

# 特定双歧杆菌菌株对炎症性肠病小鼠的影响

金丹<sup>1\*</sup> 孟繁平<sup>1</sup> 崔逢德<sup>1</sup> 李红花<sup>1</sup> 金寿起<sup>2</sup>

(1. 延边大学基础医学院免疫学与病原生物学教研部 吉林 延吉 133000)

(2. 韩国延世大学原州医科大学微生物学教研室 韩国 原州)

**摘要:** 为了观察特定双歧杆菌菌株对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的 Balb/c 小鼠结肠炎的影响, 探讨该双歧杆菌菌株对炎症性肠病(IBD)的防治作用及其可能机制。将小鼠分为 3 组: 正常对照组、模型组(DSS 组)、实验组(DSS+Bf 组)。用已挑选好的双歧杆菌菌株预先处理小鼠 4 周后, 用 4% DSS 溶液诱导急性结肠炎。实验结束后, 检测每组小鼠结肠的长度及结肠炎炎症程度, 利用半定量 RT-PCR 法检测小鼠肠道派伊尔结细胞中 IL-10 的表达, 利用免疫组化实验检测肠道黏膜中 IL-10 分泌阳性细胞。结果实验组小鼠结肠的平均长度为 7.80 cm±0.21 cm, 虽较正常对照组(9.10 cm±0.82 cm)缩短, 但较模型组(6.80 cm±0.31 cm)其缩短程度减少; 结肠炎炎症程度肉眼评分结果: 模型组和实验组分别为 8.60±0.24 分和 6.60±0.68 分, 两组之间均有显著性差异( $P<0.05$ ), 显微镜下评分结果为实验组(6.80±0.73 分)较模型组(8.80±0.37 分)明显减少( $P<0.05$ ); 实验组小鼠肠道派伊尔结细胞 IL-10 的表达和肠道黏膜 IL-10 分泌阳性细胞数明显多于模型组。该实验所用的双歧杆菌菌株减轻了 DSS 诱导的小鼠肠道炎症反应, 并且增强了肠道免疫细胞的 IL-10 的表达及分泌。

**关键词:** 双歧杆菌, 炎症性肠病, 白介素-10

## Effect of specific *Bifidobacteria* strain on the inflammatory bowel disease mice

JIN Dan<sup>1\*</sup> MENG Fan-Ping<sup>1</sup> CUI Feng-De<sup>1</sup> LI Hong-Hua<sup>1</sup> JIN Shou-Qi<sup>2</sup>

(1. Department of Immunology and Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

(2. Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea)

**Abstract:** In the present paper we investigated the effects of specific bifidobacteria strain as supplementation on acute inflammatory bowel disease (IBD) induced by dextran sulfate sodium (DSS) and the possible mechanism was also discussed. Mice were divided into three groups as control, DSS, and experiment (DSS+Bf) group. The mice in DSS group were fed with 4% DSS (W/V) solution for 7 days to induce colitis, and the mice in DSS+Bf group, were then given bifidobacteria by oral gavage for next 4 weeks. Both the colonic lengths and the magnitude of colonic inflammation were measured for three groups. Furthermore, expression of IL-10 mRNA in Peyer's patch (PP) cells and secretion of IL-10 in intestinal mucosa

were also assessed by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. It was found that the average colonic length observed in the DSS+Bf group was shorter than those in the control group but longer than those in the DSS group. Both macro-and micro-disease scoring showed that the values of the DSS+Bf group significantly decreased compared with the DSS group, while both the expression of IL-10 mRNA in PP cells and the IL-10 positive cells in intestinal mucosa of the samples in the DSS+Bf group were also significantly higher than those of DSS group. It is obvious that the bifidobacteria strain involved in the present studies could prevent the DSS-induced murine colitis and improve the expression levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 in intestinal mucosa.

