,每组 10 只,采用自由饮水 7 天造模:对照组:DSS 造模 + 无菌生理盐水灌肠;胞壁组:DSS 造模 + BCW (100ug/ml)灌肠;DNA 组:DSS 造模 + DNA (1ug/ml)灌肠;正常组:正常饮食。

1.3 动物处理

每天记录小鼠疾病活力指数积分 (DAI),7 天后将其颈椎脱臼处死,游离结肠和远端回肠,取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段,放于冷生理盐水中,沿着肠系膜,纵向剪开,用冷生理盐水冲洗掉肠内污物,在滤纸上将肠壁展开,观察各组小鼠结肠的大体改变、测量整个结肠长度及湿重,并根据如下公式计算肠重指数,肠重指数 = 结肠重量 / 体重 $\times 100\%$ 。分别于结肠末端(距肛门 1cm)处剪取 0.5cm 长结肠,福尔马林浸泡,石蜡包埋、切片,做病理检查及免疫组化。

1.4 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示,用 SPSS13.0 软件处理数据,对计量治疗进行方差齐性检验后,组间比较采用方差分析检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的 DAI 积分

图 1 为嗜酸乳杆菌 DNA、BCW 对小鼠疾病活力指数的影响变化趋势图,如图所见,正常组 DAI 始终稳定在零水平附近。小鼠饮用 DSS 后 DAI 呈逐渐上升趋势,第 7 天生理盐水组的 DAI 高达 6.85 ± 0.94 。用嗜酸乳杆菌 DNA、BCW 干扰饮用 DSS 的小鼠后,DAI 的变化趋势在前 6 天均呈上升趋势,与生理盐水组无明显差异,至第 7 天接受 BCW 和细菌 DNA 灌肠小鼠由于大便基本成型,粪便隐血大部分消失,DAI 积分较对照组小鼠明显降低(分别为 4.27 ± 0.41 和 4.62 ± 0.56),与生理盐水组比较有明显差异($p < 0.05$)。图中结果表明:饮用 DSS 的小鼠疾病活力逐渐增加,用生理盐水不能阻止病情的发展。随着实验进程,嗜酸乳杆菌 DNA、BCW 能有效阻止症状加重。

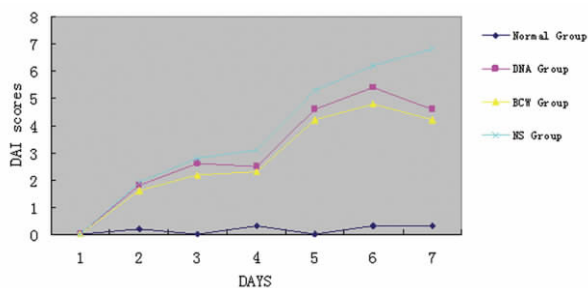


图 1 嗜酸乳杆菌 DNA、BCW 对小鼠 DAI 积分的影响

Fig. 1 Effects of *L. acidophilus* BCW and it's DNA on mice DAI scores

2.2 结肠组织学

正常组小鼠直肠结肠组织黏膜结构及绒毛完整,腺体排列整齐,隐窝正常,杯状细胞无减少,未见粘膜糜烂,出血,无炎性细胞浸润(图 2A),嗜酸乳杆菌 BCW 组小鼠结肠粘膜轻度破坏,

呈糜烂状,可见局部充血,腺体减少,隐窝部有炎性细胞的浸润(图 2B),嗜酸乳杆菌 DNA 组小鼠结肠有溃疡形成,局部粘膜缺失,腺体减少,绒毛基本消失,底部有较多的炎性细胞浸润(图 2C);生理盐水组小鼠结肠粘膜可见大片溃疡,绒毛及腺体消失,炎症累及全层,大量炎性细胞浸润(图 2D)。以上结果可以看出,嗜酸乳杆菌 BCW、DNA 均能减轻 DSS 造成的粘膜损伤,恢复腺体及绒毛排列,减轻炎性细胞浸润,而生理盐水并无此效果。在组织学评分方面,正常小鼠分值基本为零,生理盐水组分值远远高于嗜酸乳杆菌 BCW、DNA 处理组,说明嗜酸乳杆菌 BCW、DNA 能改善小鼠组织学损伤,各组小鼠组织学积分见图 3。

2.2 结肠粘膜 NF- κ B 的表达

图 4 为结肠粘膜 NF- κ B 的免疫组化图片,从图中可以看出,饮用 DSS 后各组小鼠 NF- κ B 在结肠上皮细胞上表达增加,特别是生理盐水对照组可见粘膜及粘膜下大量炎性细胞内表达,在予以嗜酸乳杆菌 BCW、DNA 治疗后小鼠结肠上皮细胞 NF- κ B 表达减少,而在正常小鼠 NF- κ B 在结肠上皮组织中仅有少量表达,见表 1。