**Keywords:** Bifidobacteria, IBD, IL-10

双歧杆菌(Bifidobacteria)是肠道内主要的益生菌之一,具有很多生物学活性,如降血脂、抗衰老、抗炎、抗感染、免疫调节作用、维持肠黏膜稳定等<sup>[1-3]</sup>。近年来双歧杆菌与 IBD 之间关系的研究越来越受广大国内外医学科学人员的重视<sup>[4-5]</sup>。但不同研究中所用的菌株对 IBD 的效应不同,其作用机制也随着不同。本实验利用特定双歧杆菌菌株选择 DSS 诱导的急性 IBD 小鼠模型,检测该菌株对小鼠模型的防治作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 双歧杆菌菌株及培养:** 特定双歧杆菌菌株挑选自健康婴幼儿粪便中分离培养出的菌株,是刺激小鼠巨噬细胞后白介素 10 (IL-10) mRNA 表达量较多的菌株。双歧杆菌用 MRS (Man-Rogosa-Sharpe, Difco, BD 公司)液体培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h。之后在室温 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清,用 PBS 洗涤 2 次后将浓度调至  $1 \times 10^9$  CFU/mL。

**1.1.2 实验动物及分组:** 7 周龄 Balb/c 雄性小鼠, 体重 8-16 g, 共 20 只。随机分为正常对照组(6 只)、模型组(DSS 组, 7 只)、实验组(DSS+Bf 组, 7 只)。

**1.1.3 主要试剂:** 葡聚糖硫酸钠 (Dextran sulfate sodium, DSS, M.W=36 000-50 000, Eschwege 公司), 抗 IL-10 单克隆抗体(PharMingen 公司), Trizol (Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂盒(Promega 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物处理:** 给实验组小鼠每日灌服浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的双歧杆菌菌液 1 mL, 具体操作方法为每日新配制浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的双歧杆菌菌液, 并用 1 mL 注射器取该菌液 1 mL, 充分混匀

后, 置换小鼠灌胃用针头, 将针头插入小鼠胃部, 确认针头已进入胃部后, 将菌液全部灌入, 为了确保菌液全部进入胃内, 操作结束后停留 3-5 s 后再将针头慢慢取出来。正常对照组和模型组灌服同量的 PBS 缓冲液。4 周后, 给模型组和实验组小鼠自由饮用 4% DSS 溶液 7 d, 第 8 天饮用纯净水, 正常对照组一直自由饮用纯净水。制模第 8 天, 各组小鼠处死, 取结肠测量其长度, 肉眼观察炎症发生程度后, 置于 10%福尔马林液内固定、包埋、切片、HE 染色, 免疫组织化学染色, 行一般组织病理学观察。

**1.2.2 派伊尔结细胞的制备:** 将小鼠处死后, 取出派伊尔结, 匀浆, 用 200 目尼龙网过滤, 细胞悬液用 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶解红细胞后, 各自经台盼蓝染色实验发现细胞存活率达 93%-95%。

**1.2.3 RNA 提取和 RT-PCR:** 提取总 RNA: 采用异硫氰酸胍-氯仿法提取细胞总 RNA, 经紫外分光光度仪测定其  $A_{260}/A_{280}$  比值, 计算 RNA 浓度。反转录: RT 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中总 RNA 1  $\mu\text{g}$ , oligo dT 0.5  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ RT buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1.5  $\mu\text{L}$ , RNA 抑制剂 1  $\mu\text{L}$ , M-MLV 1  $\mu\text{L}$ , DEPC 水调总体积 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 42 °C 1 h, 95 °C 5 min。PCR 扩增: 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 包括转录产物 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 1.25  $\mu\text{L}$ , 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , DEPC 水调总体积 25  $\mu\text{L}$ 。实验中所用引物序列、反应条件及片段长度如下:  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAG-3', 下游引物 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3', 348 bp; IL-10 上游引物 5'-AGAAATCAAGGAG CATTGA-3', 下游引物 5'-CTGCAGGTGTTTTAGC TTTT-3', 351 bp。反应条件为 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 分别扩增 30 和 35 个循环; 72 °C 5 min。

PCR 产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳 40 min 后观察结果。

**1.2.4 结肠炎炎症程度的比较:** 小鼠结肠炎炎症程度的肉眼评价是根据文献<sup>[6]</sup>的标准进行的。结肠炎的组织学变化是观察黏膜溃疡、炎症细胞的浸润、肌层的增厚、杯状细胞的减少、出血等现象, 根据每一项出现的现象逐一打分, 并根据其分数总和来判断炎症发生的轻重程度<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 统计学处理:** 所有的数据均以均数±标准差形式表示, 其数据统计学分析均经 Prism 4.0 处理, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 结肠长度比较