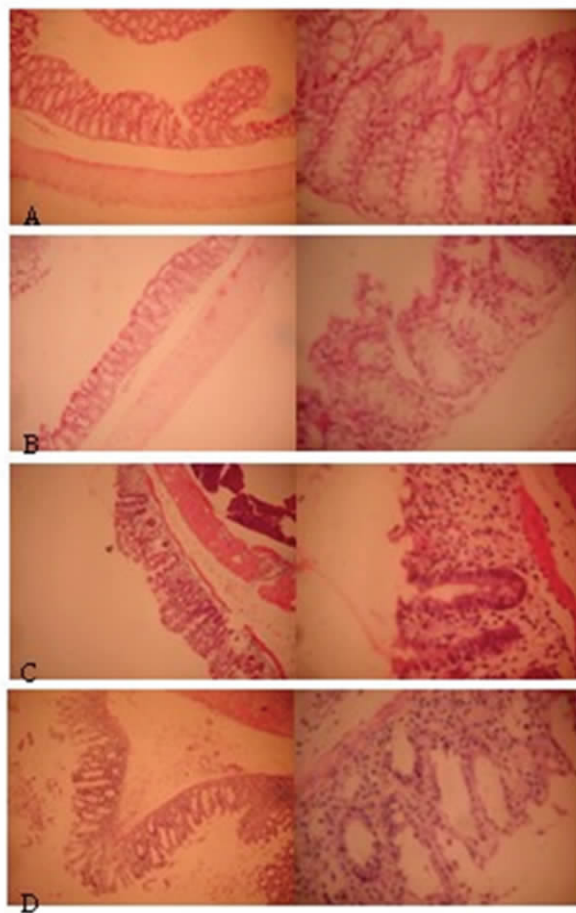


图 2 各组小鼠结肠组织病理学图(HE 染色,左 $\times 100$;右 $\times 400$)。A 为正常小鼠,B 为嗜酸乳杆菌 BCW 组小鼠,C 为嗜酸乳杆菌 DNA 组小鼠,D 为生理盐水组小鼠。

Fig. 2 Histopathology of mice colons stained by hematoxylin-eosin(Left $\times 100$;Right $\times 400$). Normal mouse(A); *L. acidophilus* BCW-treated mouse(B); *L. acidophilus* DNA-treated mouse(C); physiological saline treated mouse(D).

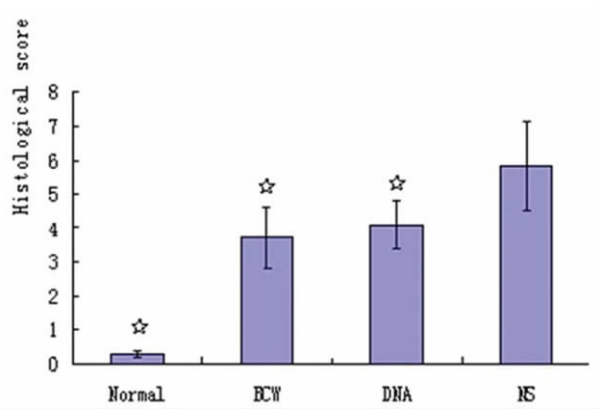


图3 各组小鼠结肠组织学积分图。
(比较生理盐水对照组, ☆p<0.05。)
Fig. 3 Histological scores of mice colons of each group.
(compared with NS control group, ☆p<0.05.)

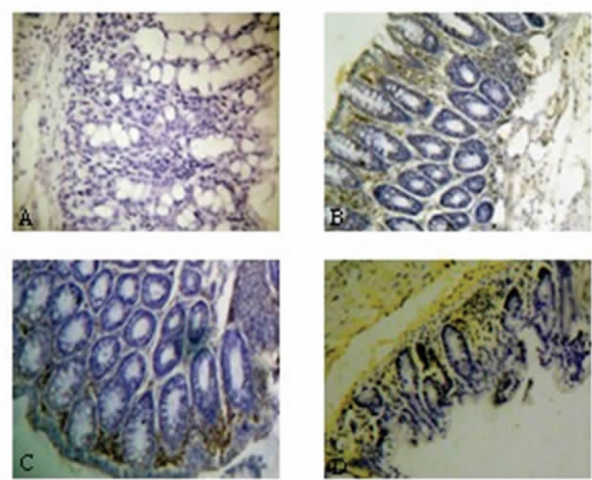


图4 结肠粘膜细胞 NF-κ B 的免疫组化图(× 400)。A 为正常小鼠,B 为嗜酸乳杆菌 BCW 组小鼠,C 为嗜酸乳杆菌 DNA 组小鼠,D 为生理盐水组小鼠
Fig. 4 Expression of NF-κ B in colonic epithelial cells(× 400). Normal mouse(A); L. acidophilus BCW-treated mouse(B); L. acidophilus DNA-treated mouse(C); physiological saline treated mouse(D)