模型组小鼠结肠平均长度为  $6.8 \text{ cm} \pm 0.31 \text{ cm}$ , 较正常对照组小鼠结肠的平均长度( $9.1 \text{ cm} \pm 0.82 \text{ cm}$ )

明显减少( $P<0.01$ ), 而实验组小鼠结肠的平均长度为  $7.8 \text{ cm} \pm 0.21 \text{ cm}$ , 较模型组缩短程度减轻, 但没有统计学意义。

### 2.2 结肠的组织学改变

正常对照组肠粘膜、腺体完整, 无炎症细胞浸润(图 1A), 模型组肠黏膜广泛缺失, 腺体大多数不完整, 炎症细胞广泛浸润, 呈典型炎症改变(图 1B)。实验组黏膜缺失少见, 小部分腺体不完整, 炎症细胞浸润少(图 1C)。

### 2.3 结肠炎炎症程度比较结果

模型组和实验组的结肠炎炎症程度肉眼评分结果分别为:  $8.6 \pm 0.24$  分和  $6.6 \pm 0.68$  分, 显微镜下评分结果为  $6.8 \pm 0.73$  分和  $8.8 \pm 0.37$  分, 其结果两组之间均有显著性差异( $P<0.05$ ) (图 2)。

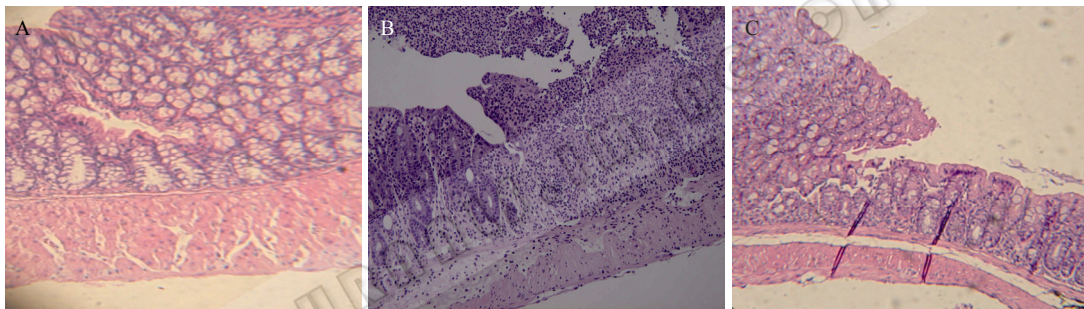


图 1 DSS 诱导的 IBD 小鼠及正常小鼠结肠黏膜组织学变化

Fig. 1 Intestinal histology of DSS-induced inflammatory bowel disease BALB/c mice model

Note: A: Intestinal histological section of control group (HE-stain $\times 400$ ); B: Intestinal histological section of DSS group (HE-stain,  $\times 400$ ); C: Intestinal histological section of DSS+Bf group (HE-stain,  $\times 400$ ).

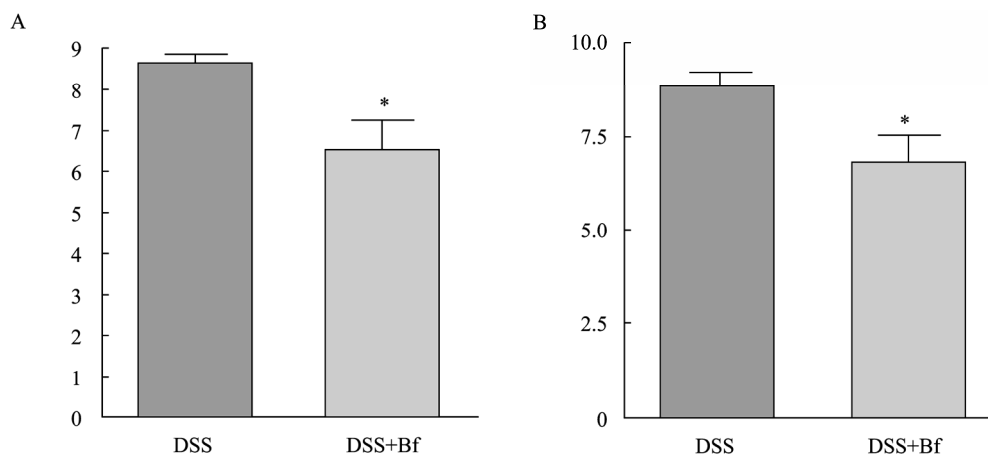


图 2 DSS 诱导的 IBD 小鼠结肠炎炎症程度评分结果

Fig. 2 Macroscopic and microscopic disease activity score for DSS-induced inflammatory bowel disease BALB/c mice model

Note: A: Macroscopic disease activity score; B: Microscopic disease activity score.

## 2.4 IL-10 的表达变化

在实验组小鼠的派伊尔结细胞中 IL-10 mRNA 的表达较模型组增加(图 3)。实验组小鼠结肠黏膜细胞 IL-10 蛋白质分泌阳性的上皮细胞和免疫细胞明显较正常对照组和模型组增多(图 4), 镜下检测 IL-10 分泌阳性细胞结果正常对照组为  $30.1 \pm 4.3$  个; 模型组为  $60.3 \pm 3.2$  个; 实验组为  $120.6 \pm 2.0$  个, 实验组与模型组间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

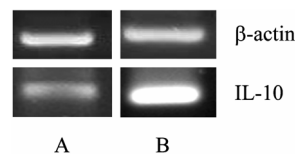


图 3 IL-10 mRNA 在 DSS 诱导的 IBD 小鼠派伊尔结细胞中的表达

Fig. 3 Expression of IL-10 mRNA in Peyer's patch (PP) cells from 4% DSS-induced inflammatory bowel disease BALB/c mice model

Note: A: DSS group; B: DSS+Bf group.

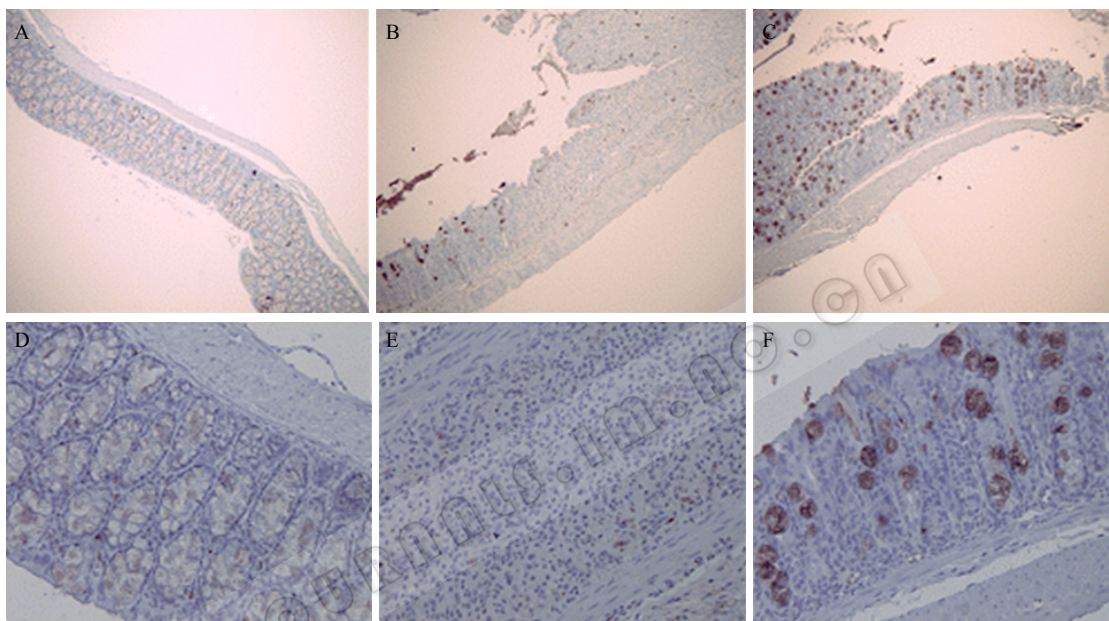


图 4 IL-10 在 DSS 诱导的 IBD 小鼠及正常小鼠结肠黏膜中的表达

Fig. 4 Immunohistochemical staining for IL-10 in the colonic mucosa of DSS-induced inflammatory bowel disease BALB/C mice model

Note: A,D: Control group; B,E: DSS group; C,F: DSS+ Bf group. A,B,C:  $\times 100$ ; D,E,F:  $\times 400$ .