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种难治性、复发性疾病,其病因还不甚清楚,研究普遍认为其产生与肠道微生物的基因易感性、粘膜免疫及肠道菌群有很重要的关系。其治疗研究从传统的氨基水杨酸、激素甚至免疫抑制剂到近年来的生物疗法。通过口服长双歧杆菌、乳酸杆菌、VSL#3 及 E.coli Nissle 1917 等多种益生菌均能获得满意的效果^[10-12],这些益生菌的治疗溃疡性结肠炎的机制普遍认为与活菌粘附、竞争性抑制及其分泌的代谢产物有密切关系。然而研究发现口服乳酸杆菌和双歧杆菌大部分都被胃酸和胆汁灭活,只有 1.5%乳酸杆菌和 37.5%双歧杆菌能到达回肠末端^[13],如此少的益生菌达到回结肠部,能够粘附定植下来的数量就更少,刑咏梅等人的研究发现德氏乳杆菌和肠球菌的灭活状态较活菌状态对肠黏膜上皮细胞的粘附性显著增高^[14]。因此在益生菌替代疗法中其作用机理可能不完全是由于

表 1 嗜酸乳杆菌 BCW、DNA 对 NF-κ B 表达的影响(̄X± SD,n=10)

Table 1 Effects of L. acidophilus BCW and it's DNA on expression

NF-κ B	
Group	Expression of NF-κ B
Normal group	0.82± 0.05 ▲
BCW group	4.67± 0.56 ▲
DNA group	6.03± 0.60 ▲
NS control group	9.15± 0.43

Notes: compared with NS control group, ▲p<0.05.

活菌粘附定植,而益生菌被消化破碎以后的菌体成分的粘附、免疫调节或抗原封闭可能是其起效的重要因素。实验研究表明,通过小鼠的体重变化、大便性状和隐血情况的综合所得到的 DAI 积分观察,饮用 DSS 后小鼠 DAI 积分明显增加,这主要表现在体重下降,大便稀烂及隐血普遍阳性;组织学方面,主要表现为结肠粘膜糜烂溃疡,绒毛及腺体消失,炎性细胞浸润,其组织学评分明显高于正常小鼠;在予以嗜酸乳杆菌 BCW 及其 DNA 治疗组小鼠,可见 DAI 积分的下降和结肠粘膜损伤的部分修复,组织学评分也低于生理盐水对照组,说明嗜酸乳杆菌 BCW 及其 DNA 能缓解溃疡性结肠炎小鼠急性期炎症。

目前对益生菌菌体成分对溃疡性结肠炎的研究较少,但很多的研究都发现益生菌裂解的抗原成分对机体的免疫调节功能,增加 IL-12、TNF-α、IL-10 等细胞因子分泌,抑制肿瘤细胞生长,发挥抗炎效果。NF-κ B 作为一种核转录因子,负责细胞内的信息交流及整合,在急性溃疡性结肠炎中表达和分布均有增加,参与炎症的启动和迁延,并与炎症严重程度一致^[6,15]。本实验亦证实了这一点,正常小鼠 NF-κ B 的表达量很少,在饮用 DSS 小鼠中,NF-κ B 表达显著增加,主要表达于粘膜及粘膜下的炎症细胞中,这与组织学变化也一致,在结肠组织损伤最重的生理盐水组,NF-κ B 的表达量最高,在给予嗜酸乳杆菌 BCW 及其 DNA 治疗的小鼠,组织学损伤较生理盐水对照组减轻,其结肠粘膜 NF-κ B 的表达量也是降低的,这与治疗后结肠粘膜的炎性细胞浸润减少有关。由于 NF-κ B 是许多细胞因子转录的必经之路,而溃疡性结肠炎中 IL-1、IL-6、TNF-α 等多种炎性因子的表达增加^[7],而这些炎性因子又有细胞趋化作用,可以引起炎性细胞的浸润,炎性细胞接受刺激信号后表达活化更多的 NF-κ B,引起炎症的级联放大。嗜酸乳杆菌 BCW 及其 DNA 能减少 NF-κ B 的表达,削弱其反馈调节作用,从而达到缓解急性溃疡性结肠炎的作用。

本研究发现嗜酸乳杆菌 BCW 及其 DNA 能改善结肠粘膜的免疫功能,具有治疗急性溃疡性结肠的潜在作用,这为开发下一个微生态药物提供了前期的实验基础,但它们如何被结肠上皮细胞识别及其作用的通路还需进一步的深入研究。

参考文献(References)

[1] 李芙蓉,王跃,刘明方,等.双歧杆菌脂磷壁酸对 B16 荷瘤小鼠 NK 细胞受体 NKG2D 及其配体的影响[J].中国微生态杂志,2009,21(1): 17-19
Li Fu-rong, Wang Yue, Liu Ming-fang, et al. Effect of lipoteichoic acid of Bifidobacterium on NKG2D receptor and its ligands of NK cell

- in mouse bearing B16 cancer. Chinese Journal of Microecology, 2009,21(1):17-19
- [2] 穆小萍,张德纯,邓文喻,等.双歧杆菌脂磷壁酸和总 DNA 对小鼠免疫功能的影响[J].中国微生态杂志,2009,21(9):804-808
Mu Xiao-ping, Zhang De-chun, Deng Wen-yu, et al. Effects of lipoteichoic acid and total DNA of Bifidobacterium on immunological function of mice. Chinese Journal of Microecology, 2009,21(9):804-808
- [3] Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways. Arthritis Rheum, 2009,60(3):801-12
- [4] Lind EF, Ahonen CL, Wasiuk A, et al. Dendritic cells require the NF- κ B2 pathway for cross-presentation of soluble antigens. J Immunol, 2008,181(1):354-63
- [5] Bednarski BK, Baldwin AS Jr, Kim HJ. Addressing reported pro-apoptotic functions of NF- κ B: targeted inhibition of canonical NF- κ B enhances the apoptotic effects of doxorubicin. PLoS One, 2009,4(9): 6992
- [6] Zhang DK, Cheng LN, Huang XL, et al. Tetrandrine ameliorates dextran-sulfate-sodium induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor- κ B activation [J]. Int J Colorectal Dis, 2009,24(1): 5-12
- [7] Yao J, Wang JY, Liu L, et al. Polydatin Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice through Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation[J]. Planta Med, 2010, Oct 26. [Epub ahead of print]
- [8] Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, et al. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. Int J Immunogenet, 2005,32(6):401-5.
- [9] Li JH, Yu JP, Yu HG, et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF- κ B activation in rats with colitis. Mediators Inflamm, 2005(4):185-93
- [10] Grabig A, Paclik D, Guzy C, et al. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways [J]. Infect Immun, 2006, 74 (7): 4075-82
- [11] Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, et al. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial[J]. Gut, 2005,54(2):242-9
- [12] Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. Am J Gastroenterol. 2005 Jul;100(7):1539-46
- [13] Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. A neglected modality for the treatment and Prevention of selected intestinal and vaginal Infections. JAMA, 1996,275(11):870-876
- [14] 邢咏梅,贾继辉,王红艳等.两种生物状态肠道益生菌的粘附和拮抗效应的对比研究[J].中国微生态学杂志,2004,16(2):69-72
Xing Yong-mei, Jia Ji-hui, Wang Hong-yan, et al. The comparative studies of the adhesion and competition inhibition of probiotics with two different biological forms. Chinese Journal of Microecology, 2004,16(2):69-72
- [15] 翁志英, 操寄望, 罗和生. 双歧杆菌对大鼠溃疡性结肠炎黏膜 MMP-2、NF- κ B 激活的影响[J].武汉大学学报(医学版),2006,27(6):701-702
Weng Zhi-ying, Cao Ji-wang, Luo Hes-heng. Effect of Bifidobacterium on the Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Nuclear Factor- κ B in Rat Intestinal Mucosa with Ulcerative Colitis. Medical Journal of Wuhan University, 2006,27(6):701-702
-
- (上接第 443 页)
- Zhang Chun-hui, Hou Ya-li, Niu Chun-yun, et al. Ischemia-reperfusion to multiple organ damage to the pathogenesis of research progress[J]. China microcirculation 2008,12(12):389-392(In Chinese)
- [19] 宋茂力, 邹小明. 肠缺血再灌注损伤防治研究的进展[J].中国比较医学杂志,2007,7(17):417-420
Song Mao-li, Zhou Xiao-ming. Ischemia-Reperfusion Injury of the Intestine and Protective Strategies Against Injury[J]. China comparative medical journals 2007,7(17):417-420(In Chinese)
- [20] 王鹏, 陈嘉勇, 袁勇. 肠缺血再灌注损伤与肠粘膜细胞凋亡的关系[J]. 昆明医学院学报,2009,(3B):285-289
Wang Peng, Cheng Jia-yong, Yuan Yong. Ischemia-reperfusion injury and intestinal mucosa cell apoptosis relationship [J]. Kunming medical journals, 2009,(3B):285-289(In Chinese)