## 3 讨论

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD) 是一种慢性肠道炎症性疾病, 其发病机制尚未完全清楚, 肠道内菌群中益生菌的数量递减、某些病原性微生物损伤上皮细胞、破坏肠道黏膜屏障、诱发异常的肠黏膜免疫反应是 IBD 发病的主要原因。所以, 在 IBD 的防治中越来越重视细菌的作用, 尤其是双歧杆菌等益生菌的作用。本实验使用的是从健康婴幼儿粪便中分离鉴定的双歧杆菌菌株(是由韩国延世大学生命科学技术系提供), 我们在前期工作中从韩国延世大学生命科学系提供的新分离的 29

个双歧杆菌菌株和 5 个标准菌株中挑选了一个菌株, 该菌株刺激小鼠巨噬细胞和脾脏细胞, 在 RNA 水平和蛋白质水平上表达和分泌 IL-10 最多。IL-10 是具有免疫调节作用的重要细胞因子之一, 主要抑制炎症反应, 尤其在 IBD 中发挥抑制炎症反应作用。IL-10 基因敲除小鼠可发生结肠炎, 如再注入 IL-10 基因可预防结肠炎的发生<sup>[8-9]</sup>。从而推断该菌株可能对 IBD 等炎症性疾病有一定的防治作用。

实验中我们首先为了证明该菌株对 IBD 模型小鼠具有防治作用, 用该菌株的活菌预先处理 Balb/c 小鼠 4 周后, 用 4% DSS 诱导急性 IBD。结果实验组小鼠的结肠长度较模型组小鼠缩短程度减轻, 并且

实验组小鼠结肠炎炎症程度肉眼评分和显微镜评分结果均较模型组明显减少, 此实验结果表明预先口服该菌株可有效地减轻 IBD 小鼠的炎症程度, 说明该菌株具有一定的防治 IBD 作用。

为了进一步证明该菌株对 IBD 模型小鼠的作用机制, 即该菌株在体内的 IL-10 分泌水平, 检测了肠道局部 IL-10 的表达及分泌水平。利用半定量 RT-PCR 法检测了 IL-10 mRNA 的表达; 利用免疫组化实验在蛋白质水平上检测了小鼠肠道中的 IL-10 的分泌程度。结果显示, 在实验组小鼠的肠道派伊尔结细胞中 IL-10 mRNA 的表达明显多于模型组, IL-10 分泌阳性细胞也较实验组明显多于模型组, 表明该菌株刺激小鼠肠道黏膜及免疫细胞增强 IL-10 的表达和分泌。

综上所述, 本实验用的双歧杆菌菌株进入小鼠机体内, 刺激小鼠肠道黏膜免疫系统, 使之分泌更多的 IL-10, 减轻了 4% DSS 诱导的 IBD 肠道炎症程度。至于该菌株通过什么途径增强 IL-10 的表达和分泌, 本实验中减轻 IBD 的炎症程度是否还有其他作用机制等问题, 是我们今后进一步要做的研究。

## 参 考 文 献

[1] Rhee YK, Han MJ, Choi EC, et al. Hypocholesterolemic ac-

tivity of *Bifidobacteria* isolated from a healthy Korean[J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(5): 681-684.

- [2] Hart AL, Lammers K, Brigidi P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria[J]. Gut, 2004, 53(11): 1602-1609.
- [3] Sekine K, Ohta J, Onishi M, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(1): 148-153.
- [4] Silva AM, Barbosa FHF, Duarte R, et al. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice[J]. J Appl Microbiol, 2004, 97(1): 29-37.
- [5] Ruiz PA, Hoffmann M, Szczesny S, et al. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats[J]. Immunol, 2005, 115(4): 441-450.
- [6] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterol, 1989, 96(3): 795-803.
- [7] McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice[J]. Gut, 1999, 45(6): 864-873.
- [8] Kühn R, Löhler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis[J]. Cell, 1993, 75(2): 263-274.
- [9] Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, et al. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10[J]. J Immunol, 2001, 166(12): 7625-7633.

## 栏目介绍

## 生物实验室

“生物实验室”栏目刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。